

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres

MILUSKA BEATRIZ NAVARRETE ZAMORA

Perfil de transferência de selênio e glicosilação em
placentas de alpacas (*Vicugna pacos*)

SÃO PAULO

2023

MILUSKA BEATRIZ NAVARRETE ZAMORA

**Perfil de transferência de selênio e glicosilação em placentas de alpacas
(*Vicugna pacos*)**

VERSÃO CORRIGIDA

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 a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento: Cirurgia

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2023

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4292 FMVZ	<p>Zamora, Miluska Beatriz Navarrete Perfil de transferência de selênio e glicosilação em placentas de alpacas (Vicugna pacos) / Miluska Beatriz Navarrete Zamora. – 2023. 126 f. : il.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2023.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.</p> <p>1. Alpaca. 2. Placenta. 3. Selênio. 4. Transferência Placentária. 5. Lectinas. I. Título.</p>
--------------	--

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Perfil de transferência de selênio e glicosilação em placentas de alpacas (*Vicugna pacos*).", protocolada sob o CEUA nº 7213120719 (ID 007710), sob a responsabilidade de **Maria Angélica Miglino e equipe; Miluska Beatriz Navarrete Zamora** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 08/04/2020.

We certify that the proposal "Profile of selenium and glycosylation transfer in placentas of alpacas (*Vicugna pacos*).", utilizing 12 Non-Brazilian wild species (12 females), protocol number CEUA 7213120719 (ID 007710), under the responsibility of **Maria Angélica Miglino and team; Miluska Beatriz Navarrete Zamora** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/08/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2019** a **08/2023** Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem:	Animais provenientes de doação espontânea		
Espécie:	Espécies silvestres não brasileiras	sexo:	Fêmeas
		idade:	2 a 6 anos
		N:	12
Linhagem:	Alpacas (<i>Vicugna pacos</i>)	Peso:	45 a 60 kg

Registro IBAMA/Sisbio/Etc: **não se aplica**

Método de Captura: **Coleta de placentas após o parto normal dos animais. Não serão eutanasiados nenhum animal para coleta. As coletas das placentas serão realizadas, fixadas em PFA 4% para processamento e estudo da matriz extracelular.**

Local do experimento: Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres (Laboratórios de Histologia e Biologia Celular e Molecular)

São Paulo, 09 de abril de 2020



Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo



Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
 Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
 Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura
 (IVITA)




Lima, 15 de Noviembre de 2019

CONSTANCIA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe, Director General del **Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura - IVITA**, deja constancia que la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos cuenta con una Estación Experimental en la ciudad de Marangani (Cusco, Perú) denominada Estación IVITA - Marangani, donde se realiza la crianza de camélidos sudamericanos principalmente alpacas.

Por lo que se autoriza a la Mg. MV. Miluska Beatriz Navarrete Zamora, docente asociado de nuestra institución, a realizar la colecta de placentas postparto de las alpacas gestantes que cuenta la estación experimental IVITA Marangani durante el tiempo de muestreo.

Se expide la presente constancia a la interesada para los fines convenientes.


Dr. LENIN MATURRANO HERNANDEZ
 Director General IVITA
 Facultad de Medicina Veterinaria
 UNMSM



FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NAVARRETE, Miluska Beatriz

Título: Perfil de transferência de selênio e glicosilação em placentas de
alpacas (*Vicugna pacos*)

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: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A meus amados pais Félix e Zenaida, pelo amor incondicional e seu apoio de sempre,
todo meu amor para vocês.

A meus irmãos Verónica e Andrés e a minhas sobrinhas Dayana, María José, Mya,
Mikita e Andreita, são o meu motor e motivo.

Ao meu querido professor e mestre Dr. Alberto Sato Sato, obrigada por sua amizade,
por confiar em mim, Deus o tenha em sua glória.

A meus queridos amigos por sua amizade e carinho e todas suas boas vibrações para
que eu possa conseguir minhas metas.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

Meu sincero agradecimento a minha orientadora, profa. Dra. Maria Angélica Miglino, pelo apoio, amizade e conselhos recebidos.

Aos amigos que Deus me colocou no caminho e que me apoiaram durante minha passagem pela USP, obrigada pela companhia, pelos conselhos, pelas risadas, pelos momentos compartilhados.

Aos professores, corpo técnico e corpo administrativo do programa de pós-graduação em Anatomia dos animais domésticos e silvestres, muito obrigada por todo o apoio.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de me capacitar em suas aulas.

A minha faculdade de Medicina Veterinária UNMSM no Peru e aos meus colegas pelo apoio durante o período de afastamento das aulas.

“Si puedes soñarlo, puedes hacerlo”

Walt Disney

RESUMO

NAVARRETE, MB. Perfil de transferência de selênio e glicosilação em placentas de alpacas (*Vicugna pacos*). 2023. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A alpaca (*Vicugna pacos*) é um camélídeo sul-americano de grande importância econômica para os habitantes andinos, principalmente no Peru, país onde se encontra a maior população de alpacas. O selênio é um mineral essencial para a saúde de humanos e animais, pois atua no metabolismo dos hormônios da tireoide, no desenvolvimento cerebral, na fertilidade, na defesa antioxidante e no sistema imunológico. Estudos relacionados à transferência placentária de minerais em camélídeos são escassos, resumindo-se as pesquisas sobre transferência de ferro principalmente. Os carboidratos estruturais têm uma enorme capacidade de transmitir informações e participar da barreira placentária. Portanto, o objetivo desta tese foi estabelecer a transferência placentária de selênio em alpacas ao final da gestação, de animais que estiveram nas condições peruanas. Além disso objetivou-se estabelecer o perfil de glicosilação placentária de acordo com as mesmas condições. Para isto, foram coletadas 12 placentas de alpacas, material obtido no momento do parto de camélídeos criados naturalmente no planalto peruano, na região de Cusco. Foi realizado um estudo histológico, para o qual, pequenas amostras de todas as camadas da placenta foram conservadas em solução aquosa de formol a 10%, tendo sido os mesmos emblocados, seccionados e colocados em lâminas histológicas de 5 um de espessura, as quais foram coradas com Hematoxilina-Eosina, Tricrômico de Masson observadas em microscópio de luz. Os cortes corados com Picrosirus Red foram observados em microscópio de polarização. Da igual maneira foi feito um estudo ultra estrutural da placenta utilizando a técnica de microscopia de varredura. Foi realizado um estudo imunohistoquímico utilizando um kit de Santa Cruz Biotechnology baseado na técnica de avidina-biotina-peroxidase, valendo-se de cortes histológicos em branco dispostos sobre lâminas carregadas positivamente, e anticorpos anti-selênio Selenoprotein P, Selenoprotein N, GPx3 y DIO-3. A análise realizada foi qualitativa de acordo com o local e com intensidade da marcação. Por último, foi feito um estudo lectinhistoquímico utilizando a técnica da avidina-peroxidase e 13 lectinas da Vector Laboratories, que permitiu analisar qualitativamente a localização e intensidade da expressão de cada carboidrato. Os resultados observados indicaram que a placenta epiteliocorial da alpaca apresenta estruturas de adaptação, proteção e sustentação materno-fetal, como projeções coriônicas, microvilosidades e mesênquima denso constituído por fibras colágenas tipo I e III. A transferência placentária de selênio é feita por selenoproteínas, sugerindo um transporte passivo via sanguínea, de acordo com a morfologia histológica epiteliocorial difusa característica da placenta desta espécie animal. Os capilares sanguíneos do córion desempenham um papel importante ao termo da gestação, devido à sua proximidade com o epitélio trofoblástico, em

condições de altitude elevada e baixa pressão de oxigênio, adaptando-se à essas condições. No final da gestação, a placenta da alpaca demonstra um perfil de glicosilação com a expressão de carboidratos, principalmente glicose, manose e galactose presentes no trofoblasto e no epitélio e mesênquima do âmnio, assim como a expressão de resíduos de ácido siálico e baixa afinidade pela fucose. Nos capilares sanguíneos fetais a expressão de estruturas complexas bi e trianténarias e manose predominam; sugerindo a participação destes carboidratos no momento do parto, quando esses animais sobrevivem em ambientes naturais peruanos.

Palavras-chave: Alpaca. Placenta. Selênio. Transferência Placentária. Lectinas.

ABSTRACT

NAVARRETE, MB. Selenium transfer and glycosylation profile in alpaca placentas (*Vicugna pacos*). 2023. 126f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The alpaca (*Vicugna pacos*) is a South American camelid of great economic importance for the Andean inhabitants, mainly in Peru, where the largest population of alpacas is found. Selenium is an essential mineral for the health of humans and animals, as it acts on the metabolism of thyroid hormones, brain development, fertility, antioxidant defense and the immune system. Studies related to the placental transfer of minerals in camelids are scarce, summarizing research on iron transfer mainly. Structural carbohydrates have an enormous capacity to transmit information and participate in the placental barrier. Therefore, the objective of this thesis was to establish the placental transfer of selenium in alpacas at the end of pregnancy, from animals that were in Peruvian conditions. Furthermore, to establish the placental glycosylation profile according to the same conditions. For this, 12 placentas of alpacas were collected, material obtained at the time of birth of camelids raised naturally in the Peruvian highlands, in the region of Cusco. A histological study was carried out, for which small samples of all layers of the placenta were conserved in a 10% aqueous solution of formalin, having been blocked, sectioned and placed on histological slides 5 µm thick, which were stained with Hematoxylin-Eosin, Masson's Trichrome observed under a light microscope. Sections stained with Picrosirius Red were observed under a polarization microscope. Likewise, an ultrastructural study of the placenta was performed using the scanning microscopy technique. An immunohistochemical study was carried out using a Santa Cruz Biotechnology kit based on the avidin-biotin-peroxidase technique, using blank histological sections arranged on positively charged slides, and anti-selenium antibodies Selenoprotein P, Selenoprotein N, GPx3 and DIO -3. The analysis carried out was qualitative according to the location and intensity of marking. Finally, a lectin histochemical study was carried out using the avidin-peroxidase technique and 13 lectins from Vector Laboratories, which allowed the qualitative analysis of the location and intensity of expression of each carbohydrate. The observed results indicated that the epitheliochorial placenta of the alpaca presents adaptation, protection and maternal-fetal support structures, such as chorionic projections, microvilli and dense mesenchyme constituted by type I and III collagen fibers. The placental transfer of selenium is carried out by selenoproteins, suggesting a passive transport via blood, according to the diffuse epitheliochorial histological morphology characteristic of the placenta of this animal species. The blood capillaries of the chorion play an important role at the end of pregnancy, due to their proximity to the trophoblastic epithelium, in conditions of high altitude and low oxygen pressure, adapting to these conditions. At the end of gestation, the alpaca placenta demonstrates a glycosylation profile with the expression of carbohydrates, mainly glucose, mannose and

galactose present in the trophoblast and in the amnion epithelium and mesenchyme, as well as the expression of sialic acid residues and low affinity for fucose. In fetal blood capillaries the expression of bi and triantennary complex structures and mannose predominate; suggesting the participation of these carbohydrates at the time of labor, when these animals survive in Peruvian natural environments.

Keywords: Alpaca. Placenta. Selenium. Placental Transfer. Lectins.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Fig. 1	Representação esquemática da placenta epiteliocorial presente em equinos, suínos e camelídeos sul-americanos. Fonte: Diaz, 2021.....	30
Fig. 2.	Coleta de placentas de parto de alpacas. A. Fazenda de criação de alpacas em La Raya, Cusco-Peru, a uma altitude de 4338 metros acima do nível do mar. B. Nascimento do filhote de alpaca e liberação da placenta. C. Mãe e recém-nascido de alpaca após o nascimento. D. Placenta de alpaca coletada. E. Trabalho de amostragem de placentas de alpaca.....	44
Fig. 3.	Fotomicrografia da placenta a termo de alpaca. Observa-se a união do córion (C) e do alantoide (A), típica das placentas corioalantóicas. Coloração HE 4x. Barra 500um.....	52
Fig. 4.	Fotomicrografia do córion da placenta a termo de alpaca. Vilosidades coriônicas são vistas com uma camada de células trofoblásticas que variam em formato e tamanho e têm um núcleo bastante basófilo além de um mesênquima de suporte (M). Coloração HE 40x. Barra 50um.....	53
Fig. 5.	Fotomicrografia de placenta a termo de alpaca. A. Células gigantes de citoplasma mais eosinófilo, podem ser encontradas na zona apical das vilosidades coriônicas. Coloração HE 10x. Barra 200um. B. Células gigantes estavam presentes no córion. Coloração HE 40x. Barra 50um.....	54
Fig. 6.	Fotomicrografia de córion da placenta a termo de alpaca. O córion se apresenta com vilosidades revestidas com camada trofoblástica (CT). Nesse caso aparecem entre as células colunares, células binucleadas (Cb), além de capilares sanguíneos (CS), característica da placenta epiteliocorial. Coloração HE 40x. Barra 50um.....	55
Fig. 7.	Fotomicrografia de alantoide de placenta de termo em alpaca. Observa-se camada de células colunares disposta em pregas. Os citoplasmas eram eosinófilos e os núcleos basófilos; um mesênquima denso contendo fibroblastos (MD) estava presente. Coloração HE 40x. Barra 50um.....	56

- Fig. 8.** Fotomicrografia do alantoide de placenta de termo em alpaca. Observa-se uma camada de células colunares (CE), um mesênquima denso (MD) e a presença de vasos sanguíneos (VS) de maior calibre. Coloração HE 10x. Barra 200um..... 57
- Fig. 9.** Fotomicrografia do Âmnio de placenta de termo em alpaca. Presença de multicamadas de células epiteliais. H-E 40x. Coloração HE 40x. Barra 50um..... 58
- Fig. 10.** Fotomicrografia de Âmnio de placenta de termo em alpaca. Camada de epitélio plana simples (EP); Membrana basal de tecido conjuntivo reticular (MB); Mesênquima avascular denso (MD) com presença de muitos fibroblastos. H-E 40x. Coloração HE 40x. Barra 50um..... 59
- Fig. 11.** Fotomicrografia da placenta de termo em alpaca. A. Observa-se no córion e no alantoide, o epitélio e a camada muscular dos vasos sanguíneos coloridos em rosa intenso, sendo as fibras colágenas coradas em azul. Coloração TM 10x. Barra 200um. B. Observa-se no mesênquima a presença de muitas fibras colágenas coradas de azul, assim como os fibroblastos e alguns glóbulos vermelhos coloridos em rosa. Coloração TM 40x. Barra 50um..... 60
- Fig. 12.** Fotomicrografia de Âmnio de placenta de termo em alpaca. A. Observa-se a abundância de fibras colágenas de cor azul com a presença de muitos fibroblastos assim como presença de fibras reticulares. Coloração TM 10x. Barra 200um. B. Observa-se o epitélio e os fibroblastos coloridos em rosa intenso, as fibras colágenas em azul e as fibras reticulares em rosa. Coloração TM 40x. Barra 50um..... 61
- Fig. 13.** Fotomicrografia de placenta de termo em alpaca. A. B. Observa-se escassas fibras colágenas tipo III (CIII) no córion. Coloração Picosirius Red 40x. Barra 50um. C.D. Observa-se maior presença de fibras colágenas tipo I (CI) e tipo III (CIII) no alantoides. Coloração Picosirius Red 10x. Barra 200um. E.F. Observa-se maior presença de fibras colágenas tipo I (CI) e tipo III (CIII) no âmnio, as quais estavam entrelaçados. Coloração Picosirius Red 10x. Barra 200um..... 62
- Fig. 14** Eletromicrografia de varredura. A. Córion de placenta de alpaca, observe-se diferentes formatos celulares entre poliédricas e cúbicas nas projeções coriônicas. Barra: 30um. B. Vista transversal do córion, observa-se as projeções coriônicas dispostas de maneira pregada e com escassas fibras colágenas. Barra: 100um..... 63
- Fig. 15** Eletromicrografia de varredura. A. Presença de pequenos vasos sanguíneos nas projeções coriônicas. Barra: 30um. B. 64

- Microvilosidades foram observadas na superfície das projeções coriônicas. Barra: 10um.....
- Fig. 16** Eletromicrografia de varredura. A. Alantoide de placenta de termo em alpaca. Observe-se uma camada de células de forma poligonais com certas elevações, disposta sobre uma camada de mesênquima com muitas fibras colágenas. Barra: 100um. B. Observe elevações na superfície da alantoide e presença de fibras colágenas. Barra: 3um..... 66
- Fig. 17** Eletromicrografia de varredura. A. e B. Alantoide de placenta de termo em alpaca, observe a presença de numerosos microvilosidades na superfície dando aparência de toalha felpuda. Barra: 3um. 67
- Fig. 18** Eletromicrografia de varredura da vista transversal do âmnio. Observa-se o epitélio plano (E) e uma camada de mesênquima (M) denso com numerosas fibras colágenas. Barra: 100um..... 68
- Fig. 19** Eletromicrografia de varredura. A. Epitélio do âmnio apresentando microvilosidades. Barra: 3um. B. Numerosas fibras colágenas constituem o mesênquima do âmnio. Barra: 30um..... 69
- Fig. 20** Marcação com anticorpo Selenoprotein P. Observe-se a marcação forte no conteúdo de alguns capilares sanguíneos no córion na placenta de alpaca. Barra 50um..... 71
- Fig. 21** Marcação com anticorpo Selenoprotein N. Observe-se a marcação forte no conteúdo dos capilares sanguíneos no córion na placenta de alpaca. Barra 50um..... 72
- Fig. 22** Marcação com anticorpo GPx3. Observe-se a marcação débil no conteúdo dos capilares sanguíneos do córion na placenta de alpaca. Barra 50um..... 73
- Fig. 23** Marcação com anticorpo DIO3. Observe-se a marcação débil no conteúdo dos capilares sanguíneos do córion na placenta de alpaca. Barra 50um..... 74
- Fig. 24** Expressão de glicose e resíduos de manose, pela lectina Con A. A. Marcação citoplasmática moderada a forte em córion de placenta de termo de alpaca. B. Marcação moderada a forte no epitélio e mesênquima do âmnio. Barra 50um..... 77
- Fig. 25** Expressão de α N-acetilgalactosamina, pelas lectinas SBA e DBA. A. Marcação moderada com SBA do glicocálix do córion da placenta de termo de alpaca B. Marcação débil com DBA no córion. C. Marcação forte no epitélio do âmnio e moderada no mesênquima com lectina SBA. D. Marcação débil do epitélio e mesênquima do âmnio com lectina DBA. Barra 50um 78
- Fig. 26** Expressão de β N-acetilglucosamina e resíduos de ácido siálico, por lectina WGA. A. Marcação citoplasmática forte da camada trofoblástica do córion da placenta de termo de alpaca. Barra

	200um. B. Marcação citoplasmática forte das células do epitélio plano simples do âmnio e marcação moderada no mesênquima. Barra 50um.....	79
Fig. 27	Expressão de Fucose, por lectina UEA-1. A. Débil marcação no córion da placenta de termo da alpaca (Barra 200um). B. Marcação débil no âmnio. Barra 50um.....	80
Fig. 28	Expressão de galactose e β N-acetilgalactosamina, por lectina RCA ₁₂₀ . A. Marcação forte no córion da placenta do termo de alpaca. B. Marcação moderada a forte no epitélio e mesênquima do âmnio. Barra 50um.....	81
Fig. 29	Expressão de Galactose, por meio da lectina PNA. A. Marcação moderada no citoplasma de córion da placenta de termo da alpaca. B. Marcação moderada do glicocálix do epitélio e débil no mesênquima do âmnio. Barra 50um.....	82
Fig. 30	Expressão de Galactose, por lectina GSL I. A. Moderada marcação no citoplasma das células trofoblásticas do córion. B. Moderada a forte marcação no epitélio do âmnio. Barra: 50um....	83
Fig. 31	Expressão de Manose e Glicose, por lectina PSA. A. Marcação forte no citoplasma das células epiteliais do córion e alantoide. B. Marcação forte no mesênquima denso do âmnio. Barra 50um.....	84
Fig. 32	Expressão de Manose, por lectina LCA. A. Marcação forte no citoplasma das células do epitélio do córion. Barra 50um. B. Marcação forte no mesênquima do âmnio. Barra 50um.....	85
Fig. 33	Expressão de estruturas complexas, por lectina PHA-E. A. Observa-se a marcação do endotélio dos capilares sanguíneos do córion. Barra 50um. B. Observa-se a marcação forte do mesênquima denso do âmnio. Barra 50um.....	86
Fig. 34	Expressão de estruturas complexas, por lectina PHA-L. A. Observe-se a forte marcação do endotélio dos capilares sanguíneos interditados no córion. Barra 50um. B. Observe-se a marcação débil no epitélio e no mesênquima do âmnio. Barra 50um.....	87
Fig. 35	Expressão de N- Acetil glucosamine, por lectina sWGA. A. Observe-se a marcação moderada do glicocálix das células epiteliais do córion. Barra 50um. B. Observe-se a marcação moderada do epitélio do âmnio. Barra 50um.....	88

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Anticorpos primários, tipo, diluições, controle positivo e laboratórios de procedência utilizados para a pesquisa imunohistoquímica das placentas das alpacas.....	47
Tabela 2. Avaliação qualitativa da marcação de anticorpo primário para selênio em placentas de alpacas.....	48
Tabela 3. Kits Vector Labs® Lectina I e II. Indicações sobre sua origem e concentração e afinidade de carboidratos.....	48
Tabela 4. Avaliação qualitativa da marcação de lectina em placenta de alpaca.....	50
Tabela 5. Avaliação da expressão de lectina em placenta de termo de alpaca.....	75

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS E HIPOTESE.....	23
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1.ALPACA.....	26
3.2.PLACENTA E TRANSPORTE PLACENTARIO NOS MAMÍFEROS: ASPECTOS GERAIS.....	27
3.3.PLACENTAÇÃO EM CAMELÍDEOS SUL-AMERICANOS.....	31
3.4.IMPORTÂNCIA DO SELÊNIO E DA SUA TRANSFERENCIA VIA PLACENTARIA DURANTE A GESTAÇÃO.....	33
3.5.GLICOBIOLOGIA NA GESTAÇÃO.....	38
4. MATERIAS E METODOS.....	41
4.1.MATERIAIS.....	42
4.1.1. Equipamentos utilizados.....	42
4.1.2. Materiais de laboratório.....	42
4.2.METODOS.....	43
4.2.1. Coleta de material biológico.....	43
4.2.2. Estudo histológico.....	45
4.2.3. Estudo ultra estrutural.....	45
4.2.4. Estudo imunohistoquímico.....	46
4.2.5. Estudo lectinhistoquímico.....	48
5. RESULTADOS.....	51
5.1.ESTUDO HISTOLÓGICO.....	52
5.1.1 Córion.....	52
5.1.2 Alantoide.....	55
5.1.3 Âmnio.....	57
5.2. ESTUDO ULTRA ESTRUTURAL DA PLACENTA DE ALPACA.....	63
5.2.1 Córion.....	63

5.2.2 <i>Alantoide</i>	65
5.2.3 <i>Âmnio</i>	68
5.3. ESTUDO IMUNOHISTOQUIMICO.....	70
5.4. ESTUDO LECTINHISTOQUIMICO.....	75
6. DISCUSSÃO	89
7. CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
APÊNDICE	117

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Alpaca (*Vicugna pacos*) é um dos camelídeos sul-americanos de grande importância econômica para a alta população andina, principalmente no Peru, um país que tem a maior população desses animais, que sobrevivem acima de 3000 metros de altitude, ambiente no qual os níveis de oxigênio e demais condições atmosféricas são reduzidas (IÑIGUEZ; ALEM, 1996). Há, portanto, uma adaptação de uma eficiente irrigação placentária que garante a sobrevivência fetal. Caracterizada como de tipo epiteliochorial difuso, a placenta de alpaca atende à uma gestação de aproximadamente 342 dias, realizando transferência placentária de nutrientes via sangue (OLIVERA *et al.*, 2003b). É importante indicar que esses camelídeos desempenham um papel importante na sociedade peruana como fonte de renda para a produção de fibra e carne, sendo que em algumas regiões é também considerada como animal de estimação (QUISPE *et al.*, 2009).

Durante a gestação, o feto recebe os nutrientes necessários para o seu crescimento mediante o sangue materno a placenta, sendo esses nutrientes principalmente representados pela glicose, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais. A nutrição correta e completa do feto é vital para seu crescimento e desenvolvimento. A capacidade de transporte de nutrientes pela placenta está intimamente ligada à biodisponibilidade de nutrientes maternos, bem como à taxa de fluxo sanguíneo no útero - circulação placentária (BROLIO *et al.*, 2010).

O selênio é um antioxidante que permite o crescimento adequado do feto (HEFNAWY; PÉREZ, 2008). Estudos relacionados à transferência placentária de minerais é, quando encontrados, são restritos à transferência de ferro (ITURRIZAGA *et al.*, 2007). Considerado um mineral essencial na saúde de seres humanos e animais, o selênio age sobre o metabolismo de hormônios da tireoide, o desenvolvimento do cérebro, fertilidade, defesa antioxidante e do sistema imunológico (MUÑOZ DEL VALLE, 2016; HEFNAWY; PÉREZ, 2008; ALBARAA; WED; GULFAM, 2021).

Estudos relacionados à glicosilação na placenta de alpaca têm sido realizadas levando-se em conta as fases da gestação, e são principalmente relacionados à interface materna (JONES *et al.*, 2002; OLIVERA *et al.*, 2003a; JONES *et al.*, 2008). Essa estrutura tem sido caracterizada como rica em carboidratos estruturais que apoiam a

manutenção da gestação, entretanto, indicam que o perfil de expressão das glicosiltransferasas é altamente regulado, e varia sensivelmente em resposta a numerosos estímulos externos. Portanto, uma mesma célula em dois contextos diferentes pode apresentar variações no padrão de glicosilação que afetam e que modulam a funcionalidade das glicoproteínas de membrana, constituindo um nível adicional de regulação dos processos celulares (CROCI, 2011), como pode ser visto no momento do parto.

Portanto, a hipótese deste estudo é que haja transferência de selênio através da placenta de alpaca, e que existe uma diferença no perfil de glicosilação das placentas de alpaca ao final da gestação, demonstrada mediante estudo histológico, ultraestrutural, imunohistoquímico e lectihistoquímico em placentas de termo na espécie.

Os resultados deste trabalho relacionam-se à impactos importantes cientistas relacionados aos camelídeos sul-americanos principalmente a alpaca. Impactos tecnológicos serão evidentes mediante aplicação de técnicas específicas podendo inferir que a alpaca possa ser um modelo animal de transferência placentária de minerais sob condições de altitude, modelo que poderia ser extrapolado para investigar a situação das mulheres gestantes que habitam essas regiões.

O conhecimento mais aprofundado dos mecanismos de transferência de minerais via placenta é importante para o avanço da prática médica veterinária, principalmente considerando as especialidades relacionadas à reprodução, e à nutrição animal durante a gestação, bem como para o aprimoramento da utilização de modelos animais em estudos voltados ao bem-estar e à saúde dos humanos.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESE

OBJETIVOS

Objetivo Geral: Descrever a via de transferência placentária de selênio em alpacas gestantes que habitam os Andes peruanos, assim como descrever o perfil de glicosilação placentária de acordo com estas condições.

Objetivos Específicos:

- Fazer a descrição histológica e ultraestrutural da placenta de alpaca no final da gestação.
- Determinar microscopicamente a transferência de selênio em placentas de alpacas no final da gestação.
- Determinar quais carboidratos estruturais estão presentes na placenta da alpaca no final da gestação, estabelecendo um perfil de glicosilação.

HIPÓTESE

Há transferência de selênio através da placenta de alpaca, e existe uma diferença no perfil de glicosilação das placentas de alpaca ao final da gestação.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. ALPACA

Os camelídeos são classificados na Ordem Artiodactyla, Subordem Tylopoda e Família Camelidae (FOWLER, 2008). A família Camelidae é dividida em três gêneros *Camelus*, *Lama* e *Vicugna*. Os primeiros, vivem nas áreas desérticas da Ásia e da África, e são conhecidos como camelídeos do Velho Mundo. Os dois últimos habitam a América do Sul ao longo da cordilheira dos Andes e são conhecidos como camelídeos sul-americanos (CSA) ou camelídeos do Novo Mundo. A principal diferença é a presença de uma corcova e tamanho maior nos camelídeos do Velho Mundo. O gênero *Camelus* inclui o camelo (*Camelus bactrianus*) e o dromedário (*Camelus dromedarius*). No gênero *Lama* incluem-se o guanaco (*Lama guanicoe*) e a lhama (*Lama glama*) enquanto no gênero *Vicugna* incluem-se a vicunha (*Vicugna vicugna*) e a alpaca (*Vicugna pacos*) (PINTO; MARTIN; CID, 2010).

Os camelídeos sul-americanos (CSA) representados por alpacas, guanacos, lhamas e vicunhas, são encontrados principalmente no Peru, Bolívia, Chile e Argentina, locais onde esses animais estão bem adaptados à altas altitudes e condições de frio extremo (OLIVERA *et al.*, 2003a). Nessas altitudes entre 3.600 e 4.900 metros, os animais convertem com eficiência a vegetação nativa em carne e fibras de alta qualidade (IÑIGUEZ; ALEM, 1996). Isso determina que os camelídeos sul-americanos sejam considerados como o principal meio de vida e fonte de recursos para muitos produtores que habitam os países andinos centrais da América do Sul (QUISPE *et al.*, 2009). A mulher andina habitante do Peru é uma das principais criadoras de alpacas, dividindo as mesmas condições de altitude e baixa pressão de oxigênio com os animais (NAVARRETE *et al.*, 2017).

Os CSA são considerados meio de transporte, e fonte de carne, lã e couro, por isso têm grande valor para a população andina, apesar desses camelídeos apresentarem baixa fertilidade e alta incidência de mortalidade embrionária, em comparação com outros mamíferos domesticados (SUMAR, 1999).

Embora algumas alpacas fêmeas acasalem com idades que variam entre 6-12 meses de idade, pois os criadores têm pressa em multiplicá-las, é recomendado que a

primeira gestação ocorra entre os 18-24 meses de idade, no sentido de permitir maturidade física e social do animal (BURTON; BURTON; MARSHALL, 2006). A gestação na alpaca ocorre em aproximadamente 345 dias, desenvolvendo-se no corno uterino esquerdo, e geralmente resulta no nascimento de um único filhote (OLIVERA *et al.*, 2003a; SUMAR, 1999).

3.2.PLACENTA E TRANSPORTE PLACENTARIO NOS MAMÍFEROS: ASPECTOS GERAIS

Durante a gestação, os animais vivíparos desenvolvem um sistema complexo de membranas nutricionais que circundam o feto para fins de troca materno-fetal (LEISER; KAUFMANN, 1994). A placenta é o primeiro dos órgãos fetais a se desenvolver (CROSS, 2006).

Embora a placenta seja um órgão temporário, representa a interface entre a mãe e o feto em desenvolvimento, tornando-a um órgão multifacetado que desempenha uma série de funções importantes durante a gestação. Essas funções incluem a fixação do feto em desenvolvimento à parede uterina, mediando a tolerância imunológica materna, a troca de gases e nutrientes para o feto e a remoção de resíduos durante o desenvolvimento fetal (BAUER *et al.*, 1998; FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014).

A placenta, órgão transitório da gestação onde o conceito permanece abrigado, é uma estrutura desprovida de inervação. Portanto, a comunicação entre a mãe e o feto é estabelecida por substâncias transportadas pelo sangue, as quais podem exercer uma ação local agindo sobre a mesma placenta e à distância a nível uterino ou no feto (GUDEA *et al.*, 2004).

Nos mamíferos, o crescimento e a sobrevivência do feto dependem exclusivamente da placenta, composta pelos tecidos materno e fetal. A estrutura fetal é representada pelo córion, o qual de acordo com o tipo de placentação, está associado ao saco vitelino ou ao alantoide. O componente materno é dado pela área mais superficial do endométrio uterino. A placenta forma uma interface entre a circulação materna e fetal, facilitando as trocas gasosas e metabólicas. Tem também a capacidade de secretar hormônios, bem como produzir uma barreira entre os dois sistemas imunológicos, facilitando a sobrevivência do feto no útero (ROA; SMOK; PRIETO, 2012).

A placenta é um órgão efêmero materno-fetal, que permite a transferência restrita de metabólitos e drogas por meio de áreas de transferência especializadas. Ela organiza a implantação do embrião, estabelecendo a interface para nutrição e trocas gasosas entre as circulações materna e fetal. Inicia também o reconhecimento materno da gestação, alterando o envolvimento imune local, bem como as funções cardiovasculares e metabólicas maternas, por meio de produção de hormônios parácrinos e endócrinos. A estrutura anatômica da placenta é variada entre as espécies a níveis macro e microscópicos. Tais diferenças se refletem nos mecanismos de troca de substâncias. O feto recebe os nutrientes necessários para seu crescimento por meio do sangue materno através da placenta – principalmente glicose, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais. A transferência de uma substância através da barreira materno-fetal depende da espessura e extensão da barreira, bem como do gradiente de concentração da substância, ou da presença de mecanismos de transmissão ativa. A variação da placentação em espécies mamíferas é um ponto importante a ser considerado quando modelos animais são utilizados para estudos da função placentária de transferência de nutrientes maternos para o feto (BROLIO *et al.*, 2010).

Estudos conduzidos em humanos sob condições naturais de hipóxia (ZAMUDIO, 2003), bem como em camundongos em ambientes hipobáricos (CUFFE *et al.*, 2014) demonstraram que o desenvolvimento da placenta é altamente regulado pelos níveis de oxigênio, bem como pela disponibilidade de nutrientes na circulação materna (CROSS; MICKELSON, 2006). A menor disponibilidade de oxigênio provoca uma diminuição no transporte de nutrientes para o feto, o que pode ser compensado por um adelgaçamento das membranas fetais (ZAMUDIO, 2003). Isso significa que o padrão de desenvolvimento da placenta pode ser alterado pelo ambiente, além disso, o desenvolvimento da placenta pode tentar compensar outros defeitos (CROSS, 2006).

A placenta é o único canal de transporte de nutrientes para o feto, e as demandas dessa estrutura aumentam exponencialmente à termo, juntamente com uma ampla variedade de modificações morfológicas (WOODING *et al.*, 2000).

É um órgão de grande importância na sobrevivência da espécie, pois as placentas consideradas eficientes devem ser eliminadas rapidamente, principalmente em animais cujas populações devem nascer quando houver disponibilidade de alimento (ENDERS; CARTER, 2004).

A placenta tem a capacidade de fornecer nutrientes ao feto em desenvolvimento e se adaptar de acordo com a demanda fetal (DILWORTH *et al.*, 2010). Quando é totalmente formada desempenha um papel importante na manutenção da nutrição do feto e gerando, portanto, a capacidade da mãe de levar a gravidez até o final (FURUKAWA *et al.*, 2014).

O transporte de moléculas na placenta ocorre por difusão ou transporte ativo. No caso da difusão, é influenciado pela distância interhemal ou pela espessura da barreira celular entre o sangue materno e fetal. Portanto, o número de camadas celulares que separam o sangue materno do fetal é considerado um fator que modifica a transferência de nutrientes entre a mãe e o feto, sendo esse um dos fatores importantes no transporte placentário entre as espécies animais (PÈRE, 2003; FURUKAWA *et al.*, 2014). A troca de metabólitos é morfológicamente visível como vesículas micropinocitóticas em ambos os epitélios. Isso permite a manutenção de uma fixação firme e definitiva no nível fetal (ABD-ELNAEIM *et al.*, 1999).

ROA; SMOK; PRIETO, 2012 indicam que o critério de classificação da placenta considera o tipo de relação estabelecida entre a mãe e o feto de acordo com a origem vascular; outro critério é anatômico, e um terceiro é o histológico. Segundo origem vascular nos mamíferos, a placenta se desenvolve inicialmente como uma placenta coriovitelina, este tipo de placentação é estabelecido quando a parede do saco vitelino se une com o córion, esse tipo de placenta logo sofre um processo de involução. Em contraste, a placenta corioalantóica é estabelecida quando o alantoide se funde com o córion. A placenta corioalantóica é formada tardiamente e é a definitiva, sendo um eficiente mediador das trocas fisiológicas entre a mãe e o feto. De acordo com a distribuição das vilosidades coriônicas na placenta, existe a seguinte classificação anatômica: placenta difusa, placenta cotiledonária, placenta zonal e placenta discoidal.

Na placenta difusa, as vilosidades e as pregas coriônicas são pequenas e uniformemente distribuídas na superfície fetal da placenta; estes se opõem no contato íntimo com depressões ou sulcos do epitélio uterino. Este tipo de placenta é encontrado em porcos, cavalos, camelídeos e cetáceos (BARBEITO, 2008).

A classificação segundo a estrutura histológica é a mais útil para descrever funcionalmente o tipo de placenta; é baseada no número de barreiras que se interpõem

entre o sangue fetal e materno, sendo número máximo é seis camadas, três fetais e três maternas. São tecidos fetais: epitélio córion fetal, tecido mesenquimal fetal e endotélio capilar fetal. São tecidos maternos: epitélio da mucosa uterina, tecido conjuntivo materno, endotélio dos capilares maternos (ROA; SMOK; PRIETO, 2012). Neste sistema, três tipos principais são reconhecidos de acordo com as camadas de células que compõem a área interhemal: (1) tipo epiteliocorial (cavalos, porcos e ruminantes), (2) tipo endotelocorial (carnívoros) e (3) tipo hemocorial (primatas, roedores e coelhos) (FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014; DA ANUNCIACÃO *et al.*, 2017).

A placenta epiteliocorial tem a vantagem de isolar os componentes materno e fetal. A presença de dois epitélios completos reduz os problemas imunológicos, como a migração de células fetais para o organismo materno. A desvantagem é a maior dificuldade na passagem dos materiais, que é parcialmente superada por diversos mecanismos, como a formação de zonas especializadas (ENDERS; CARTER, 2004). Ver Figura 1.

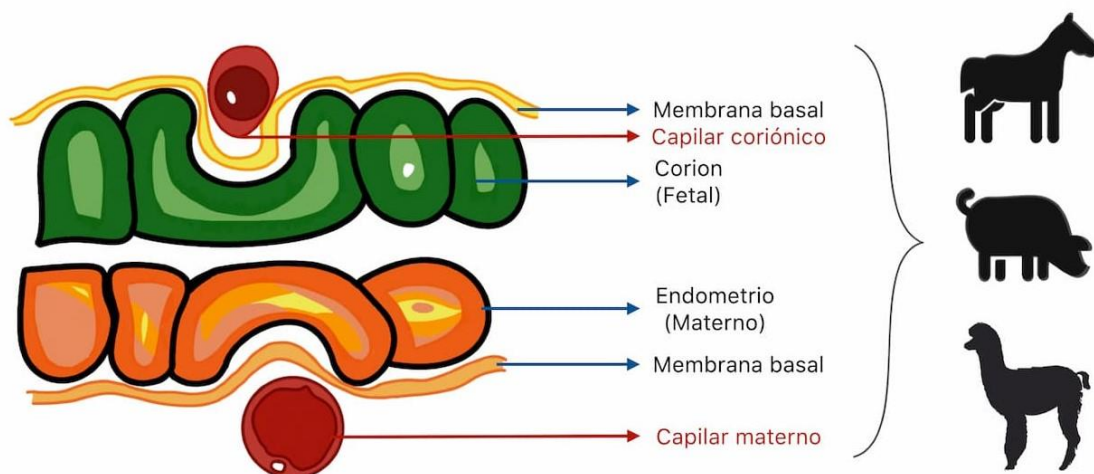


Figura 1. Representação esquemática da placenta epiteliocorial presente em equinos, suínos e camélídeos sul-americanos. Fonte: Diaz, 2021.

Nas placentas epiteliocoriais existem áreas nas quais uma camada delgada de trofoblasto delgado situa-se próximo ao epitélio endometrial, ou seja, colunas de células trofoblásticas situam-se justapostas ao epitélio endometrial. Essas áreas constituem complexos de glândulas areolares e as seções sobrepostas do trofoblasto são chamadas de aréolas. Essas formações podem ingerir secreções glandulares e eritrócitos (ENDERS;

CARTER, 2006). Tais áreas foram estudadas em muitas espécies, incluindo camelídeos (ABD-ELNAEIM *et al.*, 2003; OLIVERA *et al.*, 2003b). As aréolas variam de vaginações trofoblásticas simples, geralmente localizadas nas glândulas endometriais (HRADECKÝ; MOSSMAN, 1987), para sacos com vilosidades trofoblásticas como em espécies suiformes (DANTZER; LEISER, 1993; JONES *et al.*, 2004). A nutrição histotrófica é provavelmente de maior importância no grupo epiteliocorial do que em outros grupos placentários (ENDERS; CARTER, 2006).

3.3. PLACENTAÇÃO EM CAMELÍDEOS SUL-AMERICANOS

A placenta das alpacas é descrita como epiteliocorial e difusa, tendo como característica especial a presença de células gigantes multinucleadas (CARTER; ENDERS, 2013). Tem semelhanças morfológicas com alguns aspectos da placenta do porco, do cavalo e dos camelídeos do Velho Mundo (OLIVERA *et al.*, 2003b). A placenta epiteliocorial está presente nos maiores animais com os mais longos períodos de gestação (ENDERS; CARTER, 2004; ITURRIZAGA *et al.*, 2007).

No início da gestação, o início da placentação é caracterizado por dois eventos, os quais na placenta epiteliocorial da alpaca são: (1) Implantação do embrião no útero, que tem início entre os dias 15 e 20 de gestação (2) Aumento da superfície de contato devido ao crescimento de vilosidades e dobras, que ocorre entre os dias 20 e 45 da gestação. A irrigação originada garante a nutrição e uma ancoragem firme do embrião ao útero (ABD-ELNAEIM *et al.*, 1999; OLIVERA *et al.*, 2003a).

Ao longo da gestação, o trofoblasto forma uma única camada de células que inclui células mononucleadas, multinucleadas e gigantes, todas repousando sobre um mesênquima ricamente vascularizado (OLIVERA *et al.*, 2003b). A expulsão das membranas fetais ocorre cerca de 45 minutos após o nascimento do feto (STEVEN *et al.*, 1980).

As células trofoblásticas apresentam morfologia variável, tais como: cúbicas, redondas e quase triangulares. Os nucléolos basofílicos apresentam-se na maioria das células multinucleares; além disso, células trofoblásticas gigantes foram encontradas na porção superior das projeções coriônicas facilmente distinguíveis por seu citoplasma basofílico que contém de 5, 6 ou até mais núcleos. Vasos sanguíneos de diâmetros

diferentes, dispunham-se proximais à camada trofoblástica, e eram interligados com as células trofoblásticas, formando uma rede subtrofoblástica (ITURRIZAGA, 2005).

Na placenta epiteliocorial, existem regiões onde as seis camadas de células da barreira materno-fetal são finas o suficiente para se igualar à distância interhemal mínima das três camadas de células presentes na placenta humana (FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014). A distância existente entre as microvilosidades do feto e a superfície materna parece ser muito mais estreita nos camelídeos sul-americanos do que em outros ungulados, o que pode sugerir que seja uma adaptação do animal a grandes altitudes (STEVEN *et al.*, 1980; ITURRIZAGA *et al.*, 2007).

Particularmente nas alpacas, possui capilares maternos e fetais que sangram o epitélio e o trofoblasto, ocorrendo ao longo de toda a interface materno-fetal e esta rede capilar subepitelial do trofoblasto é muito mais proeminente nos estágios finais da gestação. Na verdade, em comparação com outros animais, a distância interhemal em alpacas é substancialmente menor do que a encontrada em outras espécies com placentas epiteliocoriais (STEVEN *et al.*, 1980; OLIVERA; BEVILACQUA, 2014), uma condição que é atribuída a um processo adaptativo para compensar o baixo oxigênio no ambiente. O notável padrão de vascularização placentária nas alpacas também poderia ser resultante dessa hipóxia ambiental (AHMED *et al.*, 2000).

Os dados apresentados na caracterização da placenta da alpaca sugerem que apesar de ser considerada uma placenta epiteliocorial difusa, ela apresenta modificações estruturais, aumentando assim a troca molecular em regiões especializadas que funcionam como sítios histotróficos (OLIVERA, 2007). Como no caso da placenta equina, possui dois componentes estruturais principais, as areolas, vaginações do trofoblasto formadas por colunas de células nas glândulas uterinas, e os microcotiledones, que são pequenas interdigitações das vilosidades placentárias que se projetam para o endométrio; ambas as aréolas e microcotiledones aumentam significativamente durante a gestação (WOODING *et al.*, 2000). As aréolas dos camelídeos sul-americanos constituem uma fonte de reserva de substâncias nutritivas para o feto, além de permitir que o trofoblasto as utilize continuamente (ITURRIZAGA *et al.*, 2007).

ITURRIZAGA *et al.*, 2007 estudaram a placenta da lhama, descobrindo que o corno uterino da gestante, em todos os casos, era o esquerdo e o córion apresentava

projeções coriônicas em direção ao endométrio. Os resultados histológicos dos cortes transversais demonstraram dobras compostas por quatro ou cinco ramos, recobertas por uma camada de trofoblasto. As células trofoblásticas apresentaram morfologia variável: cúbicas, redondas e quase triangulares. Foram observadas células não nucleadas e poucas células trofoblásticas multinucleadas gigantes, seus núcleos eram quase todos arredondados, com nucléolos basofílicos. As poucas células trofoblásticas gigantes nucleadas são encontradas na parte superior das projeções coriônicas, e eram facilmente distinguíveis de outras células da camada trofoblástica por seus citoplasmas basofílicos, que continham 5, 6 ou mais núcleos. No estudo ultraestrutural, os autores encontraram a presença de um material eletrodense amorfo dentro dos núcleos, microvilosidades na superfície apical e desmosomos entre as membranas de células vizinhas. A aparência pregada da interface materno-fetal foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura na superfície fetal. Na placenta da lhama, a uteroferrina foi imunolocalizada no lúmen glandular e no citoplasma das células glandulares na forma de granulações.

MEESTERS; OPSOMER; GOVAERE, 2019 realizaram a avaliação macroscópica da placenta de alpaca pós-parto, constatando que o peso médio das placentas a termo era de $0,8 \pm 0,19$ kg, ou seja, 10% do peso corporal dos recém-nascidos. Os pesos do alantoamnião e cório foram $0,2 \pm 0,07$ kg e $0,5 \pm 0,13$ kg, respectivamente. O comprimento do cordão umbilical foi de $8,8 \pm 2,84$ cm, e o comprimento do corno uterino de grávidas e não grávidas foi de $69,4 \pm 12,77$ cm e $54,5 \pm 6,81$ cm, respectivamente. O comprimento do corpo uterino foi de $14,6 \pm 4,68$ cm e a distância do umbigo ao corpo do útero foi de $18,5 \pm 6,13$ cm. O volume de tecido do alantoamnião foi $0,14 \pm 0,079$ L, e o volume coriônico foi de $0,37 \pm 0,078$ L. A área de superfície do alantoamnião e do cório foi $87,6 \pm 15,56$ dm² e $72,3 \pm 9,28$ dm², respectivamente. Todas as placentas apresentavam pequenas calcificações ao redor do cordão umbilical.

3.4.IMPORTÂNCIA DO SELÊNIO E DA SUA TRANSFERENCIA VIA PLACENTARIA DURANTE A GESTAÇÃO

O selênio (Se) é um micronutriente essencial que possui várias funções importantes para a saúde humana e animal. As funções biológicas do Se são realizadas por selenoproteínas (codificadas por vinte e cinco genes em humanos e vinte e quatro

genes em camundongos). Como um componente das selenoproteínas, o Se tem funções estruturais e enzimáticas na gravidez. Estudos recentes indicam sua ação na função ovariana humana, embora os mecanismos moleculares e bioquímicos subjacentes exatos, pelos quais o Se ou as selenoproteínas agem na reprodução feminina sejam ainda desconhecidos (QAZI *et al.*, 2018).

Estudos em animais, indicam que o feto cobre suas necessidades de selênio por via transplacentária, em quantidades variáveis de acordo com a condição da mãe. Entretanto em ruminantes a passagem de Selênio (Se) para o feto ocorre mesmo quando a mãe tem baixa disposição do elemento. As observações feitas nesse sentido sugerem que a fêmea poderia sacrificar sua própria condição para manter o elemento de transporte para o feto. Em geral, uma redução nos níveis plasmáticos de selênio materno é observada, conforme a gestação progride e os fetos aumentam em tamanho e em peso. Presumivelmente como consequência da importância das selenoenzimas na função tireoideia, a glândula contém mais selênio por grama de tecido do que qualquer outro órgão no sistema. A relação e a atividade da tireoide está associada à atividade da peroxidase na síntese de hormonas da tireoide, a actividade das desiodinases e também as selenoenzimas que catalisam a activação e a transformação, a partir de T3 de T4. A patologia da doença do músculo branco é caracterizada pela presença de degeneração de Zencker em fibras ou grupos de fibras musculares. Os músculos com maior atividade metabólica são mais afetados pela doença: diafragma, intercostal, gastrocnêmio e miocárdio, este último particularmente em ruminantes recém-nascidos ou mesmo antes do nascimento (HEFNAWY; PÉREZ, 2008).

A ação biológica do selênio está associada principalmente à sua atividade antioxidante na forma de glutathione peroxidase. A atividade antioxidante do selênio é complementada e está intimamente associada à vitamina E. Deficiências de selênio, vitamina E, ou ambos, manifestam-se como degeneração muscular com subsequente necrose. O tipo de músculo afetado (estriado ou cardíaco) e a capacidade de responder ao selênio, vitamina E, ou ambos, dependem da espécie. O selênio também está associado à proteína desiodase responsável pela conversão da tiroxina (T4) em sua forma ativa triiodotironina (T3); portanto, a deficiência de selênio tem sido implicada em certas condições de hipotireoidismo. Várias outras selenoproteínas são reconhecidas, embora suas funções biológicas não sejam completamente esclarecidas (CEBRA *et al.*, 2014).

Deficiência severa de selênio resulta na degeneração patológica das fibras musculares esqueléticas com fibrose secundária. Os animais afetados apresentam sinais clínicos que refletem os músculos específicos afetados e a gravidade das alterações degenerativas nas fibras musculares. Normalmente, ambos os membros pélvicos são afetados simetricamente; entretanto, os músculos da língua e do coração são comumente envolvidos em animais recém-nascidos ou em crescimento. Com danos ao músculo esquelético, os animais jovens ou mais velhos afetados apresentam graus variados de claudicação, fraqueza ou dificuldade de movimentação. A morte súbita pode ocorrer em animais mais jovens com músculo cardíaco danificado. Animais recém-nascidos com lesões na língua apresentam dificuldades na amamentação e podem ser diagnosticados como animais "fictícios". A deficiência severa de selênio em mulheres grávidas tem sido associada a abortos e natimortos. Todas essas manifestações clínicas foram documentadas na maioria das espécies domesticadas, embora a miopatia seja rara em camelídeos (CEBRA *et al.*, 2014).

Devido à transferência placentária de selenoproteínas, malformações congênitas de cascos podem estar presentes em animais recém-nascidos. Os ovinos são os menos sensíveis à selenose e apresentam poucos sinais além das alterações na textura da lã. Em outros animais como os bovinos e não ruminantes, as alterações são mais discretas. Não se sabe se as alpacas são sensíveis ao envenenamento crônico por selênio (CEBRA *et al.*, 2014).

SEBOUSSI *et al.*, 2008 estudaram a suplementação de selênio em camelos em diferentes concentrações, avaliando seus valores no soro sanguíneo de glutathione-peroxidase (GSH-Px), e na excreção de selênio na urina e fezes. Os resultados sugeriram confirmar a sensibilidade do camelo à suplementação de selênio, com um aumento significativo no selênio sérico. No entanto, esse aumento não foi necessariamente um exemplo da fisiologia característica do comportamento do camelo. Tal resultado pode sugerir um aumento da sensibilidade à toxicidade no camelo.

Os ruminantes são menos sensíveis à toxicidade do selênio em comparação com os não ruminantes. Supõe-se que os camelídeos sul-americanos sejam semelhantes aos ruminantes em relação à digestão e à utilização de selênio. Um recente relatório do Nuclear Regulatory Commission (NRC) da U.S. Food and Drug Administration (FDA) recomenda a suplementação de 0,74 mg de selênio por dia para lhamas e alpacas, baseado

na taxa média de suplementação de selênio para lhamas adultas relatada por Herdt. Neste estudo, a administração de selênio para lhamas gestantes e lactantes, melhorou as condições dos animais suplementados com mais de 1 mg de selênio por dia. No entanto, lhamas com menor ingestão de selênio foram capazes de manter concentrações razoavelmente normais dele no sangue. Lhamas que consomem feno de alfafa contendo 0,2 mg de selênio por quilograma de matéria seca, foram capazes de manter um estado adequado de selênio (CEBRA *et al.*, 2014).

Em ruminantes, as deficiências em vitaminas A, E ou selênio foram envolvidas no aumento da perda embrionária precoce. A deficiência de selênio pode levar ao nascimento de bebês fracos que não conseguem se levantar ou levantar a cabeça para amamentar. Em caso de camelídeos, existem relatos anedóticos de deficiência de selênio que resultam nessa síndrome. É uma prática bastante comum para tutores de camelídeos administrarem preparações contendo selênio em qualquer ninhada fraca, independentemente da causa (CEBRA *et al.*, 2014).

HUSAKOVA *et al.*, 2014 estudaram a relação existente entre a concentração de selênio (Se) (que é usado como um método direto para o diagnóstico do estado de selênio) e a atividade da glutathiona peroxidase (método indireto) no sangue total de alpacas. Compararam a adequação da utilização desses dois métodos diagnósticos, determinando o status de selênio em relação a diferentes faixas etárias em alpacas suplementadas com diferentes tipos de selênio. Não houve influência significativa da idade na atividade de glutathiona peroxidase (GSH-Px). A avaliação do estado do Se, dividindo as fazendas de alpaca, de acordo com diferentes padrões de suplementação com selênio, demonstrou uma concentração média de selênio no sangue significativamente maior e atividade de GSH-Px em fazendas onde o suplemento de selênio na ração era regular. Os resultados deste estudo também indicaram que a utilização prática do método indireto de determinação do status de selênio na alpaca é limitado. Portanto, os autores recomendaram a medição da concentração do Se e da atividade de GSH-Px para caracterizar com precisão o status de Se em alpacas.

KACHUEE *et al.*, 2019 avaliaram o efeito da suplementação de nanopartículas de selênio orgânico e inorgânico na fase final de gestação sobre as concentrações de selênio, zinco, cobre e ferro em cabras mães, assim mesmo a transferência placentária, por colostro e leite desses traços minerais de cabras mães para seus filhotes. Os resultados

indicaram uma maior eficiência da transferência placentária e colostrária de selênio em filhotes de cabras tratadas com selenometionina em comparação a aquelas que receberam doses de nanopartículas de selênio ou selenito de sódio. Concluíram que a suplementação com selênio pode afetar e se correlacionar com os níveis de Cu., Zn e Fe. Este efeito é altamente dependente da variedade química ou física da suplementação de selênio, segundo os autores.

Até muito recentemente, considerava-se que a principal e quase única função do Se no organismo animal seria fazer parte da GSH-Px, uma enzima que ajuda a manter a integridade das membranas celulares, evitando ou reduzindo o efeito dos peróxidos formados durante o metabolismo celular. Entretanto, até o momento, mais de quatorze selenoproteínas foram caracterizadas, algumas delas com atividade redox enzimática e outras com funções estruturais e de transporte (MCKENZIE *et al.*, 2002). De fato, o Se é o único oligoelemento especificado no código genético como se-cisteína, e é considerado hoje como o aminoácido número 21 (RAYMAN, 2002). As novas funções reconhecidas incluem a produção e regulação do nível de ativação dos hormônios tireoidianos a partir da tiroxina bem como a estabilização das proteínas relacionadas à maturação dos espermatozoides e a manutenção da fertilidade nos machos (RAYMAN, 2002). O papel do Se no desenvolvimento da espermatogênese e da qualidade do sêmen pode ser mais importante que o da própria vitamina E (KOLODZIEJ; JACYNO, 2004).

A importância do Se como um oligoelemento essencial está relacionada ao seu papel como selenocisteína em uma série de selenoproteínas, incluindo as enzimas antioxidantes glutathione peroxidases (GSH-Px), tioredoxina redutases (TrxR) e selenoproteína P (SePP). Essas enzimas protegem os tecidos contra o efeito prejudicial de espécies reativas de oxigênio (ROS) bem como de outros produtos endógenos do metabolismo celular envolvidos no dano ao DNA, e potencialmente, levando à mutagênese, morte celular e carcinogênese. A redução da atividade da enzima antioxidante e do Se corporal durante a gravidez, resulta em estresse oxidativo nos tecidos, que contribuíram para o trabalho de parto prematuro, aborto espontâneo, pré-eclâmpsia e retardo do crescimento intrauterino. Como o desenvolvimento da placenta é altamente dependente do status de oxigênio, a formação descontrolada de ROS pode ser prejudicial. Apesar dessas descobertas, o papel das enzimas dependentes de Se e Se na gravidez permanecem controversos (ZACHARA, 2018).

BURK *et al.*, 2013 estudaram a transferência materno-fetal de selênio em camundongos, nos quais, a placenta forneceu nutrientes ao feto de camundongo durante a última metade da gestação. A imunistoquímica da placenta d-18 (gravidez tardia) demonstrou a presença de Sepp1 em vesículas dentro das células trofoblásticas do labirinto placentário, mas o Gpx3 não foi detectado na placenta. Os autores constataram que vários mecanismos garantem a transferência de selênio da gestante para o concepto. O saco vitelino visceral absorvia o fluido uterino contendo Sepp1 e Gpx3, enquanto a placenta retirava Sepp1 do sangue materno por meio de endocitose mediada por apoER2. Ambos os mecanismos dependem de selenoproteínas e funcionam em condições de deficiência de selênio. Os autores também detectaram um terceiro mecanismo que não parece depender diretamente de selenoproteínas, mas em grande parte do status de selênio da fêmea grávida tornando-as, portanto, menos eficazes em condições de deficiência de selênio.

O metilmercúrio (MeHg) é um neurotóxico conhecido por afetar o desenvolvimento do cérebro fetal como um órgão-alvo sensível. Como a maior parte do mercúrio (Hg) no sangue é MeHg, os níveis de mercúrio total (THg) no sangue são usados para estimar a carga de MeHg no corpo. Os nutrientes selênio (Se), vitamina E e ácido docosahexaenóico (DHA) protegem contra a toxicidade do MeHg. É por isso que SAKAMOTO *et al.*, 2018 compararam as concentrações de substâncias bioquímicas no sangue do cordão umbilical e materno, THg e Se, vitamina E, DHA e outros elementos, ácidos graxos e aminoácidos em 54 pares de mães e recém-nascidos japoneses para elucidar o risco fetal de toxicidade por MeHg. As proporções de Se / THg, vitamina E / THg e DHA / THg no sangue do cordão umbilical foram menores do que as proporções no sangue materno. Esses resultados sugerem que os fetos apresentam risco aumentado de toxicidade por MeHg.

3.5. GLICOBIOLOGIA NA GESTAÇÃO

A glicobiologia é o estudo de carboidratos estruturais, carboidratos que tem uma enorme capacidade de transmitir informações, muito maior do que os ácidos nucléicos e proteínas. Numerosos carboidratos têm papéis cruciais específicos em processos tão variados como infecção, inflamação, imunidade, fertilização, gestação, disseminação de

células tumorais e duplicação de proteínas (GABIUS *et al.*, 2004; GIMENO; BARBEITO, 2004; VARKI, 2017). Biologicamente, os carboidratos ou monossacarídeos componentes estruturais das células mais importantes são sete: Manose, Glicose, Fucose, Galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina e Ácido Siálico (WALSH, 2010; VARKI *et al.*, 2017).

As lectinas são proteínas com a capacidade de se ligar com certa especificidade aos carboidratos como glicoproteínas (GIMENO; BARBEITO, 2004). O processo de biossíntese de glicoproteínas é mediado por glicosiltransferases e glicosidases que atuam de forma coordenada à medida que as proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático e transportadas pelo aparelho de Golgi até a superfície celular (CROCI, 2011).

JONES *et al.*, 2002; JONES; SKIDMORE; APLIN, 2008 realizaram estudos sobre a glicosilação da placenta em camédeos na interface materno-fetal, propondo que existem glicotipos maternos e fetais com compatibilidade mútua determinando a estabilidade dessa interface, assim como a expressão de glicanos pode contribuir para a dificuldade de produzir híbridos. Porém, o perfil de glicosiltransferases que uma célula expressa é altamente regulado e varia sensivelmente em resposta a numerosos estímulos externos; por tanto, uma mesma célula em dois contextos diferentes pode apresentar variações no padrão de glicosilação que afetam e modulam a funcionalidade das glicoproteínas de membrana, constituindo um nível adicional de regulação dos processos celulares (CROCI, 2011).

LOPEZ *et al.*, 2014 estudaram a lectinohistoquímica do útero da alpaca, o PNA, SJA, SBA, ConA, LCA e PSA lectinas mostraram diferenças entre o corno direito e esquerdo, sugerindo que glicoconjugados que se ligam a estas lectinas poderia participar na geração de um ambiente propício para a implantação, que geralmente ocorre no corno esquerdo na alpaca. Conclui-se que a alpaca possui um padrão de glicosilação que pode variar com os tratamentos hormonais de superovulação.

A alpaca tem sido estudada em nível reprodutivo especialmente em transferência de embriões; OLIVERA, 2007 estudou a placenta da alpaca em um nível macroscópico e microscópico estabelecendo que o órgão é uma placenta do tipo epiteliocorial difusa com a presença de aréolas. O autor afirmou também que a placenta da alpaca não se parece

com a placenta em ruminantes, mas tem semelhança com a placenta dos suínos, porque a expressão de glicoproteínas na placenta epiteliocorial difusa de alpacas, estudado por MAJEWSKA; PANASIEWICZ; SZAFRANSKA em 2013, na Polônia, demonstrou ser a mesma de padrão semelhante àquele encontrado nos suínos.

Em 2002, JONES *et al.*, faz uma comparação de glicosilação uteroplacentária entre camelo e alpaca, indicando que existe uma maior diferença na expressão de glicano no trofoblasto que no epitélio uterino, quando são comparadas ambas as espécies.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS:

Doze placentas de final de prenhez (parto) de alpaca obtidas de gestação por reprodução natural em altas altitudes nos Andes Peruanos, foram utilizadas para este trabalho. As alpacas foram registradas e fertilizadas no mês de fevereiro do ano 2020, e pertencem à estação experimental IVITA Marangani da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Nacional Maior de San Marcos, localizada em La Raya, na região de Cusco, Peru, situada à uma altitude de 4338 metros acima do nível do mar.

4.1.1. Equipamentos utilizados:

- Micrótomo de rotação manual Leica modelo RM2125 RTS;
- Centro de inclusão de tecidos Leica modelo Arcadia;
- Banho de flutuação de tecidos Leica modelo HI1210;
- Forno micro-ondas LG;
- Agitador magnético marca Biobase;
- Microscópio de luz Leica DM 750 com câmera digital integrada ICC50W;
- Software Leica Macrosystems LAS 4.12;
- Estereomicroscópio Leica S9i com câmera integrada;
- Ponto crítico Leica;
- Metalizador Emitech modelo K550; e
- Microscópio eletrônico de varredura LEO 435VP.

4.1.2. Materiais de laboratório

Materiais de dissecação, formaldeído, glutaraldeído, álcoois de várias concentrações, vidros de coplin, lâminas histológicas, corantes histológicos,

micropipetas, ponteiras, porta-lâminas, kits de imunohistoquímica e lectinhistoquímica.

4.2.MÉTODOS:

Termos de Ética:

Os procedimentos usados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 08/04/2020, CEUA nº 7213120719.

Da mesma forma, obteve-se autorização do Diretor do Instituto Veterinário de Pesquisas Tropicais e de Altitude - IVITA da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Nacional Mayor de San Marcos no Peru, para o uso de alpacas na estação IVITA Marangani em Cusco.

4.2.1. Coleta de material biológico

A coleta de 12 placentas de alpacas na cidade de Cusco, Peru foi realizada no final de janeiro de 2021. A alpaca como camelídeo sul-americano vive normalmente em áreas de grande altitude, tem um longo tempo de gestação de aproximadamente 11 meses, tem uma periodicidade que nas alturas do planalto peruano possui um manejo animal de reprodução com o macho e ovulação induzida entre os meses de janeiro e fevereiro. Os nascimentos ocorrem entre dezembro e janeiro do ano seguinte.

As placentas foram coletadas após o nascimento dos filhotes, levando em média 40 minutos após o nascimento para a expulsão das membranas fetais.

Após a separação dos fragmentos placentários destinados as análises histológicas, as placentas foram fixadas em formaldeído 10%; e para análise ultra estrutural foram fixadas em glutaraldeído a 2,5%.



Figura 2. Coleta de placentas de parto de alpacas. A. Fazenda de criação de alpacas em La Raya, Cusco-Peru, a uma altitude de 4338 metros acima do nível do mar. B. Nascimento do filhote de alpaca e liberação da placenta. C. Mãe e recém-nascido de alpaca após o nascimento. D. Placenta de alpaca coletada. E. Trabalho de amostragem de placentas de alpaca.

4.2.2. *Estudo histológico*

As placentas foram preservadas em formol ao 10% e depois transferidas para o Laboratório de Pesquisa Morfológica em Anatomia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária UNMSM em Lima para serem processados.

Antes, porém foram coletadas amostras aleatórias de 8 partes da placenta que incluem todas as membranas fetais. Em seguida, foi realizada a coleta dos tecidos, na medida entre 1 e 3 cm de cada amostra, destinada ao preparar os blocos em parafina seguida de cortes histológicos com aproximadamente 5µm de espessura, coradas com hematoxilina eosina, coloração de Tricrômico de Masson e Picrosirius Red.

Tais amostras foram coletadas e processadas para serem submetidas à leitura feitas em um microscópio Leica DM 750 com câmera digital integrada ICC50W e software de medição Leica Macrosystems LAS 4.12. Um microscópio Olympus BX60 com câmera AxioCam HRc Carl Zeiss e software Zen 2 blue edition foi usado para polarização.

4.2.3. *Estudo ultra estrutural*

Foi reduzido o tecido placentário em uma pequena amostra de 1 x 1 centímetro, extraído e fixadas em glutaraldeído a 2,5% em solução tampão e preservadas em álcool de 70°; as amostras menores foram processadas no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem (CADI) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

As amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcoois em concentrações de 70%, 80%, 90% e 100%, secas em aparelho de ponto crítico LEICA EM CPD 300, colados com cola de carbono em bases metálicas de alumínio (stub) e metalizados (“sputting”) com ouro no aparelho metalizador EMITECH K550, e foram analisadas e fotodocumentados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) LEO 435VP.

4.2.4. *Estudo imunohistoquímico*

Amostras das placentas de alpaca reduzidas em blocos de parafina foram usadas para preparar cortes histológicos de tecidos de 5µm de espessura não corada, utilizando slides carregados positivamente para evitar que durante o processamento de imunohistoquímica da placenta houvesse o dobramento do tecido imerso na parafina. Tais procedimentos foram realizados no Laboratório de Anatomia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária UNMSM no Peru.

O processamento das amostras foi realizado seguindo os protocolos padronizados da técnica imunohistoquímica Avidina -Biotina -Peroxidase com o kit do laboratório Santa Cruz Biotechnology, Inc®.

O procedimento foi o seguinte: os cortes histológicos incluídos em parafina e dispostos em lâminas carregadas positivamente foram submersos em substituto de xileno (Neo Clear ®) e reidratados em álcool (100%). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 30 minutos em metanol misturado com peróxido de hidrogênio. Continuou a reidratação em soluções alcoólicas de concentração decrescente (96°, 70° e 50°). PBS (solução salina tamponada com fosfato) foi usado para lavagens. Para a recuperação do antígeno, as lâminas foram imersas em tampão citrato + ácido clorídrico até atingir pH=6, colocadas em coplin de plástico em forno de micro-ondas a 750 watts por 10 minutos e depois resfriadas à temperatura ambiente.

As lavagens foram feitas em PBS e foi aplicada albumina sérica bovina (BSA 1%) para evitar a união dos anticorpos com as proteínas e para evitar uniões inespecíficas, em seguida foram deixados em incubação por 30 minutos e lavados em PBS. As seções foram incubadas com o anticorpo primário correspondente em uma câmara úmida durante a noite a 4 graus centígrados sob refrigeração. No dia seguinte, foram lavados em PBS e aplicado o anticorpo secundário de acordo com o kit para monoclonal ou policlonal, deixando-se incubar em temperatura ambiente por 30 minutos. A lavagem foi realizada e a enzima AB foi aplicada antes da preparação e incubação da preparação por 30 minutos). As lavagens foram realizadas novamente em PBS para então revelar com diaminobenzidina (DAB), observando-se a marcação ao microscópio e anotando-se o tempo de marcação. Para contraste, as lâminas foram imersas em Hematoxilina de Harris

por 5 segundos, depois desidratadas em álcoois de concentrações crescentes e em substituto de xileno (Neo Clear ®). Ao final do procedimento, a montagem foi feita com bálsamo do Canadá usando lamínulas.

As diluições de anticorpos primários foram padronizadas e foram os seguintes:

Tabela 1. Anticorpos primários, tipo, diluições, controle positivo e laboratórios de procedência utilizados para a pesquisa imunohistoquímica das placentas das alpacas

Anticorpo Primário	Tipo	Diluição	Controle positivo	Laboratório
Selenoprotein P (B-9)	Monoclonal	1:50	Pâncreas de rato	Santa Cruz Biotechnology, Inc®.
Selenoprotein N (A-11)	Monoclonal	1:50	Placenta humana	Santa Cruz Biotechnology, Inc®.
GPx-3 (23B1) Glutathiona peroxidase	Monoclonal	1:50	Rins de rato	Santa Cruz Biotechnology, Inc®.
Dio 3 (Iodotironina deiodinase)	Policlonal	1:100	Placenta humana	Merck ®

O controle negativo foi feito mediante não utilização do anticorpo primário.

A leitura e a análise das imagens foram feitas usando um microscópio Leica DM 750 com câmera digital integrada ICC50W e software Leica Macrosystems LAS 4.12.

A intensidade da marcação no tecido foi classificada qualitativamente e descritas em imagens digitais.

Tabela 2. Avaliação qualitativa da marcação de anticorpo primário para selênio em placentas de alpacas

Classificação	Marcação	Característica
-	<i>Negativa</i>	Sem marcação. Nenhuma mudança de coloração foi vista em relação à amostra de controle
+	<i>Débil</i>	Um leve tom marrom é visto
++	<i>Moderado</i>	Um tom castanho claro é apreciado
+++	<i>Forte</i>	Há uma mudança bastante óbvia para uma cor variando da coloração de marrom a marrom escuro

4.2.5. Estudo lectinohistoquímico

Utilizando 1cm do tecido placentário, protocolos histológicos foram realizados e os blocos em parafina, foram seccionados em cortes de 5µm. Foram utilizadas lâminas carregadas positivamente com tecido sem coloração para aplicação das técnicas de lectinohistoquímica (LHQ).

Uma bateria de 13 lectinas biotinizadas foram utilizadas oriundas do Vector Labs®, seguindo protocolos padronizados mediante sistema avidina-peroxidase.

O controle positivo foi a amostra de intestino de camundongo e o controle negativo foi a não aplicação de lectina.

Tabela 3. Kits Vector Labs® Lectina I e II. Indicações sobre sua origem, concentração e afinidade de carboidratos.

Acrônimo	Lectina	Concentração	Afinidade de carboidratos
Con A	Concanavalin A	2mg/ml	Glicose, Manose
SBA	Glycine max (soybean) agglutinin	2mg/ml	N-Acetil galactosamina α (GalNAc)

WGA	Triticum vulgare (wheat germ) agglutinin	2mg/ml	N- Acetil glucosamina β (GlcNAc), resíduos de Ácido siálico
DBA	Dolichos biflorus agglutinin	2mg/ml	N-Acetil galactosamina α (GalNAc)
UEA I	Ulex europaeus agglutinin I	2mg/ml	Fucosa
RCA ₁₂₀	Ricinus communis agglutinin	2mg/ml	Galactose (α Gal), N-Acetil galactosamina β (GalNAc)
PNA	Arachis hypogaea (peanut) agglutinin	7.5mg/ml	Galactose (α Gal)
GSL I	Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia lectin I	2mg/ml	Galactose (α Gal)
PSA	Pisum sativum agglutinin	2mg/ml	Manose, Glicose
LCA	Lens culinaris agglutinin	2mg/ml	Manose
PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin	2mg/ml	Estruturas complexas (Sequências ligadas a N complexas bi/tri-antênarias bisetadas)
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin	2mg/ml	Estruturas complexas (Sequências ligadas a N complexas tri/tetra-antênarias não bisetadas)
sWGA	Wheat germ agglutinin, succinylated	2mg/ml	N- Acetil glucosamina β (GlcNAc)

O processamento foi o seguinte:

Os cortes histológicos incluídos em parafina e dispostos em lâminas carregadas positivamente foram submersos em substituto de xileno (Neo Clear ®) e reidratados em álcool (100%). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 30 minutos em metanol misturado com peróxido de hidrogênio. Foi dada a continuidade a reidratação das amostras em soluções alcoólicas de concentração decrescente (96°, 70° e 50°). PBS (solução salina tamponada com fosfato) foi utilizado para lavagens, e foi aplicada albumina sérica bovina (BSA 1%) para evitar uniões inespecíficas. Em seguida os cortes

foram deixados em incubação por 30 minutos e lavados em PBS. As seções foram incubadas com as lectinas correspondentes segundo a diluição (ver Tabela 3) em uma câmara úmida, durante uma noite a 4 graus centígrados sob refrigeração. No dia seguinte, as amostras foram lavadas em PBS e, em cada uma foram aplicadas cerca de 50 µL da solução de Estreptavidina-Peroxidase (Estreptavidina Peroxidase Horseradish VECTOR LABS®). As lâminas foram colocadas em câmara úmida, permitindo repousar por 30 minutos em temperatura ambiente. As lavagens foram realizadas novamente em PBS para então revelar com diaminobenzidina (DAB), observando-se a marcação ao microscópio e anotando-se o tempo de marcação. Para contraste, as lâminas foram imersas em Hematoxilina de Harris por 5 segundos, depois desidratadas em álcoois de concentrações crescentes e em substituto de xileno (Neo Clear ®). Ao final do procedimento, as montagens foram feitas com bálsamo do Canadá usando lamínulas.

A intensidade da marcação foi classificada qualitativamente e foram descritos com imagens digitais. O estudo lectinhistoquímico foi realizado no Laboratório de Anatomia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária UNMSM no Peru.

Tabela 4. Avaliação qualitativa da marcação de lectina em placenta de alpaca.

Classificação	Marcação	Característica
-	<i>Negativa</i>	Nenhuma mudança de coloração foi vista em relação à amostra de controle
+	<i>Débil</i>	Um leve tom marrom é visto
++	<i>Moderado</i>	Um tom castanho claro é apreciado
+++	<i>Forte</i>	Há uma mudança bastante óbvia para uma cor variando de marrom a marrom escuro

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. ESTUDO HISTOLÓGICO

5.1.1. *Córion:*

Se observou que a união do córion com a alantoide (Figura 3) permaneceu intimamente intactas. As vilosidades coriônicas foram observadas microscopicamente e apresentaram epitélio cuboidal simples (Figura 4) sendo evidente a presença de algumas células gigantes nas extremidades apicais das vilosidades (Figura 5). Essas vilosidades encontravam-se recobertas por uma camada de epitélio trofoblástico, o qual continha células cuja morfologia variava entre cúbica, arredondada, plana e até piramidal, sendo os núcleos arredondados basófilos. Células binucleadas também foram encontradas na camada do epitélio trofoblástico. Um mesênquima contendo fibroblastos e uma rede de pequenos vasos sanguíneos foram encontrados (Figura 6).

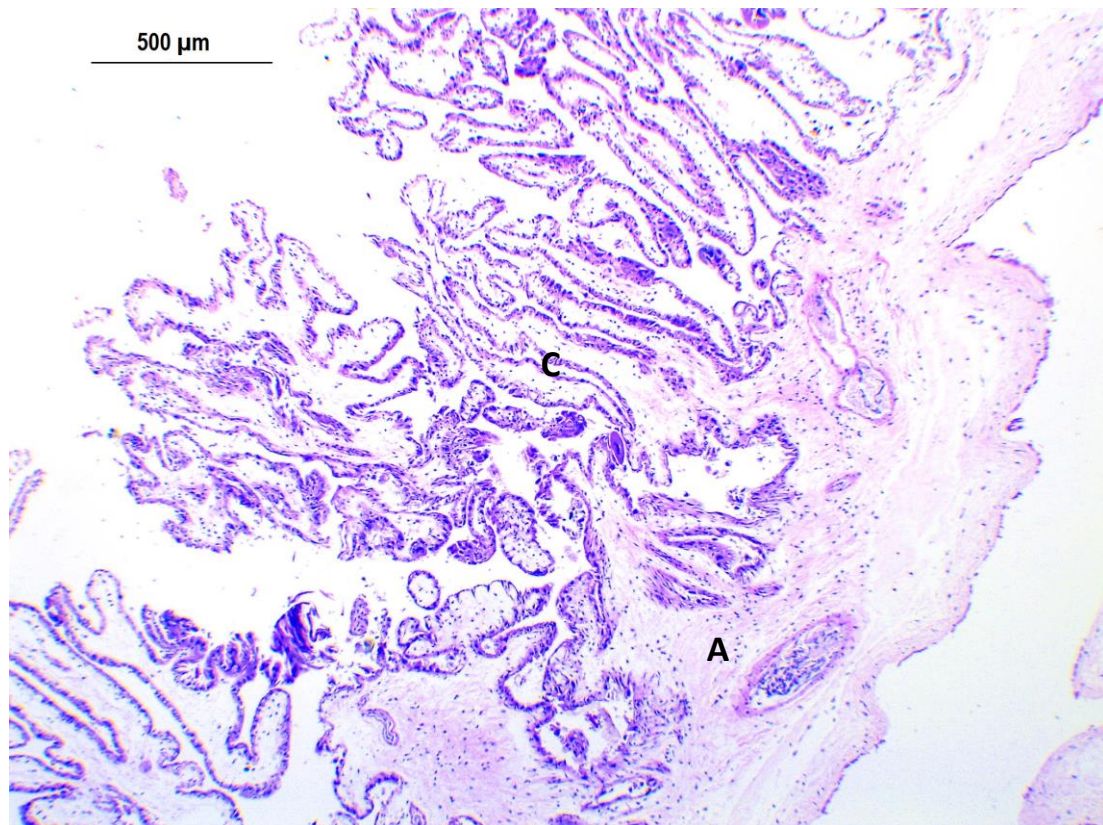


Figura 3. Fotomicrografia da placenta a termo de alpaca. Observa-se a união do córion (C) e do alantoide (A), típica das placentas corioalantóicas. Coloração HE 4x. Barra 500um.

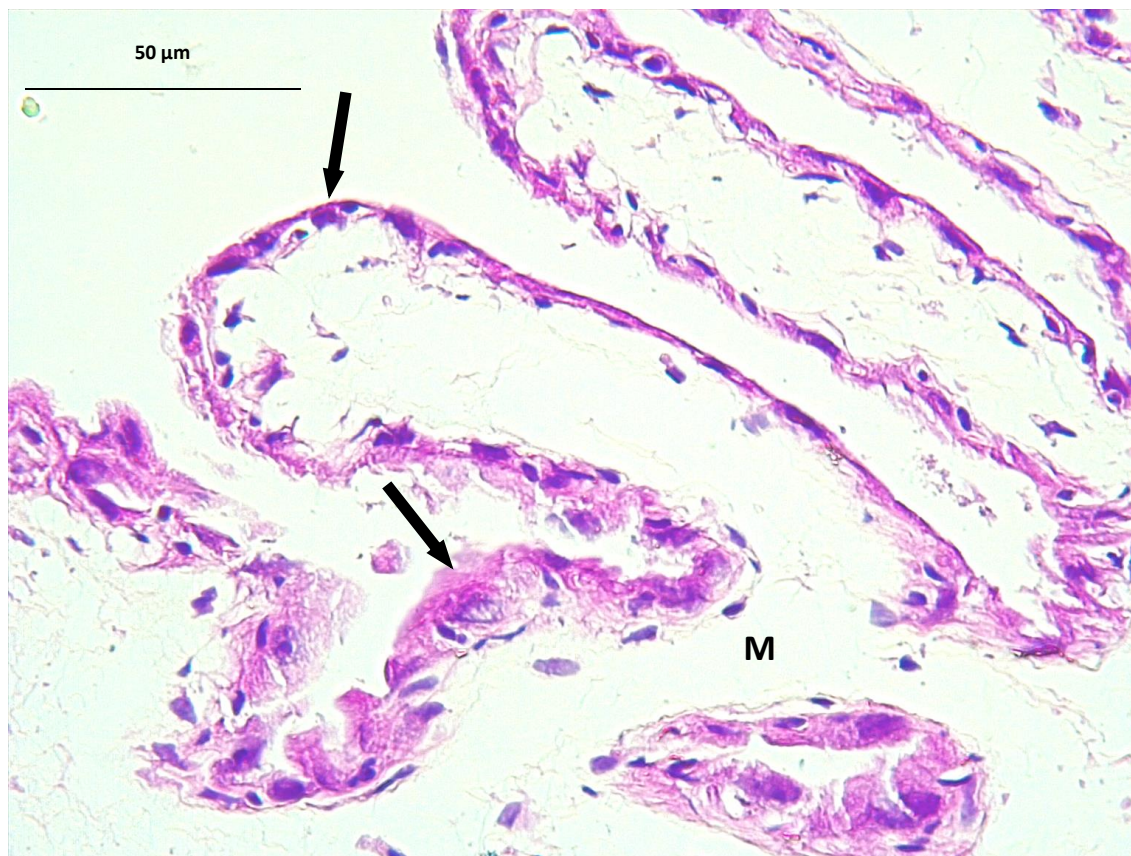


Figura 4. Fotomicrografia do córion da placenta a termo de alpaca. Vilosidades coriônicas são vistas com uma camada de células trofoblásticas que variam em formato e tamanho e têm um núcleo bastante basófilo além de um mesênquima de suporte (M). Coloração HE 40x. Barra 50um.

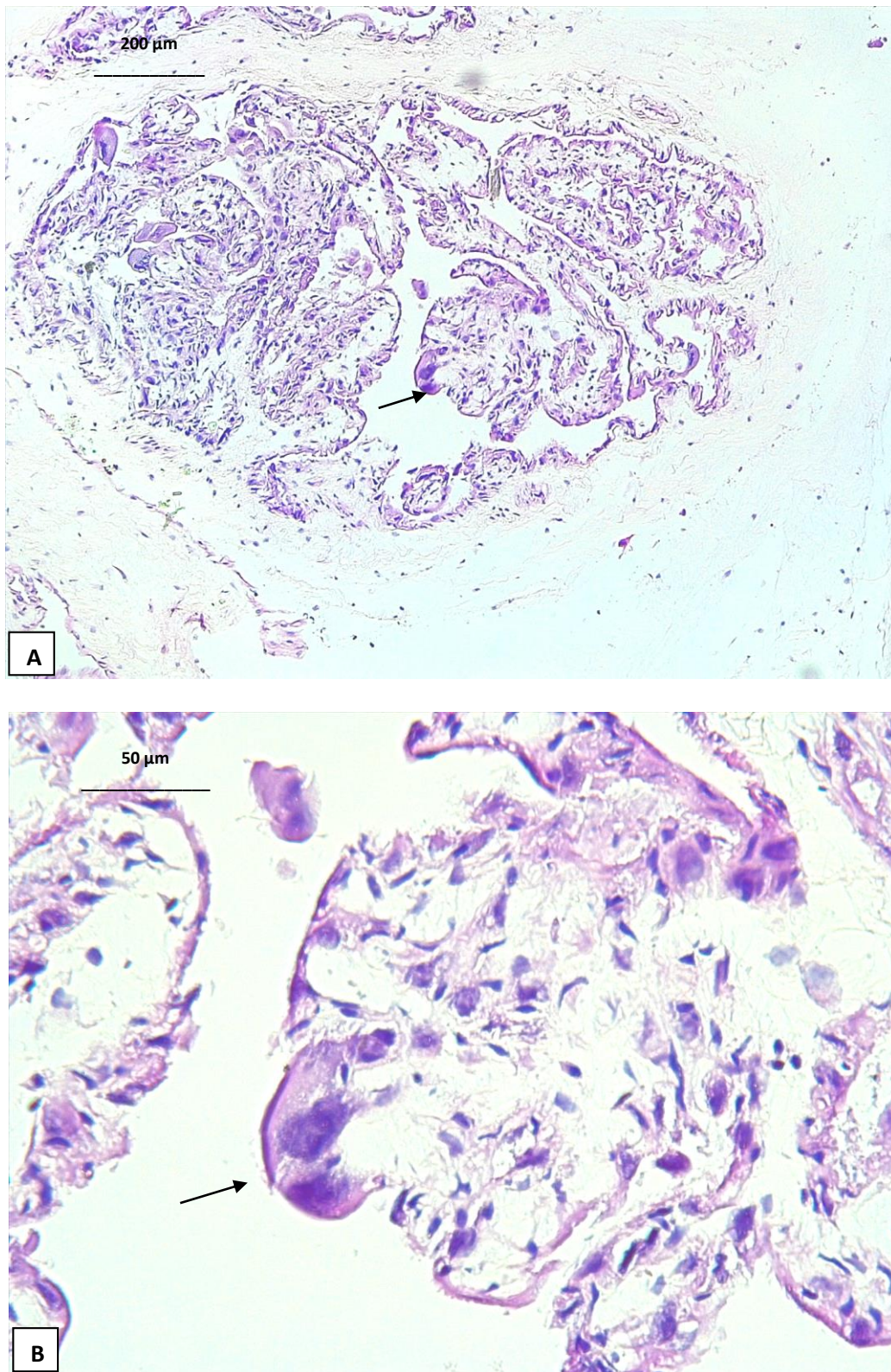


Figura 5. Fotomicrografia de placenta a termo de alpaca. A. Células gigantes de citoplasma mais eosinófilo, podem ser encontradas na zona apical das vilosidades coriônicas. Coloração HE 10x. Barra 200um. B. Células gigantes estavam presentes no córion. Coloração HE 40x. Barra 50um.

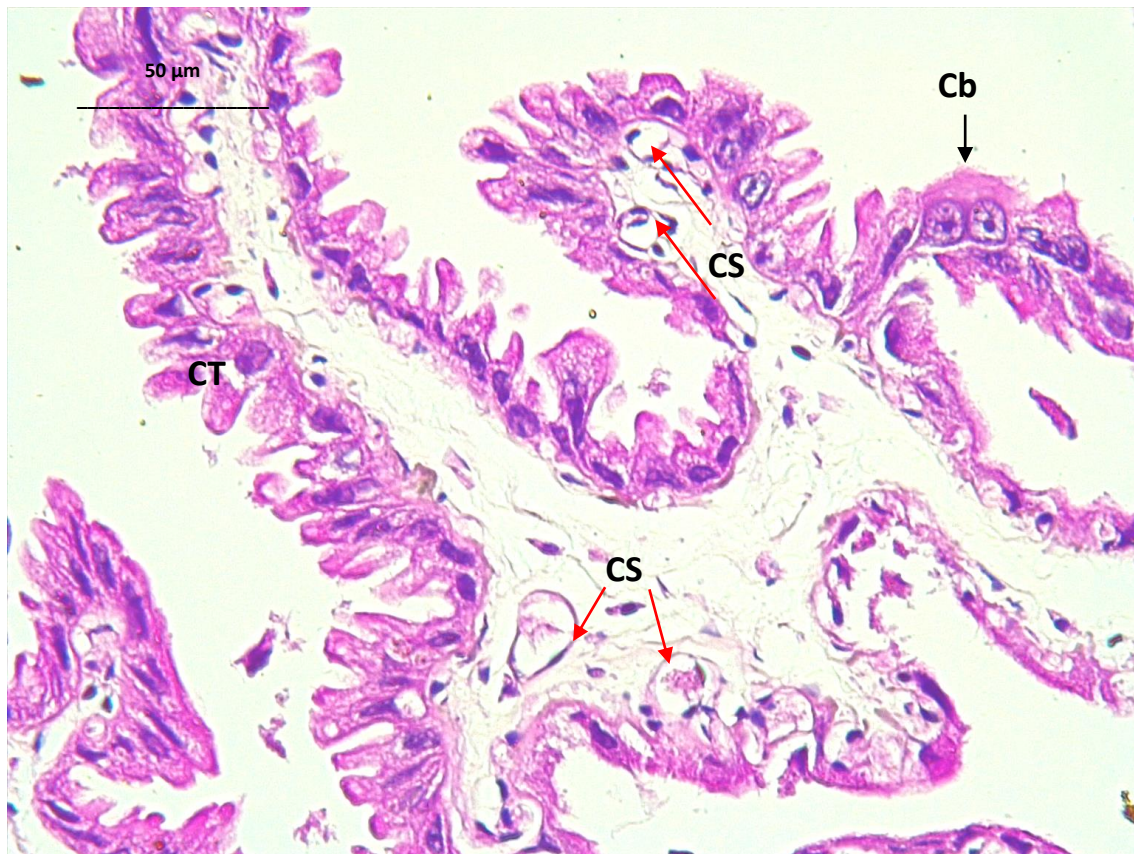


Figura 6. Fotomicrografia de córion da placenta a termo de alpaca. O córion se apresenta com vilosidades revestidas com camada trofoblástica (CT). Nesse caso aparecem entre as células colunares, células binucleadas (Cb), além de capilares sanguíneos (CS), característica da placenta epilicóricia. Coloração HE 40x. Barra 50µm.

5.1.2. Alantoide:

Observou-se que o alantoide se encontrava aderido ao mesênquima do córion, como uma camada de células colunares com citoplasmas eosinófilos e núcleos basófilos, disposta também de forma pregueada (Figura 7). Um mesênquima denso encontrava-se anexado ao córion. A presença de vasos sanguíneos de maior calibre e tamanho era evidente, pois no alantoide é a camada de fornecimento vascular fetal na alpaca (Figura 8).

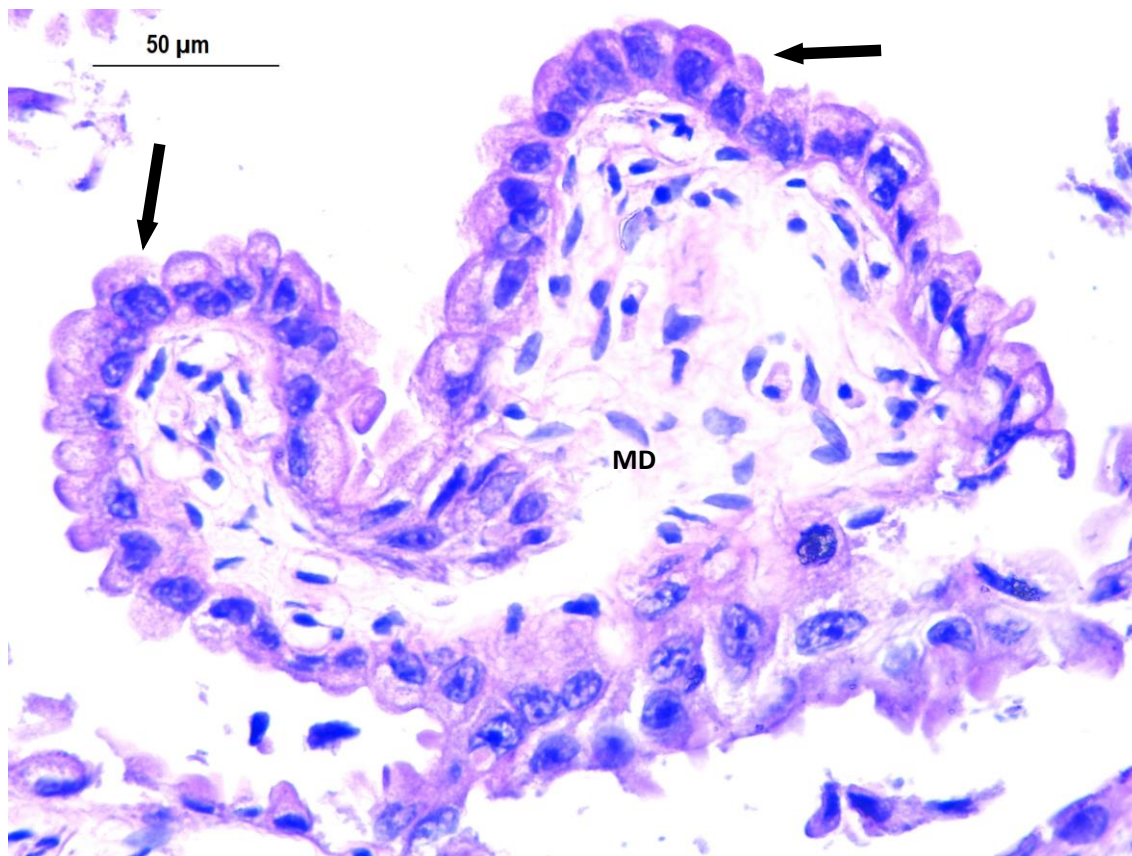


Figura 7. Fotomicrografia de alantoide de placenta de termo em alpaca. Observa-se camada de células colunares disposta em pregas. Os citoplasmas eram eosinófilos e os núcleos basófilos; um mesênquima denso contendo fibroblastos (MD) estava presente. Coloração HE 40x. Barra 50um.

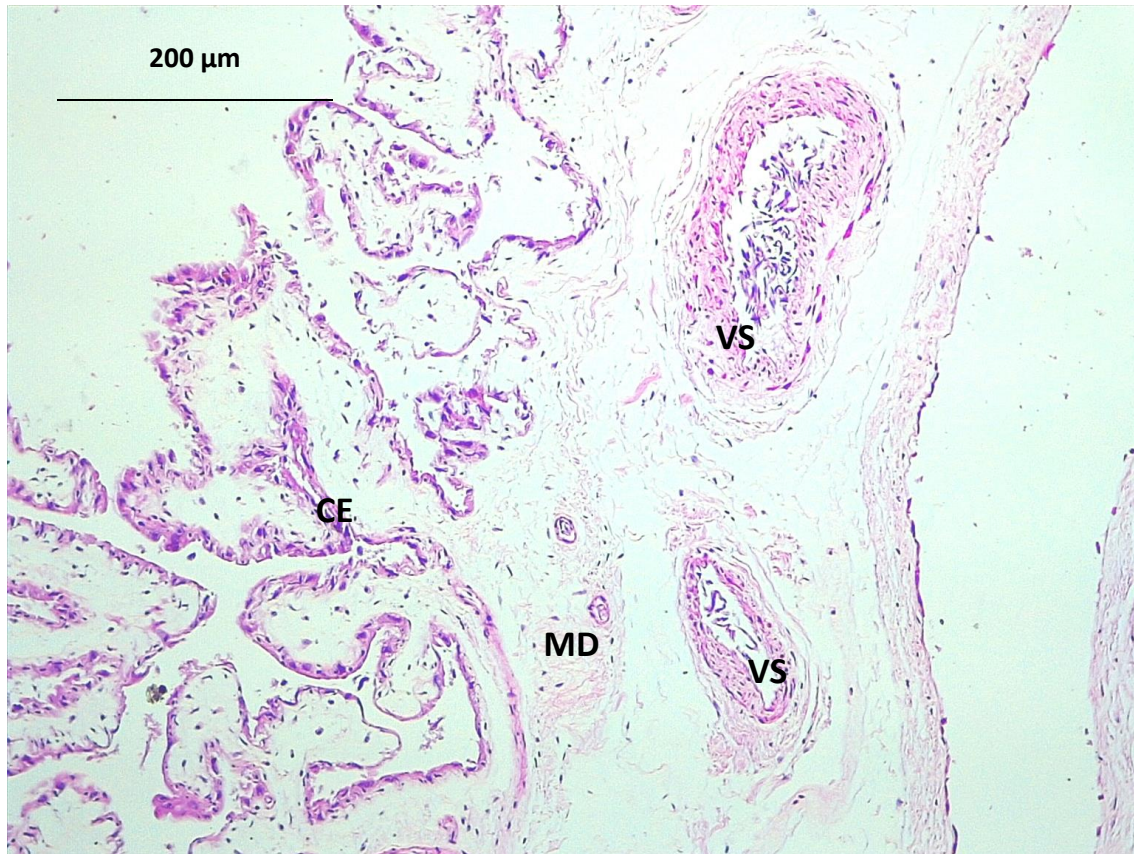


Figura 8. Fotomicrografia do alantoide de placenta de termo em alpaca. Observa-se uma camada de células colunares (CE), um mesênquima denso (MD) e a presença de vasos sanguíneos (VS) de maior calibre. Coloração HE 10x. Barra 200um.

5.1.3. Âmnio:

O âmnio era constituído por uma camada de células epiteliais planas simples, mas que poderiam ser poligonais, aparecendo também algumas áreas de multicamadas celulares (Figura 9). Sob essa camada, foi encontrado uma membrana basal e um denso mesênquima avascular contendo tecido conjuntivo reticular, revestido por uma camada de fibroblastos (Figura 10).



Figura 9. Fotomicrografia do Âmnio de placenta de termo em alpaca. Presença de multicamadas de células epiteliais. Coloração HE 40x. Barra 50um.

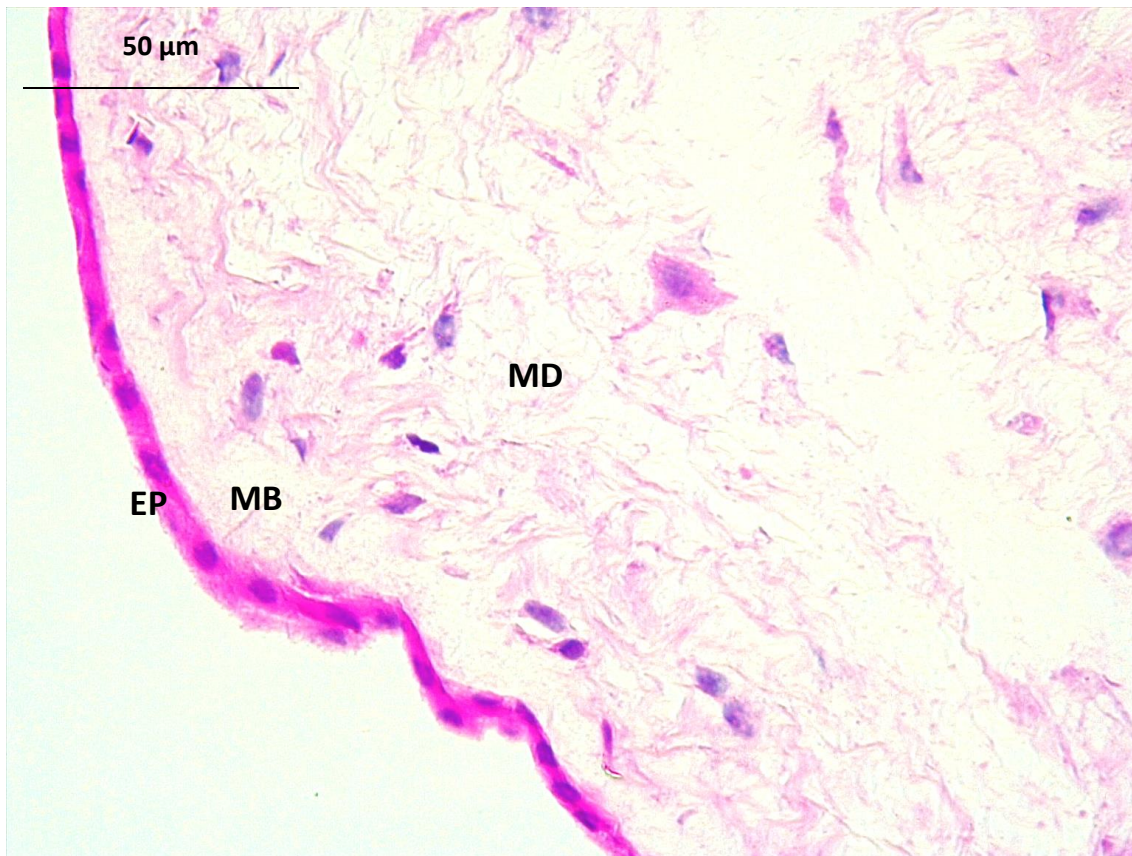


Figura 10. Fotomicrografia de Âmnio de placenta de termo em alpaca. Camada de epitélio plana simples (EP); Membrana basal de tecido conjuntivo reticular (MB); Mesênquima avascular denso (MD) com presença de muitos fibroblastos. Coloração HE 40x. Barra 50um.

A coloração de Tricrômico de Masson permitiu visualizar claramente as fibras de colágeno tipo I, que formavam fibras ou feixes grossos, projetados para fornecer resistência principalmente ao mesênquima. Também foram verificadas, em menor grau, fibras reticulares. O âmnio apresentava maior quantidade de fibras colágenas. (Figura 11 e 12).

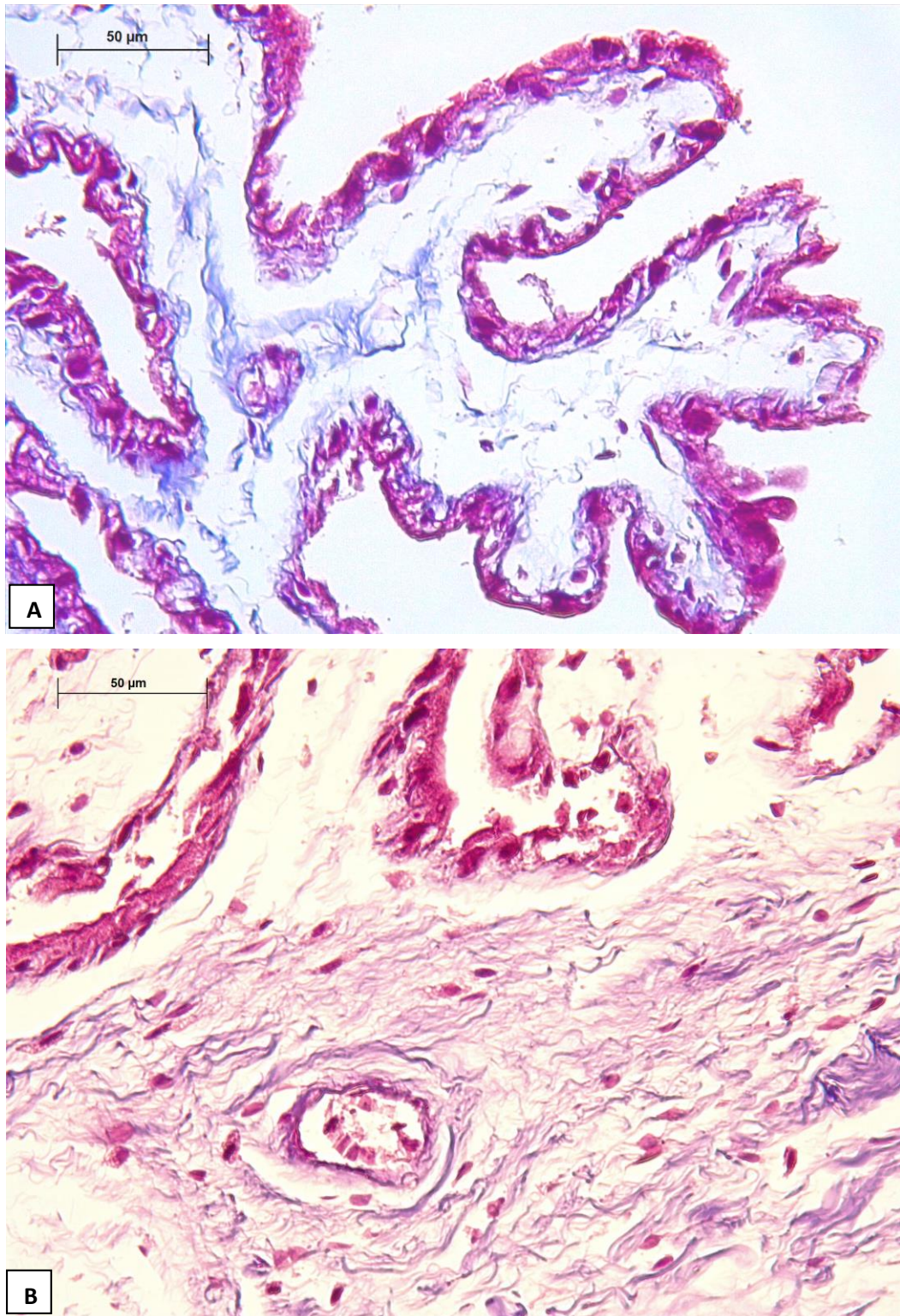


Figura 11. Fotomicrografia da placenta a termo de alpaca. A. Observa-se no córion e no alantoide, o epitélio e a camada muscular dos vasos sanguíneos coloridos em rosa intenso, sendo as fibras colágenas coradas em azul. Coloração TM 10x. Barra 200um. B. Observa-se no mesênquima a presença de muitas fibras colágenas coradas de azul, assim como os fibroblastos e alguns glóbulos vermelhos coloridos em rosa. Coloração TM 40x. Barra 50um.

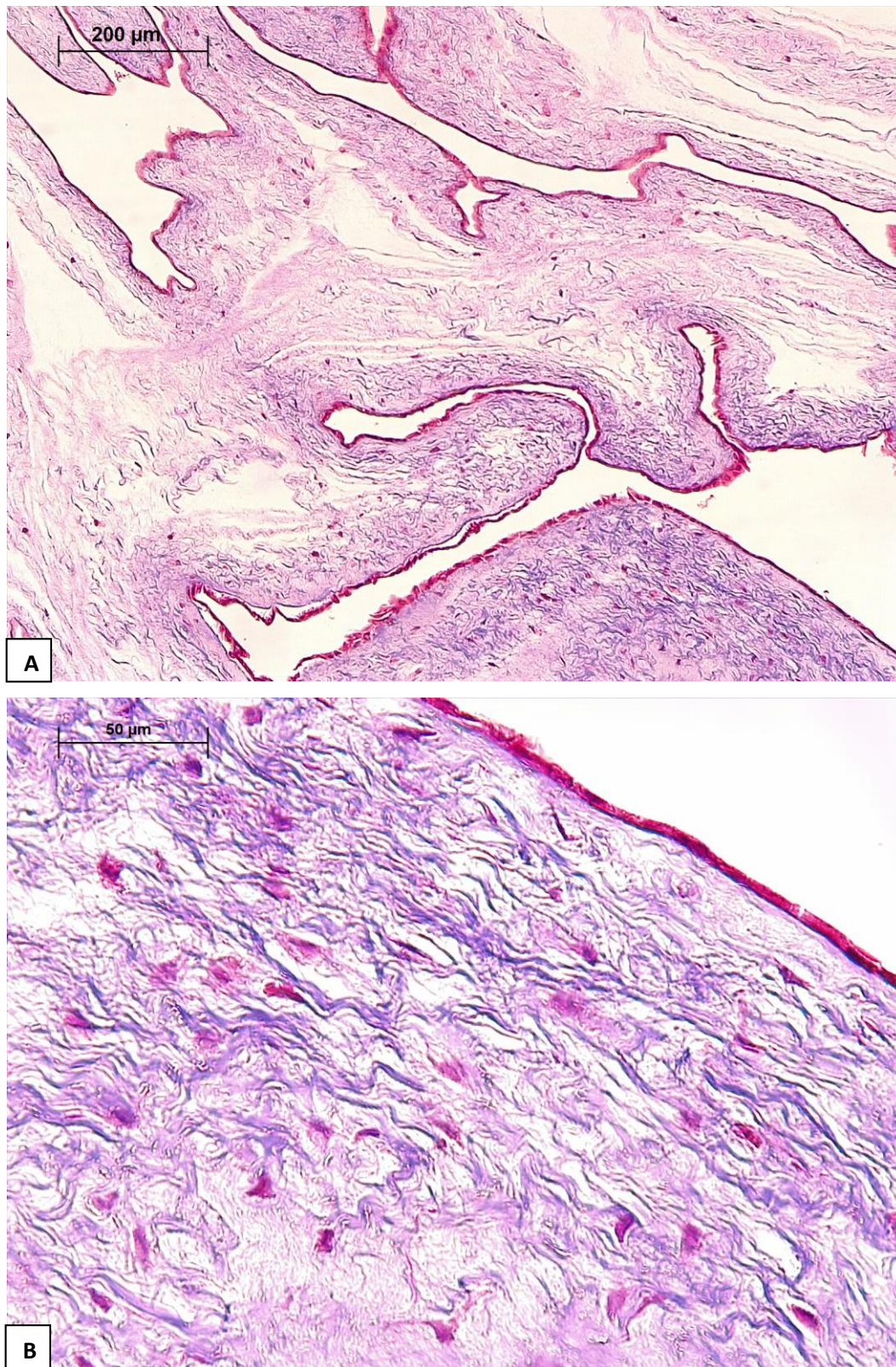


Figura 12. Fotomicrografia de Âmnio de placenta de termo em alpaca. A. Observa-se a abundância de fibras colágenas de cor azul com a presença de muitos fibroblastos assim como presença de fibras reticulares. Coloração TM 10x. Barra 200um. B. Observa-se o epitélio e os fibroblastos coloridos em rosa intenso, as fibras colágenas em azul e as fibras reticulares em rosa. Coloração TM 40x. Barra 50um.

A técnica de Picosirius Red por ser uma coloração seletiva de tecido conjuntivo permitiu a marcação de fibras colágenas e diferenciação tecidual dos tipos de colágenos tipo I e III (Figura 13)

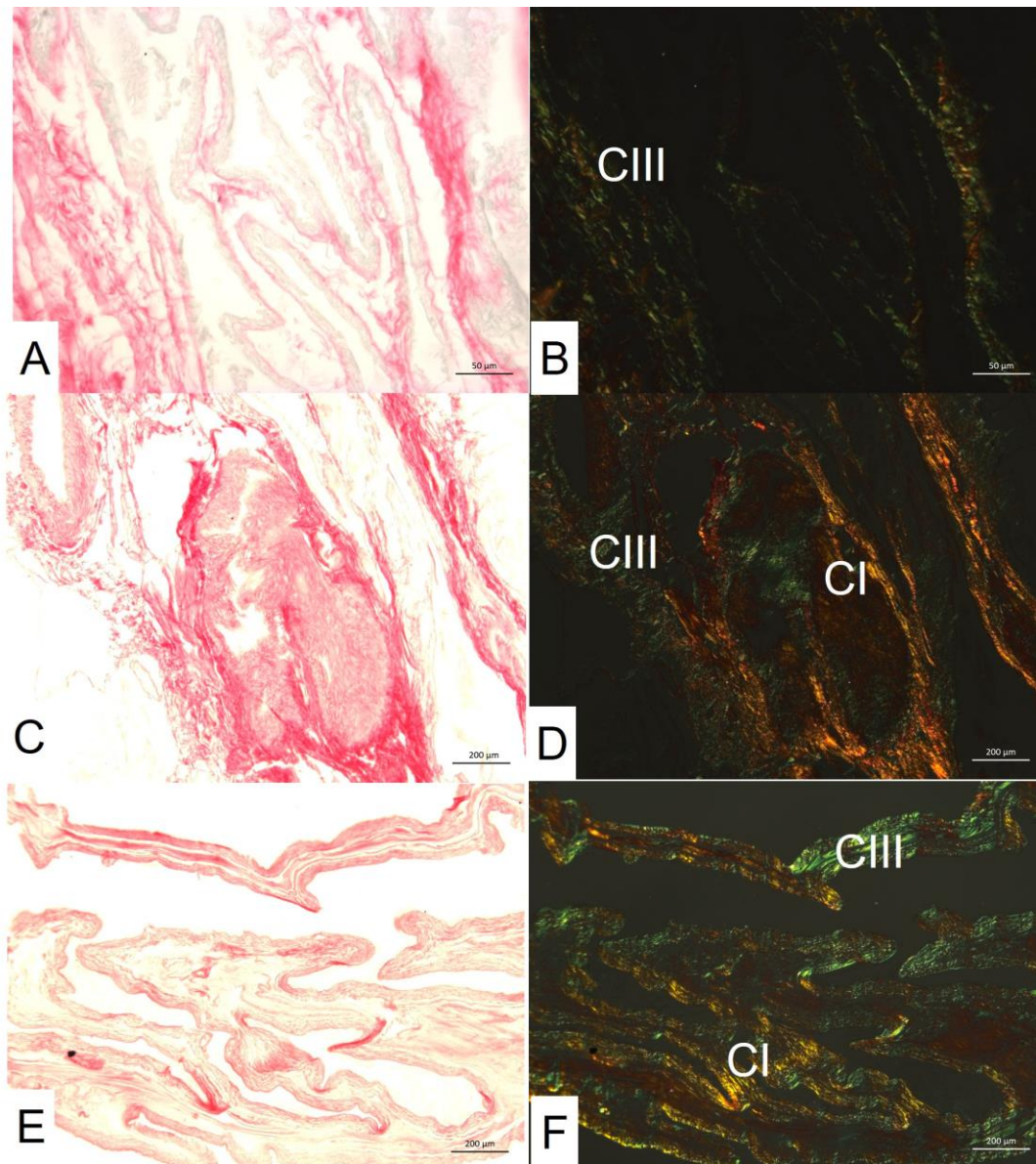


Figura 13. Fotomicrografia de placenta a termo de alpaca. A. B. Observa-se escassas fibras colágenas tipo III (CIII) no córion. Coloração Picosirius Red 40x. Barra 50um. C.D. Observa-se maior presença de fibras colágenas tipo I (CI) e tipo III (CIII) no alantoides. Coloração Picosirius Red 10x. Barra 200um. E.F. Observa-se maior presença de fibras colágenas tipo I (CI) e tipo III (CIII) no âmnio, as quais estavam entrelaçados. Coloração Picosirius Red 10x. Barra 200um.

5.2. ESTUDO ULTRA ESTRUTURAL DA PLACENTA DE ALPACA

5.2.1. *Córion*

Usando a microscopia eletrônica de varredura, o córion demonstrou ter projeções coriônicas, recobertas com células de diferentes formatos e contato próximo entre elas. Microvilosidades foram observadas no topo dessas projeções assim como vasos sanguíneos. As fibras colágenas observadas neste tecido eram muito escassas e dispersas. (Figura 14, 15 e 16).

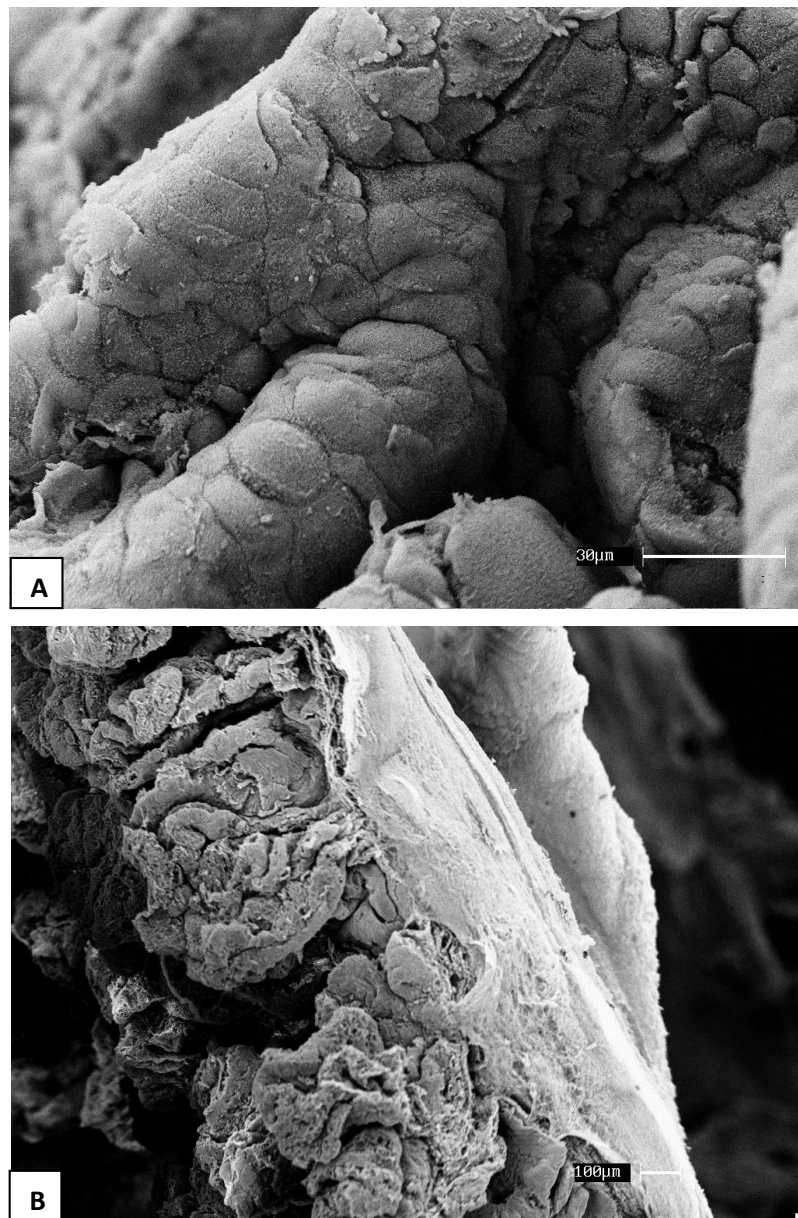


Figura 14. Eletromicrografia de varredura. A. No córion de placenta de alpaca, observam-se diferentes formatos celulares entre poliédricas e cúbicas nas projeções coriônicas. Barra: 30µm. B. Vista transversal do córion, com as projeções coriônicas dispostas de maneira pregada e com escassas fibras colágenas. Barra: 100µm.

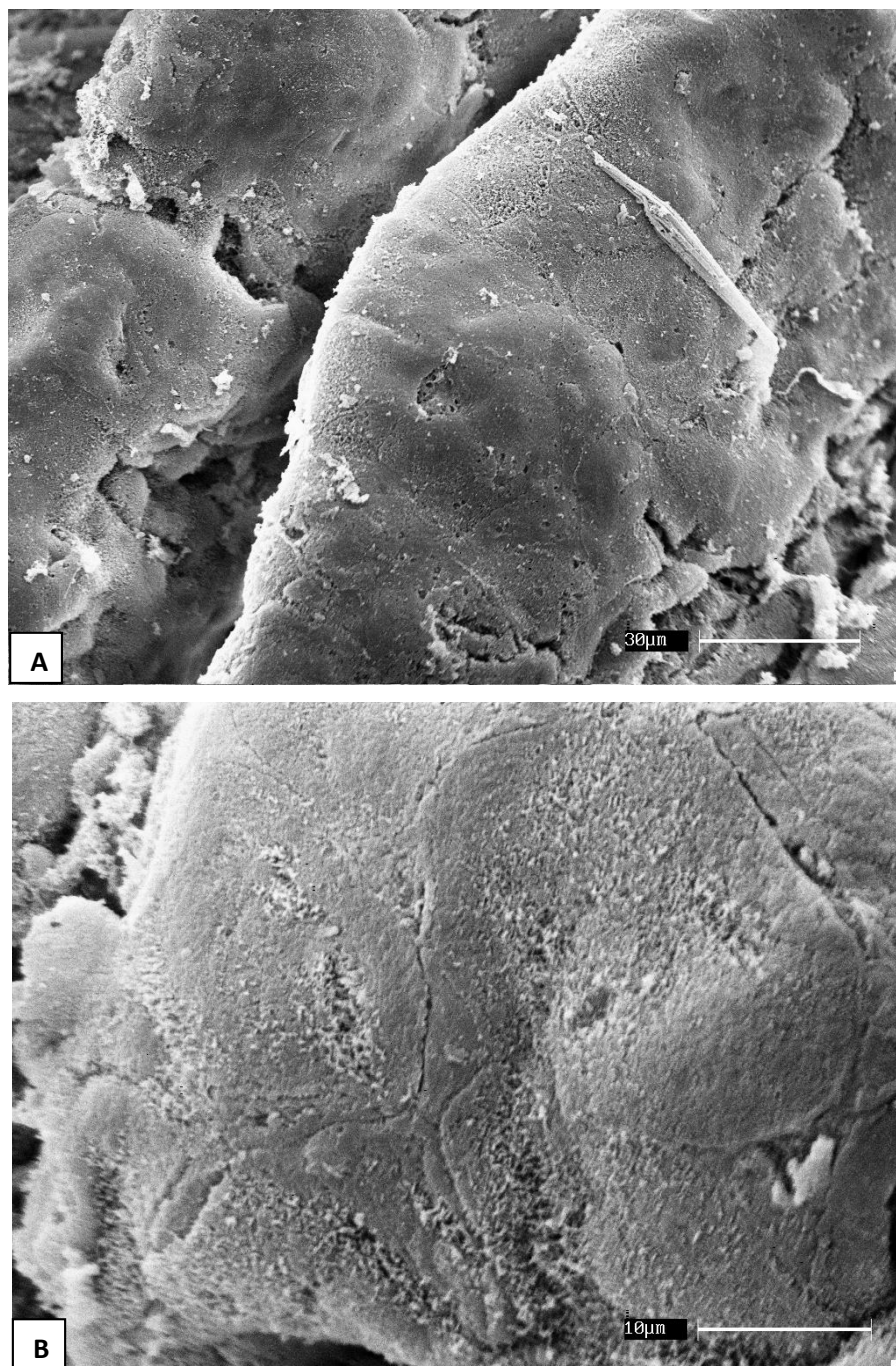


Figura 15. Eletromicrografia de varredura. A. Presença de pequenos vasos sanguíneos nas projeções coriônicas. Barra: 30µm. B. Microvilosidades foram observadas na superfície das projeções coriônicas. Barra: 10µm.

5.2.2. *Alantoide*

Ao microscópio eletrônico de varredura, a superfície do alantoide pela vista fetal, demonstrou a camada portadora de superfície irregular e algumas áreas pregadas. Células de formato poliédrico unidas entre elas, apoiadas sobre um mesênquima rico em fibras colágenas, foram igualmente observadas. Numerosas microvilosidades eram evidentes na superfície dando uma aparência de toalha felpuda (Figura 16 e 17).

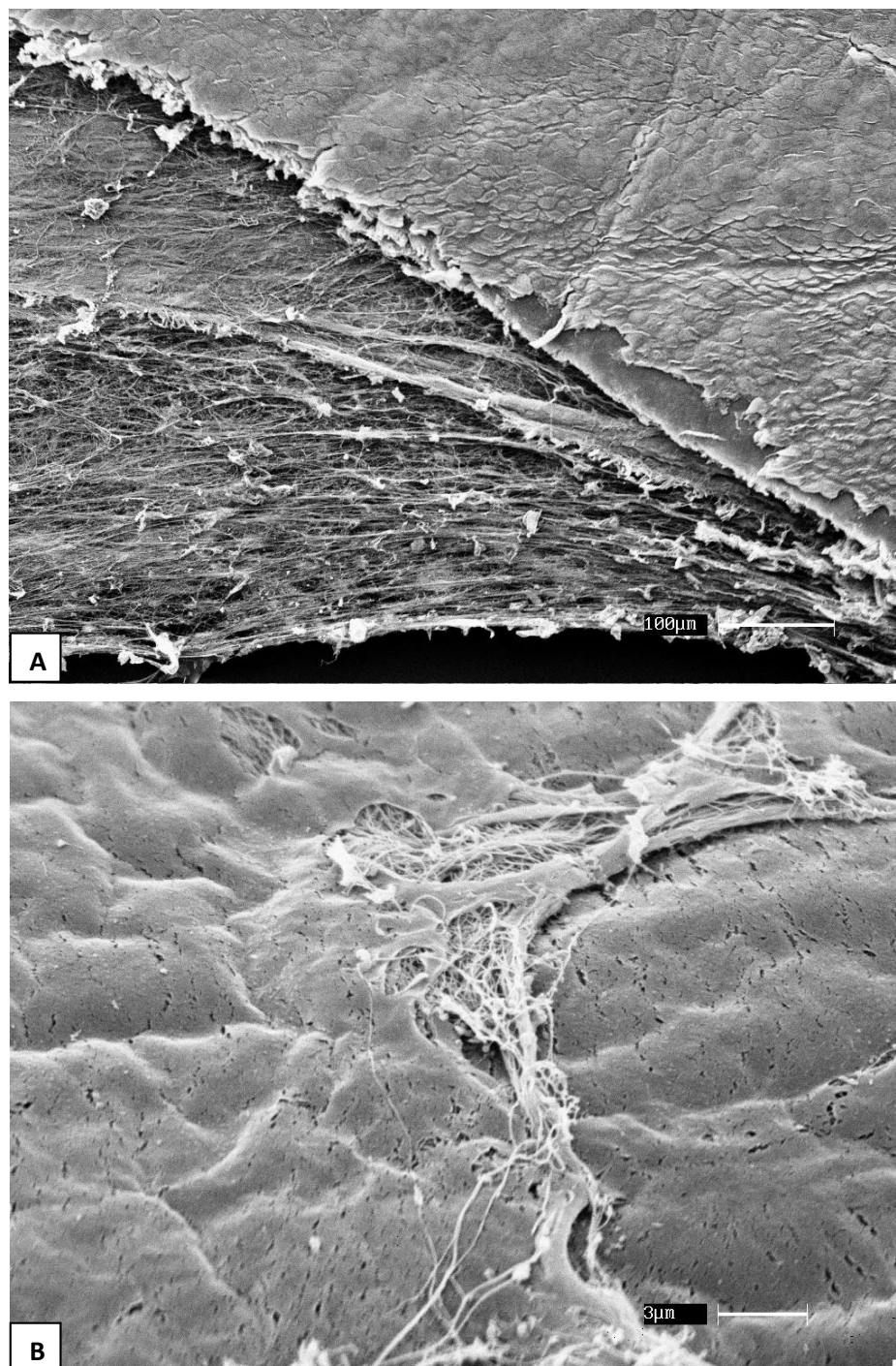


Figura 16. Eletromicrografia de varredura. A. Alantoide de placenta a termo de alpaca. Observe-se uma camada de células de forma poligonais com certas elevações, disposta sobre uma camada de mesênquima com muitas fibras colágenas. Barra: 100 μ m. B. Observe elevações na superfície da alantoide e presença de fibras colágenas. Barra: 3 μ m.

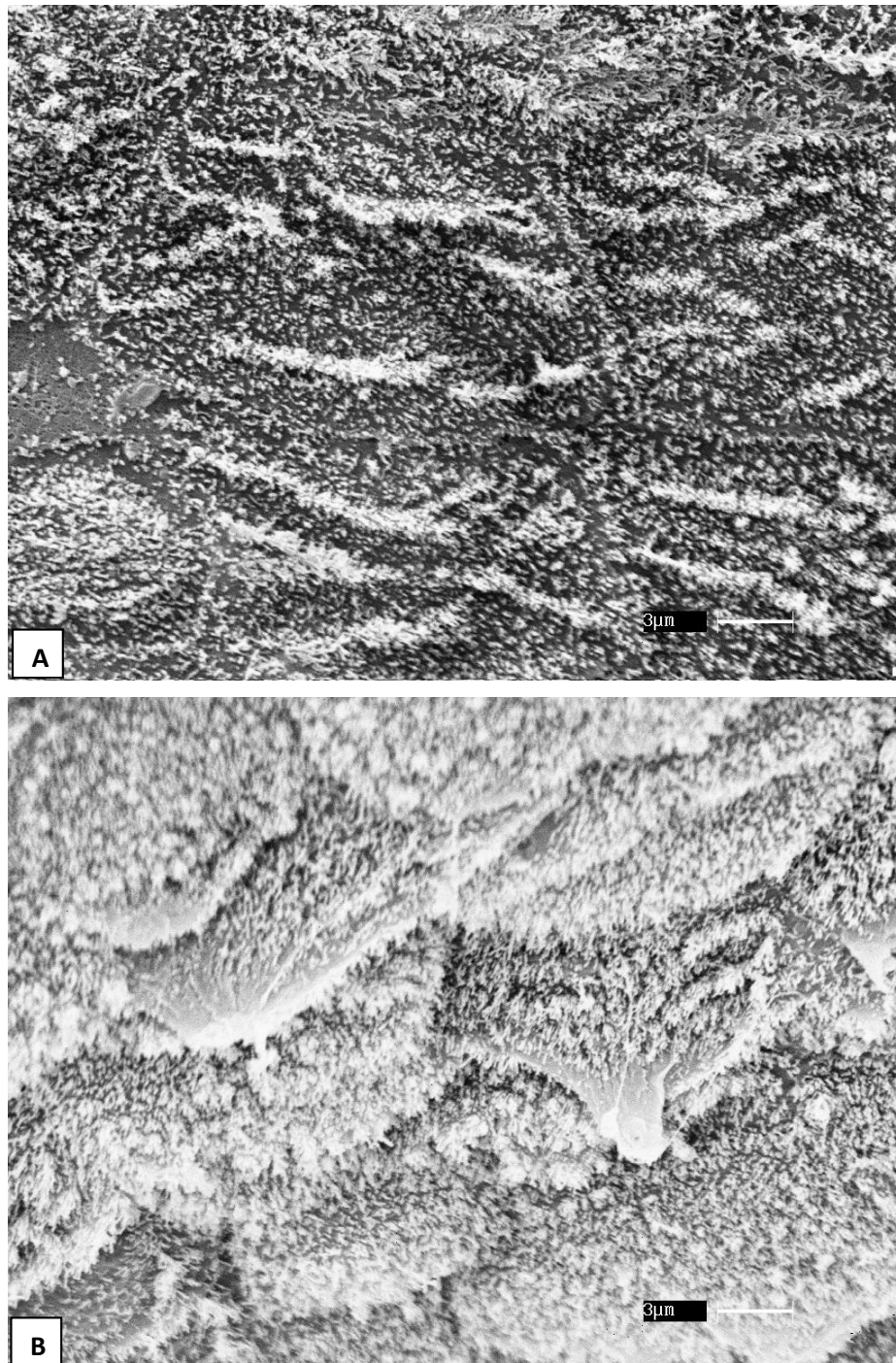


Figura 17. Eletromicrografia de varredura. A. e B. Alantoide de placenta de termo em alpaca, observe a presença de numerosos microvilosidades na superfície dando aparência de toalha felpuda. Barra: 3µm.

5.2.3. Âmnio

O âmnio examinado pelo microscópio eletrônico de varredura, demonstrou apresentar um epitélio plano constituído pelos amniócitos, e um mesênquima com numerosas fibras colágenas, maior que o alantoide. A semelhança das outras membranas fetais, o âmnio apresentou microvilosidades na sua superfície (Figuras 18 e 19).

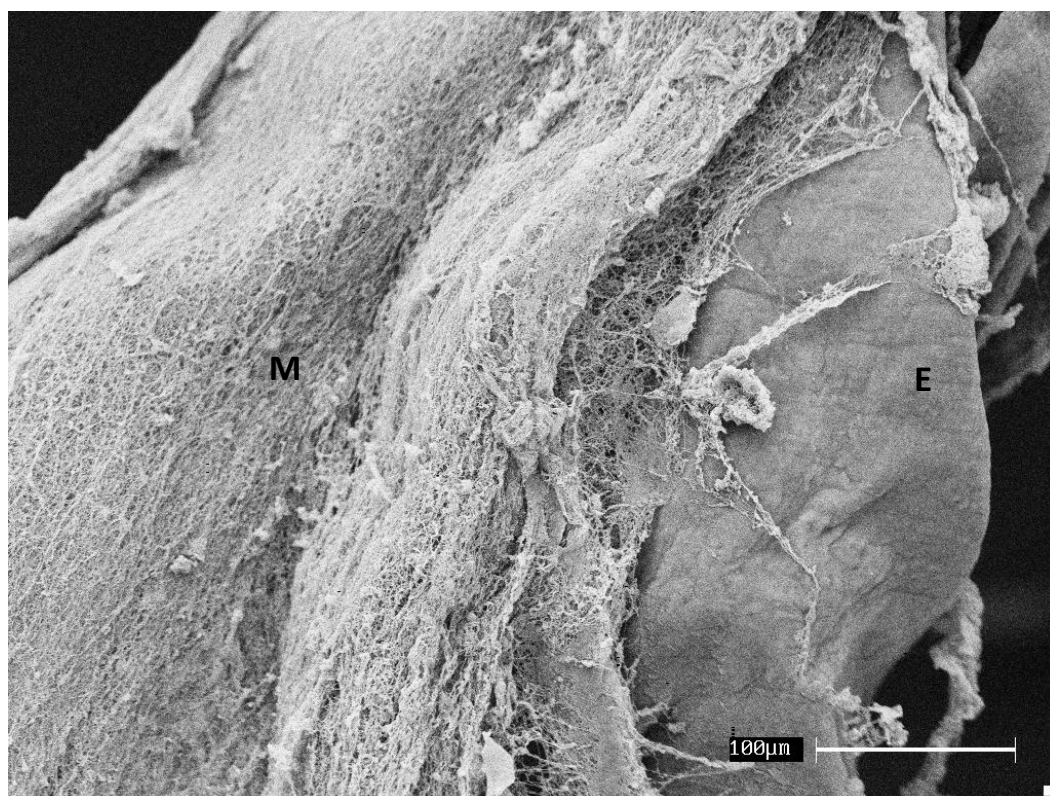


Figura 18. Eletromicrografia de varredura da vista transversal do âmnio. Observa-se o epitélio plano (E) e uma camada de mesênquima (M) denso com numerosas fibras colágenas. Barra: 100um.

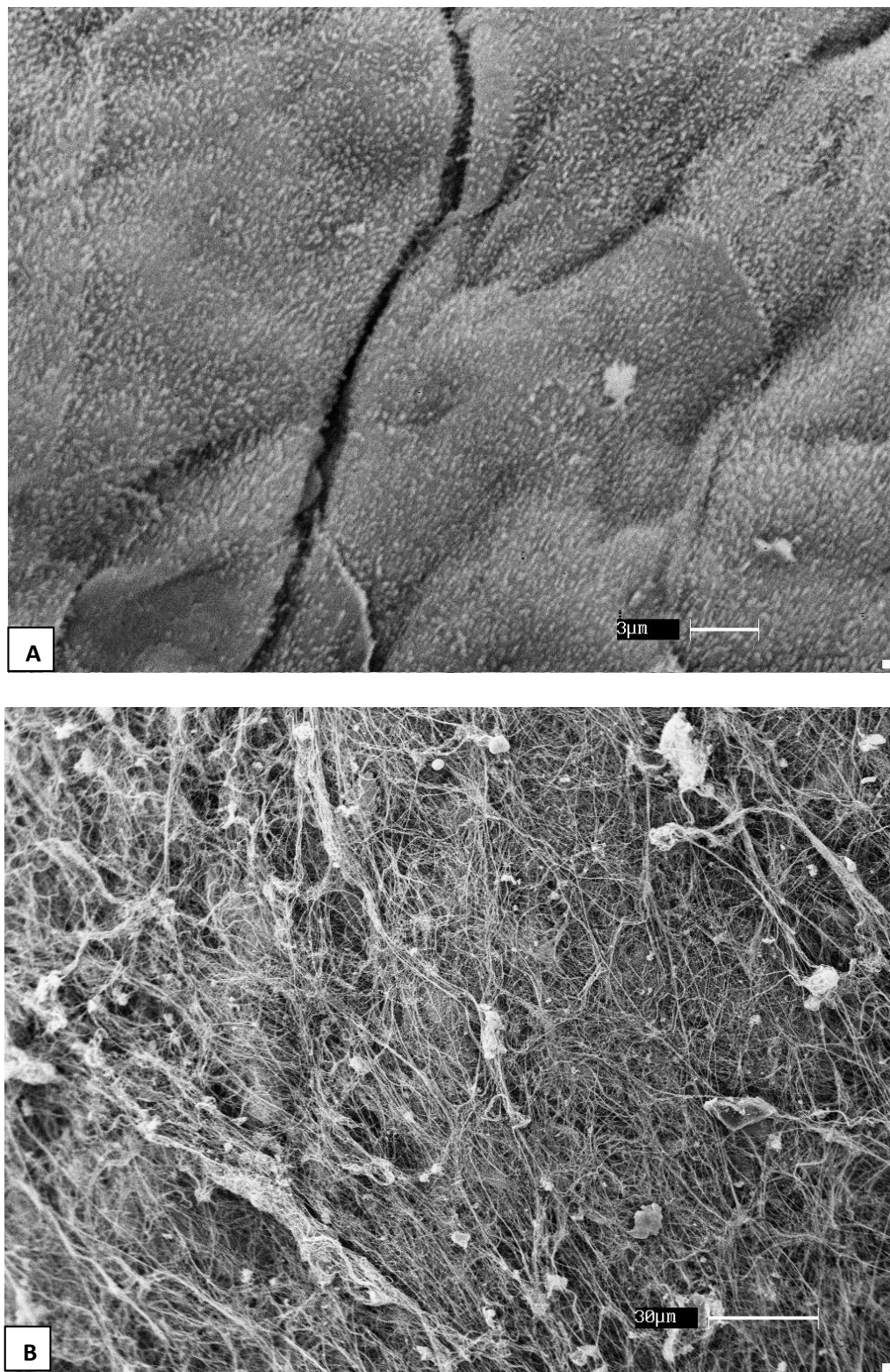


Figura 19. Eletromicrografia de varredura. A. Epitélio do âmnio apresentando microvilosidades. Barra: 3µm. B. Numerosas fibras colágenas constituem o mesênquima do âmnio. Barra: 30µm.

5.3. ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

Detectou-se a marcação de anticorpos para selênio com variada intensidade, denotada por uma coloração marrom, em alguns capilares sanguíneos das vilosidades coriônicas e em seus conteúdos. Essas vilosidades coriônicas se apresentavam curtas, podendo ser as projeções do córion que se relacionavam com as aréolas maternas. O córion é a camada fetal da placenta que mantinha contato com o útero materno.

Foi demonstrada a transferência placentária de selênio da mãe ao feto de alpaca de termo de gestação, principalmente como selenoproteínas, sendo selenoproteína P a mais consistente, quando comparada à selenoproteína N.

O selênio também foi detectado como glutathione peroxidase, indicando que mediante a transferência placentária, o feto recebe antioxidantes que protegem seu desenvolvimento durante as trocas que ocorrem durante a gestação, evitando ou reduzindo o efeito dos peróxidos formados durante o metabolismo celular da prenhez.

A marcação de DIO-3 como iodotironina deiodinase, indicou que o selênio também participa do metabolismo de hormônios da tireoide, ao participar da atividade normal da glândula tireoide na conversão da tiroxina (T4) em sua forma ativa triiodotironina (T3). Portanto, durante o desenvolvimento e crescimento do feto de alpaca.

Os resultados do estudo imunohistoquímico na placenta de alpaca de termo de gestação sugere que há transferência placentária do selênio da mãe ao feto (Figuras 20-23)

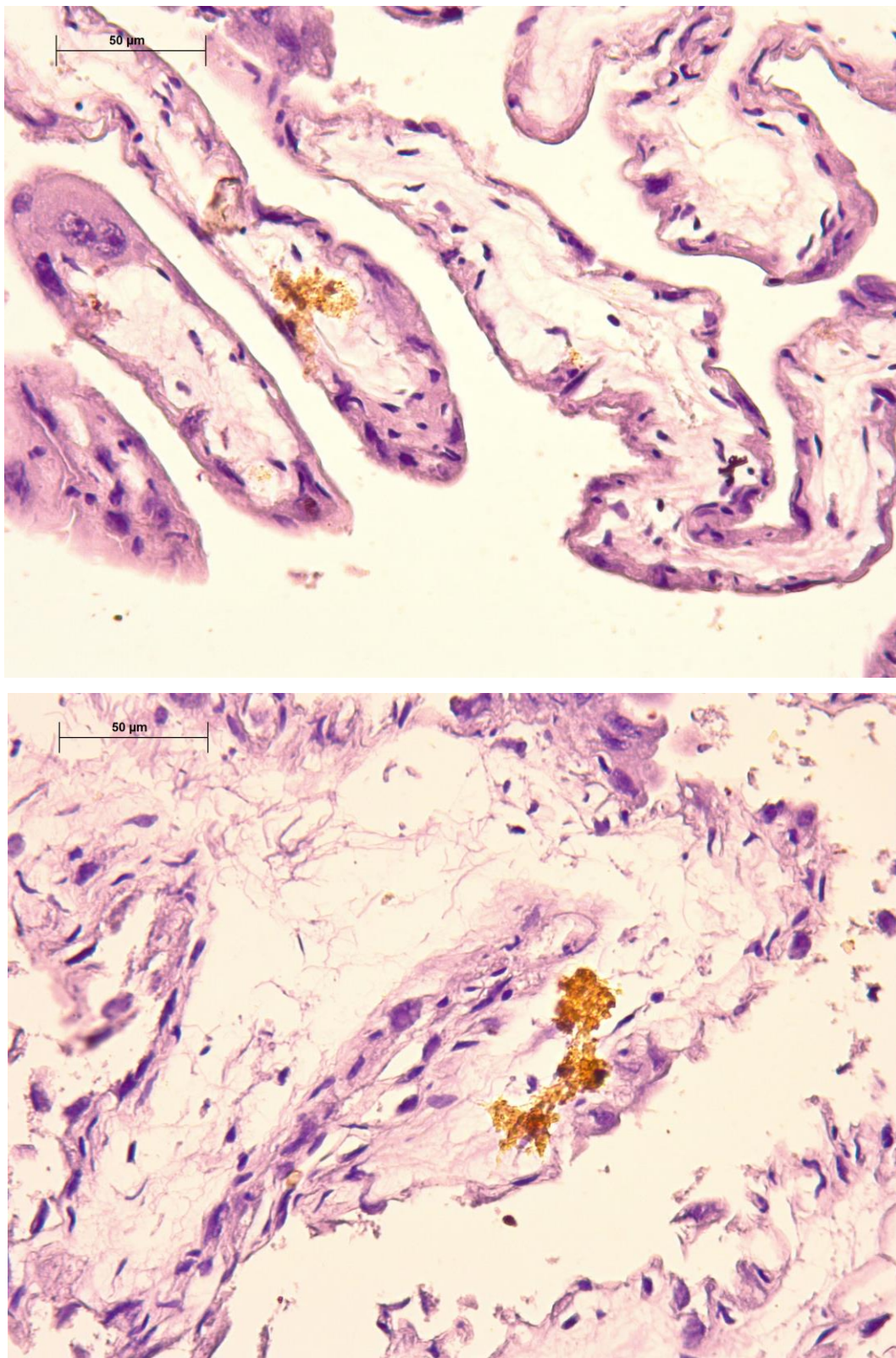


Figura 20. Marcação com anticorpo Selenoprotein P. Observe-se a marcação forte no conteúdo de alguns capilares sanguíneos no córion na placenta de alpaca. Barra 50um.

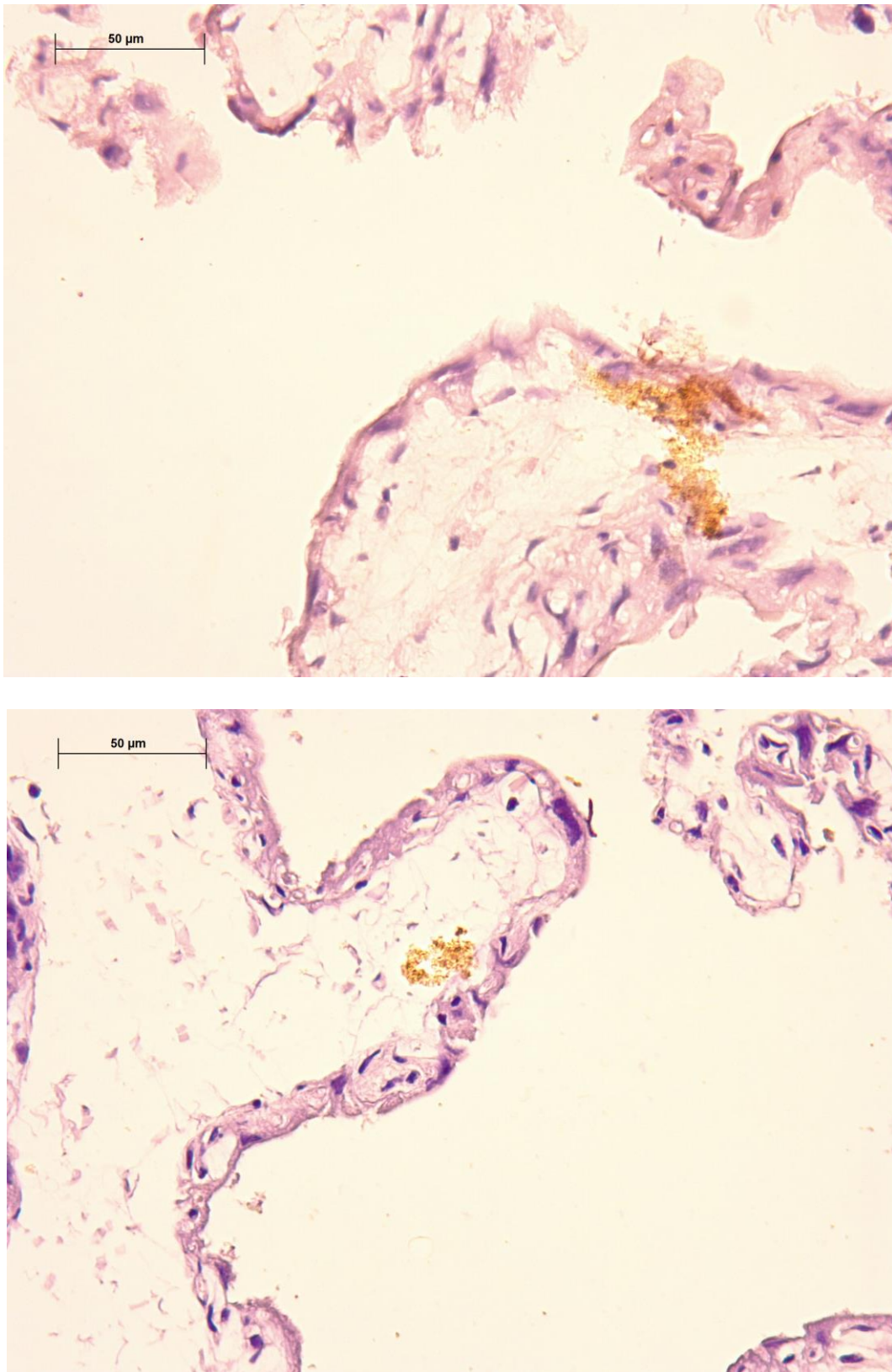


Figura 21. Marcação com anticorpo Selenoprotein N. Observe-se a marcação forte no conteúdo dos capilares sanguíneos no córion na placenta de alpaca. Barra 50um.

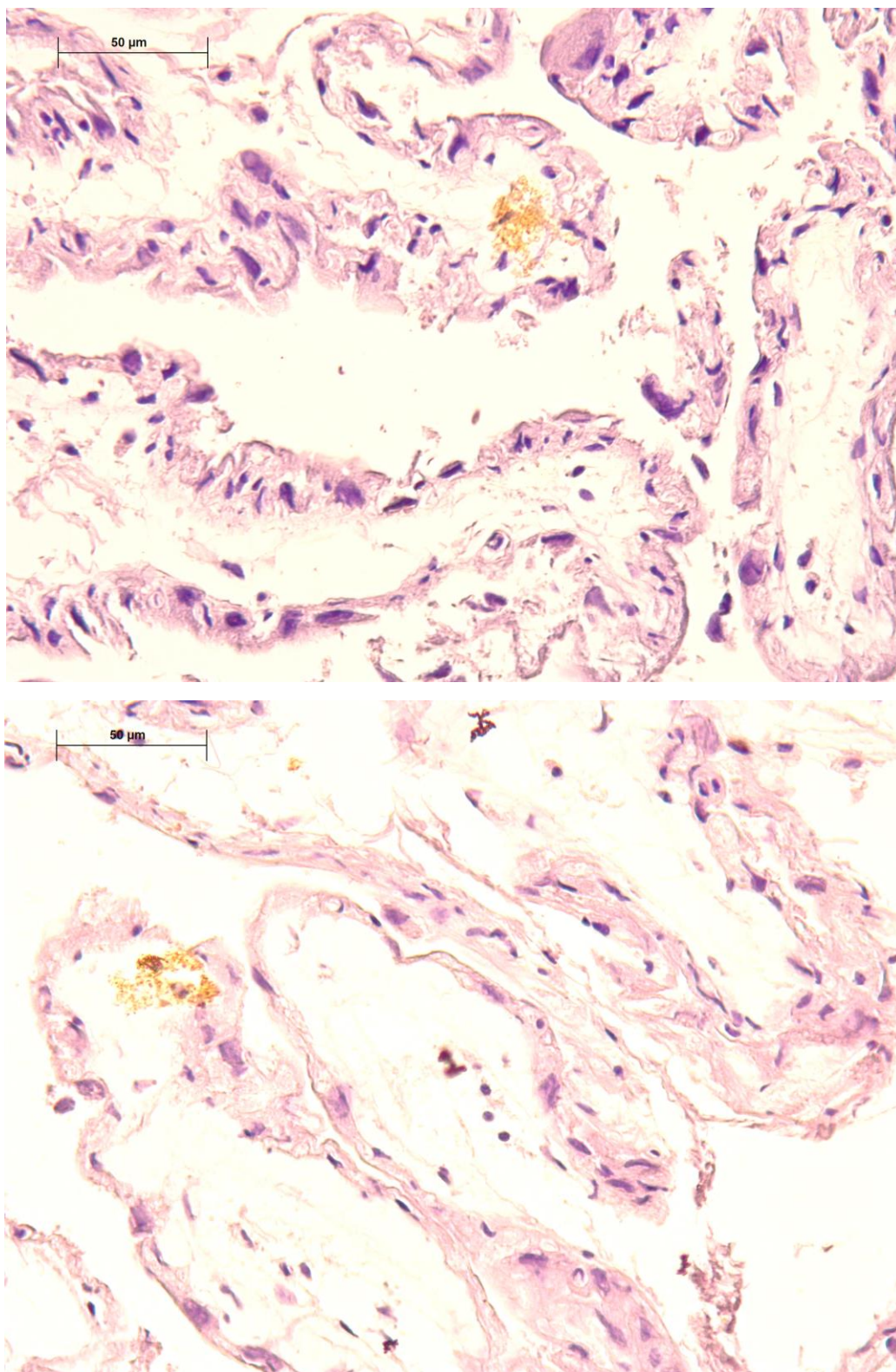


Figura 22. Marcação com anticorpo GPx3. Observe-se a marcação débil no conteúdo dos capilares sanguíneos do córion na placenta de alpaca. Barra 50um.

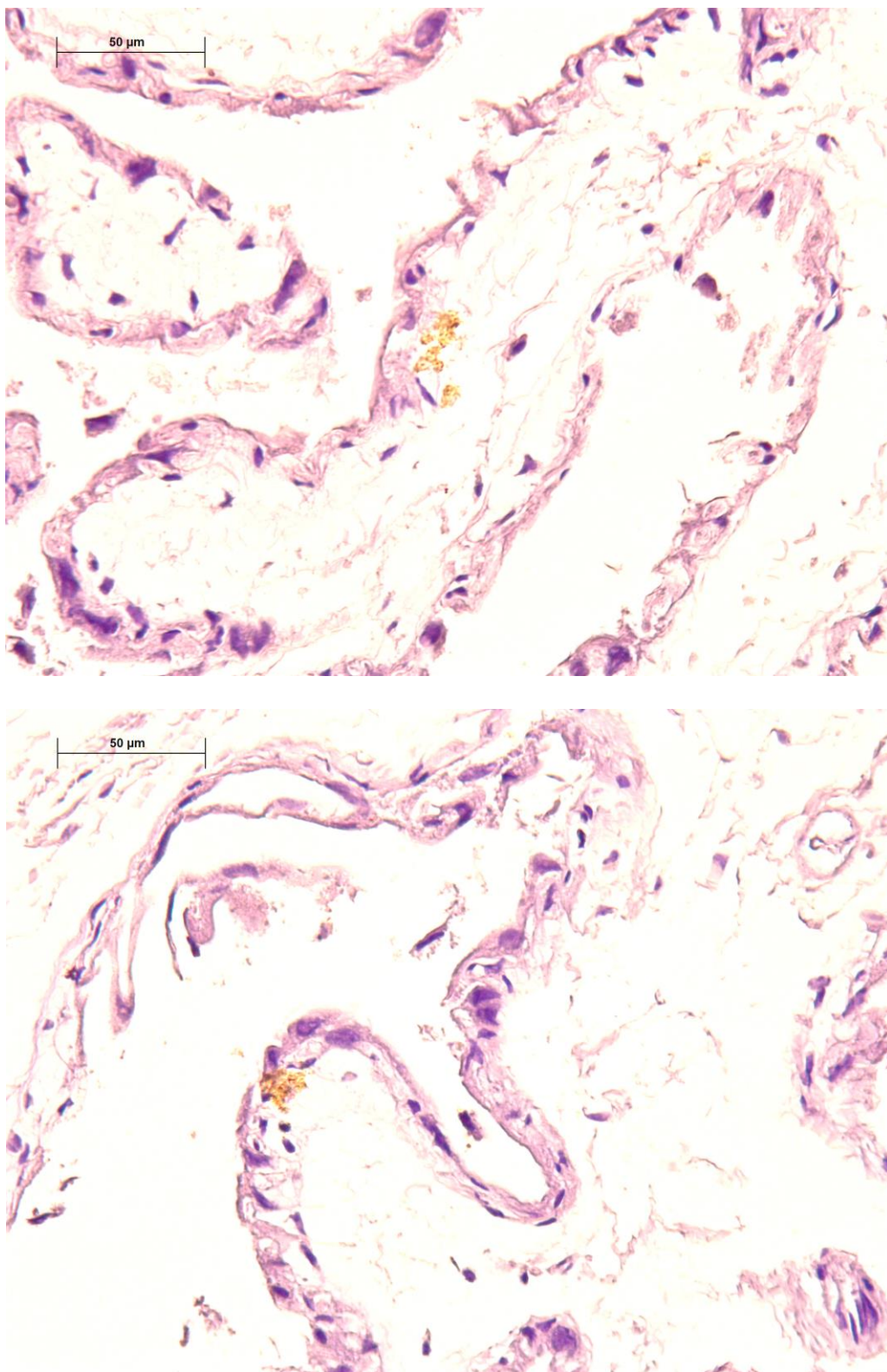


Figura 23. Marcação com anticorpo DIO3. Observe-se a marcação débil no conteúdo dos capilares sanguíneos do córion na placenta de alpaca. Barra 50um.

5.4. ESTUDO LECTINHISTOQUIMICO

Foi avaliada a expressão dos glicoconjugados no corioalantoide e âmnio da placenta de termo de alpaca.

Tabela 5. Avaliação da expressão de lectina em placenta de termo de alpaca.

Lectina	Marcação Corioalantoide		Marcação Âmnio	
	Escala	Local de Marcação	Escala	Local de Marcação
Con A	++/+++	Citoplasma das células trofoblásticas	++/+++	Citoplasma das células epiteliais e mesênquima
SBA	++	Glicocálix Superfície das células trofoblásticas	++/+++	Citoplasma das células epiteliais e mesênquima
WGA	+++	Citoplasma das células trofoblásticas	++/+++	Citoplasma das células epiteliais e mesênquima
DBA	+	Citoplasma das células trofoblásticas	+	Citoplasma das células epiteliais e mesênquima
UEA I	-/+	Citoplasma das células trofoblásticas	+	Citoplasma das células epiteliais
RCA ₁₂₀	+++	Citoplasma das células trofoblásticas	++/+++	Citoplasma das células epiteliais e mesênquima
PNA	+ / ++	Glicocálix Superfície das células trofoblásticas	+ / ++	Glicocálix Superfície das células epiteliais
GSL I	++	Citoplasma das células trofoblásticas	+ / ++	Citoplasma das células epiteliais
PSA	+++	Citoplasma das células trofoblásticas e endotélio dos vasos sanguíneos do mesênquima	+++	Citoplasma das células epiteliais e mesênquima

LCA	++/+++	Citoplasma das células trofoblásticas	++/+++	Mesênquima
PHA-E	++/+++	Endotélio dos capilares sanguíneos do córion	++	Citoplasma das células epiteliais e mesênquima
PHA-L	++/+++	Endotélio dos capilares sanguíneos do córion	+	Citoplasma das células epiteliais e mesênquima
sWGA	++	Glicocálix Superfície das células trofoblásticas	++	Citoplasma das células epiteliais

Os resultados demonstram afinidade do corionalantoide e do âmnio da placenta de termo de alpaca por lectinas que se referem a componentes de carboidratos estruturais de galactose, glicose, manose e ácido siálico assim como N-acetilgalactosamina e N-acetilglicosamina, embora apresentem uma baixa afinidade pela fucose. Os capilares sanguíneos fetais demonstram afinidade por estruturas complexas bi e tri antenarias e manose (Figuras 24 - 35).

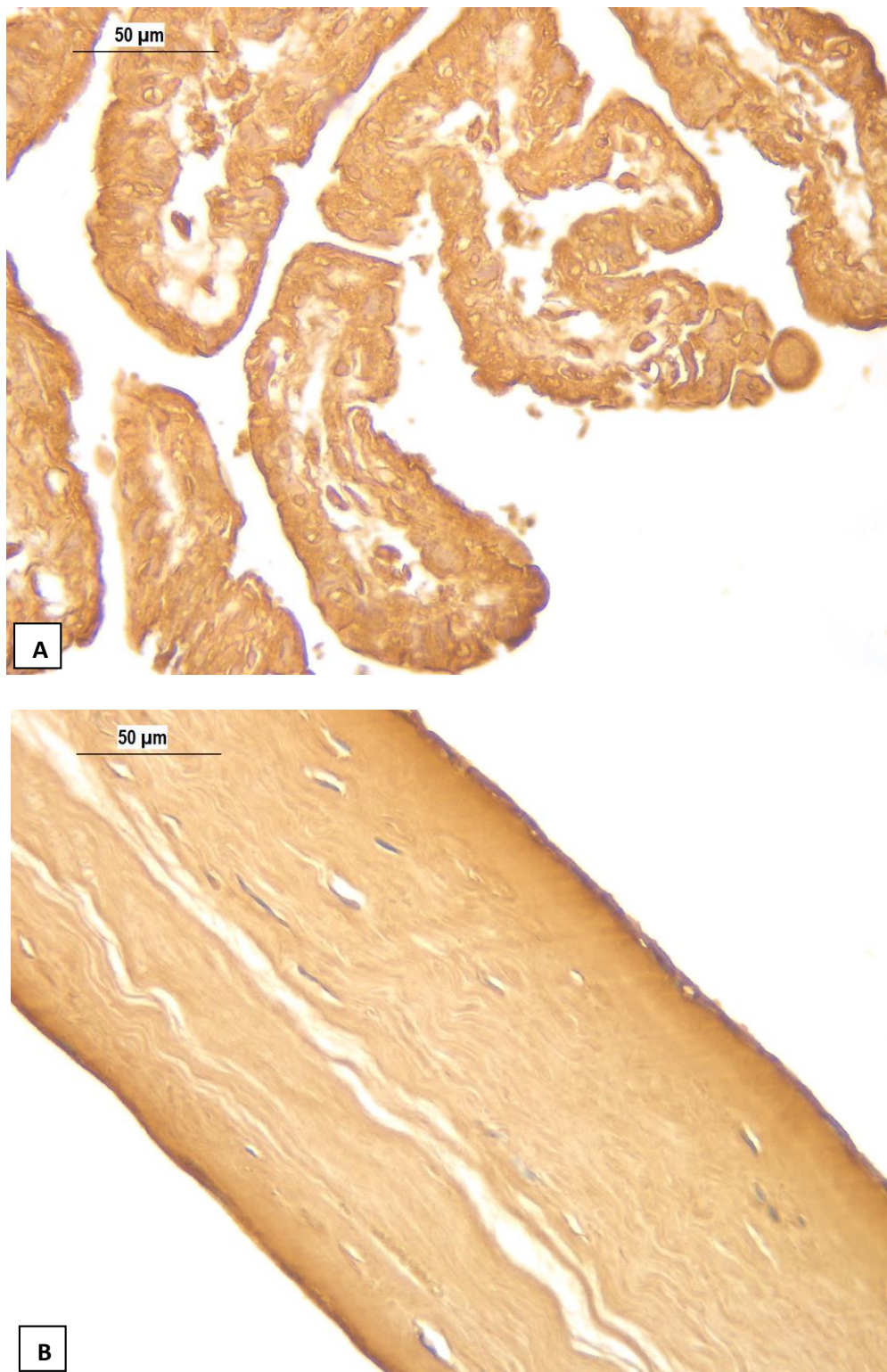


Figura 24. Expressão de glicose e resíduos de manose, pela lectina Con A. A. Marcação citoplasmática moderada a forte em córion de placenta de termo de alpaca. B. Marcação moderada a forte no epitélio e mesênquima do âmnio. Barra 50um.

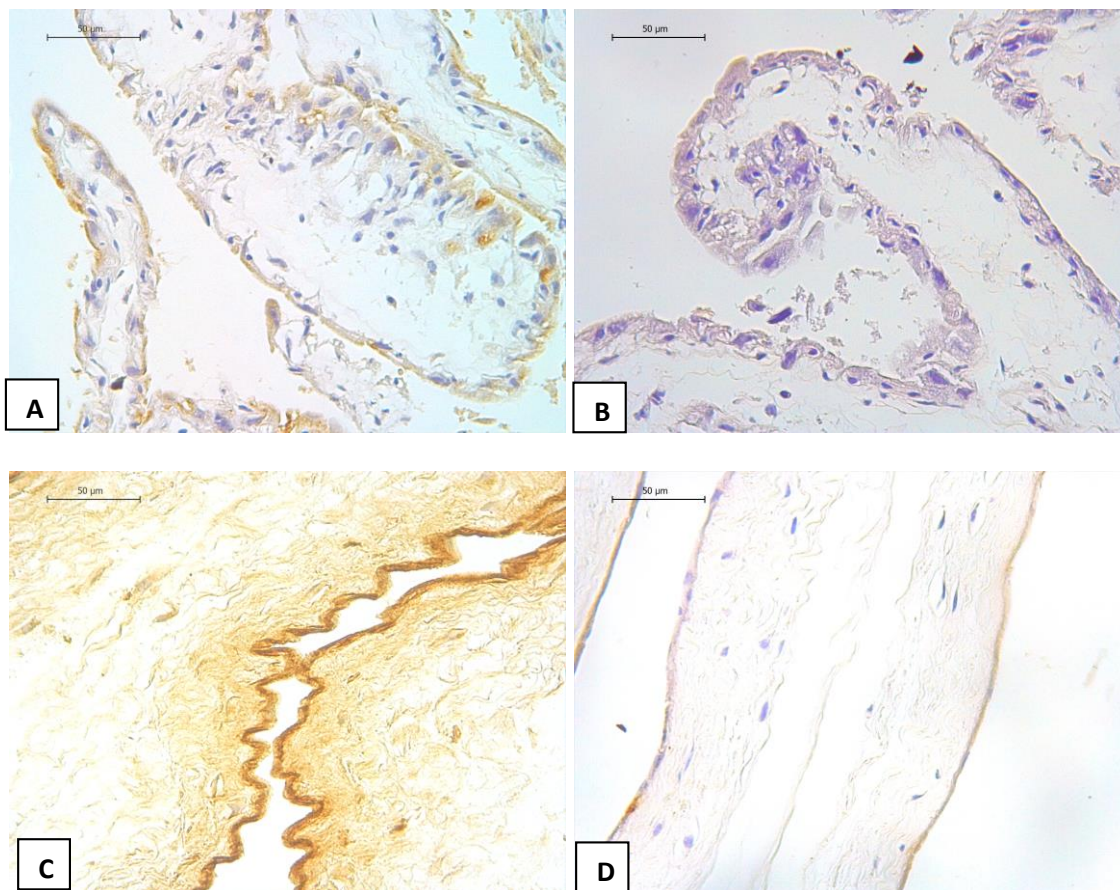


Figura 25. Expressão de α N-acetilgalactosamina, pelas lectinas SBA e DBA. A. Marcação moderada com SBA do glicocálix do córion da placenta de termo de alpaca B. Marcação débil com DBA no córion. C. Marcação forte no epitélio do âmnio e moderada no mesênquima com lectina SBA. D. Marcação débil do epitélio e mesênquima do âmnio com lectina DBA. Barra 50um.

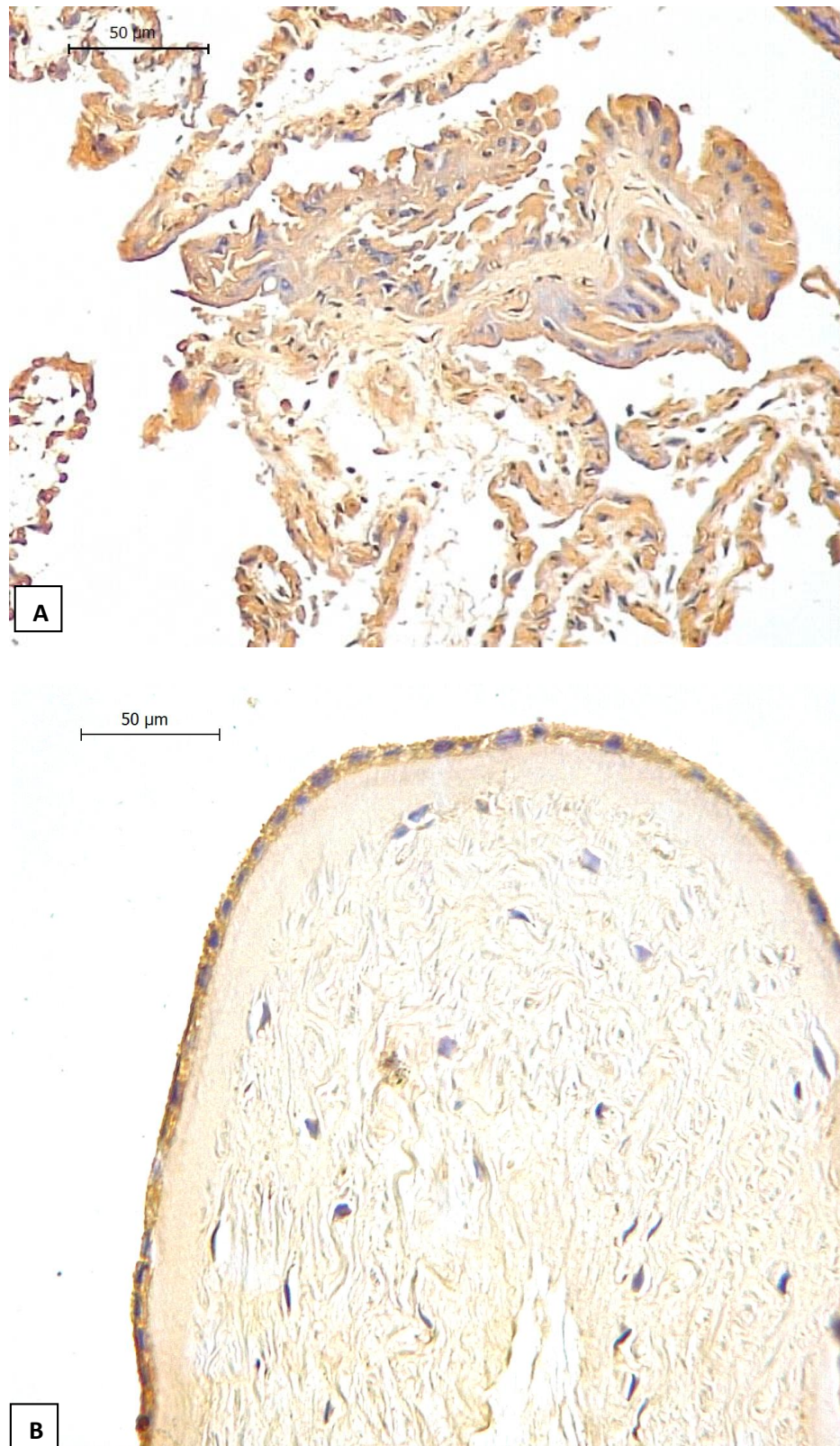


Figura 26. Expressão de β N-acetilglucosamina e resíduos de ácido siálico, por lectina WGA. A. Marcação citoplasmática forte da camada trofoblástica do córion da placenta de termo de alpaca. Barra 200 μ m. B. Marcação citoplasmática forte das células do epitélio plano simples do âmnio e marcação moderada no mesênquima. Barra 50 μ m.

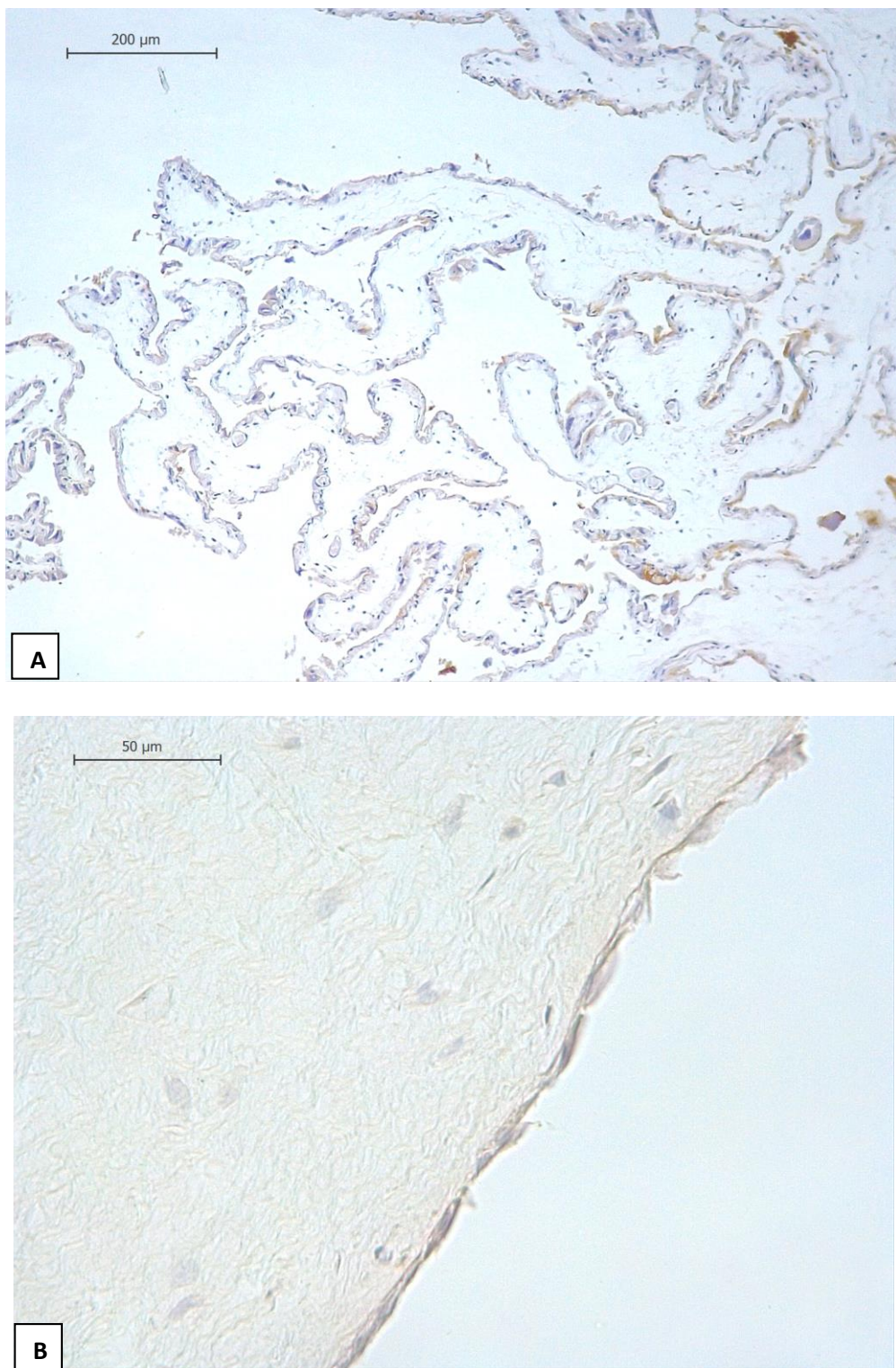


Figura 27. Expressão de Fucose, por lectina UEA-1. A. Débil marcação no córion da placenta de termo da alpaca (Barra 200um). B. Marcação débil no âmnio (Barra 50um).

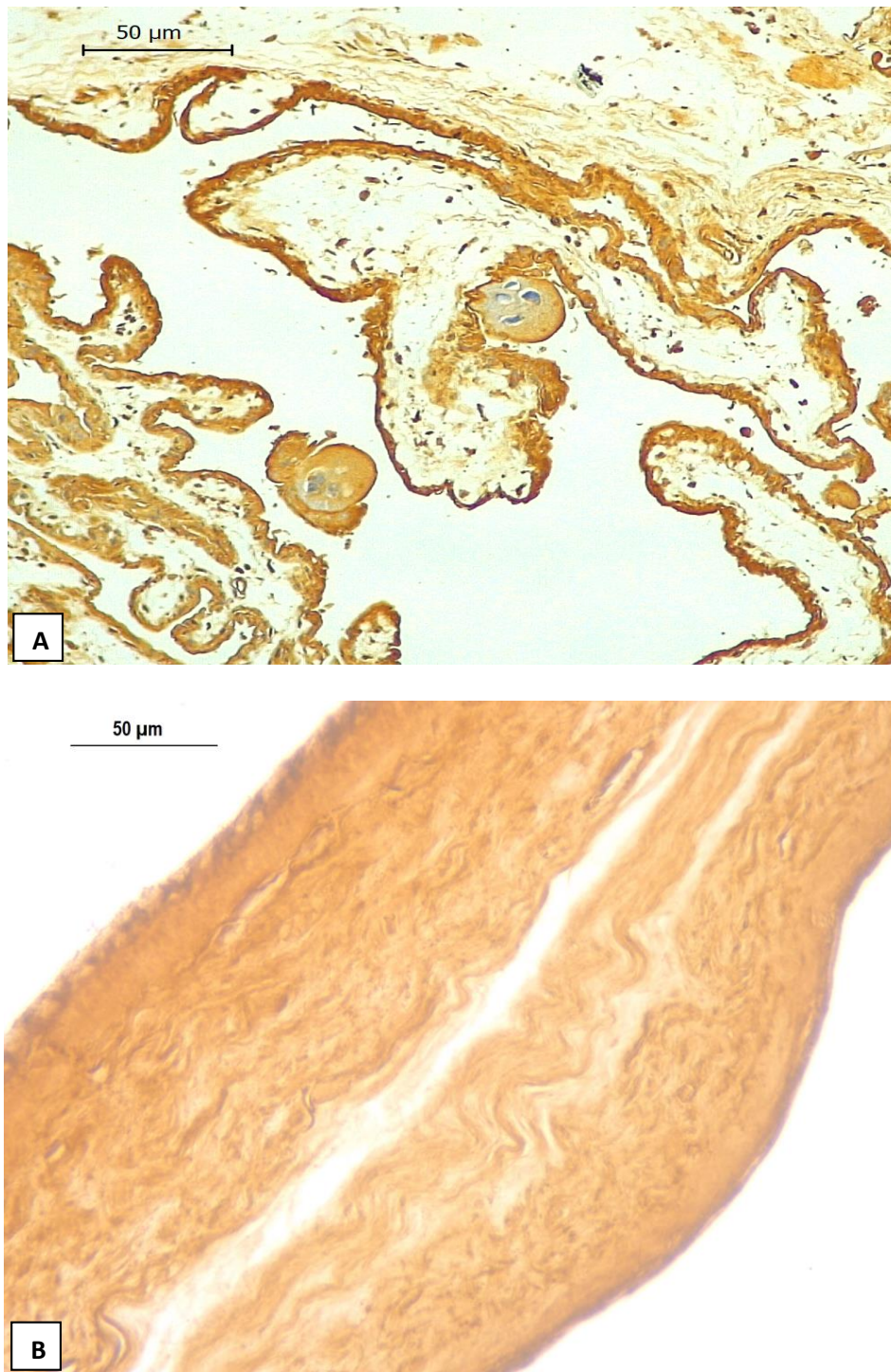


Figura 28. Expressão de galactose e β N-acetilgalactosamina, por lectina RCA₁₂₀. A. Marcação forte no córion da placenta de termo de alpaca e o citoplasma das células gigantes nas projeções coriônicas. B. Marcação moderada a forte no epitélio e mesênquima do âmnio. Barra 50um.

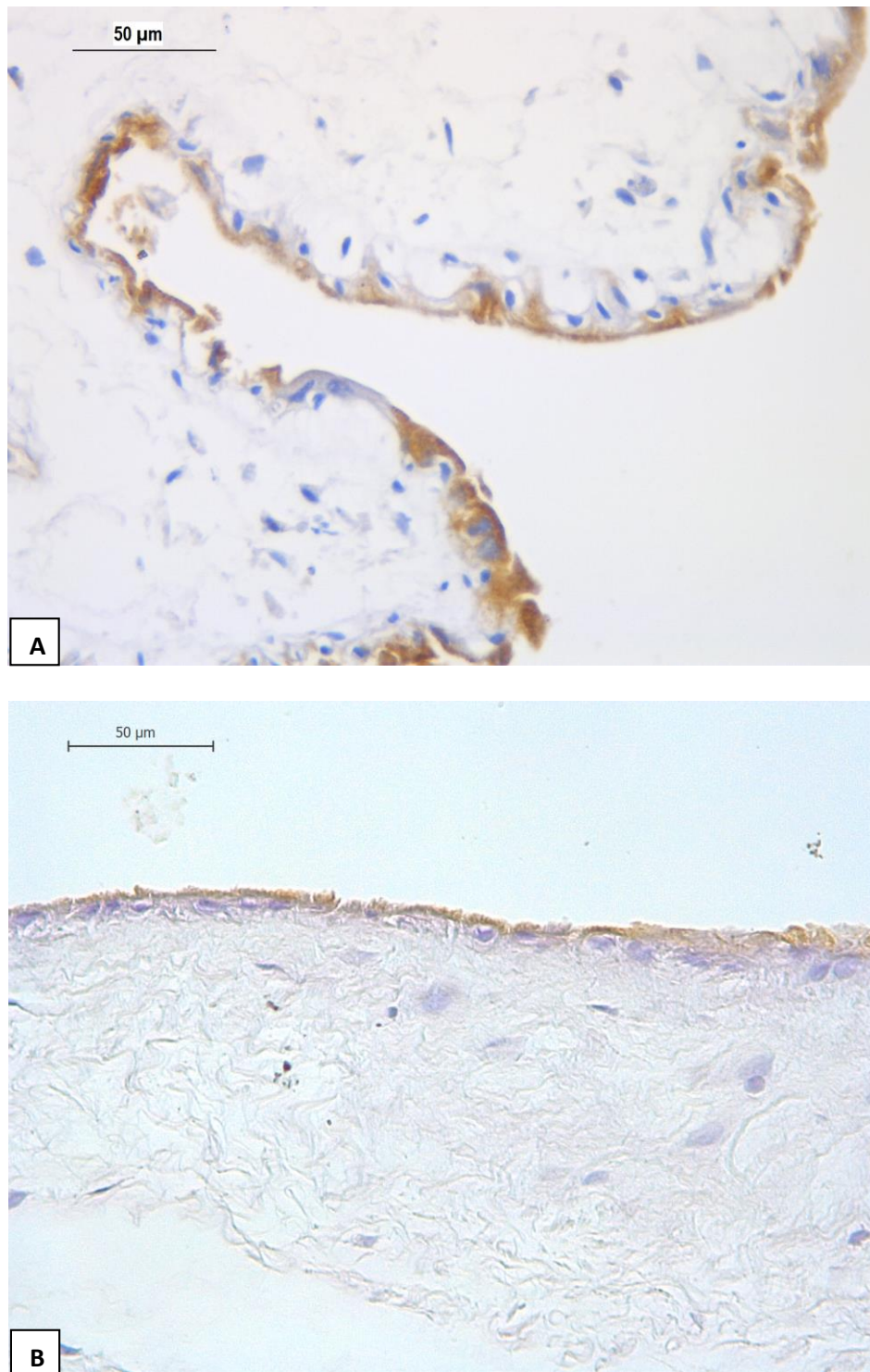


Figura 29. Expressão de Galactose, por meio da lectina PNA. A. Marcação moderada no citoplasma de córion da placenta de termo da alpaca. B. Marcação moderada do glicocálix do epitélio e débil no mesênquima do âmnio. Barra 50um.

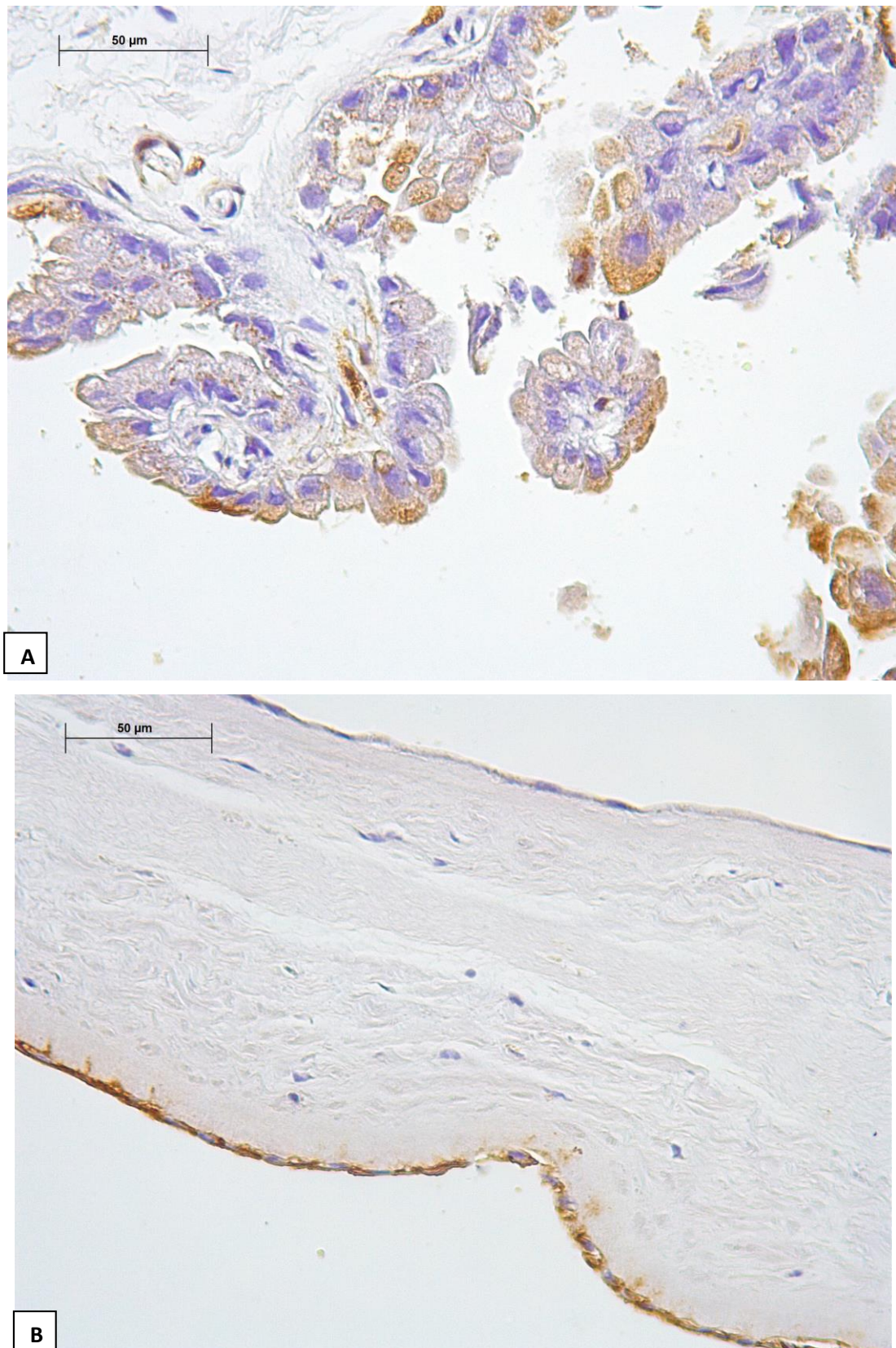


Figura 30. Expressão de Galactose, por lectina GSL I. A. Moderada marcação no citoplasma das células trofoblásticas do córion. B. Moderada a forte marcação no epitélio do âmnio. Barra: 50um.

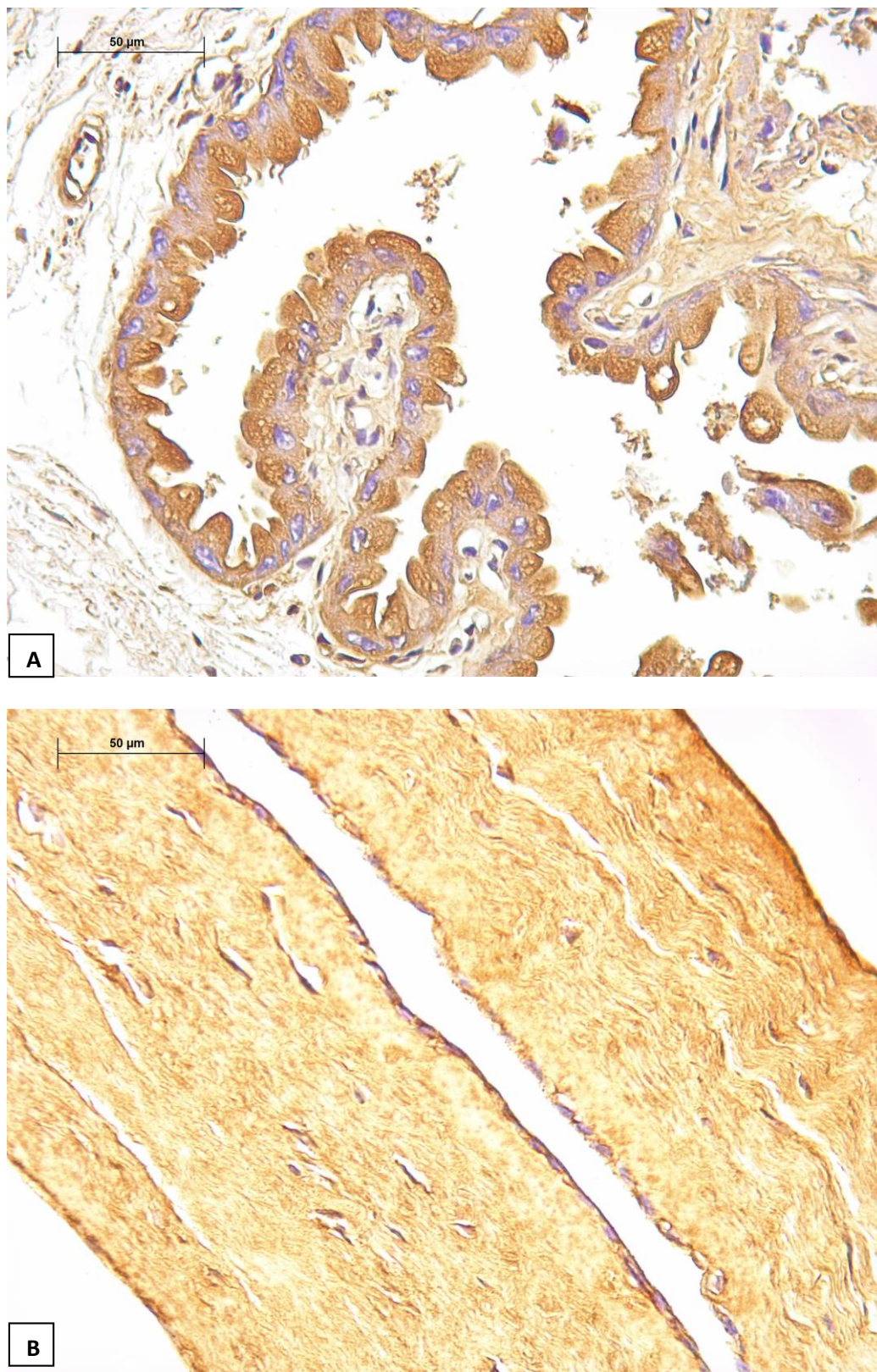


Figura 31. Expressão de Manose e Glicose, por lectina PSA. A. Marcação forte no citoplasma das células epiteliais do córion e alantoide. B. Marcação forte no mesênquima denso do âmnio. Barra 50um.

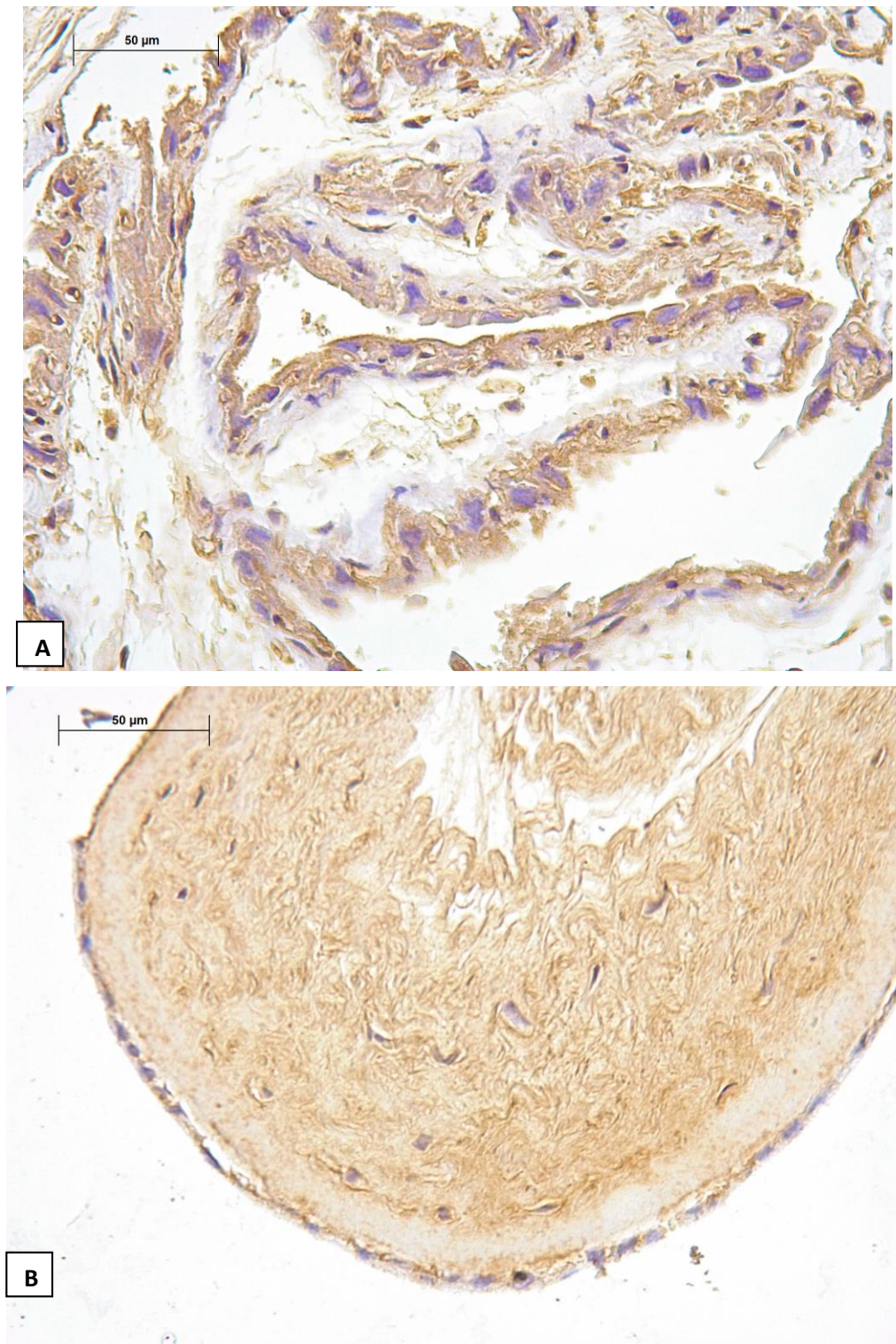


Figura 32. Expressão de Manose, por lectina LCA. A. Marcação forte no citoplasma das células do epitélio do córion. Barra 50µm. B. Marcação forte no mesênquima do âmnio. Barra 50µm.

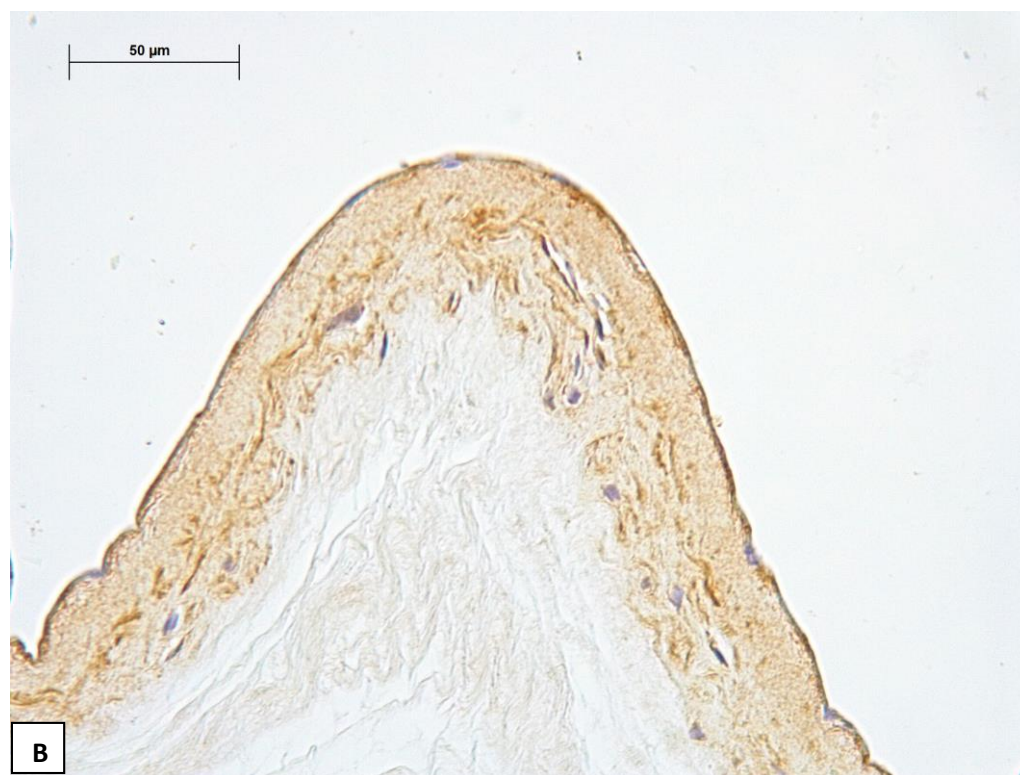
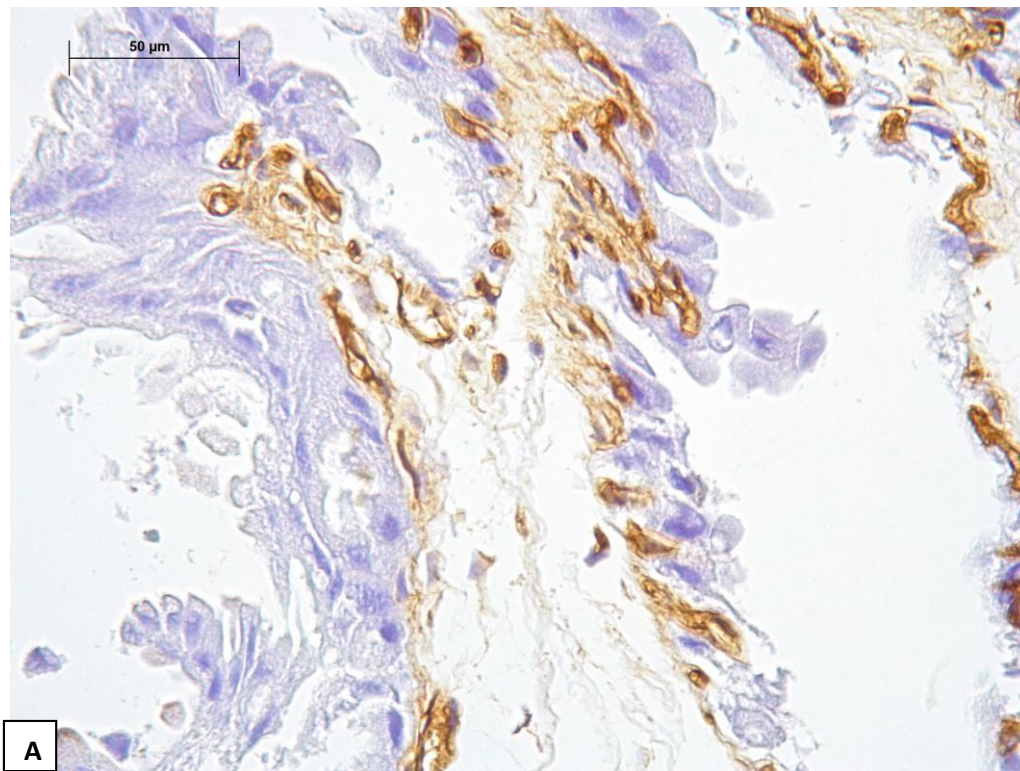


Figura 33. Expressão de estruturas complexas, por lectina PHA-E. A. Observa-se a marcação do endotélio dos capilares sanguíneos do córion. Barra 50um. B. Observa-se a marcação forte do epitélio do mesênquima denso do âmnio. Barra 50um.

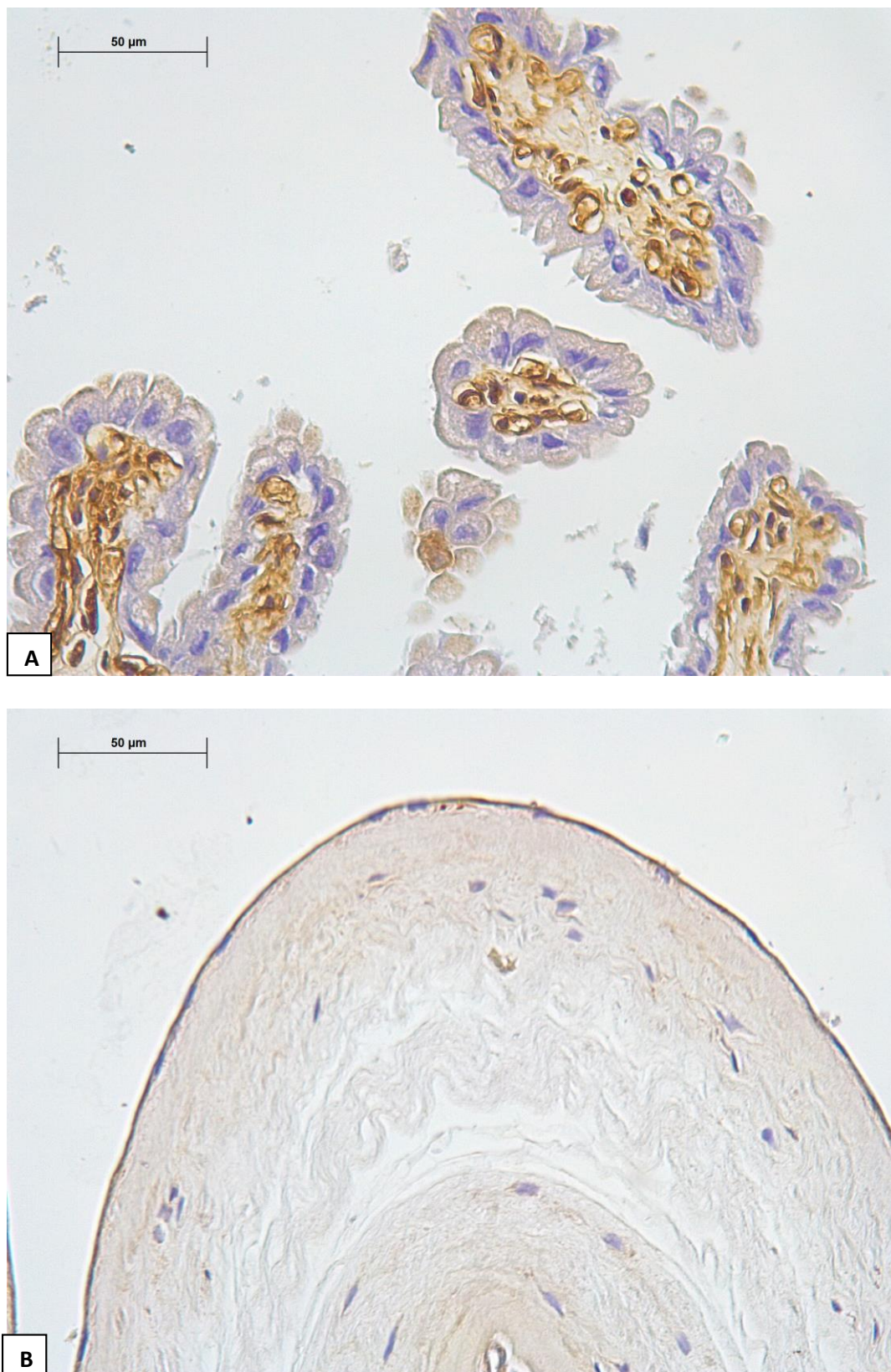


Figura 34. Expressão de estruturas complexas, por lectina PHA-L. A. Observe-se a forte marcação do endotélio dos capilares sanguíneos interditados no córion. Barra 50um. B. Observe-se a marcação débil no epitélio e no mesênquima do âmnio. Barra 50um.

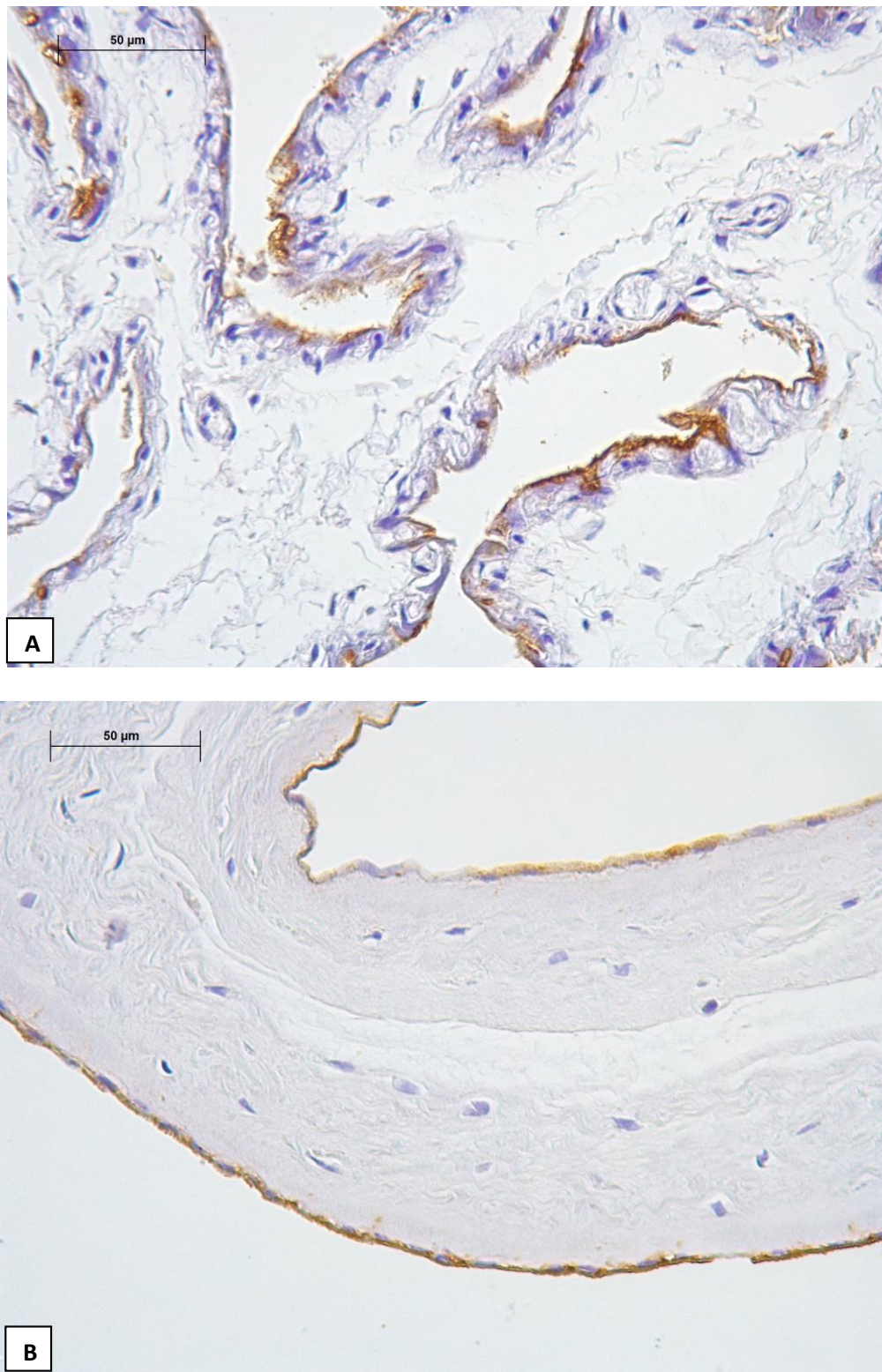


Figura 35. Expressão de N- Acetil glucosamine, por lectina sWGA. A. Observe-se a marcação moderada do glicocálix das células epiteliais do córion. Barra 50um. B. Observe-se a marcação moderada do epitélio do âmnio. Barra 50um.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A placenta da alpaca apresenta morfologia histológica epiteliocorial difusa, onde o córion se junta ao alantoide, estrutura típica das placentas corioalantoides. Na presente pesquisa foi observado um córion com vilosidades coriônicas revestido de epitélio cuboidal simples. A presença de algumas células gigantes multinucleadas na extremidade apical das vilosidades foi verificada na alpaca como descrito por CARTER; ENDERS, 2013. Essas vilosidades eram recobertas por uma camada trofoblástica com células com morfologia que variava entre cúbica, arredondada e até piramidal, sendo seus núcleos arredondados basofílicos. Células binucleadas também foram encontradas na camada trofoblástica similares às encontradas na placenta dos ruminantes (WOODING, 2022). O alantoide composto por mesênquima fetal denso apresentava grandes vasos sanguíneos evidenciando os locais de maior vascularização endereçada ao feto.

Com semelhanças morfológicas de alguns aspectos das placentas suína, equina e de outros camelos (OLIVERA *et al.*, 2003b), as placentas epiteliocoriais estão presentes nos animais com os maiores períodos de gestação (ENDERS; CARTER, 2004; ITURRIZAGA *et al.*, 2007). Têm a vantagem de isolar os componentes materno e fetal, e demonstrar a presença de dois epitélios completos, reduzindo os problemas imunológicos tais como a migração de células fetais para o organismo materno (WOODING, 2022). A desvantagem desse tipo de placentação reside na maior dificuldade de passagem dos materiais pela barreira placentária, fato parcialmente superado por diversos mecanismos tal como a formação de zonas placentárias especializadas (ENDERS; CARTER, 2004).

Na placenta difusa, as vilosidades e as pregas coriônicas são pequenas e uniformemente distribuídas na superfície fetal da mesma. Essas se opõem ao contato íntimo das depressões ou sulcos do epitélio uterino. Este tipo placentário é encontrado em porcos, cavalos, camelídeos e cetáceos (BARBEITO, 2008).

Estudos referentes à placentação de camelídeos e pesquisas relativas à interface materno-fetal em alpacas e lhamas foram conduzidos por OLIVERA *et al.*, 2003a; OLIVERA *et al.*, 2003b; ITURRIZAGA, 2005; ITURRIZAGA *et al.*, 2007. Entretanto a presente investigação analisa a transferência de minerais na placenta de alpaca expelida a termo, que passou por um processo de descolamento do epitélio coriônico, e sofreu

maior frouxidão do mesênquima placentário fetal, devido ao fato dos capilares fetais da camada trofoblástica estarem localizados próximos as vilosidades coriônicas.

Por essa razão, essa rede capilar subepitelial encontrava-se aumentada, o que demonstrava a passagem de substâncias por esses capilares maternos e fetais (OLIVERA, 2007; SCHAEFER *et al.*, 2012). Essa é uma condição atribuída a um processo adaptativo para compensar o ambiente de baixo oxigênio, devido justamente a criação desses animais em regiões como Cusco, Peru, locais de maior altitude que obriga os camelídeos a desenvolverem adaptações anatômicas e funcionais necessárias à liberação placentária aproximadamente uma hora pós-parto, sem risco de retenção placentária ou perda de sangue. Isso se justifica por se tratar de uma placenta não decidual, onde predomina o córion frondoso (ROA *et al.*, 2012). Essa adaptabilidade também é observada em relação ao horário do parto das alpacas, que ocorre nas primeiras horas da manhã, entre 6h e 9h, horário em que o frio não é tão intenso.

Na placenta epiteliocorial da alpaca, existem regiões onde as seis camadas de células da barreira materno-fetal são finas o suficiente para se igualar à distância interhemal mínima das três camadas de células presentes na placenta humana (FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014). A distância existente entre as microvilosidades do feto e a superfície materna parece ser muito mais estreita nos camelídeos sul-americanos do que em outros ungulados, o que pode sugerir que haja uma adaptação do animal a grandes altitudes (STEVEN *et al.*, 1980; ITURRIZAGA *et al.*, 2007); a distância interhemal em alpacas é substancialmente menor em comparação com outras espécies com placentas epiteliocoriais (STEVEN *et al.*, 1980). Este notável padrão de vascularização placentária nas alpacas também poderia ser resultante dessa hipóxia ambiental (AHMED *et al.*, 2000).

O âmnio da placenta de alpaca se apresentou como uma membrana fetal muito resistente, que poderia se desprender da placenta sem apresentar tantos danos com o descolamento. Isso porque o âmnio apresenta um rico mesênquima denso de fibras reticulares e colágenas com muitos fibroblastos. Talvez em maior quantidade no córion e alantoide. Da mesma forma sua camada epitelial com células epiteliais planas simples apresentadas em algumas áreas, multicamadas de células entre planas e poligonais, características evidenciadas no âmnio da placenta humana (HILMY; YUSOF, 2017).

A placenta é um órgão transitório que cumpre funções vitais para a sobrevivência fetal. Sua morfologia demonstra sua complexidade com o decorrer da gestação, evidenciando estruturas de adaptação, proteção e sustentação materno-fetal, demonstradas pela conformação ultraestrutural estudada por ITURRIZAGA *et al.*, 2007 em lhamas. Na alpaca, aparece como projeções coriônicas, microvilosidades e mesênquima denso com fibras colágenas (OLIVERA e BEVILACQUA, 2014). VEGA *et al.*, 2008 descrevem ultraestruturalmente o âmnio da placenta humana como tendo a maior rede de fibras colágenas, enquanto o córion é constituído principalmente por células trofoblásticas.

Os dados apresentados na caracterização da placenta da alpaca sugerem que apesar de ser considerada uma placenta epiteliocorial difusa, ela apresenta modificações estruturais, aumentando assim a troca molecular em regiões especializadas que funcionam como sítios histotróficos (OLIVERA, 2007). Como no caso da placenta equina, possui dois componentes estruturais principais, as aréolas, invaginações do trofoblasto formadas por colunas de células nas glândulas uterinas. A seu turno, os microcotiledones, são pequenas interdigitações das vilosidades placentárias que se projetam para o endométrio. Ambos, aréolas e microcotiledones aumentam significativamente durante a gestação (WOODING *et al.*, 2000). As aréolas dos camelídeos sul-americanos constituem uma fonte de reserva de substâncias nutritivas para o feto, além de permitir que o trofoblasto as utilize continuamente (ITURRIZAGA *et al.*, 2007).

O selênio (Se) é um micronutriente mineral essencial que possui várias funções importantes para a saúde humana e animal. As funções biológicas do Se são realizadas por selenoproteínas (codificadas por vinte e cinco genes em humanos e vinte e quatro genes em camundongos). Como um componente das selenoproteínas, o Se tem funções estruturais e enzimáticas na gravidez (QAZI *et al.*, 2018). Estudos em animais, indicam que o feto cobre suas necessidades de selênio por via transplacentária, em quantidades variáveis de acordo com a condição da mãe. Entretanto em ruminantes a passagem de Selênio (Se) para o feto ocorre mesmo quando a mãe tem baixa disposição do elemento. As observações feitas nesse sentido sugerem que a fêmea poderia sacrificar sua própria condição para manter o elemento de transporte para o feto (HEFNAWY; PÉREZ, 2008).

A ação biológica do selênio está associada principalmente à sua atividade antioxidante na forma de glutathione peroxidase. A atividade antioxidante do selênio é complementada, e está intimamente associada à vitamina E; também está associada à proteína desidrodase responsável pela conversão da tiroxina (T4) em sua forma ativa triiodotironina (T3); portanto, a deficiência de selênio tem sido implicada em certas condições de hipotireoidismo (CEBRA *et al.*, 2014).

Essas selenoproteínas protegem os tecidos contra o efeito prejudicial de espécies reativas de oxigênio (ROS) bem como de outros produtos endógenos do metabolismo celular envolvidos no dano ao DNA, potencialmente, levando à mutagênese, morte celular e carcinogênese. A redução da atividade do Se corporal durante a gravidez, resulta então em estresse oxidativo nos tecidos, que contribuíram para o trabalho de parto prematuro, aborto espontâneo, pré-eclâmpsia e retardo do crescimento intrauterino. Como o desenvolvimento da placenta é altamente dependente do status de oxigênio, a formação descontrolada de ROS pode ser prejudicial. Apesar dessas descobertas, o papel das enzimas dependentes de Se e Se na gravidez permanecem controversos (ZACHARA, 2018).

Na presente pesquisa em placentas de termo de alpacas, detectou-se a marcação de anticorpos para selênio com marcada intensidade para selenoproteínas P y N e em menor intensidade para GPx3 (glutathione peroxidase 3) e DIO3 (iodotironina deiodinase 3), denotada por uma coloração marrom em alguns capilares sanguíneos das vilosidades coriônicas e em seu conteúdo. Essas vilosidades coriônicas apresentavam projeções curtas, o que poderia sugerir que são sítios de troca de nutrientes em contato com as aréolas das glândulas uterinas maternas (OLIVERA, 2007).

A transferência de uma substância através da barreira materno-fetal depende da espessura e extensão da barreira, bem como do gradiente de concentração da substância ou da presença de mecanismos de transmissão ativa (BROLIO *et al.*, 2010). O feto em crescimento requer selênio, e o selênio é transportado através da placenta por difusão passiva em um gradiente de concentração. As concentrações de selênio decidual são maiores que as endometriais, enquanto as concentrações de selênio venoso umbilical são menores que as maternas em placentas humanas (MISTRY *et al.*, 2012). Estudos sobre cobre e selênio indicam que eles são transferidos passivamente ao longo de um gradiente

de concentração na placenta humana, ao contrário dos de magnésio e ferro onde o transporte placentário é ativo (NANDAKUMARAN; DASHTIAND; AL-ZAID, 2002).

As proporções de sangue fetal-materno iguais ou menores que a unidade, relatadas por vários pesquisadores para cobre e selênio, são indicativas de transporte passivo mediado por difusão através da membrana placentária em humanos (NANDAKUMARAN; DASHTIAND; AL-ZAID, 2002). A taxa de difusão simples está inversamente relacionada com a espessura da membrana, mas a permeabilidade das células tem relação limitada com sua espessura. Capilares fetais e maternos da placenta, muitas vezes, ultrapassam o tecido conjuntivo e denteiam as coberturas epiteliais. Assim, ambos os sangues podem atingir íntima relação apesar do número variado de camadas intervenientes. Vilos e microvilos constituem áreas de maior contato, fornecendo uma extensa superfície para intercâmbio (BROLIO *et al.*, 2010)

A restrição à transferência placentária é a distância de difusão entre os leitos capilares maternos e fetais em diferentes animais. Em todas as espécies investigadas até agora, os capilares maternos e fetais sangram progressivamente para o epitélio uterino e trofoblasto, respectivamente, à medida que a gestação avança, reduzindo continuamente a distância de difusão, sendo a ovelha a espécie que teria o desenho mais “eficiente” (WOODING; FOWDEN, 2006).

No entanto, estudos de placentação em camelídeos sul-americanos, indicam que essa distância entres os capilares sanguíneos da mãe e o feto, é substancialmente menor, reduzindo a espessura do contato materno-fetal muito mais proeminente nos estágios finais da gestação (STEVEN *et al.*, 1980; WOODING, 2022). A passagem de substâncias é evidenciada nas paredes dos capilares materno e fetal, essa troca molecular parece ser favorecida pela distância reduzida entre ambos os capilares devido ao sangrado dos capilares fetais na camada trofoblástica e a diminuição da espessura do epitélio uterino e evidente aumento da rede vascular capilar subepitelial (OLIVERA, 2007).

Na troca de nutrientes na superfície materno-fetal da placenta de alpaca durante a gestação, OLIVERA; BEVILACQUA, 2014 encontraram vesículas relacionadas ao sistema de endocitose como característica comum da superfície apical do trofoblasto e o sangrado do trofoblasto por capilares também parece ser um mecanismo no qual a distância entre a vascularização materna e fetal diminui e otimiza as condições de

absorção. Nas alpacas, esse sangrado do trofoblasto é muito proeminente no final da gravidez.

Um último fator que afeta diretamente a medida da "eficiência" da difusão materno-fetal é a utilização de oxigênio pelo próprio tecido placentário. Em ovelhas, os tecidos placentários usam proporcionalmente menos O₂ à medida que a gestação avança (de 70% do total transferido pela mãe no meio da gestação para 50% no termo), mas a mesma proporção é usada no cavalo (50%) durante toda a gestação. Isso provavelmente está relacionado à demanda de crescimento contínuo e ganho de peso da placenta equina ao longo da gestação, enquanto em ovelhas a placenta diminui de peso a partir do meio da gestação (WOODING; FOWDEN, 2006).

Estudos conduzidos em humanos sob condições naturais de hipóxia (ZAMUDIO, 2003), bem como em camundongos em ambientes hipobáricos (CUFFE *et al.*, 2014) demonstraram que o desenvolvimento da placenta é altamente regulado pelos níveis de oxigênio, bem como pela disponibilidade de nutrientes na circulação materna (CROSS; MICKELSON, 2006). A menor disponibilidade de oxigênio provoca uma diminuição no transporte de nutrientes para o feto, o que pode ser compensado por um adelgaçamento das membranas fetais (ZAMUDIO, 2003). Isso significa que o padrão de desenvolvimento da placenta pode ser alterado pelo ambiente. Além disso, o desenvolvimento da placenta pode tentar compensar outros defeitos (CROSS, 2006).

Estudos ressaltam a importância então de se considerar a área de contato feto-materno, ou seja, a superfície por onde ocorre toda a transferência de nutrientes, e não apenas o peso. Isso sugere que a eficiência por grama de placenta pode não ser uma medida tão relevante quanto a área de superfície de troca materno-fetal dentro desse grama. O cavalo é relatado como tendo uma área muito menor por unidade de volume do que a vaca, mas ambos produzem um peso de recém-nascido semelhante a partir de uma gravidez semelhante. Em ovinos, a área por unidade de volume é semelhante à da vaca. Isso pode ser atribuído à diferença na circulação contracorrente/cruzada, mas resta saber se esse é o único fator que explica a diferença na eficiência placentária; os vasos sanguíneos da placenta equina são organizados de modo que o sangue materno flui na direção oposta ao sangue fetal nas redes capilares que formam os vasos de troca, produzindo o sistema de contracorrente ideal (WOODING; FOWDEN, 2006). A única característica que inicialmente parecia se correlacionar com a eficiência placentária em várias espécies

(medido como peso fetal ao nascer produzido por grama de peso placentário fetal) era a direção relativa dos fluxos sanguíneos materno e fetal, com a contracorrente sendo considerada "melhor" (LEISER; KAUFMANN, 1994).

A placenta da alpaca é do tipo epiteliocorial e difusa e o transporte de nutrientes é pelo sangue, semelhante ao equino (FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014), o que sugeriria que o selênio como micronutriente mineral teria transferência placentária por transporte passivo em camelídeos sul-americanos.

Demonstrou-se a transferência placentária de selênio da mãe ao feto de alpaca a termo de gestação, principalmente como selenoproteínas, sendo selenoproteína P a predominante. Estudos sugerem que a selenoproteína P pode ser um bom marcador bioquímico do status de selênio (SCHOMBURG, 2022), havendo a possibilidade de utilizar outras enzimas como marcadores funcionais. No entanto, é improvável que haja um único indicador do estado funcional do selênio, mas sim um conjunto de marcadores que refletiriam problemas específicos associados a um estado subótimo do mineral. Além disso, a única proteína funcional para a qual existem dados suficientes em humanos é a glutathione peroxidase (BRANDAO, 2010).

As abreviaturas usadas para selenoproteína P são SELENOP, SEPP1, SeP, SelP, sendo a mesma encontrada no espaço extracelular (HOGAN; PERKINS, 2022). Difere de outros membros das selenoproteínas por conter múltiplos resíduos de selenocisteína (Sec) por subunidade de proteína, 10 resíduos de Sec no total e estar presente no plasma humano. O principal papel da SelP é o transporte e entrega de selênio aos tecidos. Um papel adicional pode ser servir como um quelante ou antioxidante de metais pesados (LU; HOLMGREN, 2009).

Os genes que codificam a selenoproteína P tanto no rato quanto no humano foram isolados, sequenciados e caracterizados (HILL *et al.*, 1991; HILL; LLOYD; BURK, 1993). A função desta selenoproteína P é que ela desempenha um papel importante no armazenamento e transporte de selênio, sendo um indicador do status de selênio em humanos e animais (HOGAN; PERKINS, 2022); aparentemente, também teria um efeito protetor nas células endoteliais contra o ataque de peroxinitrito (FOREROS, 2006).

A selenoproteína P desempenha um papel no transporte transplacentário de selênio para o feto durante o final da gravidez humana, juntamente com a GPx3, que é liberada

na circulação fetal e materna, desempenhando um papel importante no transporte de selênio (HOGAN; PERKINS, 2022). Estudos na placenta de ratos encontraram que a mensagem do gene da selenoproteína P, está presente na placenta durante o último terço da gravidez, atingindo níveis máximos no termo. O nível de expressão na placenta é no máximo cerca de 25% do observado no fígado adulto; a semelhança de expressão observada no fígado fetal e placenta sugere uma regulação coordenada da expressão deste gene nestes tecidos, no final da gestação (KASIK; RICE, 1995). A associação entre o baixo teor de selênio no sangue e a prevalência de baixo crescimento fetal, podem estar relacionados ao efeito direto do selênio na expressão da selenoproteína placentária. Entretanto, níveis elevados de selenoproteína P estão associados ao desenvolvimento de pré-eclâmpsia e, assim, que níveis elevados desta selenoproteína P possa ser um biomarcador adequado para a detecção de pré-eclâmpsia em mulheres, embora em associação com outros determinantes (HOGAN; PERKINS, 2022).

BURK *et al.*, 2013 estudaram a transferência materno-fetal de selênio em placenta hemocorial de camundongos, para os quais, a placenta forneceu nutrientes ao feto de camundongo durante a última metade da gestação. A imunohistoquímica da placenta d-18 (gravidez tardia) demonstrou a presença de Sepp1 em vesículas dentro das células trofoblásticas do labirinto placentário, porém o Gpx3 não foi detectado na placenta; vários mecanismos garantem a transferência de selênio da gestante para o conceito.

Demonstrou-se também nos capilares sanguíneos do córion da alpaca, a presença da selenoproteína N, abreviado como SELENON, SelN, SEPN1, cuja função determina a regulação da mobilização de cálcio mediada pelo sistema RyR, necessários para o desenvolvimento e diferenciação muscular normal. Não se sabe, entretanto, se também desempenha um papel na mobilização de cálcio em outros tecidos. A localização subcelular desta selenoproteína é a membrana do retículo endoplasmático das células eucarióticas (HOGAN; PERKINS, 2022). Mutações da selenoproteína N causam distrofia muscular espinhal rígida, em alguns casos levando à insuficiência respiratória fatal (LU; HOLMGREN, 2009).

O conhecimento de SelN também é limitado na placenta. Há dados, que sugerem que há uma alta expressão de SelN em tecidos fetais e células em proliferação, essenciais na formação muscular precoce. A deficiência de selênio reduz significativamente a expressão de selenoproteínas nos tecidos maternos e na placenta, especificamente SelN e

SelP (HOGAN; PERKINS, 2022). Assim, deficiência severa de selênio resulta na degeneração patológica das fibras musculares esqueléticas com fibrose secundária. Os animais afetados apresentam sinais clínicos que se refletem nos músculos dos membros pélvicos, nos músculos da língua e do coração em animais recém-nascidos ou em crescimento, os quais demonstram dificuldades na amamentação. A deficiência severa de selênio em fêmeas grávidas tem sido associada à abortos e natimortos. Todas essas manifestações clínicas foram documentadas na maioria das espécies domesticadas, embora a miopatia seja rara em camelídeos (CEBRA *et al.*, 2014).

Na presente pesquisa, o selênio também foi detectado em capilares sanguíneos do córion em formato de glutathione peroxidase tipo 3, cuja abreviatura é GPx3, indicando que mediante a transferência placentária, o feto recebe antioxidantes que protegem seu desenvolvimento ante as trocas que se apresentam durante a gestação, evitando ou reduzindo o efeito dos peróxidos formados durante o metabolismo celular na prenhez (HOGAN; PERKINS, 2022). A família da glutathione peroxidase (GPx) compreende pelo menos 8 membros (GPx1-GPx8) e é considerada a mais importante de todas as selenoproteínas (BENSTOEM *et al.*, 2015). Essas selenoproteínas são enzimas com atividade antioxidante que estão localizadas dentro e fora da célula, mas GPx3 está localizada no plasma extracelular, e possuem diferentes especificidades para substratos hidroperoxidados (MUÑOZ DEL VALLE, 2016). Portanto, GPx3 tem a função de manter o estado redox celular, principal antioxidante dos fluidos extracelulares e do plasma, envolvidos na implantação do conceito no endométrio. Envolve-se ainda nos mecanismos de transferência materno-fetal, na gravidez e no parto, estando também implicado na pré-eclâmpsia em mulheres. Por fim, também participa na prevenção do apoptose celular, induzido pelo estresse oxidativo (HOGAN; PERKINS, 2022).

A GPx3 é sintetizada no rim e, portanto, é muito abundante neste tecido, mas também está presente de maneira proeminente no coração. Essa selenoproteína é encontrada no espaço extracelular e no plasma, contendo cerca de 10-25% do selênio total do plasma (COMBS, 2015; QUISIRUMBAY; VÍLCHEZ, 2019). Como todas as isoformas da GPx, a GPx3 possui atividade antioxidante, protegendo contra H₂O₂ e hidroperóxidos lipídicos. Entretanto demonstra atividade bem menor que a GPx1 (cerca de 10 vezes menor) (MUÑOZ DEL VALLE, 2016). A GPx3 em combinação com a SelP, representa mais de 97% de todo o selênio do plasma, e desempenha um papel no transporte e

homeostase do selênio. Demonstrou-se que desempenha ainda um papel nos mecanismos de transferência materno-fetal de selênio, importantes na gravidez e no parto, participando também da implantação embrionária e da placentação (HOGAN; PERKINS, 2022). GPx3 também pode representar um biomarcador para subtipos de tumores ovarianos em mulheres (PAPP *et al.*, 2007).

A marcação de DIO-3 como iodotironina deiodinase na placenta de alpaca, sugere que o selênio também participaria no metabolismo de hormônios da tireoide, ao participar na atividade normal da glândula tireoide na conversão da tiroxina (T4) em sua forma ativa triiodotironina (T3). Portanto, participa no desenvolvimento e crescimento do feto de alpaca. Três desidases foram identificadas em todos os tipos de células humanas e animais; entretanto, apenas DIO2 e DIO3 foram expressos na placenta, podendo ser responsáveis pela regulação dos hormônios tireoidianos que são vitais para o desenvolvimento fetal saudável. O DIO3 foi identificado no primeiro e terceiro trimestres da gestação humana no sincitiotrofoblasto. Os hormônios tireoidianos são necessários para o desenvolvimento fetal normal e o feto depende do suprimento materno até a metade da gestação. Em placentas a termo, a atividade de DIO3 na face fetal foi significativamente maior do que na face materna da placenta, sugerindo um papel importante na desativação dos hormônios tireoidianos (HOGAN; PERKINS, 2022).

Especulou-se que o nível significativamente alto de expressão de DIO3 no sítio de implantação protege o desenvolvimento embrionário fetal devido à exposição excessiva dos mesmos hormônios tireoidianos maternos que podem afetar negativamente o desenvolvimento fetal no útero. Da mesma forma, a atividade de DIO3 também aumenta com a idade gestacional avançada em células placentárias humanas (MOJADADI *et al.*, 2021).

HUANG *et al.*, 2003 relataram um alto nível de expressão de DIO3 em diferentes locais, como o sincitiotrofoblasto e citotrofoblasto, os revestimentos endoteliais, o âmnio e a placenta, além de também estar presente na bainha umbilical de vasos amniônicos, útero decíduo, epitélio do feto humano não grávido e endométrio. No cérebro e na placenta, a expressão de DIO2 e DIO3 foram mantidas durante a restrição de selênio. Entretanto, o modelo de deleção DIO3 exibiu o fenótipo mais anormal entre os DIOS, demonstrando viabilidade reduzida, retardo de crescimento significativo, fertilidade prejudicada, além de sintomas de hipotireoidismo onde T3 foi significativamente

reduzido e os níveis de T4 aumentaram em camundongos. O padrão de desenvolvimento anormal é provavelmente atribuído ao fato de DIO3 ser uma enzima fetal (PAPP *et al.*, 2007). Também foi sugerido que a atividade de DIO3 na placenta contribui para a liberação de íons iodeto na circulação fetal para a síntese fetal de TH (HOGAN; PERKINS, 2022).

Como a gravidez determina o aumento da demanda por nutrientes e aumento da atividade do estresse oxidativo, deficiências em micronutrientes como o selênio dificultam as respostas antioxidantes, podendo expor a placenta ao acúmulo de radicais livres e estresse oxidativo. Isso pode causar insuficiência e disfunção placentárias, levando a complicações na gravidez, como pré-eclâmpsia, parto prematuro, diabetes gestacional, restrição de crescimento intrauterina (MOJADADI *et al.*, 2021; HOGAN; PERKINS, 2022). A deficiência materna de selênio aumenta as concentrações de triiodotironina e tetraiodotironina, reduz as concentrações de glicose no sangue fetal e induz a restrição do crescimento fetal (HOFSTEE *et al.*, 2019).

A detecção e quantificação das selenoproteínas fornecem informações relevantes sobre a função fisiológica do selênio. Assim, as selenoproteínas utilizadas principalmente em animais como biomarcadores de selênio funcional são GPx1 e GPx3, enquanto em humanos são mais limitadas por sua acessibilidade nos tecidos, estando, portanto, GPx3 e SelP, presentes no plasma (COMBS, 2015). Uma maior compreensão das selenoproteínas placentárias poderia sugerir a potencial utilização da suplementação de selênio como intervenção terapêutica para prevenir o desenvolvimento de doenças gestacionais (HOGAN; PERKINS, 2022).

A barreira materno-fetal de cada espécie animal apresenta seu próprio glicocódigo (JONES *et al.*, 1997), sendo capaz de alterar os padrões de glicanos entre a concepção e o desenvolvimento placentário (JONES; DANTZER; STODDART, 1995). Por haver grande diversidade na glicosilação tecidual que compreende a barreira interhemal de espécies com diferentes tipos de placenta (JONES *et al.*, 2000), o perfil de glicosiltransferases que uma célula expressa é altamente regulado e varia sensivelmente sob estímulos externos (CROCI, 2011), sendo suas principais funções, adesão, controle e inibição do processo invasivo do trofoblasto, proteção imunológica, bem como a presença de moléculas sinalizadoras de hormônios, enzimas e fatores de crescimento (DANTZER; LEISER, 1993).

Os camelídeos apresentam um tipo de placenta epiteliocorial com microvilosidades interdigitadas no útero materno, formato e estrutura consideradas como uma adaptação evolutiva avançada (MESS; CARTER, 2007). Estudos de glicosilação da interface materno-fetal em camelídeos (camelos e camelídeos sul-americanos) já foram realizados indicando diferenças na glicosilação do tecido uterino e trofoblástico (JONES *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2002; JONES; SKIDMORE; APLIN, 2008). No entanto, na presente investigação aprofundamos a conformação estrutural dos carboidratos na placenta a termo da alpaca, imediatamente após o parto, incluindo o córion-alantoide e o âmnio.

As lectinas que tiveram uma forte marcação no citoplasma das células trofoblásticas das vilosidades coriônicas foram RCA₁₂₀, Con A e WGA expressando os carboidratos galactose e β N-acetilgalactosamina, glicose e resíduos de manose, e β N-acetilglucosamina e resíduos de ácido siálico, respectivamente. Essa forte marcação foi evidenciada nas placentas de alpacas, também no âmnio, tanto na camada epitelial quanto no mesênquima. Estudos realizados em placentas de camelos e placentas de camelídeos sul-americanos indicaram que a alpaca é a única espécie entre os camelídeos, que demonstra a presença de ácido siálico no trofoblasto (JONES; SKIDMORE; APLIN, 2008). Tal resultado foi também encontrado em nosso estudo utilizando a lectina WGA, que pode se ligar tanto ao ácido siálico quanto aos oligômeros de N-acetilglucosamina. Essa marcação é mais forte em humanos, moderada em tatus e cobaias (JONES *et al.*, 2007). Resíduos de ácido siálico também foram encontrados nas vilosidades coriônicas da placenta de suínos em diferentes estágios gestacionais (SANCHIS; MERKIS; KONCURAT, 2009) compartilhando resultados semelhantes em grupos de animais que apresentam o mesmo tipo de placenta: suínos e camelídeos.

A marcação com a lectina WGA foi expressa em placentas suína, equina, bovina, ovina e humana, porém, sua marcação se mostrou mais evidente em células trofoblásticas equinas (JONES; ALLEN; WILSHER, 2017) e humanas (JONES *et al.*, 1997). Entre os camelídeos, o guanaco demonstrou marcação mais evidente de WGA no trofoblasto (JONES; SKIDMORE; APLIN, 2008). O sWGA teve moderada marcação no glicocálix das células trofoblásticas e nas células epiteliais do âmnio da placenta de alpaca. TATSUZUKI *et al.*, 2009 observaram que as células na borda em escova da camada sincitiotrofoblástica da placenta humana, expressava fortemente GlcNAc através das lectinas WGA e sWGA e na membrana basal do trofoblasto expressava fortemente

manose (positivo por Con A, LCA) e galactose (fortemente positivo por ECL, RCA₁₂₀) porém não reagia com lectinas do grupo GlcNAc ou do grupo das lectinas fucose. ACUÑA *et al.*, 2023 indicam que a positividade para WGA é a condição ancestral para Placentália e é conservado em todas as espécies.

A placenta de camelo demonstrou menor reação do glicoconjugado quando foi comparado com a alpaca, lhama e guanaco, usando lectinas com Con A, PSA, DBA e DSA, porém maior reação é a lectina SBA (JONES; SKIDMORE; APLIN, 2008). A placenta de alpaca de termo, apresentou forte reação à expressão de glicose e manose através da lectina Con A. Estudos realizados em placenta suína, a seu turno, evidenciaram em vasos sanguíneos a marcação mais evidente com lectina Con A (SANCHIS *et al.*, 2012), resultando também evidente em outros tipos de placentas, onde estavam presentes nos capilares maternos e fetais da placenta equina (JONES *et al.*, 1999). Resíduos glicosilados de α -manose e α -glicose que se ligam a Con A estariam presentes no endotélio dos vasos placentários durante a gravidez suína, coincidindo com os resultados encontrados em placentas humanas, gestações normais, que demonstram leve expressão de α -manose nos vasos sanguíneos da placenta, através de um estudo realizado com Con A e LCA (JONES *et al.*, 1997). A positividade de Con A é a condição plesiomórfica para Placentália e é conservada em todas as espécies (ACUÑA *et al.*, 2023).

Uma expressão leve de carboidrato fucose foi também descrita quando experimentos foram feitos utilizando lectina UEA-1, evidenciando a presença do marcador tanto no córion quanto no âmnio na placenta ao termo de alpaca. Resultado semelhante também foi encontrado em camelos (APLIN; JONES, 2012). Por outro lado, não foi evidente a marcação desta lectina na placenta de alpacas nos estudos realizados por JONES; SKIDMORE; APLIN, 2008. No entanto, JONES *et al.*, 2002 ocasionalmente encontraram marcação UEA-1 na placenta nos dias 145, 170 e 350 de gestação em camelo e marcação UEA-1 ocasionalmente no dia 283 de gestação em alpacas. Estudos realizados no útero de alpaca em tratamento superovulatório e normal, não demonstraram a marcação desta lectina (LÓPEZ *et al.*, 2014) como também na placenta equina, não houve evidência de marcação com fucose (JONES *et al.*, 1999) fato também não registrado na membrana microvilosa da placenta humana ((JONES *et al.*, 1997). Tal descoberta indicaria mudanças na fucosilação na placenta de termo da alpaca. APLIN; JONES, 2012 indicam que a conservação o a mudança na expressão do gene da fucosiltransferase ao

longo do tempo evolutivo desempenha um papel na determinação da estabilidade da interface materno-fetal.

A expressão de α N-acetilgalactosamina foi evidenciada com o uso das lectinas SBA e DBA na placenta de termo de alpaca, porém as reações as marcações foram diferentes. Tanto no córion quanto no âmnio a marcação com SBA foi mais moderada, enquanto foi muito débil com DBA. Estudos realizados em placentas de camelo e alpaca (JONES *et al.*, 2002) demonstram que não foi encontrada ligação à lectina DBA. Entretanto na alpaca foi possível encontrar atividade da glicosiltransferase na superfície celular das microvilosidades coriônicas, mas que diminuía com o avanço da gestação. Segundo JONES *et al.*, 2002 o DBA não marcou o trofoblasto de camelo, porém grânulos ocasionais foram evidentes no trofoblasto de cavalo e burro. A lectina DBA apresenta marcação diferenciada em placentas de diferentes espécies, e é fortemente expressa em trofoblastos ovinos e bovinos, moderadamente expressa em equinos, mas ausente em suínos e humanos (JONES *et al.*, 2007). No entanto, a SBA é expressa em ovinos, bovinos, cavalos e porcos, não sendo visualizada em humanos (JONES *et al.*, 1997).

A expressão da galactose por meio da lectina PNA foi evidenciada com uma marcação moderada no glicocálix das células coriônicas da placenta de termo de alpaca, enquanto GSL I marcou o citoplasma das células trofoblásticas. No âmnio foi moderada no glicocálix (PNA) e citoplasma das células epiteliais (GSL I) e débil no mesênquima. Estudos destacam a presença de resíduos de ligação de PNA galactosilados nas glândulas endometriais do final da gravidez. Assim, β -Gal (1,3) resíduos de GalNAc foram relatados nas placentas endotelocoriais da cadela, principalmente nas células glandulares da placenta próximas ao parto (FERNÁNDEZ *et al.*, 2000) assim também no trofoblasto da placenta da gata (FERNÁNDEZ *et al.*, 2014). Em contraste, nos tecidos placentários humanos do primeiro trimestre, a lectina AHA, que compartilha especificidade com PNA, mostrou-se fortemente ligada às secreções glandulares e ao glicocálix do epitélio glandular (JONES; APLIN; BURTON, 2010).

A expressão da manose com a lectina PSA e LCA, foi verificada bem caracterizada no citoplasma das células trofoblásticas, evidenciando grânulos. Da mesma forma, marcou fortemente o endotélio dos capilares sanguíneos fetais, bem como o epitélio e mesênquima do âmnio, sugerindo a importância da manose como um açúcar na placenta do termo alpaca. Estudos com esta lectina indicam que ela se expressa em todas as

espécies, mas de forma variável. No caso da placenta humana de termo marcou fortemente o citoplasma do trofoblasto bem como a membrana basal e a membrana endotelial (TATSUZUKI *et al.*, 2009). Porém foi pouco caracterizada e expressa nos trofoblastos equino, suíno e do vison, sendo ocasionalmente verificada em bovinos e ovinos, marcando fortemente os capilares sanguíneos fetais de todas essas espécies (JONES *et al.*, 1997).

A marcação da lectina PHA-L, que expressa estruturas do complexo triantenário não bisetados, foi muito evidente nos capilares sanguíneos fetais do córion da placenta de termo da alpaca, e uma leve marcação em forma de grânulos no citoplasma do trofoblasto, semelhante aos resultados relatados em ovinos e suínos por JONES *et al.*, 1997; porém distinto daquele encontrado em cavalos, marcação leve, tanto nos capilares sanguíneos fetais quanto no trofoblasto similares ao endotélio materno (JONES *et al.*, 1999). Em bovinos foram marcados moderadamente os capilares sanguíneos e as células gigantes, enquanto em humanos houve marcação moderada no trofoblasto, e leve nos capilares sanguíneos fetais (JONES *et al.*, 1997). Nos camelos não apresentaram marcação desta lectina no trofoblasto na placenta de termo (JONES *et al.*, 2000) semelhante ao que ocorre na alpaca. Já no âmnio da alpaca, a lectina PHA-L marcou levemente o citoplasma das células epiteliais e o mesênquima.

A lectina PHA-E expressa estruturas complexas bi/tri-antênárias bisetadas marcou fortemente semelhante ao PHA-L, os capilares sanguíneos fetais do córion, porém não marcou o trofoblasto, resultado diferente encontrado em camelos que tiveram marcação positiva leve para o trofoblasto; e em cavalos e asnos demonstraram marcação mais moderada no trofoblasto (JONES *et al.*, 2000). Por sua vez, SANCHIS; MERKIS; KONCURAT, 2009 encontraram em placentas de termo em suínos, a marcação abundante de oligossacarídeos ligantes de PHA-E nas vilosidades do córion, que coincidiu com a forte intensidade de marcação encontrada na interface materno-fetal suína em estudo realizado por JONES *et al.*, 2004, assim como em placentas de duas espécies de peccaries (*Tayassu tajacu* e *Tayassu pecari*) (JONES *et al.*, 2004) e em camelos (*Camelus dromedarius*) (JONES *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 2004). Quando JONES; SKIDMORE; APLIN, 2008 compararam as marcações nas placentas de camélídeos, entre eles os camelos, alpacas, lhamas, guanacos, vicunhas e camas (cruzadas de camelo e lhama), não foi encontrada marcação positiva de lectinas

PHA-E ou PHA-L na interface materno-fetal, resultado que difere de nosso estudo em alpacas, onde encontramos uma marcação bastante forte nos capilares sanguíneos fetais, sugerindo a importância desses oligossacarídeos ligantes de PHA-E durante o trabalho de parto da espécie mencionada. ACUÑA *et al.*, 2023 indicam que a positividade para PHA-E é a condição ancestral para os Placentária e é preservada nas espécies, exceto *Lama glama*.

A diversidade estrutural da interface materno-fetal é acompanhada por um grau muito alto da diversidade bioquímica em glicanos, conforme evidenciado pelos padrões amplamente distintos de ligação de lectina em cada camada da placenta entre as espécies (MAJEWSKA; PANASIEWICZ; SZAFRANSKA, 2013), especialmente nas células coriônicas, evidenciado também em diferentes estádios gestacionais em camelídeos, como a alpaca e camelos, outros animais domésticos, e em humano (MAJEWSKA; PANASIEWICZ; SZAFRANSKA, 2011). A expressão de resíduos glicosídicos mostra a história evolutiva da placenta entre os eutérios e as relações filogenéticas entre espécies de diferentes táxons (ACUÑA *et al.*, 2023).

Os estudos realizados na interface materno-fetal em camelídeos (JONES; SKIDMORE; APLIN, 2008) confirmam que a maior diferença na expressão de glicanos ocorre a nível do trofoblasto fetal, e não no útero materno, principalmente para fins de hibridização entre diferentes espécies de camelídeos (JONES *et al.*, 2002). Nossos resultados corroboram com o citado estudo, o que varia devido a fatores externos, uma vez que as alpacas, criadas em seu habitat natural, onde os níveis de pressão de oxigênio são baixos devido às grandes altitudes, somado à espécie que apresenta hiperglicemiante natural (CEBRA *et al.*, 2001). Isso implica na sugestão de aprofundar ainda mais estudos sobre o papel da glicose e dos carboidratos nas diversas ações fisiológicas em animais que sobrevivem às altas altitudes. O possível papel principal das cadeias de açúcar na placenta pode envolver a troca e o metabolismo de várias substâncias, como os minerais, a produção de vários hormônios e a barreira placentária (TATSUZUKI *et al.*, 2009). Assim, o camelídeo sul-americano pode-se constituir ser um novo modelo animal útil para o estudo do metabolismo do açúcar e suas várias facetas que envolvem a diabetes mellitus, especialmente naquilo que diz respeito à proteção contra os efeitos deletérios da glicosilação (ARAYA *et al.*, 2000).

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. Concluímos que, o selênio tem transferência placentária na alpaca mediante selenoproteínas, principalmente selenoproteína P, N, GPx3 e DIO3, que foram demonstradas em nossos resultados.
2. Sugerimos um transporte passivo via sangue de acordo com a morfologia histológica epiteliochorial difusa da placenta que apresenta a espécie animal em questão.
3. Os capilares sanguíneos do córion desempenham um papel importante ao termo da gestação, devido à sua proximidade com o epitélio trofoblástico em condições de altitude elevada e baixa pressão de oxigênio como adaptabilidade à essas condições.
4. No final da gestação, a placenta da alpaca apresentou um perfil de glicosilação com a expressão de carboidratos, principalmente glicose, manose e galactose presentes no trofoblasto e no epitélio e mesênquima do âmnio.
5. A placenta de alpaca expressa resíduos de ácido siálico e tem baixa afinidade pela fucose; enquanto nos capilares sanguíneos fetais a expressão de estruturas complexas bi e triantênárias e manose predominaram, sugerindo a participação destes carboidratos na atividade fisiológica e ao envolvimento de hormônios no parto em seu habitat natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ELNAEIM M, PFARRER C, SABER AS, ABOU-ELMAGD A, JONES CJP, LEISER R. Fetomaternal Attachment and Anchorage in the Early Diffuse Epitheliochorial Placenta of the Camel (*Camelus dromedarius*). **Cells Tissues Organs**. 164(3):141–154. 1999. doi:10.1159/000016652.
- ABD-ELNAEIM M, SABER A, HASSAN A, ABOU-ELMAGD A, KLISCH K, JONES CJP, LEISER R. Development of the Areola in the Early Placenta of the One-humped Camel (*Camelus dromedarius*): A Light, Scanning and Transmission Electron Microscopical Study. **Anat Histol Embryol**. 32(6):326–334. 2003. doi:10.1111/j.1439-0264.2003.00465.x.
- ACUÑA F, CARRIL J, PORTIANSKY EL, FLAMINI MA, MIGLINO MA, BARBEITO CG. Placental glyco-type of the caviomorph rodent *Lagostomus maximus* and its evolution within Eutheria. **Journal of Morphology**. 2023 Mar;284(3):e21566. DOI: 10.1002/jmor.21566. PMID: 36738449.
- AHMED A, C DUNK, S AHMAD, UN KHALIQ. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen--a review. **Placenta**. Mar-Apr 2000;21 Suppl A:S16-24. 2000. doi: 10.1053/plac.1999.0524.
- ALBARAA A, WED P, GULFAM A. Role for Selenium in Metabolic Homeostasis and Human Reproduction. **Nutrients** 13, 3256, 2021. <https://doi.org/10.3390/nu13093256>
- APLIN JD, JONES CJ. Fucose, placental evolution and the glycode. **Glycobiology**, 22, 470– 478.2012. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr156>
- ARAYA AV, ATWATER I, NAVIA MA, JEFFS S. Evaluation of insulin resistance in two kinds of South American camelids: llamas and alpacas. **Comp Med**. Oct;50(5):490-4. 2000. PMID: 11099130.
- BARBEITO C. Historia de las placentas y su relación con la morfología. **Ciencias Morfológicas**. Año 10, Vol. X, N° 2 - DICIEMBRE 2008. p. 1-15.
- BAUER MK, HARDING JE, BASSETT NS, BREIER BH, OLIVER MH, GALLAHER BH, EVANS PC, WOODALL SM, GLUCKMAN PD. Fetal growth and placental function. **Mol Cell Endocrinol**. 140(1–2):115–120. 1998. doi:10.1016/S0303-7207(98)00039-2.
- BRANDAO, A. **Efeitos da suplementação de selênio durante a gestação: uma revisão sistemática**. Dissertação de Mestre, Universidade de São Paulo. 2010.
- BROLIO, M.P., AMBROSIO C.E., FRANCIOLLI A.R., MORONI A.C., GUERRA R.R., MIGLINO M.A. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.4, p.222-232, out./dez. 2010. Disponível em www.cbpa.org.br
- BURK RF, GARY E. OLSON, KRISTINA E. HILL, VIRGINIA P. WINFREY, AMY K. MOTLEY, SUGURU KUOKAWA. Maternal-fetal transfer of selenium in

the mouse. **The FASEB Journal** Volume27, Issue8, pages 3249-3256. 2013. <https://doi.org/10.1096/fj.13-231852>

BURTON M, BURTON R, MARSHALL C. **Information Resources on the South American. United States Department of Camelids: Llamas, Alpacas, Guanacos, and Vicunas.** AWIC Resource Series No. 12. 2006.

CARTER AM, ENDERS AC. The Evolution of Epitheliochorial Placentation. **Annu Rev Anim Biosci.** 1(1):443–467. 2013. doi:10.1146/annurev-animal-031412-103653.

CEBRA CK, TORNQUIST SJ, VAN SAUN RJ, SMITH BB. Glucose tolerance testing in llamas and alpacas. **Am J Vet Res.** May;62(5):682-6. 2001. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.682. PMID: 11341385.

CEBRA, C; ANDERSON, D; TIBARY, A; VAN SAUN, R AND JHONSON, L. **Llama and alpaca care: medicine, surgery, reproduction, nutrition and herd health.** Edition 1. El Sevier, St Louis, MO. USA. 2014.

COMBS GF Jr. Biomarkers of selenium status. **Nutrients.** 2015 Mar 31;7(4):2209-36. doi: 10.3390/nu7042209. PMID: 25835046; PMCID: PMC4425141.

CROCI, D. **Interacción entre lectinas y glicanos en procesos de neovascularización tumoral: implicancias en estrategias de inmunoterapia en cáncer.** Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

CROSS JC. Placental function in development and disease. **Reprod Fertil Dev.** 18(1–2):71–76. 2006. doi:10.1071/RD05121.

CROSS JC, MICKELSON L. Nutritional influences on implantation and placental development. **Nutr Rev.** 64(5 SUPPL. 1). 2006. doi:10.1301/nr.may.S12-S18.

CUFFE JSM, WALTON SL, SINGH RR, SPIERS JG, BIELEFELDT-OHMANN H, WILKINSON L, LITTLE MH, MORITZ KM. Mid- to late term hypoxia in the mouse alters placental morphology, glucocorticoid regulatory pathways and nutrient transporters in a sex-specific manner. **J Physiol.** 592(14):3127–3141. doi:10.1113/jphysiol.2014.272856. 2014. [accessed 2021 Mar 20]. /pmc/articles/PMC4214664/.

DA ANUNCIACÃO A, MESS AM, ORECHIO D, AGUIAR BA, FAVARON PO, MIGLINO MA. Extracellular matrix in epitheliochorial, endotheliochorial and haemochorial placentation and its potential application for regenerative medicine. **Reprod Domest Anim.** 2017 Feb;52(1):3-15. doi: 10.1111/rda.12868. Epub 2016 Dec 7. PMID: 27925305.

DANTZER V, LEISER R. Microvasculature of regular and irregular areolae of the areola-gland subunit of the porcine placenta: structural and functional aspects. **Anat Embryol (Berl).** 188(3):257–267. 1993. doi:10.1007/BF00188217.

DIAZ, R. Cap. 8 Gestación. In: **Reproducción de los animales domésticos.** Libro digital. UNAM. México. 2021.

- DILWORTH, M. R., KUSINSKI, L. C., COWLEY, E., WARD, B. S., HUSAIN, S. M., CONSTÂNCIA, M., GLAZIER, J. D. Placental-specific Igf2 knockout mice exhibit hypocalcemia and adaptive changes in placental calcium transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107(8), 3894–3899. 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911710107>
- ENDERS AC, CARTER AM. What Can Comparative Studies of Placental Structure Tell Us?—A Review. **Placenta**. 25:S3–S9. 2004. doi:10.1016/J.PLACENTA.2004.01.011.
- ENDERS AC, CARTER AM. Comparative Placentation: Some Interesting Modifications for Histotrophic Nutrition - A Review. **Placenta**. 27(SUPPL.):11–16. 2006. doi:10.1016/j.placenta.2005.10.013.
- FERNÁNDEZ, P., BARBEITO, C., PORTIANSKY, E., GIMENO, E. Intermediate filament protein expression and sugar moieties in normal canine placenta. **Histol Histopathol**, vol. 15, p. 1-6. 2000.
- FERNÁNDEZ PE, DIESSLER ME, PACHAME A, ORTEGA HH, GIMENO EJ, PORTIANSKY EL, BARBEITO CG. Intermediate filament proteins expression and carbohydrate moieties in trophoblast and decidual cells of mature cat placenta. **Reprod Domest Anim**. 2014 Apr;49(2):263-9. doi: 10.1111/rda.12265. Epub 2014 Jan 29. PMID: 24471554.
- FOREROS LE. **Vitamina E y selenio en la reproducción porcina**. Sitio Argentino de Producción Animal. Argentina. 2006.
- FOWLER M. Camelids are not ruminants. **Zoo and Wild Animal Medicine** 375-385. 2008. doi: 10.1016/B978-141604047-7.50049-X.
- FURUKAWA S, KURODA Y, SUGIYAMA A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. **J Toxicol Pathol**. 27(1):11–8. 2014. doi:10.1293/tox.2013-0060.
- GABIUS HJ, SIEBERT HC, ANDRÉ S, JIMÉNEZ-BARBERO J, RÜDIGER H. Chemical biology of the sugar code. **ChemBiochem**. Jun 7;5(6):740-64. 2004. doi: 10.1002/cbic.200300753. PMID: 15174156.
- GIMENO, E.J. Y BARBEITO, C.G. Glicobiología, una nueva dimensión para el estudio de la biología y de la patología. **Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria LVIII**; vol. 58, pp. 6-34. 2004.
- GUDEA, N. M.; ROBERTS, C. T.; KALIONISA, B. & KING, R. C. Growth and function of the normal human placenta. **Thrombosis Research**, 114:397-407, 2004.
- HEFNAWY, A. E; PÉREZ, J. T. “Selenio y salud animal” importancia, deficiencia, suplementación y toxicidad. **Arq. Ciênc. Vet. Zool**. Unipar, Umuarama, v. 11, n. 2, p. 153-165, jul./dez. 2008.
- HILL KE, LLOYD RS, YANG JG, READ R, BURK RF. The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. **J Biol Chem**; 266: 10050–10053. 1991.

HILL KE, LLOYD RS, BURK RF. Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3' untranslated region of selenoprotein P mRNA. **Proc Nat Acad Sci U S A**; 90: 537–541. 1993.

HILMY N, YUSOF N. Cap. 5. Anatomy and Histology of Amnion. In: **Human Amniotic Membrane: Basic Science and Clinical Application**. Editorial World Scientific; 1er edición. Pag. 87-101. 2017.

HOFSTEE P, BARTHO LA, MCKEATING DR, RADENKOVIC F, MCENROE G, FISHER JJ, HOLLAND OJ, VANDERLELIE JJ, PERKINS AV, CUFFE JSM. Maternal selenium deficiency during pregnancy in mice increases thyroid hormone concentrations, alters placental function and reduces fetal growth. **J Physiol**. 2019 Dec;597(23):5597-5617. doi: 10.1113/JP278473.

HOGAN C, PERKINS AV. Selenoproteins in the Human Placenta: How Essential Is Selenium to a Healthy Start to Life? **Nutrients**. 2022 Jan 31;14(3):628. doi: 10.3390/nu14030628. PMID: 35276987; PMCID: PMC8838303.

HRADECKÝ P, MOSSMAN HW. Vertebrate Fetal Membranes: Comparative Ontogeny and Morphology; Evolution; Phylogenetic significance; Basic Functions; Research Opportunities. **J Zoo Anim Med**. 18(2/3):55. 1987. doi:10.2307/20460238.

HUANG SA, DORFMAN DM, GENEST DR, SALVATORE D, LARSEN PR. Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human uteroplacental unit and in fetal epithelium. **J Clin Endocrinol Metab**. 2003 Mar;88(3):1384-8. doi: 10.1210/jc.2002-021291. PMID: 12629133.

HUSAKOVA T, L. PAVLATA, A. PECHOVA, K. HAUPTMANOVA, L. TICHY. Assessment of selenium status in alpaca. **Small Ruminant Research** 117 (2014) 176–182. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.030

ÑIGUEZ, L, ALEM R. Role of camelids as means of transportation and exchange in the andean region of Bolivia. **World Animal Review** 86: 12-21. 1996.

ITURRIZAGA, D. **Estudo micro-estrutural, histoquímico e imunoistoquímico da placenta da lhama (*Lama guanicoe glama*)**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. 2005.

ITURRIZAGA D.M., VERECHIA F.T., SANTOS T.C., BOMBONATO P.P., TEIXEIRA D.G. & MIGLINO M.A. The materno-fetal interface in lhama (*Lama guanicoe glama*). **Pesquisa Veterinária Brasileira** 27 (6): 221-228. 2007.

JONES CJ, DANTZER V, STODDART RW. Changes in glycan distribution within the porcine interhaemal barrier during gestation. **Cell Tissue Res**. Mar;279(3):551-64. 1995. doi: 10.1007/BF00318167. PMID: 7736552.

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

JONES, C; F. B. P. WOODING, V. DANTZER, R. LEISER AND R. W. STODDART. A Lectin Binding Analysis of Glycosylation Patterns During Development of the Equine Placenta. **Placenta**, 20, 45–57. 1999.

JONES CJ, WOODING FB, ABD-ELNAEIM MM, LEISER R, DANTZER V, STODDART RW. Glycosylation in the near-term epitheliochorial placenta of the horse, donkey and camel: a comparative study of interbreeding and non-interbreeding species. **J Reprod Fertil**. 2000 Mar;118(2):397-405. PMID: 10864805.

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

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

JONES CJ, CARTER AM, APLIN JD, ENDERS AC. Glycosylation at the fetomaternal interface in hemomonochorial placentae from five widely separated species of mammal: is there evidence for convergent evolution? **Cells Tissues Organs**. 2007;185(4):269-84. doi: 10.1159/000102175. PMID: 17587801.

JONES CJ, SKIDMORE JA, APLIN JD. Placental glycosylation in a cama (camel-llama cross) and its relevance to successful hybridisation. **Mol Phylogenet Evol**. 2008 Dec;49(3):1030-5. doi: 10.1016/j.ympev.2008.09.024. Epub 2008 Oct 4. PMID: 18950721.

JONES, C., APLIN, J., BURTON, G. First Trimester Histiocyte Shows Altered Sialylation Compared with Secretory Phase Glycoconjugates in Human Endometrium. **Placenta**, vol. 31, p. 576-580. 2010.

JONES CJP, ALLEN WRT, WILSHER S. A lectin histochemical study to detect variation in glycosylation at the feto-maternal interface in three interbreeding equine species. **Placenta**. 2017 Oct;58:115-121. doi: 10.1016/j.placenta.2017.08.075. Epub 2017 Sep 4. PMID: 28962689.

KACHUEE, RASOOL; HOSSEIN ABDI-BENEMAR; YAGHOUB MANSOORI; PEDRO SÁNCHEZ-APARICIO; JAMAL SEIFDAVATI; MONA M. M. Y. ELGHANDOUR; REGULO JIMÉNEZ GUILLÉN; ABDELFATTAH Z. M. SALEM. Effects of Sodium Selenite, L-Selenomethionine, and Selenium Nanoparticles During Late Pregnancy on Selenium, Zinc, Copper and Iron Concentrations in Khalkhali Goats and Their Kids. **Biological Trace Element Research** volume 191, pages389–402 (2019).

KASIK JW, RICE EJ. Selenoprotein P expression in liver, uterus and placenta during late pregnancy. **Placenta**. Jan;16(1):67-74. 1995. doi: 10.1016/0143-4004(95)90082-9. PMID: 7716129.

KOŁODZIEJ A, JACYNO E. Effect of dietary selenium and vitamin E supplementation on reproductive performance of young boars. **Elect. J. Polish Agric. Univ.**, 7: 102-107. 2004.

LEISER R, KAUFMANN P. Placental structure: In a comparative aspect. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. 102(3):122–134. 1994. doi:10.1055/s-0029-1211275.

LÓPEZ V, VÁSQUEZ M, HUANCA W, SANTIANI A, BARBEITO C, ZANUZZI C, LIRA B, RODRÍGUEZ J. Estudio lectinohistoquímico del útero de alpacas (*Vicugna pacos*) bajo tratamiento superovulatorio. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, 25(1), 1-15. 2014.

LU J, HOLMGREN A. Selenoproteins. **J Biol Chem**. 2009 Jan 9;284(2):723-7. doi: 10.1074/jbc.R800045200. Epub 2008 Aug 29. PMID: 18757362.

MAJEWSKA M, PANASIEWICZ G AND SZAFRANSKA B. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) family localized in chorionic cells within the epitheliochorial/diffuse placenta of the alpaca (*Lama pacos*). **Acta Histochemica** Volume 113, Issue 5, September 2011, Pages 570-577.

MAJEWSKA M, PANASIEWICZ G AND SZAFRANSKA B. Expression of pregnancy-associated glycoprotein family in the epitheliochorial placenta of two Camelidae species (*C. dromedarius* and *C. bactrianus*). **Acta Histochemica** 115 (2013) 669–676.

McKENZIE, R.C., ARTHUR, J.R., MILLER, S.M., RAFFERTY, T.S. y BECKETT, G.J. Selenium and the immune system. En: **Nutrition and immune function**. Calder, P.C., C.J. Field y H.S. Gill (Eds.). CABI Publishing. Wallingford, Reino Unido. pp. 239-250. 2002.

MEESTERS M, OPSOMER G, GOVAERE J. Macroscopic evaluation of the placenta of the alpaca (*Vicugna pacos*). **Reprod Dom Anim**. 2019; 54:996–1002. <https://doi.org/10.1111/rda.13453>

MISTRY HD, BROUGHTON PIPKIN F, REDMAN CW, POSTON L. Selenium in reproductive health. **Am J Obstet Gynecol**. Jan;206(1):21-30. 2012. doi: 10.1016/j.ajog.2011.07.034. Epub 2011 Jul 29. PMID: 21963101.

MOJADADI A, AU A, SALAH W, WITTING P, AHMAD G. Role for Selenium in Metabolic Homeostasis and Human Reproduction. **Nutrients**. Sep 18;13(9):3256. 2021. doi: 10.3390/nu13093256. PMID: 34579133; PMCID: PMC8469766.

MUÑOZ DEL VALLE, P. **Implicación del selenio en la programación del síndrome metabólico**. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 175p. 2016.

NANDAKUMARAN M, DASHTI HM, AL-ZAID NS. Maternal-fetal transport kinetics of copper, selenium, magnesium and iron in perfused human placental lobule: in vitro study. **Mol Cell Biochem**. 2002 Feb;231(1-2):9-14. doi: 10.1023/a:1014426612180. PMID: 11952171.

NAVARRETE, M., MANZANO, R., GONZALEZ, F., PEREZ, W., KÖNIG, H. Lamas und Alpakas – ein wichtiger Wirtschaftsfaktor bei der einheimischen Bevölkerung im Hochland der Anden. Fachzeitschrift **LAMAS**. 25 Jahrgang, heft 4. Pp. 10-15. 2017.

OLIVERA L, ZAGO D, JONES C, BEVILACQUA E. Developmental changes at the materno-embryonic interface in early pregnancy of the alpaca, *Lamos pacos*. **Anat Embryol** (Berl). 207(4–5):317–331. 2003a. doi:10.1007/s00429-003-0346-1.

OLIVERA L, ZAGO D, LEISER R, JONES C, BEVILACQUA E. Placentation in the alpaca *Lama pacos*. **Anat Embryol** (Berl). 207(1):45–62. 2003b. doi:10.1007/s00429-003-0328-3.

OLIVERA, L. Histological Characterization utero- placentaries membranes of the alpaca. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** Vol. 15 (Supl. 1). 202-204. 2007.

OLIVERA L, BEVILACQUA E. Interacción trofoblasto-epitelio uterino en la formación de la placenta epiteliocorial, alpacas. **Rev. Investig. Altoandina**; Vol. 16 N°2: 17-24. 2014.

PAPP LV, LU J, HOLMGREN A, KHANNA KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid Redox Signal.** 2007 Jul;9(7):775-806. doi: 10.1089/ars.2007.1528. PMID: 17508906.

PÈRE, M. C. Materno-foetal exchanges and utilisation of nutrients by the foetus: Comparison between species. **Reproduction Nutrition Development**, Vol. 43, pp. 1–15. 2003. <https://doi.org/10.1051/rnd:2003002>

PINTO C, MARTIN C, CID M. Camélidos sudamericanos: Clasificación, origen y características. **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias** 4 (1): 23-36. 2010.

QAZI IH, ANGEL C, YANG H, PAN B, ZOIDIS E, ZENG C-J, HAN H, ZHOU G-B. Selenium, Selenoproteins, and Female Reproduction: A Review. **Molecules.** 2018; 23(12):3053. <https://doi.org/10.3390/molecules23123053>

QUISPE, E., RODRÍGUEZ, T., ÑIGUEZ, L. Y MUELLER, J. Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. **Información sobre recursos zogenéticos**, 45, 1-14. 2009. doi: 10.1017 / S1014233909990277

QUISIRUMBAY-GAIBOR J; VÍLCHEZ-PERALES C. Meta-analysis: effect of selenium dietary supplementation on tissue concentration in pigs. **Scientia Agropecuaria** 10(3): 369 – 375 (2019).

RAYMAN, M.P. The argument for increasing selenium intake. **Proc. Nutr. Soc.** 61: 203-215. 2002.

ROA I, SMOK C, PRIETO R. Placenta: Anatomía e Histología Comparada. **Int. J. Morphol.**, 30(4):1490-1496. 2012.

SAKAMOTO M, HING MAN C, DOMINGO J, CHIHAYA K, KATSUYUKI M. Placental transfer and levels of mercury, selenium, vitamin E, and docosahexaenoic acid in maternal and umbilical cord blood. **Environment International**, Volume 111, pages 309-315. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.11.001>.

SANCHIS, EG; MERKIS, CI; KONCURAT, MA. Detección de glicoconjugados en las vellosidades placentarias porcinas de diferentes períodos gestacionales. **Revista Electrónica de Veterinaria**, vol. 10, núm. 12, diciembre, 2009, pp. 1-12

SANCHIS G, CRISTOFOLINI A, CHANIQUE A, MERKIS C. Glandular and vascular glycosilation pattern in porcine placenta. **Revista Electrónica de Veterinaria**: 2012, Vol. 13 N° 3, pp. 1-15.

SCHAEFER DL, BILDFELL R.J, LONG P, LÖHR CV. Characterization of the Microanatomy and Histopathology of Placentas from Aborted, Stillborn, and Normally Delivered Alpacas (*Vicugna pacos*) and Llamas (*Lama glama*). **Veterinary Pathology** 49(2) 313-321. 2012.

SCHOMBURG L. Selenoprotein P - Selenium transport protein, enzyme and biomarker of selenium status. *Free Radic Biol Med*. 2022 Oct; 191:150-163. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.08.022. Epub 2022 Sep 5. PMID: 36067902.

SEBOUSSI R; G. ALHADRAMI; M. ASKAR; W. IBRAHIM; K. HASSAN; B. MAHJOUB. Effect of Different Selenium Supplementation Levels on Selenium Status in Camel. **Biol Trace Elem Res** (2008) 123:124–138. DOI 10.1007/s12011-008-8107-x

SUMAR JB. Reproduction in female South American domestic camelids. **J Reprod Fertil Suppl**. 1999; 54:169-78

STEVEN DH, BURTON GC, SUMAR J, NATHANIELSZ PW. **Ultrastructural observations on the placenta of the alpaca (*Lama pacos*)**. 1980. DOI: 10.1016/S0143-4004(80)80013-0

VARKI A. Biological roles of glycans. **Glycobiology**. 2017 Jan;27(1):3-49. doi: 10.1093/glycob/cww086. Epub 2016 Aug 24. PMID: 27558841; PMCID: PMC5884436.

VEGA R, CASTILLO M, HORNELAS Y, GÓMEZ N, BELTRÁN J, VADILLO F. Análisis tridimensional de la estructura de las membranas corioamnióticas humanas al término de la gestación. **Ginecol Obstet Mex** 2008;76(1):38-44. 2008.

WALSH G. Post-translational Modification of Protein Biopharmaceuticals. **Drug Discov Today**. 2010 Sep;15 (17-18): 773-80. Doi: 10.1016/j.drudis.2010.06.009

WOODING FBP, MORGAN G, FOWDEN AL, ALLEN WR. Separate Sites and Mechanisms for Placental Transport of Calcium, Iron and Glucose in the Equine Placenta. **Placenta**. 21(7):635–645. 2000. doi:10.1053/plac.2000.0550.

WOODING FB, FOWDEN AL. Nutrient transfer across the equine placenta: correlation of structure and function. **Equine Vet J**. 2006 Mar;38(2):175-83. doi: 10.2746/042516406776563341. PMID: 16536389.

WOODING FBP. The ruminant placental trophoblast binucleate cell: an evolutionary breakthrough. **Biol Reprod**. 2022 Sep 12;107(3):705-716. doi: 10.1093/biolre/ioac107. PMID: 35594454; PMCID: PMC9476219.

ZACHARA BA. Selenium in Complicated Pregnancy. A Review. **Advances in Clinical Chemistry**, Volume 86, 2018, Pages 157-178. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.05.004>

ZAMUDIO S. The placenta at high altitude. **High Alt Med Biol**. 4(2):171–191. 2003. doi:10.1089/152702903322022785.

APÊNDICE

APÊNDICE 1: PROTOCOLO DE LABORATÓRIO

PROCEDIMENTO PARA COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

- Desparafinização em Estufa 60°C por 60 minutos.
- Desparafinização com Neo Clear I (substituto do Xilol) por 10 minutos.
- Desparafinização com Neo Clear II (substituto do Xilol) por 10 minutos.
- Hidratação com Álcool Etílico 100% 5 minutos.
- Hidratação com Álcool Etílico 90% 5 minutos.
- Hidratação com Álcool Etílico 70% 5 minutos.
- Lavagem com Água destilada por 7 minutos.
- Coloração Hematoxilina por 3 minutos.
- Lavagem Água corrente por 3 minutos.
- Coloração Eosina por 7 minutos.
- Desidratação em Álcool Etílico 70% 5 minutos.
- Desidratação em Álcool Etílico 90% por 5 minutos.
- Desidratação em Álcool Etílico 100% I por 3 minutos.
- Desidratação em Álcool Etílico 100% II por 5 minutos.
- Fixação do corante e conservação do material em Neo Clear I por 5 minutos.
- Fixação do corante e conservação do material em Neo Clear II por 10 minutos.
- Montar com Permount e lamínulas

PROCEDIMENTO PARA COLORAÇÃO TRICRÔMICO DE MASSON

- Desparafinização em Estufa 60°C por 60 minutos.
- Desparafinização com Neo Clear I (substituto do Xilol) por 10 minutos.
- Desparafinização com Neo Clear II (substituto do Xilol) por 10 minutos.
- Hidratação com Álcool Etílico 100% 5 minutos.
- Hidratação com Álcool Etílico 90% 5 minutos.
- Hidratação com Álcool Etílico 70% 5 minutos.
- Lavagem com Água destilada por 7 minutos.
- Cobrir amostra em solução de Bouin por 1 hora na estufa a 60 graus e deixar esfriar.
- Lavar em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Bouin.
- Passe em água destilada
- Core pela solução de Hematoxilina Férrica de Weigert por 10 minutos.
- Lavar em água corrente por 10 minutos.
- Passe em água destilada.
- Corar pela solução de Fuscina ácida - Biebrich Scarlet por 15 minutos.
- Passe por água destilada.
- Diferencie pela solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico durante 3 a 5 minutos.
- Passe por água destilada.
- Corar pela solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos.
- Lave em água destilada.
- Passe pela solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos.
- Passe por água destilada.
- Desidrate com álcool absoluto e deixar secar.
- Clarificar em xilol e montar.

PROCEDIMENTO PARA COLORAÇÃO PICROSIRIUS RED

- Desparafinização com Xilol I por 10 minutos
- Xilol II por 10 minutos
- Álcool + Xilol por 10 minutos
- Álcool 100% I por 10 minutos
- Álcool 100% II por 10 minutos
- Álcool 90% por 10 minutos
- Álcool 70% por 10 minutos
- Lavagem rápida em água corrente
- Aplicar ácido fosfomolibdico máximo por 1 minuto
- Lavagem rápida em água corrente
- Aplicar picrosirius por 45 a 60 minutos
- Água corrente por 5 minutos
- Álcool 70% por 5 minutos
- Álcool 90% por 5 minutos
- Álcool 100% I por 5 minutos
- Álcool 100% II por 5 minutos
- Álcool + Xilol por 5 minutos
- Xilol por 5 minutos
- Montar com Permout e lamínulas

PROTOCOLO DE IMUNOHISTOQUÍMICA

<i>Procedimento</i>	<i>Descrição do procedimento</i>
<i>Preparação prévia</i>	As amostras, uma vez fixadas em formalina tamponada a 10% por 72 horas, foram colocadas em solução de parafina para serem cortadas em micrótomo com espessura de 5 µm e montadas em lâminas positivas da marca Globe Scientific inc ®.
<i>Desparafinado</i>	Foi feito com uma solução Neo Clear ® dos laboratórios SIGMA ALDRICH, que é um solvente aromático substituto do Xileno. Para esse processo, as amostras foram levadas a duas lavagens de 10 minutos.
<i>Hidratação</i>	Após a desparafinação, a amostra foi submetida a um processo de hidratação, que compreende duas lavagens de 10 minutos em etanol 100%.
<i>Bloqueio da peroxidase endógena</i>	As amostras são lavadas durante 30 minutos numa solução de 200 ml de metanol e 4 ml de peróxido de hidrogénio pra reduzir atividade peroxidativa do tecido.
<i>Hidratação</i>	A hidratação da amostra é continuada submetendo a amostra a diferentes concentrações de álcoois de forma decrescente em quatro lavagens de cinco minutos cada um (duas vezes com álcool a 90%, uma vez a 70% e uma final a 50%)
<i>Lavados em buffer Fosfato (PBS)</i>	Foram realizadas três lavagens em PBS de cinco minutos cada um.
<i>Recuperação de antígeno</i>	As amostras foram colocadas em uma solução tampão de citrato a pH 6 e aquecidas usando um forno de

<i>Lavados em buffer Fosfato (PBS)</i>	micro-ondas de 750 watts por 10 minutos e depois deixadas esfriar em temperatura ambiente.
<i>Inativação de uniões inespecíficas</i>	Foram realizadas três lavagens em PBS de cinco minutos cada um.
<i>Aplicação de Anticorpo primário</i>	Foi aplicado soro de albumina bovina 1% (BSA 1%) e as amostras foram deixadas em repouso em câmara úmida em temperatura ambiente por 30 minutos.
<i>Lavados em buffer Fosfato (PBS)</i>	As diluições dos anticorpos primários foram realizadas de acordo com a tabela 1. 100 µL das diluições de cada uma dos anticorpos foram aplicadas em suas respectivas lâminas rotuladas com o código da amostra em uma câmara úmida e deixadas em repouso durante a noite em refrigeração a 4°C.
<i>Aplicação de Anticorpo secundário</i>	Foram realizadas três lavagens em PBS de cinco minutos cada um.
<i>Lavados em buffer Fosfato (PBS)</i>	Em cada amostra foram aplicados cerca de 100 µL do anticorpo secundário provido no kit segundo seja monoclonal ou policlonal do laboratório Santa Cruz Biotechnology® e as lâminas foram colocadas em câmara úmida, permitindo repousar por 30 minutos em temperatura ambiente.
<i>Aplicação de Enzima AB</i>	Foram realizadas três lavagens em PBS de cinco minutos cada um.
	Em cada amostra foram aplicados cerca de 100 µL da enzima Avidina-Biotina provido no kit segundo seja monoclonal ou policlonal do laboratório Santa Cruz Biotechnology®) e as lâminas foram colocadas em câmara úmida, permitindo repousar por 30 minutos em temperatura ambiente.

<i>Processo de revelado</i>	<p>O cromógeno diaminobenzidina (DAB) do Laboratorios Vector® foi preparado de acordo com a diluição do fabricante. Em cada lâmina aplicou-se 100 µL do cromógeno preparado, deixando-se realizar a reação de desenvolvimento até que fosse observada a marcação, cada anticorpo teve um tempo de marcação diferente, então a reação foi interrompida com uma lavagem em água corrente e outro lavado em água destilada por 5 minutos.</p>
<i>Coloração de contraste</i>	<p>Se uso Hematoxilina de Harris do laboratório Merck®, colocando a lâmina por cinco segundos y se enxugo em água corrente para eliminar o excedente de colorante. Se fiz um lavado em água corrente por 5 minutos e logo em água destilada por 5 minutos.</p>
<i>Desidratação</i>	<p>As amostras foram submetidas a uma passagem de lavagens em álcoois em concentrações crescentes (50 °, 70 ° e 96 °), duas lavagens em etanol 100% e duas lavagens em um derivado de xileno (Neo Clear®) por 5 minutos em cada solução.</p>
<i>Montagem de lâminas</i>	<p>Bálsamo do Canadá ® foi utilizado colocando uma gota do produto com leve pressão por 10 segundos. Posteriormente, a lâmina foi limpa após 48 horas com Neo Clear ® para remoção de resíduos de cola.</p>

PROTOCOLO DE LECTINHISTOQUÍMICA

<i>Procedimento</i>	<i>Descrição do procedimento</i>
<i>Preparação prévia</i>	As amostras, uma vez fixadas em formalina tamponada a 10% por 72 horas, foram colocadas em solução de parafina para serem cortadas em micrótomo com espessura de 5 µm e montadas em lâminas positivas da marca Globe Scientific inc ®.
<i>Desparafinado</i>	Foi feita com uma solução Neo Clear ® dos laboratórios SIGMA ALDRICH, que é um solvente aromático substituto do Xileno. Para esse processo, as amostras foram levadas a duas lavagens de 12 minutos.
<i>Hidratação</i>	Após a desparafinação, a amostra foi submetida a um processo de hidratação, que compreende duas lavagens de 10 minutos em etanol 100%. Isso se deve ao fato de a parafina substituir os fluidos dos tecidos e ser necessária para hidratar os tecidos para evitar a deformação da histoarquitetura.
<i>Bloqueio da peroxidase endógena</i>	Em geral, os tecidos têm atividade peroxidativa, como, por exemplo, em tecidos onde há eritrócitos ou hepatócitos, o que pode causar alterações nos resultados e, portanto, nos dar uma leitura errada, por isso optou-se por submeter previamente a amostra a peróxido de hidrogênio. As amostras são lavadas durante 30 minutos numa solução de 200 ml de metanol e 4 ml de peróxido de hidrogênio.
<i>Hidratação</i>	A hidratação da amostra foi continuada submetendo a amostra às diferentes concentrações de álcoois de forma decrescente em quatro lavagens de cinco

	minutos cada um (duas vezes com álcool a 96%, uma vez a 70% e uma final a 50%)
<i>Lavados em buffer Fosfato (PBS)</i>	Foram realizadas três lavagens em PBS de cinco minutos cada um.
<i>Inativação de uniões Inespecíficas</i>	Foi aplicado soro de albumina bovina 1% (BSA 1%) e as amostras foram deixadas em repouso em câmara úmida em temperatura ambiente por 30 minutos.
<i>Aplicação de Lectinas Biotiniladas</i>	As diluições das lectinas foram realizadas de acordo com a tabela 1. 100 µL das diluições de cada uma das lectinas foram aplicadas em suas respectivas lâminas rotuladas com o código da amostra, seção e lectina em uma câmara úmida e deixadas em repouso durante a noite em refrigeração a 4°C.
<i>Lavados em buffer Fosfato (PBS)</i>	Foram realizadas três lavagens em PBS de cinco minutos cada um.
<i>Processo de Amplificação</i>	Em cada amostra foram aplicados cerca de 50 µL da solução de Estreptavidina-Peroxidase (Estreptavidina Peroxidase Horseradish VECTOR LABS®) e as lâminas colocadas em câmara úmida, permitindo repousar por 30 minutos em temperatura ambiente.
<i>Lavados em buffer Fosfato (PBS)</i>	Foram realizadas três lavagens em PBS de cinco minutos cada um.
<i>Processo de revelado</i>	O cromógeno diaminobenzidina (DAB) do Laboratorios Vector foi preparado de acordo com a diluição do fabricante. Em cada lâmina aplicou-se 100 µL do cromógeno preparado, deixando-se realizar a reação de desenvolvimento até que fosse observada a marcação, cada lectina teve um tempo de marcação diferente, então a reação foi interrompida com uma

lavagem em água corrente e outro lavado em água corrente por 5 minutos.

Coloração de contraste

Se uso Hematoxilina de Harris, colocando a lâmina por cinco segundos y se enxugo em água corrente para eliminar o excedente de colorante. Se fiz um lavado em água corrente por 5 minutos e logo em água destilada por 5 minutos.

Desidratação

As amostras foram submetidas a uma passagem de lavagens em álcoois em concentrações crescentes (50°, 70 ° e 96 °), duas lavagens em etanol 100% e duas lavagens em um derivado de xileno (Neo Clear®) por 5 minutos em cada solução.

Montagem de lâminas

Bálsamo do Canadá ® foi utilizado colocando uma gota do produto com leve pressão por 10 segundos. Posteriormente, a lâmina foi limpa após 48 horas com Neo Clear ® para remoção de resíduos de cola.