



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANDRÉ MENEZES DO VALE

**CARACTERIZAÇÃO DOS EVENTOS REPRODUTIVOS EM PREÁS (*Galea spixii* Wagler,
1831)**

MOSSORÓ – RN
2017

ANDRÉ MENEZES DO VALE

**CARACTERIZAÇÃO DOS EVENTOS REPRODUTIVOS EM PREÁS (*Galea spixii*
Wagler, 1831)**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira-UFERSA

MOSSORÓ – RN
2017

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

V149c VALE, ANDRÉ MENEZES DO VALE.
Caracterização dos eventos reprodutivos em
preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) / ANDRÉ MENEZES
DO VALE VALE. - 2017.
307 f. : il.

Orientador: MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA OLIVEIRA.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2017.

1. Sistema reprodutor feminino. 2. Ciclo
estral. 3. Placentação. 4. Embrião/feto. 5.
Glicosaminoglicanos. I. OLIVEIRA, MOACIR FRANCO
DE OLIVEIRA, orient. II. Título.



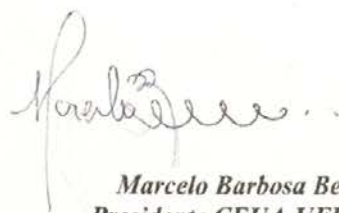
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Mossoró, 15 de março de 2016.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado *“Caracterização dos eventos reprodutivos, placentação e expressão dos glicosaminoglicanos sulfatados em preás (*Galea spixii*, Wangler, 1831)”*, protocolo n. 23091.010264/2015-90 sob a responsabilidade de Moacir Franco de Oliveira – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da lei 11794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido –UFERSA em reunião de 09/09/2015

Vigência do projeto	Março a maio de 2016
Espécie/linhagem	<i>Galea spixii</i>
N. de Animais	15
Peso/idade	fetos
Sexo	Machos/Fêmeas
Origem	CEMAS



Marcelo Barbosa Bezerra
Presidente CEUA-UFERSA

ANDRÉ MENEZES DO VALE

**CARACTERIZAÇÃO DOS EVENTOS REPRODUTIVOS EM *Galea spixii* Wagler,
1831**

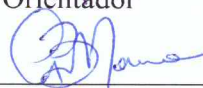
Tese apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-Árido - UFERSA, Campus de Mossoró,
como parte das exigências para a obtenção do
título de doutor em Ciência Animal.

APROVADO EM: 17/02/2017

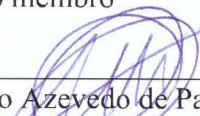
BANCA EXAMINADORA:



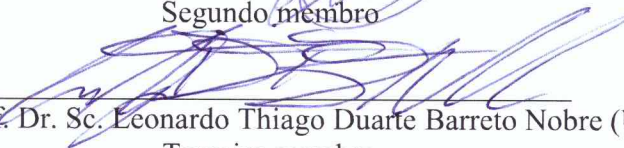
Prof. Dr. Sc. Moacir Franco de Oliveira (UFERSA)
Orientador



Prof. Dr. Sc. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFERSA)
Primeiro membro



Prof. Dr. Sc. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes (UFERSA)
Segundo membro



Prof. Dr. Sc. Leonardo Thiago Duarte Barreto Nobre (UFRN)
Terceiro membro



Prof. Dr. Sc. Naisandra Bezerra da Silva (UFRN)
Quarto membro

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRÉ MENEZES DO VALE - Juazeiro do Norte/CE, 20/05/1980. Concluiu o ensino médio no colégio Hipócrates em Natal/RN. Possui graduação em Farmácia e Análises Clínicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2004). Foi monitor da disciplina de Farmacotécnica 1 e 2 no período de 01/03/2002 a 27/02/2004. É especialista em Citologia Clínica pela Universidade Potiguar e especialista em hematologia Clínica pela Universidade Federal do Ceará. É mestre em Ciência Animal - na área de morfofisiologia – pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Atualmente exerce o cargo de Farmacêutico bioquímico no Hospital Veterinário Dix Huit Rosado Maia da UFERSA. Tem experiência nas áreas de Farmácia, Análises Clínicas, Microbiologia Clínica e Placentação de roedores. Possui 21 artigos completos publicados em periódicos nacionais e internacionais, atuando ainda como revisor de uma revista nacional e docente externo da disciplina de Hematologia Veterinária no Programa de Residência Multiprofissional em Medicina Veterinária da UFERSA.

DEDICATÓRIA

A **Deus** pela proteção, amor e força em todos os momentos da minha vida. Obrigado senhor por me abençoar todos os dias!

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Diana Maria Moreira de Menezes** e **Pedro Sérgio Bezerra do Vale**. À minha irmã **Candice Menezes do Vale**. Vocês representam minha felicidade e sempre me apoiaram.

MUITO OBRIGADO!

DEDICATÓRIA

À minha vovó Ozir (*in memorian*).
Sei que a senhora sempre teve
orgulho de mim...

AGRADECIMENTOS

Ao meu cêlere e grandioso orientador **Professor Dr. Moacir Franco de Oliveira** pela profunda orientação, apoio, ensinamentos, compreensão e conselhos que só um pai-orientador poderia proporcionar. Muito obrigado Moa. Saio com um título acadêmico dignificante e ainda me tornei um cidadão e pessoa melhor.

Ao Magnífico Reitor da UFERSA **Professor Dr. José de Arimatéia Matos** pelo incentivo, apoio e empenho em tornar a nossa universidade um ambiente de pesquisa, integração e desenvolvimento de modo a promover completa harmonia para tal instituição. Muito obrigado professor por tornar essa minha conquista possível e materializada nesse momento.

À **Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)**, **Universidade de São Paulo (USP)** e a **Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)** por tornar possível a minha conclusão do doutorado em Ciência Animal.

Ao **Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (BIOPOL/UFRN)** por possibilitar o aprendizado e a estrutura laboratorial para a realização das técnicas de eletroforese de polissacarídeos.

Ao **Hospital Veterinário Dix-huit Rosado Maia (HOVET)** e funcionários pelo incentivo e suporte durante o período do doutorado.

Ao **Professor Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha** e ao biomédico **Dr. Leonardo Thiago Duarte Barreto Nobre** pelo apoio fundamental para que este trabalho fosse concluído. Nobres profissionais com enorme capacidade, inteligência e dedicação ao trabalho que serviram de inspiração para a realização desta pesquisa.

Ao amigo, Professor, Cirurgião e Médico Veterinário **Dr. Paulo Fernando Cisneiros da Costa Reis, Diretor do HOVET**. Paulinho você é um gigantesco exemplo de caráter, excelente profissional, pai e amigo de todas as horas cujos elogios e admiração não caberiam nas páginas desta tese. Sem o seu apoio eu não teria logrado êxito.

Ao amigo, Mestre, Médico Veterinário, Vice-Diretor do HOVET e futuro Médico, **Heider Irinaldo Pereira Ferreira**, por toda a ajuda, incentivo, ensinamentos, conselhos e apoio nessa jornada. Sou seu grande fã e desejo tudo de melhor para você. Valeu “peixe”.

À **Keliane de Oliveira Cavalcante**, Pró-reitora de Gestão de Pessoas da UFERSA, por todo apoio nesse trabalho bem como por todas as melhorias promovidas em favor do servidor desta universidade.

Aos amigos **Gleidson Benevides de Oliveira**, **Hélio Noberto de Araújo Júnior**, **Ferdinando Vinícius Fernandes Bezerra**, **Felipe Venceslau Câmara** e **Emanuel Calixto Santana Loreno** pela inestimável ajuda, suporte e motivação para a realização deste trabalho.

Às Médicas Veterinárias e minhas orientadas da residência do HOVET **Dra. Ivanna Cristina Nunes Gadelha Lelis** e **Maria Vanusa Nunes de Meireles** pela grande ajuda nos processamentos de algumas amostras deste experimento.

CARACTERIZAÇÃO DOS EVENTOS REPRODUTIVOS EM PREÁS (*Galea spixii* Wagler, 1831)

VALE, A. M. **Caracterização dos eventos reprodutivos em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831).** 2017. 307f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2017.

RESUMO: O período de gestação, características do ciclo reprodutivo, incluindo verificação da influência do efeito macho, descrição do sistema reprodutor feminino, placentação, desenvolvimento embrionário e fetal – acrescido de análises morfológicas - e expressão dos glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados nos órgãos reprodutivos e placentários foram caracterizados em fêmeas de preás como forma de contribuir para a conservação da espécie. Para tanto, utilizaram-se 45 fêmeas não gestantes nos seguintes experimentos: 15 fêmeas foram distribuídas em três grupos experimentais, seguido da adição de um macho em cada grupo de modo que após a cópula e fecundação, as fêmeas eram separadas segundo datas compatíveis com início (dias cinco, 10 e 15), meio (dias 20, 25, 30 e 35) e fim (dias 40, 45, 50 e 55) da gestação. Tal condição visou à obtenção de fragmentos dos sacos gestacionais, placentas e órgãos do sistema reprodutor feminino, os quais foram fixados em paraformaldeído 4% e submetidos às técnicas de microscopia de luz. As amostras fixadas em glutaraldeído foram destinadas à realização de técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Além disto, usou-se a prozima para extração dos GAGs, seguida da eletroforese em gel de agarose e posterior quantificação por densitometria. O segundo experimento consistiu na utilização de cinco fêmeas, alocadas em recinto que continha um macho para o acompanhamento da duração da gestação. O terceiro experimento objetivou a caracterização do ciclo estral em um grupo contendo cinco fêmeas mais um macho, o qual encontrou-se preso em gaiola e outras cinco, em box isento deste último. O quarto experimento foi realizado por meio da análise morfológica de embriões com 20, 25, 30 e 35 dias além de fetos nos dias 40, 45, 50, 55, 60 e recém-nascidos. Os resultados revelaram a presença de um útero duplo incompleto, formado por dois cornos, um corpo septado e uma cérvix. Os órgãos do sistema reprodutor apresentaram características macroscópicas e histológicas semelhantes as relatadas para outros roedores. A duração da gestação demonstrou média de $59 \pm 2,7487$ dias e o ciclo sexual foi classificado como poliétrico contínuo, com período médio de $14,8 \pm 0,73$ dias para as fêmeas submetidas ao efeito macho e $14,6 \pm 0,75$ dias para aquelas do outro grupo. Além disto, a presença do macho influenciou significativamente ($P < 0,05$) a duração do diestro, tornando-o mais longo. A inversão do saco vitelino ocorreu no décimo quarto dia de gestação e o endoderma visceral situou-se em aposição aos tecidos uterinos. A placenta corioalantoide apresentou forma discoidal e possuiu regiões bem definidas de espongiotrofoblasto, labirinto e subplacenta a partir da gestação intermediária. O desenvolvimento embrionário foi semelhante ao observado em roedores *hystrix*, sendo a transição para a fase fetal, ocorrida aos 40 dias de gestação. Os dados morfológicos possibilitaram o estabelecimento de correlações com a idade gestacional. O dermatam sulfato foi o GAG predominante em amostras de tubas uterinas, vaginas e placentas, ao passo que o heparan expressou-se mais no corpo do útero, no início da gestação. Houve ainda elevadas concentrações de GAGs no útero gestante e no sistema reprodutor na fase estrogênica quando comparada ao diestro. Conclui-se que os eventos reprodutivos apresentaram características da espécie correlacionáveis com outras da ordem Rodentia, fato este que indica um conjunto de estratégias evolutivas relacionadas com a sua manutenção.

Palavras Chave: Sistema reprodutor feminino, Ciclo estral, Placentação, Embrião, Feto, Morfometria, Glicosaminoglicanos.

CHARACTERIZATION OF EVENTS REPRODUCTIVE IN GALEA (*Galea spixii* Wagler, 1831)

VALE, A. M. **Characterization of events reproductive in galea (*Galea spixii* Wagler, 1831).** 2017. 307p. Thesis (Doctor's degree in animal science) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2017.

ABSTRAT: The gestation period, the characteristics of the reproductive cycle, including the selection of the influence of the male effect, the description of the female reproductive system, placentation, embryonic and fetal development – added of the morphometric analysis - and the expression of sulfated glycosaminoglycans (GAGs) in the reproductive and placental organs were the ways to contribute with the conservation of the species. For this, 45 non-pregnant females were used in the following experiments: 15 females were distributed in three experimental groups, followed by the addition of one male in each group, so that after the copulation and fertilization the females were separated in accordance with the compatible dates of beginning (days 5, 10 and 15), middle (days 20, 25, 30 and 35) and end (days 40, 45, 50 and 55) of gestation. This condition was obtained to obtain fragments of gestational sacs, placentas and organs of the female reproductive system, which were fixed in 4% paraformaldehyde and submitted to light microscopy techniques. The samples fixed in glutaraldehyde were performed in scanning and transmission electron microscopy techniques. In addition, prozima was used for GAG extraction, followed by agarose gel electrophoresis and subsequent quantification by densitometry. The second experiment consisted of the use of five females, housed in a room that contained a male to monitor the duration of gestation. The third experiment aimed to characterize the estrous cycle in a group containing five females plus one male, which was found trapped in a cage and another five, in a box exempt from the latter. The fourth experiment was performed by means of the morphometric analysis of embryos with 20, 25, 30 and 35 days plus fetuses on days 40, 45, 50, 55, 60 and newborns. The results revealed the presence of an incomplete double uterus, formed by two horns, a septate body and a cervix. The organs of the reproductive system presented macroscopic and histological characteristics similar to those reported for other rodents. The duration of gestation showed an average of $59 \pm 2,7487$ days and the sexual cycle was classified as continuous polystyric, with a mean period of 14.8 ± 0.73 days for females submitted to the male effect and 14.6 ± 0.75 days for those of the other group. In addition, the male presence significantly influenced ($D < 0.05$) the duration of the diestrus, making it longer. The yolk sac inversion occurred on the 14th day of gestation and the visceral endoderm was placed in apposition to the uterine tissues. The chorioallantoic placenta presented a discoidal shape and had well defined regions of spongiotrophoblast, labyrinth and subplacenta from the intermediate gestation. Embryonic development was similar to that observed in histricognatis rodents, being the transition to the fetal phase, occurring at 40 days of gestation. Morphometric data allowed the establishment of correlations with gestational age. Dermatan sulfate was the predominant GAG in samples of uterine tubes, vaginas and placentas, whereas heparam expressed more in the body of the uterus at the beginning of gestation. There were also high concentrations of GAGs in the pregnant uterus and still in the reproductive system in the estrogenic phase when compared to the diestrus. It is concluded that the reproductive events presented characteristics of the species correlated with others of the order Rodentia, fact that indicates a set of evolutionary strategies related to its maintenance.

Key words: Female reproductive system, Estrous cycle, Placentation, Embryo, Fetus, Morphometry, Glycosaminoglycans.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

MEC	Matriz extracelular
PGs	Proteoglicanos
GAGs	Glicosaminoglicanos
GAG	Glicosaminoglicano
HS	Heparan sulfato
CS	Condroitina sulfato
DS	Dermatana sulfato
QS	Queratina sulfato
HÁ	Ácido hialurônico
LIM-1	Gene LIM-1 (codifica a proteína LIM-1, cujo domínio contém sítios ricos em adenina e timina)
HOX	Gene homeobox
E2	Estrógeno
P4	Progesterona
NK	Célula “Natural Killer”
IgA	Imunoglobulina tipo A
IgG	Imunoglobulina tipo G
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
ER- α	Receptor estrogênico tipo alfa
ER- β	Receptor estrogênico tipo beta
PR-A	Receptor progesterônico tipo A
PR-B	Receptor progesterônico tipo B
PR-C	Receptor progesterônico tipo C
EGF	Fator de crescimento epidermal
VEGF	Fator de crescimento do endotélio dos vasos
IGFs	Fator de crescimento semelhante à insulina
ZPm3	Glicoproteína da zona pelúcida tipo 3
MCI	Massa celular interna
DNA	Ácido desoxirribonucleico
LIF	Fator inibidor da leucemia
TGF- α	Fator transformador do crescimento tipo alfa
TGF- β	Fator transformador do crescimento tipo beta
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito-monócito
DA	Decídua antimesometrial
ZDP	Zona de decídua primária
DM	Decídua mesometrial
ZRG	Zona rica em glicogênio
HE	Hematoxilina e Eosina
PAS	Ácido periódico de Schiff
^{14}C	Carbono 14 radioativo

GATA-4	Fator de transcrição GATA tipo 4
HNF 3 α	Fator nuclear hepático 3 alfa
HNF 3 β	Fator nuclear hepático 3 beta
HNF 3 γ	Fator nuclear hepático 3 gama
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
CBA	Linhagem isogênica de camundongo albino, albino e negro
CBA/J	Linhagem isogênica de camundongo albino, albino e negro modificada
MEM	Meio Mínimo Essencial
M	Molar
Ph	Potencial hidrogeniônico
³ H	Hidrogênio radioativo trítio
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
hpL	Hormônio Lactogênico Placentário
IGF2	Fator de crescimento semelhante à insulina
HGF	Fator de crescimento dos hepatócitos
LIF	Fator inibidor da leucemia
PDGFB	Fator de crescimento derivado de plaquetas tipo beta
WNT-2	Combinação das siglas Wg (Wingless) e INT (gene de interação) tipo 2
GAP	Junções celulares tipo lacuna ou fenda
SUB	Subplacenta
CEE	Celoma extraembrionário
A	Âmnio
CD	Cavidade decidual
SG	Sincícios grosseiros
SF	Sincícios finos
DB	Decídua basal
ZI	Zona intermediária
EP	Endoderma parietal
EV	Endoderma visceral
DC	Decídua capsular
LU	Luz do útero
DP	Decídua parietal
MHC-II	Complexo de Histocompatibilidade Principal classe II
MHC-I	Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HLA-G	Antígeno Leucocitário Humano tipo G
CSF-1	Fator estimulador de colônia tipo 1
AQP	Aquaporina
PPAR γ	Gene que codifica o <i>Peroxisome proliferator activated receptor</i> gamma
PPAR δ	Gene que codifica o <i>Peroxisome proliferator activated receptor</i> delta
TGF- β	Fator transformador do crescimento tipo beta
Cer-1	Gene cerberus 1
Lefty-1	Left right determination fator 1
DKK 1	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1

Nodal	Fator de crescimento nodal
Wnt 3	Combinação das siglas Wg (Wingless) e INT (gene de interação) tipo 3
BMP-4	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>
Hes 7	<i>Hes Family BHLH transcription factor 7</i>
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
Fgf8	Fator de crescimento fibroblástico tipo 8
Notch	Molécula Notch
Mesp 2	Fator de transcrição do mesoderma tipo 2
PA	Padrão absoluto
%	Percentual
°C	Graus Celsius
AT	Azul de toluidina
CO ₂	Dióxido de carbono
BIOPOL	Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
V	Volts
Cm	Centímetros
Mg	Miligramas
G	Gramas
mL	Mililitros
µg	Microgramas
PBS	Solução tampão fosfato
NaCl	Cloreto de sódio
KCl	Cloreto de potássio
NA ₂ HPO ₄	Meta fosfato dissódico
KH ₂ PO ₄	Meta fosfato
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
M	Metros
®	Marca registrada
LTDA	Limitada
µm	Micrômetro
Kg	Kilograma
MEq	Miliequivalente
Swab	Chumaço de algodão fixado à extremidade de uma haste
Synt	Marca específica de um tipo de parafina histológica granulada
-O	Ligação covalente entre determinado composto e o oxigênio
-N	Ligação covalente entre determinado composto e o nitrogênio
PG19	Proteoglicano sinônimo do serglicim
PG40	Proteoglicano sinônimo do decorim
PGII	Proteoglicano sinônimo do decorim
Kd	Kilodaltons
G1	Domínio protéico tipo G1
G2	Domínio protéico tipo G2
G3	Domínio protéico tipo G3

CD44	Receptor de superfície <i>cluster</i> 44
Hermes	Antígeno de superfície e sinônimo do CD44
PGp-1	Antígeno de superfície e sinônimo do CD44
H-CAM	Antígeno de superfície e sinônimo do CD44
Receptor de MEC III	Receptor de matriz extracelular tipo 3 e sinônimo do CD44
GP90	Antígeno de superfície e sinônimo do CD44
Hutch-1	Antígeno de superfície e sinônimo do CD44
NH2	Grupamento amino
Afgf	Fator de crescimento fibroblástico tipo a
Bfgf	Fator de crescimento fibroblástico tipo b
INF- γ	Interferon gama
MG-63	Subtipo classificável de osteossarcoma
RPMI	Meio de cultivo Roswell <i>Park Memorial Institute médium</i> a base de sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas, glicose, glutatona e vermelho de fenol
FN	Fator nuclear
DCN	Decorim
I-CAM-1	Molécula de adesão tipo 1
CPVSA	Centro de Pesquisas em Ciências Vegetais do Semiárido Nordeste
HAS2	Gene codificante do ácido hialurônico ou “hialuron synthase” 2
SHAPs	Soro derivado de proteínas associadas ao ácido hialurônico
CR	<i>Crown-rump</i>

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1– Exemplar de *Galea spixii* utilizado no experimento. Centro de Multiplicação de Animais Silvestres-UFERSA/RN. 37
- Figura 2– Representação do ciclo estral em ratas, cuja duração foram quatro dias. Neste caso, dividiu-se o diestro em duas fases e considerou-se o metaestro como um período muito curto em que consistia numa transição entre o estro e diestro. Figura modificada de Goldman et al. (2007). 53
- Figura 3– Esquema representativo do desenvolvimento embrionário inicial em camundongo. Em A evidencia-se à estrutura blastocística, aos 6 dias de desenvolvimento embrionário, no qual pode-se observar as células do endoderma e ectoderma embrionários que compõe a massa celular interna. Verifica-se também o endoderma extraembrionário do qual derivará o saco vitelino e a cavidade central da blastocèle. Em B caracteriza-se, aos 7,5 dias de desenvolvimento embrionário, o surgimento de células trofoblásticas gigantes e as regiões resultantes da proliferação do trofoblasto acima do disco germinativo: ectoderma extraembrionário e cone ectoplacentário. O segundo originará a placenta principal ou corioalantoide. Além disso, verifica-se a formação de dois endodermas: um parietal e localizado acompanhando o contorno externo do trofoectoderma, e o outro visceral que se situa revestindo o epiblasto e ectoderma extra-embrionário. Ambos formam o saco vitelino (também denominada placenta vitelina) bem como delimitam uma cavidade, ou seja, a cavidade do saco vitelino. Figura modificada de Rossant e Cross (2001). 58
- Figura 4– Saco gestacional de camundongo aos sete dias e cinco horas de desenvolvimento embrionário revelando as regiões uterinas da decídua antimesometrial (DA), zona de decídua primária (ZDP) e decídua mesometrial (DM). Esta última, possui duas sub-regiões onde, na primeira delas, verificam-se células deciduais ricas em glicogênio, o que confere uma zona esparsa e constituída por excesso desse polissacarídeo (ZRG). A outra, apresenta células estromais indiferenciadas. Observar ainda, o blastocisto (concepto) representado por C e direcionado para a porção anti-mesometrial do útero, ao passo que o cone ectoplacentário (*) situa-se em localização diametralmente oposta. ZRG: zona rica em glicogênio. Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). Figura modificada de Herington e Bany (2009). 63
- Figura 5– Representação esquemática do desenvolvimento das camadas germinativas, as relações com o embrião e formação de cavidades como ocorre em porcos na gestação inicial. Em (A) observa-se a localização do embrioblasto e início do surgimento do mesoderma. Em (B) evidencia-se a bifurcação mesodérmica que culminará com o celoma extraembrionário (exoceloma). Em (C) verifica-se o aparecimento de dobras amnióticas em processo de cavitação. Em (D) e (E) nota-se a presença do córion e o exoceloma, este último constituindo uma grande cavidade. Figura modificada de Perry (1981). 77

Figura 6– Relações espaciais anatômicas evidenciadas no modelo gestacional do cobaio (A) e humano (B) em gestações nas fases intermediárias. Em A, observa-se, em verde, o endoderma visceral do saco vitelino envolvendo toda a estrutura do botão gestacional numa situação verificada após à inversão do saco vitelino. Verificar ainda as localizações espaciais do embrião, placenta principal (corioalantoide), alantoide e grande cavidade exocelomática. Em B, verificam-se as disposições das decíduas uterinas, âmnio, córion, placenta, exoceloma e um saco vitelino cujo tamanho é bastante reduzido. Figura modificada de Perry (1981).

78

Figura 7– Representação da placenta corioalantoide em camundongos no dia 12.5 de desenvolvimento embrionário. Notar o formato discoidal desta placenta e as regiões em que se desenvolvem o espongiotrofoblasto, células trofoblásticas gigantes e labirinto. Figura modificada de Rossant e Cross (2001).

82

Figura 8– Esquema representativo das interações materno fetais nas regiões do labirinto e vilosidades coriônicas em camundongos e humanos respectivamente. Verificar os tipos celulares envolvidos em cada região citada, sendo a cor azul representativa das células derivadas do trofoblasto e a cor laranja, indicando tecidos derivados do mesoderma (vasos sanguíneos e estroma). Em camundongo, notar a grande proximidade em que as lacunas maternas encontram-se dos vasos sanguíneos fetais, ao passo que, em humanos, a estrutura trofoblástica e mesênquima subjacente encontram-se imersos em sangue materno. Figura modificada de Rossant e Cross (2001).

83

Figura 9– Diagrama de uma secção do saco gestacional no cobaio aos 35 dias de gestação. Observar as localizações da subplacenta (SUB), celoma extraembrionário (CEE), âmnio (A), cavidade decidual (CD), sincícios grosseiros (SG) e finos (SF), decídua basal (DB), zona intermediária (ZI), endodermas parietal (EP) e visceral (EV) do saco vitelino, decídua capsular (DC), luz do útero (LU) e decídua parietal (DP). Figura modificada de Davies et al. (1961).

87

Figura 10– Representação esquemática dos tipos de ligações que os glicosaminoglicanos realizam para agregarem-se a estrutura protéica do proteoglicano. Nesta figura, a proteína em questão encontra-se verticalmente representada e contém três regiões importantes, nas quais aminoácidos específicos interagem com os GAGs, respectivamente, de cima para baixo: serina, treonina (onde a ligação covalente com o GAG ocorre na hidroxila da porção terminal destes aminoácidos) e ácido aspártico (este liga-se covalentemente ao respectivo GAG mediante ligação covalente do nitrogênio do grupamento aminoterminal). SER: serina; TRE: treonina; ASP: ácido aspártico; Xil: xilose; Gal: galactose; GlcA: ácido glicurônico; GalNac: N-acetil galactosamina; GLcNac: N-acetil glicosamina; AS: ácido siálico; Man: manose; : hexosamina; : ácido urônico; : D-galactose. Figura modificada de Hardingham e Fosang (1992).

97

Figura 11– Exemplificação de proteoglicanos típicos. Em A: serglicin, o qual possui reduzida cadeia protéica ligada a 14 moléculas de condroitim sulfato. Em B: evidencia-se um filamento protéico contendo região de ligação a glicosaminoglicanos e outra

ricamente constituída pelo aminoácido leucina, este último envolvido na ligação com o colágeno e fibronectina. Em C: destaca-se um proteoglicano de heparam sulfato com domínios extra e intracelulares. Em D: verifica-se a presença de um longo proteoglicano encontrado em cartilagens e dotado de domínios de ligação ao ácido hialurônico (região superior da figura), região de ligação a cadeias de queratam sulfato, numerosas cadeias aderidas de condroitim sulfato e uma porção terminal de interação à matriz extracelular (domínio de ligação a lectinas). CS: condroitim sulfato; DS: dermatam sulfato; HS: heparam sulfato; AH: ácido hialurônico; QS: queratam sulfato. Figura modificada de Ruoslahti (1988).

99

Figura 12– Aspectos estruturais dos proteoglicanos agrecam e versicam. Nesta figura destacam-se os domínios G1, G2 e G3 e seus subdomínios característicos. Figura modificada de Ruoslahti (1988). GAGs: glicosaminoglicanos; PG: proteoglicano; Ig fold: região imunoglobulínica capaz de realizar dobramentos específicos; PTR: unidade protéica repetitiva; EGF: fator de crescimento epidermal. Figura modificada de Hardingham e Fosang (1992).

101

Figura 13– Ilustração comparativa entre os proteoglicanos ricos em leucina. As áreas escurecidas nos domínios centrais referem-se as repetições deste aminoácido. As cadeias de queratam sulfato interagem com os grupamentos amino da leucina na molécula de fibromodulina. Duas cadeias de condroitim ou dermatam sulfatos conectam-se na porção anterior do biglicam, ao passo que no decorim, uma cadeia de um destes GAGs liga-se covalentemente. A porção final dessas glicoproteínas ligam-se de forma específica a constituintes da matriz extracelular. CS: condroitim sulfato; DS: dermatam sulfato; KS: queratam sulfato. Figura modificada de Hardingham e Fosang (1992).

102

Figura 14– Características estruturais de proteoglicanos da superfície celular. O sindecam possui quatro cadeias de heparam ou condroitim sulfatos aderidas a estrutura protéica no domínio extracelular e dois pequenos segmentos protéicos, um transmembrânico e outro citosólico. Neste último, encontra-se muitos resíduos de tirosina (Y). O CD44 apresenta duas cadeias de condroitim ou heparam sulfatos, um segmento anterior constituído por proteínas em alfa hélice (PTR) e uma porção carboxil terminal intracelular. Já a trombomodulina possui regiões anteriores dispostas em hélice, uma sequência intermediária de unidades repetitivas similares ao EGF e uma única cadeia de condroitim sulfato aderida ao ectodomínio. HS: heparam sulfato; CS: condroitim sulfato; EGF: fator de crescimento epidermoide; DS: dermatam sulfato; KS: queratam sulfato. Figura modificada de Hardingham e Fosang (1992).

104

Figura 15– Composição estrutural linear dos principais glicosaminoglicanos. A molécula de heparam sulfato apresenta resíduos de N-acetilglicosamina que sofre desacetilação e posterior sulfatação no nitrogênio (NS). Além disto, tais resíduos encontram-se sulfatados em ligação 6-O (6S), ou seja, o enxofre do grupamento sulfato liga-se covalentemente ao oxigênio próximo ao carbono seis da N-acetilglicosamina. Ainda relativo ao heparam, verifica-se a sulfatação 2-O (2S) nos ácidos idurônicos

constituintes do composto. O dermatam sulfato possui sulfatações 4-O (4S) nas moléculas de N-acetilgalactosamina e 2-O (2S) nos ácidos idurônicos. O condroitim sulfato apresenta acréscimos de grupamentos sulfatos 4-O (4S) apenas nos resíduos de N-acetilgalactosamina. No ácido hialurônico não se observam sulfatações. Por fim, o queratam sulfato revela substituições fosfáticas nas unidades dissacarídicas de galactose e N-acetilglicosamina. HS: heparam sulfato; DS: dermatam sulfato; CS: condroitim sulfato; HA: ácido hialurônico; KS: queratam sulfato. Figura modificada de Couchman e Pataki (2012).

108

Figura 16– Representação esquemática da formação do ácido idurônico. A figura superior retrata o equilíbrio químico promovido pela epimerase, a qual catalisa a transformação do ácido beta glicurônico em alfa idurônico, quando ambos estão em ligações glicosídicas com a N-acetilgalactosamina. R1, R2 e R3 constituem os radicais substitutivos nas moléculas em questão. Finalmente, destaca-se, na imagem inferior, as variações conformacionais possíveis do ácido idurônico. Figura modificada de Thelin et al. (2013).

110

Figura 17 - Representação da distribuição dos animais amostrados ao longo do experimento. Fonte: acervo do pesquisador.

116

Figura 18– Confirmação da cópula pela presença de espermatozoides na citologia vaginal. Após 24 horas, considerou-se o primeiro dia de gestação. Coloração panótica rápida.

117

Figura 19 – Sistema reprodutor feminino de preás *in situ* (figura A) e *ex situ* (figura B). OD: ovário direito; OE: ovário esquerdo; tubas uterinas (setas); CD: corno uterino direito; CE: corno uterino esquerdo; CX: cérvix uterina; VA: vagina; VU: vulva. Cabeça de seta na figura A: bexiga urinária. Barra das figuras A e B: 1cm. Fonte: Acervo do pesquisador.

128

Figura 20– Ovários de preás, oriundos de fêmea não gestante (Figuras A, B e C) e gestante (Figuras D, E, F, G, H e I) em corte transversal. A: observa-se um grande corpo lúteo (*), folículos ovarianos em diferentes estágios maturativos (elipses tracejadas) e a túnica albugínea (a). As figuras B e C representam grandes aumentos de dois folículos ovarianos da figura anterior, sendo possível, na primeira, a detecção de um oócito no interior folicular; ao passo que em C, não se evidenciou tal gameta feminino. As figuras D, E, F, G e H caracterizaram, em aumentos microscópicos crescentes, um corpo lúteo (*), folículos em diferentes estágios de maturação (elipses tracejadas), sendo o destaque promovido na figura E compatível com folículo primordial. As figuras E, F e G destacaram um folículo maduro contendo o oócito (cabeça de seta) sustentado pelas células da granulosa que, possivelmente, encontrou-se representada, em sua porção inferior, pelo *cumulus oophorus* (células foliculares identificadas pelo retângulo tracejado) e envolvido pela corona radiata (camadas de células foliculares destacadas na elipse tracejada). Em H: destacou-se o corpo lúteo (*) e um vaso sanguíneo (seta). Em I: notou-se um proeminente corpo lúteo (*), a albugínea (seta) e dois folículos ovarianos, sendo um deles maduro (FM) e o outro antral (FA). Figuras A, B, C, D, E, F, G e H: microscopia eletrônica de varredura. Figura I: microscopia de luz com corte histológico corado em hematoxilina e eosina (HE). Fonte:

Figura 21– Ovários de preás, oriundos de fêmeas gestantes em início de gestação. A: evidencia-se, em destaque, um folículo primordial (circulo tracejado). B: observam-se três folículos ovarianos, sendo um deles maduro (FM) e dois em desenvolvimento (FD). Notar ainda as regiões de córtex (C) e medula (M) ovarianas. C: estrutura de um folículo ovariano maduro. Notar a presença do oócito (O), células foliculares do *cumulos oophorus* (retângulo tracejado) e da corona radiata (CR). Em D: folículo maduro apresentando: células do *cumulos oophorus* (CO), da corona radiata (CR), líquido folicular (*), corpúsculo polar (cabeça de seta). Verificar também a zona pelúcida (ZP) e citoplasma (CITO) do oócito. E: regiões do córtex (C) e medula (M) do ovário. Em F: neste folículo maduro evidenciou-se dois corpúsculos polares (cabeças de seta) e a região da teca (TE). Figuras A, B, C, D, E e F: microscopia de luz com corte histológico transversal corado em hematoxilina e eosina (HE). Fonte: Acervo do pesquisador.

131

Figura 22– Tubas uterinas oriundas de fêmeas gestantes de preás. Em A (início da gestação): notar a luz do oviduto (L), a mucosa (M) e camada muscular (m). Em B (meio da gestação): evidenciam-se projeções da mucosa direcionadas para a luz da tuba. As figuras C, D, E e F representam tubas no final da gestação. Notar a crescente formação tortuosa das dobras da mucosa e a serosa (S) que envolve a estrutura tubular. E e F: detalhe das dobras da mucosa no qual se evidencia o epitélio (E), a lâmina própria que o sustenta (seta na figura E e LP na figura F) e a muscular (m). Figuras A, B, C, D e E: cortes histológicos transversais corados em hematoxilina e eosina (HE). Figura F: microscopia eletrônica de varredura. Fonte: Acervo do pesquisador.

132

Figura 23– Útero de preás, oriundos de fêmeas não gestantes (figuras A, B, C e D) e saco gestacional contendo estruturas uterinas (figura E). Em A: representação do aparelho reprodutor feminino dissecado para facilitar o entendimento dos seus componentes. TD: tuba uterina direita; TE: tuba uterina esquerda; CD: corno uterino direito; CE: corno uterino esquerdo; CER: cérvix; VA: vagina; VE: vestibulo da vagina; VU: vulva. Notar também o septo uterino (seta vermelha) o qual divide o útero em dois cornos, direito e esquerdo (setas amarelas). Figuras C e D: detalhe do septo uterino (retângulo tracejado) e os cornos do útero assim formados (COD: corno do útero direito e COE: corno do útero esquerdo). Figuras C e D: observou-se a cérvix uterina (CE) contendo muitas dobras. Em E: saco gestacional aos 30 dias onde pode ser observada a disposição espacial do saco vitelino visceral (SVV) e sua inserção (seta) na placenta corioalantoide (PL). Notar ainda a localização da decídua basal (DB) e parietal (DP). O SVV mantém estreita relação com a PL e o útero caracterizando uma estrutura anatômica favorável aos processos abortivos. Figura A: fotodocumentação macroscópica do aparelho reprodutor feminino. Barra: 1cm. Figuras B, C, D e E: Microscopia eletrônica de varredura. Fonte: Acervo do pesquisador.

134

Figura 24– Microscopia de luz com coloração em hematoxilina e eosina (HE) dos cornos uterinos em região distal à cérvix (corte transversal) em início (figuras A, D e G), meio (figuras B, E e H) e fim (figuras C, F e I) da gestação. Figuras A, B e C: observar a luz do órgão (L), o epitélio de revestimento (cabeça de seta) e conjuntivo (C) associado. A arquitetura tecidual permanece sem alterações ao longo da gestação. Notar, nas figuras D,

E, F, G, H e I, o epitélio de revestimento (cabeça de seta) e tecido conjuntivo frouxo (Cf) que o sustenta. Figuras F e I: o * representa vasos sanguíneos no conjuntivo. Fonte: Acervo do pesquisador.

135

Figura 25– Microscopia de luz com coloração em hematoxilina e eosina (HE) do corno uterino em região proximal à cérvix (corte transversal). Figuras A, B e C: observar a luz do órgão (L), o epitélio de revestimento (cabeça de seta) e conjuntivo frouxo (Cf) associado. Figuras D, E e F: notar o epitélio de revestimento (cabeça de seta), conjuntivo frouxo (Cf) e denso não modelado (Cd). Figuras G, H e I: verificar o septo (S) de tecido conjuntivo frouxo (Cf) que divide o corno do útero em duas câmaras, nas quais acumulam-se secreções (M). As cabeças de setas referem-se ao epitélio que reveste os dois lados do septo. Fonte: Acervo do pesquisador.

136

Figura 26– Microscopia de luz com coloração em hematoxilina e eosina (HE) da cérvix uterina (corte transversal) em início (figuras A, B e C), meio (figuras D, E e F) e fim (figuras G, H e I) da gestação. Figuras A, B e C: observar a luz do órgão (L), o epitélio de revestimento (cabeça de seta), conjuntivo frouxo (C) associado e camada unilaminar de epitélio glandular (Eg). Do meio para o fim da gestação verificou-se tendência ao aumento do desenvolvimento do tecido glandular secretor. Eg: epitélio glandular. C: conjuntivo. M: muco. Fonte: Acervo do pesquisador.

137

Figura 27– Macroscopia da vagina e vestibulo (figuras A e B), análise ultraestrutural do vestibulo (figura C) em fêmeas não gestantes e histologia convencional do vestibulo vaginal no início (figuras D, E e F), meio (figura G) e fim (figuras H e I) da gestação. A: verificar a vagina (VAG) e seu vestibulo (VEST). Este último, apresentou-se extremamente pregueado conforme se verifica nas figuras B e C. Em B: verificou-se o óstio (seta) que promove a comunicação entre a cérvix e a vagina. Além disto, ao longo da gestação, verificou-se a presença da luz do vestibulo (L), o epitélio de revestimento (cabeças de setas), a musculatura estriada esquelética (Mes) e a riqueza de epitélio glandular (Eg) com atividade secretória ao final da gestação como se observa pela intensa produção de muco (M). Notar ainda, na figura I, a lâmina própria de tecido conjuntivo (C) que sustenta o epitélio secretor anteriormente citado. Figuras A e B: macroscopia. Barras: 1cm. Figuras B e C: microscopia eletrônica de varredura. Figuras D, E, F, G, H e I: microscopia de luz com coloração em hematoxilina e eosina (HE). Fonte: Acervo do pesquisador.

139

Figura 28– Vulva de preás em fêmea gestante. A: notar o aspecto macroscópico da genitália externa. 1: vulva e c: clitóris. B: detalhe do canal uretral situado no clitóris (seta amarela), canal vaginal (seta branca) e bexiga (cabeça de seta). C: detalhe tridimensional da vulva indicando a sua abertura (orifício vaginal) e região de comissura posterior (elipse tracejada). D: região vulvar apresentando epitélio glandular (Eg), conjuntivo frouxo (Cf) e musculatura estriada esquelética (mes). E: notar a riqueza de epitélio glandular (Eg) e tecido conjuntivo frouxo associado (C). As figuras F e G referem-se a região do clitóris onde verificou-se a presença de tecido conjuntivo frouxo e formação cartilaginosa (setas), as quais estiveram delimitadas por camada unilaminar de melanócitos (cabeça de seta). Figuras A e B: macroscopia. Barras: 1cm. Figura C:

microscopia eletrônica de varredura. Figuras D, E, F e G: microscopia de luz com coloração em hematoxilina e eosina (HE). Fonte: Acervo do pesquisador. 140

Figura 29– Fases do ciclo estral em fêmeas de preás. Em A: Proestro inicial. Observam-se células parabasais (setas pretas) e intermediárias (setas vermelhas) como predominantes desta fase. Notar ainda a presença de bactérias (cabeça de seta preta) e um neutrófilo (cabeça de seta amarela). Figuras B, C e D: Estro. Em B: evidenciam-se três células superficiais nucleadas contendo cromatina finamente granular (setas) e o restante, constituído por células superficiais anucleadas (escamas anucleadas). Observar ainda a presença de bactérias (cabeça de seta). Em C: no transcorrer do estro, ocorre aumento da descamação de células superficiais, presença de bactérias e ausência de leucócitos. Em D: notar o predomínio das escamas anucleadas e apenas uma célula superficial contendo núcleo picnótico (seta). Tal esfregaço apresentou fundo limpo, ou seja, isento de bactérias e leucócitos. Barra desta figura: 20µm. As figuras E e F remetem a fase de metaestro em estágio inicial e avançado, respectivamente. Em E: verificar duas células parabasais justapostas (elipse tracejada), duas células intermediárias (setas) e bactérias (cabeça de seta). Em F: nota-se o predomínio de células intermediárias, de diferentes tamanhos, seguidas das células parabasais. As bactérias e leucócitos também estiveram presentes, sendo dois destes últimos, representados pela elipse tracejada. As figuras G, H e I caracterizaram o diestro. Em G: observar duas células intermediárias (setas) e o aparecimento de células basais (elipse tracejada), as quais predominaram nesta imagem. Seguiu-se, nas figuras H e I, aumento progressivo na quantidade de células profundas (basais) e a presença de bactérias (elipse tracejada na figura H), filamentos de muco (seta na figura I), numerosos neutrófilos e uma célula intermediária binucleada (* na figura I) além de células parabasais. Os esfregaços citológicos vaginais foram corados mediante coloração panótica rápida. Fonte: Acervo do pesquisador. 144

Figura 30 – Percentual médio geral dos diferentes tipos celulares identificados pelo método colpocitológico durante as fases do ciclo estral de preás. 145

Figura 31 – Efeito do macho sobre a contagem média de escamas anucleadas pelo método colpocitológico em preás nas diferentes fases do ciclo estral. Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada grupo experimental (macho presente, macho ausente) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais dentro de cada fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro, diestro) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$). 146

Figura 32 – Efeito do macho na contagem média de células intermediárias pelo método colpocitológico em preás nas diferentes fases do ciclo estral. Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada grupo experimental (macho presente, macho ausente) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais dentro de cada fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro, diestro) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$). 147

Figura 33 – Contagem média de células superficiais nucleadas, parabasais e basais pelo método colpocitológico em preás nas diferentes fases do ciclo estral.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada tipo celular (superficiais nucleadas, parabasais e basais) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

148

Figura 34– Placentação vitelina em gestação inicial e intermediária. Em A: notar a presença do embrião (*), aos 13 dias de gestação, inserido no interior da cavidade amniótica e recoberto pelo ectoderma do âmnio; o útero (U) e a cavidade do celoma extraembrionário (CEE). Observar ainda os endodermas visceral (seta vermelha) e parietal (seta preta) delimitando a cavidade do saco vitelino (CV). Em B, verifica-se, aos 14 dias, descontinuidade e desorganização do endoderma parietal que recobre o útero (U) e placenta corioalantoide (PLC). Desta forma, as células endodérmicas ainda aderidas a tais estruturas são apontadas pelas setas azuis. Após a inversão, aos 15 dias, destaca-se, na figura C, expansões do endoderma visceral, o qual envolve o embrião e mantém íntima relação com os tecidos uterinos (círculo amarelo), fato este também demonstrado na figura D. As figuras E, F e G (aos 20 dias de gestação), H e I (aos 25 dias) referem-se as relações de aposição que se estabelece entre os endodermas parietal (EP) e visceral (EV) em região próxima à placenta principal (PLC). O endoderma visceral forma numerosas vilosidades e arranjo em tufos ou vilos que se aproximam do endoderma parietal. Notar ainda, nas figuras E e H, representadas pelas setas azuis, a membrana basal serosa. Em H, a seta preta destaca a vascularização vitelina e membrana basal visceral associada. As figuras A, B, C, E e F foram processadas por histologia convencional e coradas por hematoxilina e eosina (HE). Em I: notar a reação positiva para a vimentina na placenta principal e a localização do embrião (*). H e I: reação imunohistoquímica para vimentina. Figura D: microscopia eletrônica de varredura e figura G: microscopia eletrônica de transmissão. Fonte: Acervo do pesquisador.

152

Figura 35– Placentação vitelina em gestação avançada. Em A e B: observar a expansão das formações vilosas do endoderma visceral (EV) aos 35 dias de gestação. Em C (40 dias de gestação): verifica-se, em destaque, a membrana de Reichert (seta espessa), a qual separa a placenta principal (PLC) do endoderma parietal (EP) que permanece após a inversão. Esta membrana apresentou-se contínua e com aspecto amorfo (Figura D). Em E: notar o desenvolvimento da placenta principal (PLC), aos 40 dias de gestação, a qual contribui para as aproximações do endoderma visceral e embrião (*) a referida placenta. Evidenciar ainda a decíduas basal (DB) e parietal (DP). As figuras F e G (aos 45 dias de gestação) indicam regiões distantes da placenta principal em que células endodérmicas viscerais apresentaram-se com superfície externa bastante lisa. Na figura H (quadragésimo quinto dia de gestação), verificou-se uma situação oposta, onde células endodérmicas viscerais demonstraram superfície externa dotada de numerosas projeções similares a pseudópodes. Em I: saco gestacional obtido a termo. Evidenciou-se o cordão umbilical (seta) promovendo conexão entre o feto e placenta corioalantoide (estrutura discoidal destacada em azul). O saco vitelino visceral (* vermelho) apresentou aparência vilosa em locais próximos da placenta principal e lisa em regiões distais do referido órgão (* azul). U: útero. Figura A: histologia corada por hematoxilina e eosina (HE). Figura C: histologia corada pelo ácido periódico de Schiff (P.A.S). Figura E: histologia corada pelo azul de toluidina (AT). Figuras B, D, G e H: microscopia eletrônica de varredura. Figura I: macroscopia mediante perfusão com látex neoprene 650. Barra desta figura: 1cm. Fonte: Acervo do pesquisador.

153

Figura 36– Placentação corioalantoide no início da gestação. Em A: corte transversal do saco gestacional, aos 10 dias de gestação, demonstrando uma placenta principal imatura, contendo várias áreas de sangue e camadas trofoblásticas desorganizadas. O formato evidenciado foi elíptico e achatado. Em B: notar, aos 12 dias de gestação, o aumento da proliferação trofoblástica da placenta principal (PLC), principalmente no local de inserção desta com a decídua basal (*). Observar ainda as localizações dos endodermas parietal (EP) e visceral (EV) do saco vitelino, os quais contribuem para a delimitação de outra cavidade: o celoma extraembrionário (CEE). Em C: corte transversal de um saco gestacional aos 14 dias de gestação. Notar o estabelecimento da forma discoidal da placenta (PLC), o local de inserção desta na decídua basal (*) bem como as suas extremidades afiladas das quais partem os endodermas parietal (EP) e visceral (EV), sendo todas as estruturas citadas delimitadas pela decídua parietal (DP). Em D: observar a ancoragem da placenta principal (PLC) na decídua basal (DB) por meio do pedúnculo placentário (*). Em E: verificar a proximidade das células sinciciotrofoblásticas (ST) com o estroma da decídua basal (DB). Em F: observou-se o sinciciotrofoblasto (ST) e célula citotrofoblástica (CT) oriunda de uma região da figura anterior. As figuras D, E e F constituíram amostras aos 15 dias de gestação. Figuras A, B, C, D e E: histologia convencional e coloração por hematoxilina e eosina (HE). Figura F: microscopia eletrônica de transmissão. Acervo do pesquisador.

155

Figura 37– Placentação corioalantoide em gestação intermediária e início da avançada. Em A: corte transversal do saco gestacional, aos 16 dias de gestação, demonstrando uma placenta principal discoidal (PLC), o endoderma visceral do saco vitelino, o útero (U), decídua parietal (DP) e dois embriões (setas). Em B: aos 17 dias de gestação, evidenciou-se um aumento pronunciado no tamanho do órgão placentário (PLC), resultando em aproximações do embrião (*) e endoderma visceral associado. Notar ainda a decídua parietal (DP), basal (DB) e duas regiões placentárias discerníveis: o espongiotrofoblasto (SPT) e labirinto (LAB). Em C: no vigésimo dia de gestação, observar as relações anatômicas entre a decídua basal (DB) e placenta corioalantoide (PLC), sendo esta última constituída por espongiotrofoblasto (SPT), labirinto (LAB) e subplacenta (SP). A inserção da placenta na referida decídua ocorre pela formação do pedúnculo placentário (PP). Verificar ainda o endoderma visceral (EV). Em D: caracterizou-se a região do labirinto placentário, aos 25 dias de gestação, o qual apresentou reação positiva para a vimentina pela formação de coloração marrom característica. Em E: controle negativo para a reação imunohistoquímica evidenciada na figura anterior. Em F: no trigésimo dia gestacional, evidenciou-se o desenvolvimento predominante do labirinto (LAB), o qual passou a ocupar grande parte do volume placentário. Verificar também a presença do espongiotrofoblasto (SPT), endoderma visceral (EV) e parietal (EP) do saco vitelino. Em G: destacou-se uma visão geral do saco gestacional, aos 35 dias de gestação, onde podem ser observadas as decíduas parietal e basal, o endoderma visceral (EV), a placenta corioalantoide (* amarelo) e subplacenta (* vermelho). Em H (grande aumento da região subplacentária da figura anterior): verificar o processo de crescimento da subplacenta, os quais demonstram invaginações de camadas citotrofoblásticas (CT), as quais se apoiam em pronunciados sinciciotrofoblastos (ST). Em I: demonstraram-se dois sacos gestacionais, aos 40 dias de gestação, nos quais evidenciaram-se duas placentas corioalanoideis discoidais em amostras obtidas a fresco. Figuras A, B, F, G e H: histologia convencional e coloração pela hematoxilina e eosina (HE). Figura C: microscopia eletrônica de varredura. Figura

D: imunohistoquímica para vimentina. Figura E: controle negativo da reação da figura anterior. Figura I: macroscopia. Barra desta figura: 1cm. Fonte: Acervo do pesquisador. 158

Figura 38– Placentação corioalantoide em gestação avançada. Em A: Verificar, aos 38 dias de gestação, o elevado grau de organização da estrutura placentária, a qual apresentou formações lobulares organizadas em: centro do lóbulo (C), labirinto (LAB) e regiões de interlóbulo (I). Notar ainda a escassez de espongiotrofoblasto (SPT), também demonstrado na figura B. Em C: aos 40 dias de gestação, na região do labirinto placentário, verificou-se a presença de um grande vaso fetal, contendo numerosos eritrócitos em sua luz (*) bem como o contorno produzido pelo seu endotélio (seta preta). Muitos canais de sangue materno localizaram-se nas proximidades, sendo um deles, destacado pela seta espessa em azul. Em D: promoveram-se destaques aos endodermas visceral (EV), parietal (EP), espongiotrofoblasto (SPT), interlóbulo (I) e labirinto placentário (LAB), em amostra colhida aos 45 dias de gestação. Notar a marcação positiva, em marrom, para a vimentina. Em E: evidenciou-se, aos 50 dias de gestação, intensa vascularização, na região do labirinto placentário, fato este demonstrado pela reação da vimentina. Em F: controle negativo da reação imunohistoquímica evidenciada na figura anterior. Em G: Demonstrou-se, aos 55 dias de gestação, reação positiva para o PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) pela marcação específica, em marrom, do núcleo das células situadas no labirinto (LAB) e endoderma parietal (EP). I: interlóbulo. As figuras H e I caracterizaram sacos gestacionais obtidos a termo em amostra colhida mediante injeção de látex Neoprene e a fresco, respectivamente. Barras destas figuras: 2cm. Figuras A, B e C: histologia convencional e coloração por hematoxilina e eosina (HE). Figuras D e E: reação imunohistoquímica para vimentina. Figura G: reação imunohistoquímica para o PCNA. Fonte: acervo do pesquisador. 160

Figura 39– Desenvolvimento embrionário inicial em preás. Em A e B: aos seis dias de gestação, evidenciar o blastocisto inserido na câmara de implantação da luz uterina. Em C: aos oito dias, a estrutura blastocística permanece arredondada ou oval, sendo o seu revestimento externo composto por trofoectoderma (trofoblasto mural) e no seu centro, desenvolve-se uma cavidade denominada blastocelo (*). Num dos pólos, evidenciaram-se proliferações de células embrioblásticas (massa celular interna) (seta) e ainda proliferações de células do trofoblasto nos limites externos desse pólo (cone ectoplacentário) (CE). Figuras D e E (9 dias de gestação): a forma do blastocisto torna-se alongada, com revestimento externo constituído por trofoblasto mural (T) e interno, por células hipoblásticas (seta). Figuras F e G (10 dias de gestação): notar a formação da cavidade amniótica (CA) e desenvolvimento do embrioblasto (*). Figura H (12 dias de gestação): observar o aumento proliferativo do embrioblasto (massa celular interna) (seta) no interior da cavidade amniótica (CA). Figura I (14 dias de gestação): notar a diferenciação dos três folhetos embrionários (camadas germinativas): ectoderma embrionário (ECE), mesoderma embrionário (ME) e endoderma embrionário (ENE). Evidenciar ainda o ectoderma extraembrionário (setas pretas), o mesoderma extraembrionário (*) e endoderma extraembrionário (seta azul). Figuras A, B: microscopia eletrônica de varredura. Figura C: histologia convencional corada em azul de toluidina (AT). Figuras D, E, F, G, H e I: histologia convencional e coloração por hematoxilina e eosina (HE). Fonte: Acervo do pesquisador. 162

Figura 40– Embriogênese intermediária preás. Em A (embrião aos 15 dias de gestação): verificar a estrutura embrionária, cujos dobramentos sinalizam a formação do tubo neural (seta) e retrataram o ectoderma embrionário (Ec), mesoderma embrionário (M) e endoderma embrionário (En). EV: endoderma visceral. U: útero. Em B (embrião aos 16 dias de gestação): Evidenciar uma camada de ectoderma coriônico (C), o ectoderma embrionário (ECE) e a formação de uma invaginação que resulta na origem do sulco neural (seta preta). O mesoderma embrionário (M) é visualizado logo abaixo da estrutura anteriormente citada. Notar ainda a diferenciação do mesoderma em: somático (Ms) e esplâncnico (Me). Os endodermas embrionários e extraembrionários são identificados pela seta vermelha e *, respectivamente. U: útero. Em C (embrião aos 17 dias de gestação): notar o aparecimento do mielencéfalo (M) e uma vesícula auditiva (VA) na lateral do embrião. As figuras D, E e F representam embriões no décimo oitavo dia de gestação. Em D: verificou-se a presença do diencéfalo (D), vesícula óptica (estrutura destacada pelo círculo tracejado em amarelo), a qual foi composta pela retina (R) e cristalino (C). Notar ainda, na figura E, uma invaginação, resultando na formação do estomodeu (E). Em F: reação intensa para o PCNA, em todas as células que compõem o embrião bem como na placenta corioalantoide (PLC). Em G (embrião aos 19 dias de gestação): observar a acentuada curvatura ventral e pequena protuberância da saliência cardíaca (7). Figuras H e I (embriões aos 20 e 22 dias de gestação, respectivamente): notar o formato de nadadeira dos membros torácicos (6) e pélvicos (8), o início da formação do focinho (*) e sulco labial (setas vermelhas). Figuras A, B, C, D e E: cortes transversais de sacos gestacionais, seguidos de processamento histológico e coloração com hematoxilina e eosina (HE). Figura F: reação imunohistoquímica para o PCNA. Figuras G, H e I: fotodocumentação macroscópica com o auxílio de lupa estereoscópica. Barra das figuras: 1cm. Significado das numerações: 1 (placóide do cristalino); 2 (prosencéfalo); 3 (mesencéfalo); 4 (rombencéfalo); 5 (saliência auricular); 6 (membro torácico); 7 (saliência cardíaca); 8 (membro pélvico); 9 (cauda); 10 (cordão umbilical). Fonte: Acervo do pesquisador.

164

Figura 41– Embriogênese avançada e desenvolvimento fetal em preás. Em A: embrião aos 25 dias de gestação apresentando-se encurvado e com os membros em formato de nadadeiras. Figuras B e C (embriões aos 30 e 35 dias de gestação, respectivamente): notar a presença dos raios digitais (seta) e formação do focinho (*). Figuras D, E, F, G, H e I (fetos aos 40, 45, 48, 50, 55 e 60 dias de gestação, respectivamente): o contínuo desenvolvimento caracterizou-se pela formação das unhas, a partir do quadragésimo dia gestacional (seta apontada na figura E), crescimento dos pelos, aparecimento dos coxins palmares, estes a partir dos 55 dias de gestação (seta da figura H). Notar ainda que a abertura dos olhos dar-se-á também no dia gestacional anteriormente citado. Figuras A e B: microscopia eletrônica de varredura. Figura C: fotodocumentação macroscópica com o auxílio de lupa estereoscópica. Barra da figura: 1cm. Figuras D, E, F, G, H e I: fotodocumentação macroscópica com o auxílio de câmera digital. Barra das figuras: 2cm. Significado das numerações: 1 (placóide do cristalino); 2 (prosencéfalo); 3 (mesencéfalo); 4 (rombencéfalo); 5 (saliência auricular); 6 (membro torácico); 7 (saliência cardíaca); 8 (membro pélvico); 9 (cauda); 10 (cordão umbilical). Fonte: Acervo do pesquisador.

166

Figura 42– Variação do peso (em gramas), comprimento total e *Crown-rump*, em milímetros, de embriões e fetos de preás segundo a idade gestacional. Fonte: Acervo do

pesquisador.	168
Figura 43– Variação do comprimento cefálico, céfalo-caudal, circunferência cefálica e diâmetro biparietal, em milímetros, de embriões e fetos de preás segundo a idade gestacional. Fonte: Acervo do pesquisador.	169
Figura 44– Variação do comprimento do olho, diâmetro do olho, comprimento da orelha e comprimento dos dentes incisivos superiores e inferiores, em milímetros, de embriões e fetos de preás segundo a idade gestacional. Fonte: Acervo do pesquisador.	171
Figura 45– Variação do comprimento torácico, pélvico, das unhas dos membros torácicos e pélvicos bem como da largura das unhas, em milímetros, de embriões e fetos de preás segundo a idade gestacional. Fonte: Acervo do pesquisador.	173
Figura 46– Variação do comprimento da cauda, da tíbia e do rádio/ulna, em milímetros, de embriões e fetos de preás segundo a idade gestacional. Fonte: Acervo do pesquisador.	175
Figura 47– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em ovários de fêmeas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.	177
Figura 48– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em tubas uterinas de fêmeas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.	178
Figura 49– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em cornos uterinos de fêmeas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.	179

Figura 50– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em corpos do útero de fêmeas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.

180

Figura 51– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em cérvices uterinas de fêmeas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.

181

Figura 52– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em vaginas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.

181

Figura 53– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em vulvas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.

182

Figura 54– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em placentas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria

e a consequente variação ao longo da gestação. 183

Figura 55– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em subplacentas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do vigésimo dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão: 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador. 183

Figura 56– Gráfico representativo das médias aritméticas de GAGs, em termos de Unidades Arbitrárias de Densitometria, obtidas ao longo da gestação, em diferentes órgãos reprodutivos e placentários. 184

Figura 57– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em órgãos reprodutivos durante específica fase do ciclo estral (estro) em fêmeas de preás. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs em ovário (O), tuba uterina (T), corno uterino (C), cérvix (CE), corpo do útero (CP), vagina (V) e vulva (VV), sendo as respectivas amostras comparadas frente à uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação nos órgãos analisados. Fonte: Acervo do pesquisador. 185

Figura 58– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em órgãos reprodutivos durante específica fase do ciclo estral (diestro) em fêmeas de preás. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs em ovário (O), tuba uterina (T), corno uterino (C), cérvix (CE), corpo do útero (CP), vagina (V) e vulva (VV), sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação nos órgãos analisados. Fonte: Acervo do pesquisador. 185

Figura 59– Gráfico representativo das quantidades de GAGs, em termos de Unidades Arbitrárias de Densitometria, em diferentes órgãos reprodutivos, nas fases de estro (barras azuis) e diestro (barras laranjas). 186

Figura 60– Ovários de preás obtidos no final da gestação e submetidos a reação imunohistoquímica para heparam (figura A), dermatam (figura B) e condroitim sulfatos (figura C). A: as marcações foram predominantes no corpo lúteo (CL), células da teca dos folículos (cabeça de seta) e células estromais da medula ovariana. B: as reações para dermatam sulfato foram intensas e difusas por toda a estrutura dos ovários. C: c condroitim sulfato encontrou-se preferencialmente nas células da teca (cabeça de seta) e

no conjuntivo entre os folículos. Fonte: Acervo do pesquisador. 187

Figura 61– Tubas uterinas de preás obtidas no início da gestação e submetidas a reação imunohistoquímica para dermatam (figura A), heparam (figura B) e condroitim sulfatos (figura C). A: as marcações foram predominantes no tecido conjuntivo frouxo na região do istmo. B: as reações para o heparam sulfato foram intensas e difusas na porção do infundíbulo da tuba. C: o condroitim sulfato apresentou-se distribuído no conjuntivo frouxo e camada serosa da ampola tubária. Fonte: Acervo do pesquisador. 188

Figura 62– Cornos uterinos de preás obtidos no início da gestação e submetidos a reação imunohistoquímica para ácido hialurônico (figura A), heparam (figura B), condroitim (figura C) e dermatam sulfatos (figura D). Figuras A e B: as marcações dos respectivos GAGs foram predominantes no tecido conjuntivo frouxo. C: as reações para condroitim sulfato foram difusas, pouco evidentes e localizadas no conjuntivo frouxo. D: o dermatam sulfato encontrou-se ricamente concentrado por todo o corno uterino. Barra da figura: 20µm. Fonte: Acervo do pesquisador. 189

Figura 63– Corpo do útero de preás obtidos no início da gestação e submetidos a reação imunohistoquímica para heparam sulfato (figura A), ácido hialurônico (figura B) e dermatam sulfato (figura C). A: a reação para o heparam foi intensa e difusa no corpo do útero. B: o ácido hialurônico encontrou-se distribuído difusamente. C: notar a distribuição do dermatam sulfato. Fonte: Acervo do pesquisador. 190

Figura 64– Cérvices uterinas de preás obtidas no início da gestação e submetidas a reação imunohistoquímica para heparam sulfato (figura A), dermatam sulfato (figura B), condroitim sulfato (figura C) e ácido hialurônico (figura D). As figuras A, B, C e D apresentaram intensa marcação difusa no conjuntivo frouxo e epitélio de revestimento. Fonte: Acervo do pesquisador. 191

Figura 65– Vaginas de preás obtidas no início da gestação e submetidas a reação imunohistoquímica para dermatam (figura A), heparam (figura B) e condroitim sulfatos (figura C). As três figuras demonstram marcação específica no tecido conjuntivo deste órgão. Fonte: Acervo do pesquisador. 192

Figura 66– Placentas corioalantoides de preás obtidas no meio da gestação e submetidas a reação imunohistoquímica para dermatam (figura A), ácido hialurônico (figura B), condroitim (figura C) e heparam sulfatos (figura D). As três primeiras figuras demonstram marcação específica no tecido conjuntivo do labirinto placentário, ao passo que em D, destacou-se reação positiva no endoderma visceral do saco vitelino e espongiotrofoblasto. Fonte: Acervo do pesquisador. 193

Figura 67– Subplacentas de preás obtidas no final da gestação e submetidas a reação imunohistoquímica para heparam (figura A), dermatam (figura B) e condroitim sulfatos (figura C). As três figuras denotam marcação difusa, porém concentradas no mesênquima subplacentário. Fonte: Acervo do pesquisador. 193

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Glicosaminoglicanos (GAGs) encontrados nos tecidos uterinos de mamíferos eutérios e sua relação com a fisiologia no órgão. CS= condroitim sulfato, DS= dermatam sulfato, HS= heparam sulfato, AH= ácido hialurônico. Adaptada de Oliveira et al. (2013).	112
Tabela 2 – Glicosaminoglicanos (GAGs) encontrados nos tecidos uterinos de mamíferos eutérios e sua relação com a fisiologia no órgão. CS= condroitim sulfato, DS= dermatam sulfato, HS= heparam sulfato, AH= ácido hialurônico. Adaptada de Oliveira et al. (2013).	113
Tabela 3 – Efeito da presença do macho sobre a duração das fases do ciclo estral (média ± erro padrão, dias) de preás.	142

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	35
1.1 ASPECTOS GERAIS DOS ROEDORES	35
1.2 BIOLOGIA DO PREÁ <i>Galea spixii</i> Wagler, 1831	36
1.3 ESTUDOS DE PLACENTAÇÃO EM ROEDORES	38
1.4 IMPORTÂNCIA DOS PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS NOS EVENTOS REPRODUTIVOS	39
1.5 JUSTIFICATIVA	41
2 OBJETIVOS	42
2.1 GERAL	42
2.2 ESPECÍFICOS	42
3 REVISÃO DE LITERATURA	44
3.1 SISTEMA REPRODUTOR FEMININO	44
3.1.1 Os ovários	45
3.1.2 As tubas uterinas (ovidutos)	45
3.1.3 O útero, vulva e vagina	46
3.2 O ciclo estral nos roedores	48
3.2.1 Proestro	49
3.2.2 Estro	49
3.2.3 Metaestro	50
3.2.4 Diestro	51
3.2.5 Avaliação do ciclo estral	51
3.3 Funções do estrógeno (E2) e progesterona (P4)	54
3.4 EVENTOS MORFOFISIOLÓGICOS GERAIS RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL	55
3.4.1 Origem das membranas fetais em roedores, placentação vitelínica, inversão e funções saco vitelino	64
3.4.2 Placentação corioalantoide e desenvolvimento embrionário	79
3.5 Proteoglicanos e glicosaminoglicanos sulfatados em animais	95
3.5.1 Proteoglicanos constituintes da matriz extracelular	99
3.5.2 Proteoglicanos ricos em leucina	101
3.5.3 Proteoglicanos de superfície celular	103
3.5.4 Proteoglicanos que modulam fatores de crescimento	105
3.5.5 Distúrbios relacionados as alterações nas concentrações de proteoglicanos	105
3.5.6 Características dos glicosaminoglicanos	107
4 MATERIAL E MÉTODOS	114
4.1 ANIMAIS AMOSTRADOS	114
4.2 CITOLOGIA VAGINAL	117
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA O ESTUDO DO CICLO ESTRAL	118
4.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO-CIRÚRGICO	119
4.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA	119
4.6 DETERMINAÇÕES DOS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS EMBRIONÁRIOS/FETAIS	120

4.7 MATERIAL PARA MICROSCOPIA DE LUZ.....	121
4.7.1 Reações imunohistoquímicas para o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e vimentina	121
4.7.2 Imunolocalização dos GAGs nos tecidos: ovarianos, tubáricos, vaginais, uterinos, placentários e subplacentários.....	122
4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	123
4.8.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	123
4.8.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	124
4.9 EXPRESSÃO DOS GAGS.....	125
4.9.1 Extração dos glicosaminoglicanos.....	125
4.9.2 Eletroforese de polissacarídeos em gel de agarose.....	126
4.9.3 Quantificação dos GAGs em cada amostra.....	127
5 RESULTADOS.....	128
5.1 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO EM PREÁS.....	128
5.2 DURAÇÃO DA GESTAÇÃO E NÚMERO DE PARIÇÕES.....	141
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL EM PREÁS.....	141
5.3.1 Avaliação do ciclo estral em preás após análise estatística.....	146
5.4 PLACENTAÇÃO VITELÍNICA E CORIOALANTOIDE.....	149
5.5 EMBRIOGÊNESE E DESENVOLVIMENTO FETAL.....	161
5.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA EMBRIONÁRIA E FETAL.....	167
5.7 EXPRESSÕES DOS GLICOSAMINOGLICANOS (GAGs) E SUAS RELAÇÕES COM OS ÓRGÃOS REPRODUTIVOS, PLACENTÁRIOS E DUAS FASES DO CICLO ESTRAL.....	176
5.8 CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DAS REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS PARA GLICOSAMINOGLICANOS DIRECIONADAS AOS OVÁRIOS, TUBAS, VAGINAS, TECIDOS UTERINOS, PLACENTÁRIOS E SUBPLACENTÁRIOS.....	186
6 DISCUSSÃO.....	194
6.1 DESCRIÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO.....	196
6.2 DETERMINAÇÃO DO PERÍODO GESTACIONAL EM PREÁS.....	201
6.3 CARACTERIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL.....	202
6.4 PLACENTAÇÃO VITELÍNICA E CORIOALANTOIDE.....	209
6.5 EMBRIOGÊNESE, DESENVOLVIMENTO E MORFOMETRIA.....	222
6.6 DETERMINAÇÕES DOS PRINCIPAIS GLICOSAMINOGLICANOS PELA IMUNOHISTOQUÍMICA E ELETROFORESE DE POLISSACARÍDEOS.....	234
7 CONCLUSÕES.....	241
REFERÊNCIAS.....	246
ANEXOS.....	281

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DOS ROEDORES

A diversidade da ordem Rodentia contribui para que se constitua numa das mais ricas do mundo ao mesmo tempo em que ocupa posição de destaque na fauna de mamíferos brasileira (CADEMARTORI et al., 2008). Em termos quantitativos, verifica-se a existência de 429 gêneros e 2015 espécies de roedores, o que corresponde aos percentuais de 39% e 43,5%, respectivamente, dentro da classe Mamalia (WILSON; REEDER, 1993).

Por esse motivo, verifica-se – em roedores - uma ampla variedade de formas e tamanhos, cujas particularidades são identificáveis no tocante a dentição, crânio e mandíbula. O esqueleto pós-cranial e o desenvolvido músculo masseter contribuem para que o par de dentes incisivos executem atividades relacionadas à alimentação, escavação de túneis bem como para a própria defesa (BRASIL, 2002; WOLFF; SHERMAN, 2007). Além disso, os modos de vida particulares e diversidades reprodutivas constituem um desafio para os cientistas que utilizam esses animais em experimentos (UPHAM; PPATERSON, 2012).

Nesse sentido, pelo referido caráter diversificado e ainda mediante a reconhecível facilidade com que muitas espécies de roedores possam ser criadas em cativeiro, muitos estudos genéticos, ecológicos, demográficos e fisiológicos passam a ser justificados e viáveis com a utilização de tais modelos experimentais. Como resultado, estas informações fornecem subsídios para um melhor conhecimento dos aspectos ecológicos e evolutivos que por sua vez, moldam seus comportamentos sociais e reprodutivos (WOLFF; SHERMAN, 2007).

De acordo com Wilson e Reeder (2005) os roedores revelam-se importantes em muitos ecossistemas, mediante os variados atributos, seja pela reprodução rápida, como dispersores de sementes ou promovendo interações sociais intra e interespecíficas – o que pode contribuir para o equilíbrio em determinada comunidade biológica – seja, até mesmo, servindo como fonte de alimento para predadores, o que ratifica a transmissão energética nos diversos níveis tróficos das cadeias alimentares.

Por outro lado, e sob outra ótica, os roedores podem atuar como vetores de doenças, acarretando em consequência, problemas de saúde pública. Tal característica também proporciona inegável interesse dos pesquisadores quanto ao entendimento dos aspectos ecológicos, epidemiológicos, evolucionários e biológicos (CADEMARTORI et al., 2005).

Desse modo, é importante o conhecimento das chaves taxonômicas as quais possibilitam a correta identificação desses animais e que, por sua vez, demonstram a existência de cinco subordens: Sciuromorpha, Castorimorpha, Myomorpha, Anomaluromorpha e Hystricomorpha (WILSON; REEDER, 2005; BONVICINO et al., 2008). As famílias mais representativas são constituídas pela Muridae (representada por ratos e camundongos), Sciuridae englobando os esquilos, Echimyidae abrangendo ratos com espinhos, Heteromyidae constituída pelos camundongos com bolsa e ratos canguru e a Dipodidae incluindo os camundongos saltitantes (WOLFF; SHERMAN, 2007). Já na ordem Hystricognathi estão inclusas as cutias, pacas, capivaras, preás, dentre outros (MOOJEN, 1952).

1.2 BIOLOGIA DO PREÁ (*Galea spixii* Wagler, 1831)

Os preás são roedores de médio porte (ROOD, 1972; BONVICINO et al., 2008), desprovidos de cauda, cujo tamanho é muito inferior ao da cutia e superior aos roedores sigmodontíneos (PERCEQUILLO et al., 2007). O peso corporal e o comprimento da cabeça e corpo juntos variam entre 200 g a 357 g e 220 mm a 285 mm respectivamente, sendo a pelagem dorsal possuidora de coloração escura (cinza) e a ventral, de cor branca, da mesma forma em que se observa nas manchas infraoculares e pós-auriculares (ROOD, 1972; BRASIL, 2002; BONVICINO et al., 2008). O crânio apresenta um forâmen infra-orbital grande além de dentes incisivos (de cor amarela), um pré-molar e três molares (PERCEQUILLO et al., 2007). Suas patas anteriores apresentam quatro dígitos enquanto as posteriores, três (BRASIL, 2002).

São comumente visualizados em capinzais, serrotes de pedras (MOOJEN, 1952), forrageando em bordas de campos, alimentando-se de vegetação herbácea e buscando refúgio contra predadores em locais variados onde, preferencialmente, as formações

vegetativas sejam densas e altas (ROOD, 1972). O bioma da caatinga e regiões orientais do cerrado brasileiro constituem domínios onde essa espécie animal pode ser encontrada – incluindo áreas dos estados do Pernambuco, Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte, Bahia, Distrito Federal, noroeste de Minas Gerais e leste do Mato Grosso - (BRASIL, 2002; BONVICINO et al., 2008; GEISE et al., 2010).

A classificação taxonômica do preá (figura 1) pode ser demonstrada de acordo com Wilson e Reeder (2005) que por sua vez, descreveu da seguinte forma:

Reino Animalia

Filo Chordata

Classe Mammalia

Infraclasse Placentalia

Ordem Rodentia

Subordem Hystricomorpha

Família Caviidae

Gênero Galea

Espécie *Galea spixii* Wagler, 1831



Figura 1 – Exemplar de *Galea spixii* utilizado no experimento. Centro de Multiplicação de Animais Silvestres- UFERSA/RN. Fonte: Acervo do pesquisador

Recentemente tem-se verificado que a criação, em cativeiro, de roedores silvestres tais como preás, mocós e cutias é realizada com o intuito de proporcionar o conhecimento e a manutenção das respectivas espécies, sendo os aspectos reprodutivos, em especial os

estudos de placentação, fundamentais para que esse processo seja satisfatório (ROBERTS et al., 1984; PINHEIRO et al., 1989; LACERDA et al., 2006).

1.3 ESTUDOS DE PLACENTAÇÃO EM ROEDORES

O sucesso reprodutivo dos mamíferos reflete-se num complexo paradigma em que se estabelece um desafio para o sistema imune materno em promover tolerância imunológica frente a um novo organismo implantado e geneticamente distinto (STEWART, 1998; KING, 2002). Neste sentido, o desenvolvimento e as complexas interações entre as membranas fetais culminam com o estabelecimento de um órgão placentário, capaz de estabelecer os mecanismos adequados de troca materno-fetal e promover a manutenção da gestação. Por conseguinte, o tipo de placentação envolvido relaciona-se diretamente com o sucesso ecológico e evolucionário de determinada espécie (MESS, 2003).

Dentro dessa perspectiva, os estudos de placentação com modelos animais podem produzir informações acerca da placentação humana, proporcionando a compreensão de muitas doenças que possam ocorrer na vida pré-natal (CARTER, 2007). Outras pesquisas descrevem as características morfológicas placentárias, estabelecendo correlações filogenéticas entre as espécies com o intuito de promover novos conhecimentos relativos à evolução da placenta nos mamíferos (MESS; CARTER, 2007). Além disto, a forma como as membranas fetais interagem com os tecidos maternos revela informações relacionadas à fisiologia pré-natal, transferência de anticorpos maternos para o feto e ainda distúrbios no desenvolvimento fetal (MOSSMAN, 1987).

Dessa forma, a utilização de roedores em pesquisas envolvendo aspectos funcionais da placenta corioalantoide ou vitelina, estão cada vez mais requisitadas mediante as vantagens apresentadas por esses animais. A maioria deles possui pequeno porte e curto período de gestação podendo gerar grande número de descendentes (CARTER, 2007).

No entanto, apesar da riqueza de espécies da ordem Rodentia e do amplo número de modelos experimentais possíveis, o percentual de pesquisas, do ponto de vista da placentação, não ultrapassa três por cento das espécies recentes de roedores (MESS,

2003). Tal escassez de informações, especialmente quando se trata de roedores considerados como silvestres, confirmam a importância de se conhecer os aspectos morfológicos primordiais da estrutura placentária comparando-os com as espécies já estudadas e estabelecidas bem como no tocante ao modelo gestacional humano (HILLEMANN; GAYNOR, 1961; GEORGIADES et al., 2002; CARTER et al., 2006; MESS, 2007; MIGLINO et al., 2008).

Associado a isso, torna-se necessário extrapolar os conhecimentos relacionados aos aspectos anatômicos e morfofisiológicos placentários, embrionários/fetais e órgãos reprodutivos femininos direcionando-os para as pesquisas moleculares, nesta área, que por sua vez ratificarão e complementarão as informações inicialmente obtidas. Esta premissa é verificada, por exemplo, nos fenômenos envolvidos na implantação blastocística e placentação os quais requerem, para ocorrer, a produção de numerosos fatores de crescimento angiogênicos, citocinas, hormônios, fatores transcricionais, moléculas de adesão e complexas interações com a matriz extracelular (MEC); sendo a identificação, quantificação e inferência funcional dessas substâncias de grande importância (MEEKINS et al., 1994; REGNAULT et al., 2002).

1.4 IMPORTÂNCIA DOS PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS NOS EVENTOS REPRODUTIVOS

Os eventos desencadeados nos ciclos menstruais e estrais bem como evidenciados por ocasião da fecundação e, subsequentemente, verificados na implantação, desenvolvimento placentário e fetal, requerem complexas interações hormonais além das modificações estruturais cíclicas da matriz extracelular (NASCIUTTI et al., 2006).

Disso resulta, a importância do entendimento das modificações moleculares da MEC nos órgãos e anexos fetais envolvidos na gestação e no parto, gerando-se conseqüentemente, o conhecimento dos processos fisiológicos críticos que acompanham distúrbios no desenvolvimento fetal e mecanismos relacionados ao parto prematuro (LEPPERT, 1995; WORD et al., 2007; ALKINS et al., 2011).

A MEC compreende um complexo de macromoléculas capazes de envolver as células e gerar um ambiente adequado para a proliferação e diferenciação celulares. Sua

composição predominante constitui elastina, colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs). Tais elementos produzem um microambiente que pode atuar como reservatório para fatores de crescimento e citocinas os quais regularão os mecanismos de bioatividade celular (ORNITZ, 2000; COUCHMAN et al., 2001; KRESSE; SCHÖNHERR, 2001).

Os proteoglicanos (PGs) constituem complexos macromoleculares onde o cerne central é representado por uma proteína, a qual varia bastante dependendo do tipo de proteoglicano, e uma ou mais cadeias polissacarídicas (carregadas negativamente) de GAGs que se estabilizam na estrutura proteica mediante ligação covalente (EVERED; WHELAN, 1986; RUOSLAHHTI, 1988; HARDINGHAM; FOSANG, 1992; CHEN et al., 2007). Com relação à distribuição tissular e funções, os PGs são constituintes dos tecidos conectivos, membranas basais, superfícies celulares, grânulos intracelulares e atuam regulando a atividade de muitos tipos de células, sendo tal mecanismo dependente do tipo de proteína e cadeia polissacarídica de GAG envolvida (MERLE et al., 1999; TINGBØ et al., 2012).

Por conseguinte, muitos atributos relacionados ao reconhecimento, migração, adesão, proliferação e diferenciações celulares além da angiogênese, homeostase sanguínea, reações imunes, distúrbios metabólicos e doenças da gestação são conferidos aos GAGs (DIETRICH, 1984; NASCIUTTI et al., 2006; LI; SPILLMAN, 2012; THELIN et al., 2013). Estes podem ser definidos como heteropolissacarídeos formados por unidades repetitivas de dissacarídeos e classificados em: heparan sulfato (HS), condroitim sulfato (CS), dermatan sulfato (DS), queratan sulfato (QS), ácido hialurônico (HA) e heparina (FRASER et al., 1997; CHEN et al., 2007; COUCHMAN; PATAKI, 2012).

Alguns trabalhos demonstraram que essas moléculas de GAGs distribuem-se nos tecidos uterinos (STRAACH et al., 2005; CUBAS et al., 2010; SOH et al., 2012; SOUZA et al., 2014), placentários (CALATRONI; Di FERRANTE, 1969; LEE et al., 1973; WASSERMAN et al., 1983; WARDA et al., 2008; MURTHI et al., 2010) e apresentam variações em suas concentrações teciduais e plasmáticas dependendo da fase do ciclo estral, menstrual e da gestação bem como em condições patológicas como o Diabetes

Mellitus Gestacional (CHEN et al., 2007), endometriose (BERARDO et al., 2009) e parto pré-maturo (AKGUL et al., 2012).

No entanto, na espécie elencada para o desenvolvimento deste trabalho, inexistem informações na literatura referentes à distribuição dos GAGs, nos órgãos reprodutivos femininos e placentários, fato este que sinaliza ser essencial demonstra-los como forma de caracterizar os eventos reprodutivos.

1.5 JUSTIFICATIVA

O manejo de animais silvestres como forma de contribuir para a melhoria do padrão de vida da população rural deve ser realizado de modo cooperativo e integrado entre os costumes tradicionais - de subsistência dos criadores - e o tratamento ético e ecologicamente responsável dos animais em questão (VON RICHTER, 1979).

Consequentemente, muitos estudiosos têm desenvolvido pesquisas com esses animais - com destaque para os roedores - mediante as vantagens já expostas, como resultado do aumento da consciência pela preservação da biodiversidade, considerando inclusive a particularidade de cada ecossistema nacional. No entanto, trabalhos sobre a biologia reprodutiva envolvendo aspectos morfofisiológicos e moleculares passaram a ser desenvolvidos apenas na última década.

Por esse motivo, pesquisas que agreguem dados relativos a duração da gestação, características do ciclo estral, morfologia do sistema reprodutor feminino, placentação, desenvolvimento embrionário e fetal são importantes para caracterizar o padrão reprodutivo de uma espécie ao mesmo tempo em que fornece subsídios para manutenção desta. Além disto, a demonstração do perfil de glicosaminoglicanos em órgãos do sistema reprodutor e placenta, levando a inter-relações capazes de subjugar as funções das referidas macromoléculas, mediante análise da expressão tecidual e quantificação, em cada sitio anatômico envolvido, no transcorrer gestacional, constituem um trabalho inovador e pioneiro principalmente no tocante a espécie de roedor utilizada.

Assim, o presente trabalho torna-se justificado pela proposta abrangente bem como pelo ineditismo sugerido de modo a promover elevação do potencial reprodutivo no preá.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar, em preás, os eventos reprodutivos relacionados ao período gestacional, ciclo sexual, desenvolvimento placentário, embrionário/fetal e dos órgãos reprodutivos bem como demonstrar o perfil de glicosaminoglicanos no sistema reprodutor feminino, nas fases estrogênica e progesterônica do ciclo estral assim como no sistema reprodutor e placenta, ao longo da gestação, de modo a poder estimar sobre sua importância em tais eventos fisiológicos.

2.2 ESPECÍFICOS

a) Demonstrar por meio da macroscopia, microscopia de luz e eletrônica de varredura o sistema reprodutor feminino;

b) Determinar o tempo de gestação no preá e o número de parições;

c) Caracterizar o ciclo estral na espécie e verificar se há influência do efeito macho em cada fase bem como na celularidade cervicovaginal;

d) Descrever com base em fotodocumentações, microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, transmissão e reação imunohistoquímica para vimentina à placentação vitelínica e corioalantoide, sendo acrescido para esta última à pesquisa do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA);

e) Caracterizar o desenvolvimento embrionário/fetal em preás, utilizando-se para tal de câmera digital, lupa estereoscópica, microscopia de luz e eletrônica de varredura além da reação imunohistoquímica para o PCNA;

f) Descrever a morfometria embrionária e fetal de parâmetros como peso, *Crown-rump*, comprimento total, cefálico, céfalo-caudal, da cauda, circunferência cefálica, diâmetro biparietal, do olho, comprimento da orelha dentre outros;

g) Extrair, quantificar e analisar a distribuição dos glicosaminoglicanos no sistema reprodutor feminino, placenta e subplacenta ao longo da gestação além do sistema reprodutor nas fases estrogênica e progesterônica do ciclo estral;

h) Promover a imunolocalização de glicosaminoglicanos em órgãos reprodutivos femininos, placentários e subplacentários;

3 REVISÃO DE LITERATURA

Para a revisão bibliográfica procurou-se seguir uma sequência de assuntos que abordassem o sistema reprodutor feminino, ciclo estral, placentação vitelínica, corioalantoide, início do desenvolvimento embrionário e aspectos moleculares dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos em roedores a fim de melhor integrar os aspectos teóricos explicitados com os principais objetivos do presente trabalho.

3.1 SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

No desenvolvimento embrionário o mesoderma intermediário atua na formação do sistema urinário, do útero, ovários e porção cranial da vagina. Para que estes três últimos componentes se desenvolvam é imprescindível a expressão de genes como o Lim 1 e Hox bem como a ausência de hormônios esteroides testiculares, fato este que favorece o surgimento dos ductos de Müller os quais, nos roedores, permanecem distintos e formam um útero bipartido com dois cornos e duas cérvices. Estes ductos se fusionam na região cloacal para formar o canal vaginal, e no seio urogenital, para originar a porção caudal da vagina (HUANG et al., 2005; YIN; MA, 2005; LI; DAVIS, 2007).

Posteriormente, na vida pós-natal, verifica-se que o amadurecimento pleno do sistema reprodutor feminino varia com relação à espécie, idade bem como pelo adequado estímulo dos hormônios sexuais femininos. Neste sentido e do ponto de vista histológico de tais órgão maturados, a vagina constitui uma camada externa de tecido conectivo ou túnica adventícia, uma média ou muscular (contendo fibras musculares lisas circulares e longitudinais) e uma mucosa interna constituída por epitélio escamoso estratificado. Já o útero se diferencia numa camada externa serosa ou perimétrio, uma muscular média ou miométrio e uma mais interna ou endométrio, sendo que esta última possui um revestimento epitelial colunar bem como em suas glândulas endometriais (LI; DAVIS, 2007).

3.1.1 Os ovários

Os ovários constituem as gônadas femininas cuja função endócrina é evidenciada pela síntese de estrógeno (E2) e progesterona (P4) e a ação gametogênica, mediante a produção e maturação do gameta feminino (oócito secundário) (RODGERS et al., 1999; RICHARDS et al., 2002; LOMBARDI et al., 2012). São glândulas pares com formato elipsoide que se encontram conectadas a parede dorsal da cavidade abdominal por uma projeção do peritônio denominado mesovário, sendo este último, parte do ligamento largo do útero.

Sua superfície é revestida por um epitélio cúbico simples (epitélio germinativo) que repousa sobre uma camada de tecido conjuntivo denso (túnica albugínea). Em seguida, verifica-se a presença de uma região cortical conjuntiva que contém os folículos ovarianos em diferentes estágios de maturação e por último, uma região medular de tecido conjuntivo frouxo a qual possui uma entremeada rede vascular.

A zona cortical ovariana demonstra grande quantidade de folículos primários contendo um oócito com núcleo central e citoplasma transparente sendo esta célula envolvida por uma camada amorfa glicoproteica (zona pelúcida). Os folículos secundários contêm proliferações de células da granulosa as quais se reorganizam delimitando uma cavidade (antro) em consequência do líquido produzido pelas células foliculares. Tal reorganização e desenvolvimento da granulosa envolve o oócito (*corona radiata*) e apresenta uma pequena região espessada (*cumulus oophorus*). Toda a estrutura folicular é envolvida por células estromais ou tecas externa e interna cuja competência na síntese estrogênica é reconhecida (HOSSAIN; O'SHEA, 1983; VAN AARDE; SKINNER, 1986; GUIMARÃES et al., 1994; ALMEIDA et al., 2003; REIS et al., 2011; SANTOS et al., 2015).

3.1.2 As tubas uterinas (ovidutos)

Almeida et al. (2001) caracterizaram o ciclo estral, a histologia e anatomia das tubas uterinas no esquilo-da-mongólia (*Meriones unguiculatus*) por meio da microscopia de luz e documentação fotográfica respectivamente. Verificaram que as referidas tubas

compreendiam dois tubos longos, convolutos e localizavam-se na extremidade cranial dos cornos uterinos e ventromedial à superfície ovariana, sendo esses dois ovidutos, conectados a parede da cavidade abdominal por um ligamento fibromuscular denominado mesosalpinge. A região do infundíbulo referia-se à porção da tuba que se abria na cavidade peritoneal – próxima ao ovário – e apresentava fímbrias para favorecer a captação do ovócito. Na outra extremidade, denominada intramural, a tuba atravessava a parede uterina, abrindo-se no interior deste último.

Em relação aos aspectos histológicos dos ovidutos, verificou-se a presença de uma camada mucosa constituída por células epiteliais ciliadas e células epiteliais secretoras, ambas repousando numa lâmina basal de tecido conjuntivo frouxo, seguida por camadas circulares musculares e por último, uma lâmina serosa de peritônio.

Estas características das tubas uterinas foram descritas de forma similar e compatível no preá (*Galea spixii*) por Santos et al. (2014), na paca (*Cuniculus paca*) (REIS et al., 2011), em cutias (*Dasyprocta aguti*) (FORTES et al., 2005), na capivara (*Hydrochoerus hidrocaeris*) (COSTA et al., 2002) e genericamente para os mamíferos eutérios por Mossman (1987).

3.1.3 O útero, vulva e vagina

Uma classificação usual do útero preconiza o tipo duplo e longo, possuindo um pequeno corpo além de dois canais cervicais – em forma de V – que se abrem separadamente na vagina (coelhos e ratos) ou tais canais se juntam na vagina por um óstium (porquendo da índia). Há o tipo bicornuado e longo no qual o corpo do útero é muito curto e os canais cervicais denotam formato de Y (caninos e porcos). Em mulheres e equinos, o útero possui formato piriforme e é constituído por um corpo (porção dilatada), o fundo do útero (porção superior em forma de cúpula) e uma porção estreitada que se abre na vagina (cérvis ou colo uterino) (MOSSMAN, 1987).

Seguindo-se essa linha de classificação, Akinloye e Oke (2010) caracterizaram, por meio da análise macroscópica, o útero e glândulas mamárias do rato africano gigante (*Cricetomys gambianus*), um roedor da família Nesomyidae. Os resultados demonstraram

a presença de um útero duplo com dois cornos uterinos separados, um corpo e duas cérvices sendo este órgão ligado à parede abdominal pelo mesométrio.

Em preás, o aparelho reprodutor feminino foi descrito mediante análise macroscópica e histológica segundo o qual pode-se observar que o útero era constituído por dois cornos longos que se uniam em um pequeno corpo, formando uma cérvix única que se projetava na vagina. As fotomicrografias por meio da microscopia de luz revelaram uma camada externa serosa, uma muscular lisa espessa (miométrio) e a mucosa propriamente dita ou endométrio. Esta última apresentou epitélio colunar cúbico e uma lâmina própria que continha glândulas uterinas. A vagina apresentou três camadas: mucosa, muscular e adventícia onde o epitélio da mucosa foi caracterizado por células pavimentosas formando camadas estratificadas queratinizadas. Já a vulva - constituída pelo clitóris, pequenos e grandes lábios – carecia de vestibulo (espaço que corresponde à abertura externa da vagina) e possuía uma membrana oclusante. Respectivamente a porção interna e externa da vulva, verificou-se epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado e queratinizado (SANTOS et al., 2014).

Adicionalmente, um estudo semelhante, que detalhou a morfologia do sistema genital feminino da paca (*Cuniculus paca*), foi conduzido por Reis et al. (2011) por meio do qual verificaram-se que as tubas uterinas possuíam aspecto sinuoso e localizavam-se na região sublombar, contínua aos ovários e estendendo-se até o início de cada corno uterino, sendo fixadas à parede abdominal por uma prega lateral (parte do mesovário), a mesosalpinge. O útero localizava-se na região sublombar, caudal aos rins e prolongando-se até à entrada da pelve, onde se aproximava dorsalmente à vesícula urinária. Os dois cornos uterinos eram retilíneos e apresentavam em sua parede medial convergências caudais, formando um septo interno ou “velum” uterino que por sua vez, determinava a formação de dois canais cervicais com a presença de dois óstios uterinos internos e apenas um óstio externo o qual se abria na vagina. Esta última, se iniciava, em continuidade, logo após o colo do útero e estendia-se até a vulva, onde se abria externamente. Na extremidade proximal da vagina, circundando o colo uterino, verificou-se uma projeção em fundo de saco cego: o fórnix vaginal. Finalmente, os autores caracterizaram a vulva como sendo uma região plana, delimitada dorsalmente por uma

depressão abaixo do ânus e ventralmente pela projeção do clitóris e este apresentou-se como uma estrutura proeminente, de forma cônica e revestida por epitélio característico.

3.2 O ciclo estral nos roedores

A avaliação do ciclo estral em roedores pode ser útil na determinação da integridade do eixo hipotálamo-hipófise-ovários de modo que muitas inferências sobre as ações dos hormônios sexuais podem surgir bem como os possíveis distúrbios nos órgãos do trato reprodutor feminino (SCANDROGLIO; SPITALI, 1968; GOLDMAN et al., 2007; ANGULO et al., 2012; HAMID; ZAKARIA, 2013).

Nessa perspectiva, pode-se considerar que as modificações cíclicas do útero, ovários e vagina mantêm correlações com as variações do sistema imune nestes órgãos, os quais apresentam diferenças no quantitativo celular de linfócitos, células Natural Killer (NK), neutrófilos, macrófagos, células de Langerhans e ainda nas concentrações das imunoglobulinas IgA e IgG além da produção de muco secretório (WIRA; SANDOE, 1977; WIRA; STERN, 1992; LOPEZ; STANLEY, 2005).

Uma dentre as diversas modificações anatômicas que acontecem é caracterizada pela formação do orifício vaginal externo (abertura vaginal) que por sua vez, denota o início da puberdade em roedores. Neste sentido, com o transcorrer do desenvolvimento, verifica-se que os folículos ovarianos, até então quiescentes, crescem por estímulos produzidos pelo hormônio folículo estimulante (FSH), da hipófise, o qual é capaz de induzir modificações no oócito, células da granulosa e do estroma que envolve os folículos. Disso resulta na especialização da teca interna bem como das células da granulosa para a síntese de estrógenos, fato este que aumenta continuamente a concentração deste hormônio. Em consequência disto, células da adenohipófise são estimuladas a secretarem o hormônio luteinizante (LH) cujo efeito final será a ovulação, cursando com a ruptura do folículo maduro, liberação do oócito secundário na luz das tubas uterinas e formação do corpo lúteo que por sua vez, apresenta a capacidade endócrina de síntese da progesterona (MANN; PLANT, 2002; RICHARDS et al., 2002; LI; DAVIS, 2007).

3.2.1 Proestro

A primeira fase do ciclo estral – em roedores – é o proestro segundo a qual existe aumento nas concentrações de FSH que, por sua vez, estimula a produção de estrógeno e progesterona pelos ovários. Nesta etapa, com a formação de folículos maduros, há um direcionamento para uma maior síntese de estrógeno, acarretando, consequentemente, uma liberação hipofisária pulsátil e crescente do LH que atinge um pico pré-ovulatório em termos de concentração. As ações estrogênicas no útero resultam no crescimento, proliferação das células endometriais e aumento da permeabilidade vascular, o que caracteriza o aspecto espessado e com aumento da atividade glandular. Além disso, as células dos ductos das glândulas mamárias, o epitélio escamoso da vulva e vagina apresentam um processo de diferenciação e multiplicação, cujo resultado macroscópico seria o aspecto edemaciado e hipertrofiado destes órgãos (LI; DAVIS, 2007; VILELA et al., 2007).

Com relação a citologia vaginal, Guimarães et al. (1997) demonstra, em cutias (*Dasyprocta prymnolopha*), no início do proestro, a presença de células parabasais, intermediárias, superficiais e leucócitos; sendo na metade desta fase em diante, verificadas apenas as células intermediárias e superficiais. No caso de roedores de laboratório, Goldman et al. (2007) caracterizam o proestro inicial mediante a presença apenas de células basais e parabasais, sendo o final desta fase constituído pelas referidas células do início acrescidas das células intermediárias. Já Westwood (2008) descreve, em ratas, a fase de proestro como um período construtivo - de elevada atividade mitótica -, em que se formam, no tecido vaginal, os estratos mucinosos, granulosos e córneos; e os esfregaços vaginais, apresentam células intermediárias e superficiais como característicos desta fase.

3.2.2 Estro

O estro coincide com a receptividade da fêmea ao macho e também se caracteriza pelo estímulo do LH; aumentos máximos e mínimos de estrógeno e progesterona respectivamente, ovulação, edema vulvar e uterino (LI; DAVIS, 2007), aumento do

número de vasos sanguíneos, quimiotaxia de neutrófilos para a vagina (no entanto, tais células ainda não são evidentes em esfregaços vaginais), abertura do orifício vaginal e presença de pouca secreção na mucosa respectiva (BAKER, 1979).

A análise histológica do útero demonstra descamação do estrato córneo, presença de algumas áreas necróticas, devido à degeneração vacuolar e apoptose do epitélio luminal e glandular, aumento da luz uterina bem como ausência de migração leucocitária (WESTOOD, 2008).

Há, na citologia vaginal, ausência de leucócitos, poucas células intermediárias e predomínio quase que absoluto de células superficiais escamosas, muitas das quais são desprovidas de núcleo, sendo assim denominadas escamas anucleadas (GUIMARÃES et al., 1997; GOLDMAN et al., 2007) e isto ocorre devido à progressiva descamação do epitélio escamoso estratificado vaginal (WESTWOOD, 2008) o qual se relaciona com a redução gradativa de estrógeno que passa a ocorrer em virtude da ovulação, consequente formação do corpo lúteo e produção de progesterona (VILELA et al., 2007).

3.2.3 Metaestro

A fase de metaestro corresponde as circunstâncias geradas mediante a pós-ovulação – estágio de transição em que as produções de estrógeno diminuem e de progesterona aumentam - segundo a qual o corpo lúteo funciona, o que leva a correlação que tal período encontra-se na dependência da secreção do LH. Além disso, apesar de haver aumento na síntese de progesterona, o corpo lúteo também continua produzindo estrógeno (FERRMAN, 1988; HAMID; ZAKARIA, 2013).

Se houver, nesta fase, o acasalamento e a fecundação, o corpo lúteo será mantido pela prolactina e a progesterona secretada por aquele participará da remodelação dos tecidos uterinos cujo intuito seria o favorecimento da implantação do blastocisto (GOLDMAN et al., 2007). Adicionalmente, após a implantação, a decídua uterina e placenta corioalantoide passam a produzir e liberar o hormônio lactogênico (na primeira metade da gestação), o qual possui ação agonista nos receptores da prolactina de modo a preservar o corpo lúteo e promover a manutenção da gestação, seguindo-se, na metade final da gestação, a produção de progesterona pela placenta (SOARES, 2004). No

entanto, caso não ocorra a fertilização, os eventos anteriores não ocorrem devido à degeneração do corpo lúteo (HAMID; ZAKARIA, 2013).

A histologia uterina revela degeneração vacuolar das células endometriais e infiltração moderada de leucócitos. Já os achados histológicos da vagina são descritos mediante completa degeneração e descamação do estrato córneo, contínua descamação do epitélio escamoso e infiltração leucocitária variável (WESTWOOD, 2008). A citologia vaginal é demonstrada pela presença de células parabasais, intermediárias e grande quantidade de leucócitos (GUIMARÃES et al., 1997; LI; DAVIS, 2007). Em ratas, Westwood (2008) preconiza, no final do metaestro, a presença de células parabasais, intermediárias e poucas células superficiais.

3.2.4 Diestro

Como citado anteriormente, na ausência de fecundação, o corpo lúteo permanecerá ativo por determinado período. Logo após a ovulação, os ovários apresentam o corpo lúteo em seu tamanho máximo, cujas células apresentam numerosos vacúolos, o que sugere intensa atividade secretora de hormônios esteroides, em especial a progesterona que será secretada em maiores concentrações na fase de diestro. Este hormônio, induz, ao longo desta fase, a proliferação do estroma endometrial, das células epiteliais glandulares bem como dos vasos sanguíneos, gerando-se, em consequência, aumento da espessura endometrial; e ainda, hipertrofia do miométrio e das células estromais (LI; DAVIS, 2007). O epitélio vaginal atinge a menor espessura apresentando uma fina camada do estrato germinativo, sendo por esse motivo, os esfregaços vaginais caracterizados pela presença de muco, leucócitos e células profundas: basais e parabasais (WESTWOOD, 2008).

3.2.5 Avaliação do ciclo estral

Os reflexos decorrentes das modificações morfológicas e funcionais dos ovários, ao longo do ciclo estral, denotam consequentes manifestações respectivas no útero e

vagina, fato este convergente com a atividade cíclica dos hormônios sexuais envolvidos nos ciclos reprodutivos (HOUSSAY et al., 1951; LOPEZ; STANLEY, 2005).

Por conseguinte, a citologia vaginal constitui um método prático, pouco invasivo (MARCONDES et al., 2002; BASTOS et al., 2003) e cujos sistemas de coloração dos esfregaços (Giemsa, Azul de Metileno e Shorr) são relativamente rápidos e eficientes (BARBOSA et al., 2007) de modo que o padrão morfológico e quantitativo das células são importantes na avaliação da integridade do sistema reprodutor feminino (LOHMILLER; SWIN, 2006; GOLDMAN et al., 2007).

Desta forma, Paccola et al. (2013) realizaram análise qualitativa e quantitativa do ciclo estral em fêmeas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) por meio da citologia vaginal com o método de coloração descrito por Shorr (Shorr, 1941). As lâminas coradas e visualizadas na microscopia de luz puderam proporcionar a classificação dos diferentes tipos de células que compuseram o epitélio escamoso vaginal e, consequentemente, pelo predomínio de determinados tipos bem como por critérios adicionais como a presença de leucócitos e/ou muco, tornou-se possível a caracterização do referido ciclo.

As células epiteliais foram classificadas em cinco tipos: pequenas células basofílicas (células basais e parabasais) cuja forma era redonda, o citoplasma corava-se em azul e possuíam cromatina nuclear finamente granular; grandes células basofílicas (células intermediárias) as quais possuíam formato poligonal, citoplasma corado em azul claro e cromatina nuclear condensada; células pré-acidófilas que apresentavam uma morfologia poligonal, citoplasma metacromático (coloração determinada pela mistura das cores azul e laranja); células nucleadas acidófilas (células superficiais), poligonais, continham citoplasma laranja e núcleo com cromatina extremamente condensada (picnose nuclear) e por último, células enucleadas acidofílicas (escamas anucleadas), as quais representariam células superficiais sem núcleo no qual estes foram previamente destruídos por um processo denominado cariorrexe.

Os resultados revelaram que as escamas anucleadas foram evidenciadas em todas as fases do ciclo, porém foram abundantes no final do proestro e compreenderam 90% do total de células verificadas no estro. Após esta fase, as referidas células declinaram em número durante o metaestro e só voltaram a elevar-se no final do diestro. As células superficiais também foram abundantes no proestro e estro. Os leucócitos foram ausentes

no estro e abundantes no metaestro e diestro. Poucas células basais e parabasais foram visualizadas durante todo o ciclo, sendo o seu maior percentual, assim como a presença de muco, verificado na metade do diestro.

Adicionalmente aos achados citológicos, Goodman e Cooper (2007) correlacionaram as variações hormonais evidenciadas ao longo do ciclo estral, com duração de quatro dias, em ratas, conforme se observa na representação esquemática da figura a seguir:

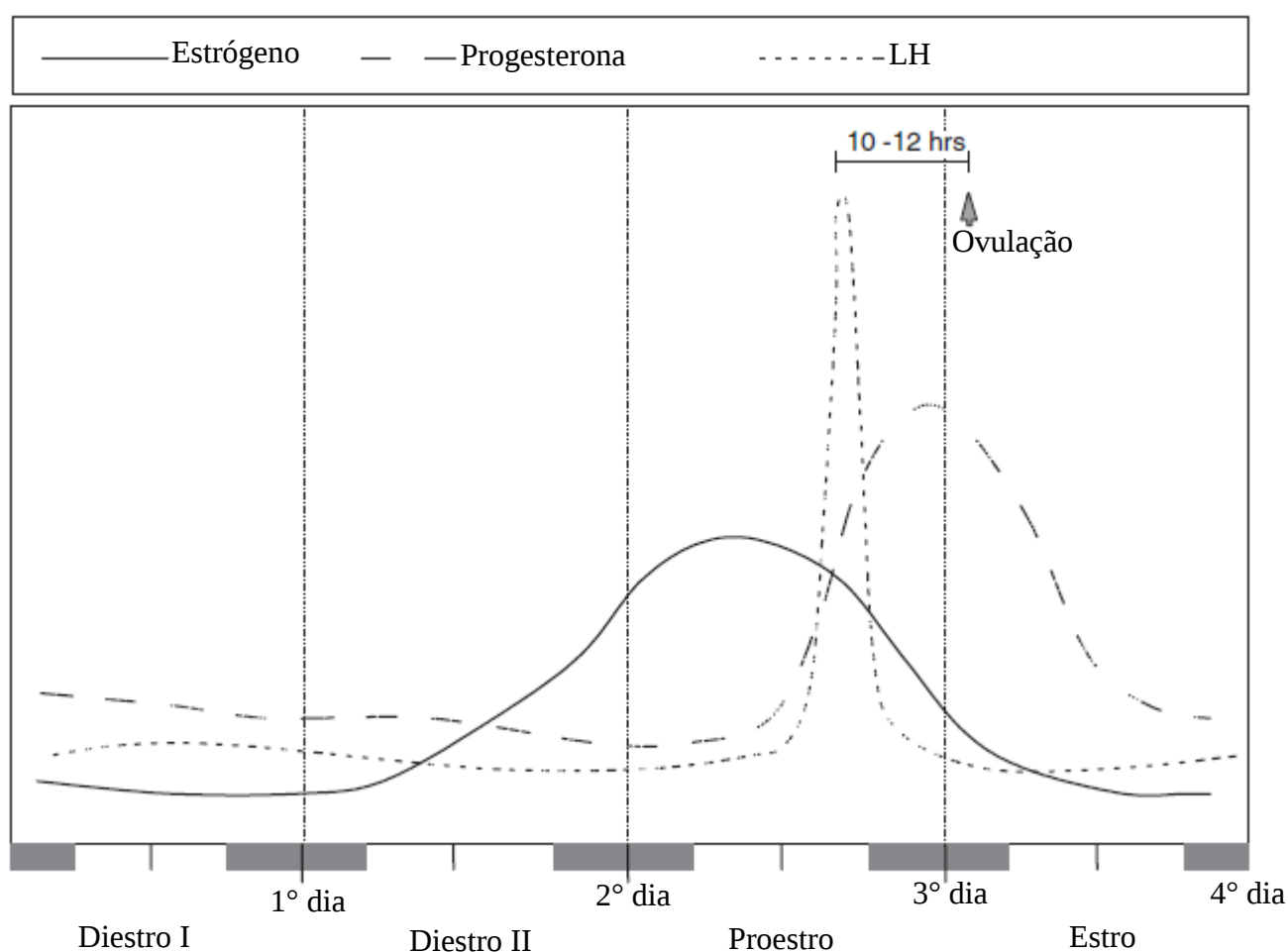


Figura 2- Representação do ciclo estral em ratas, cuja duração foram quatro dias. Neste caso, dividiu-se o diestro em duas fases e considerou-se o metaestro como um período muito curto em que consistia numa transição entre o estro e diestro. Figura modificada de Goldman et al. (2007).

3.3 Funções do estrógeno (E2) e progesterona (P4)

As ações destes hormônios são mediadas via interação com os respectivos receptores que se localizam no citosol de diversos tipos celulares, em muitos órgãos, cujo destaque refere-se aqueles do aparelho reprodutor feminino (LI; DAVIS, 2007). Os receptores estrogênicos são do tipo alfa ou beta (ER- α , ER- β) (SAUNDERS, 1998), sendo ambos envolvidos com as respostas clássicas ao referido agonista, divergindo no tocante a distribuição tissular (DECHERING et al., 2000); e os progesterônicos possuem três subtipos A, B e C (PR-A, PR-B e PR-C) (WEI et al., 1997; CONNEELY et al., 2003; LI; DAVIS, 2007).

A expressão do ER- α é cíclica, ocorre em todos os tipos celulares, em especial no útero, e pode variar em decorrência do ciclo estral, sendo as fases, em que predomina, correspondentes ao proestro e estro (WANG et al., 2000). Com relação ao tipo beta, verifica-se a presença de elevadas concentrações em células do estroma subepitelial uterino e menores distribuições nas células epiteliais luminais, epitélio glandular, células musculares lisas e endoteliais dos vasos (LI; DAVIS, 2007).

Além destas características, sabe-se que quando ocorre a interação do estrógeno com o receptor, sistemas intracelulares de translocação carregam o complexo formado para o núcleo celular, gerando-se interações específicas com regiões promotoras de genes alvo (NARDULLI; SHAPIRO, 1993; KLINGE, 2001). Em consequência disto, modulações transcricionais induzem o aumento da síntese do fator de crescimento epidermal (EGF) e de seu respectivo receptor; fator de crescimento do endotélio dos vasos (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGFs) (RUTANEN et al., 1993; MA, 2001; MARQUEZ et al., 2001) e proteínas quinases ativadoras de mitose (MAPK) (WEISZ et al., 1990; CHIAPPETTA et al., 1992). De modo que as ações resultantes consistem em proliferações das células epiteliais endometriais e aumento da permeabilidade vascular, ao passo que na vagina verifica-se um processo de queratinização, pelo desenvolvimento, proliferação e descamação das células superficiais bem como das escamas anucleadas (GOLDMAN et al., 2007; LI; DAVIS, 2007).

A isoforma do receptor da progesterona tipo A é a mais abundante, possui a maior expressão nas células epiteliais uterinas durante o diestro bem como nas células estromais

uterinas durante o proestro (TAN et al., 1999; UOTINEN et al., 1999) além da capacidade de inibir o PR-B. O PR-C possui a característica supressora da ação da progesterona (WEI et al., 1997). Com relação aos aspectos funcionais da progesterona, verificam-se efeitos antagônicos aqueles proporcionados pelo estrógeno mediante a redução do número de receptores deste último além do aumento catabólico de sua forma mais ativa, o estradiol (SHELBY et al., 1996; LI; DAVIS, 2007). Consequentemente, haverá redução da proliferação e diferenciação do epitélio escamoso vaginal (GOLDMAN et al., 2007).

Diante das informações apresentadas pode-se afirmar que as características do ciclo estral associada as variações cíclicas do estrógeno e progesterona bem como os processos de remodelação uterina e a expressão de diferentes moléculas regulatórias e estruturais configuram-se essenciais para estudos posteriores, em decorrência da fertilização, que analisem os processos desencadeados pela implantação blastocística, placentação e o consequente desenvolvimento embrionário (ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993; PACCOLA et al., 2013).

3.4 EVENTOS MORFOFISIOLÓGICOS GERAIS RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL

A união do espermatozoide com o óvulo, no oviduto, consiste em múltiplos mecanismos moleculares que envolvem interações entre as proteínas do gameta masculino que se ligam ao óvulo (beta-lactosiltransferases, alfafucosiltransferases, fosfolipase A2, proteína espermática 56) e os receptores específicos na zona pelúcida do ócito, podendo-se citar, em consequência disto, o estímulo à proteína ZPm3, que por sua vez, participa do mecanismo da reação acrossômica. Mediante tais ativações, acrescidas da motilidade espermática, enzimas hidrolíticas do acrossomo são liberadas na zona pelúcida a qual favorecerão o deslocamento transpositivo do espermatozoide, pela referida zona e membrana plasmática oocitária, o que culminará com a fusão gamética e, por conseguinte, a fecundação (WASSARMAN et al., 2001).

O zigoto assim formado, ainda envolto pelas camadas de mucopolissacarídeo da zona pelúcida, passa a realizar sucessivas divisões mitóticas (clivagens) associadas a

processos de polarização e compactações celulares os quais cursam com o surgimento de pequenas células (blastômeros) no interior da esfera zigótica, sendo tal estrutura reconhecida como mórula. Esta última, caso não sofra desenvolvimento ao estágio de blastocisto no oviduto e tampouco se implante neste local, desloca-se ao longo das tubas uterinas e atinge a luz do útero, sendo este trajeto marcado por modificações na estrutura morular, na qual se forma uma cavidade central (blastocelo) que se preenche com líquido, resultando na formação do blastocisto, onde em decorrência de contínuas modificações estruturais, perde a zona pelúcida e inicia o prelúdio da implantação (PERRY, 1981; CROSS et al., 1994; CROSS, 1998; SCHALAFER et al., 2000; ROSSANT; CROSS, 2001).

Concomitantemente, modificações histológicas uterinas surgem pelo aumento do número de vasos sanguíneos, hipertrofia da musculatura miometrial bem como proliferação das células epiteliais endometriais, o que acarreta em aumento de tamanho das glândulas deste epitélio. Disso se verifica, na luz uterina, muitas formações com o aspecto de criptas que contém precipitados sugestivos de atividade secretória. Por conseguinte, a proeminente mucosa endometrial apresenta dobras projetadas na cavidade delimitada pelo lúmen uterino, fato este que gera extensões laterais similares e extremidades mesometriais e antimesometriais conforme a proximidade de cada uma ao mesométrio. Tais modificações surgem com o intuito preparatório para a implantação blastocística (WIMSATT; WISLOCKI, 1947; MOSSMAN, 1987).

Nesse sentido, Mossman e Weisfeldt (1939) ao descreverem a placentação de primitivo roedor pertencente à família Sciuridae, verificaram que a luz uterina, apresentava a forma de T invertido no qual a base larga situava-se em posição mesometrial e foi denominada câmara placentária devido ao fato de albergar a placenta corioalantoide no transcorrer gestacional da espécie analisada. Do lado oposto, ou mesometrial, denominou-se como câmara de implantação no qual o blastocisto ancorava-se e implantava-se precocemente. Tal constatação foi exatamente oposta àquela verificada por Miglino et al. (2008) ao analisar a placentação vitelina invertida da *Dasyprocta leporina*, *Cuniculus paca* e *Galea spixii* além das informações fornecidas por Oliveira et al. (2008) em estudo que caracterizou a placenta corioalantoide em preás. Estas duas publicações mais recentes demonstraram o desenvolvimento de uma placenta

principal ocorrendo no lado antimesometrial do útero ao passo em que o blastocisto e consequentemente o futuro embrião, desenvolver-se-iam no lado mesometrial.

No entanto, antes de aprofundarmos os conhecimentos relativos ao estabelecimento de um órgão placentário específico, concentremo-nos na organização estrutural do blastocisto e o consequente processo de implantação. Para tanto, é importante ressaltar as definições e argumentações proporcionados por Jolie (1990) ao promover uma convergência de informações morfológicas no tocante ao desenvolvimento embrionário de roedores de laboratório. Desta forma, o blastocisto inicial apresentou natureza bilaminar, sendo composto por um revestimento externo de células trofoblásticas, ou seja, uma camada externa de trofoectoderma (também denominado trofoblasto mural); e uma camada mais interna – formada por células endodérmicas hipoblásticas - a qual, após proliferação, constituiriam a massa celular interna (MCI) (também chamada disco embrionário, disco germinativo ou embrioblasto). Desta última, diferenciam-se duas camadas distintas, onde aquela que passa a revestir a blastocele (situando-se imediatamente abaixo do trofoectoderma) denomina-se endoderme hipoblástica extraembrionária (futuro saco vitelino), sendo o endoderma presente no disco germinativo caracterizado como endoderme embrionária; e a segunda camada seria aquela que permanece em contato com a endoderme embrionária, em posição externa a esta última, denominando-se ectoderme epiblastica embrionária (epiblasto) que se desenvolve num dos pólos do blastocisto.

Similarmente, Rossant e Cross (2001), em artigo de revisão sobre o desenvolvimento placentário em camundongos, indicam as modificações pelas quais passam a estrutura blastocística e a placenta, caracterizando-as cronologicamente de acordo com dias cursados após a fecundação. Com esse intuito, estabelecem que a implantação ocorre por volta do dia 4,5 (na escala cronológica anteriormente citada) e enfatizam que durante este processo, as células do trofoectoderma situadas acima da MCI sofrem diferenciações originando: a ectoderme extraembrionária e o cone ectoplacentário (futura placenta corioalantoide). Já as células do trofoblasto mural, localizadas distantes do embrioblasto, reduzem as divisões mitóticas e algumas delas passam a duplicar continuamente o ácido desoxiribonucléico (DNA) até adquirirem a configuração de

célula trofoblástica gigante. Até este momento, os eventos supracitados podem ser demonstrados de acordo com a figura a seguir.

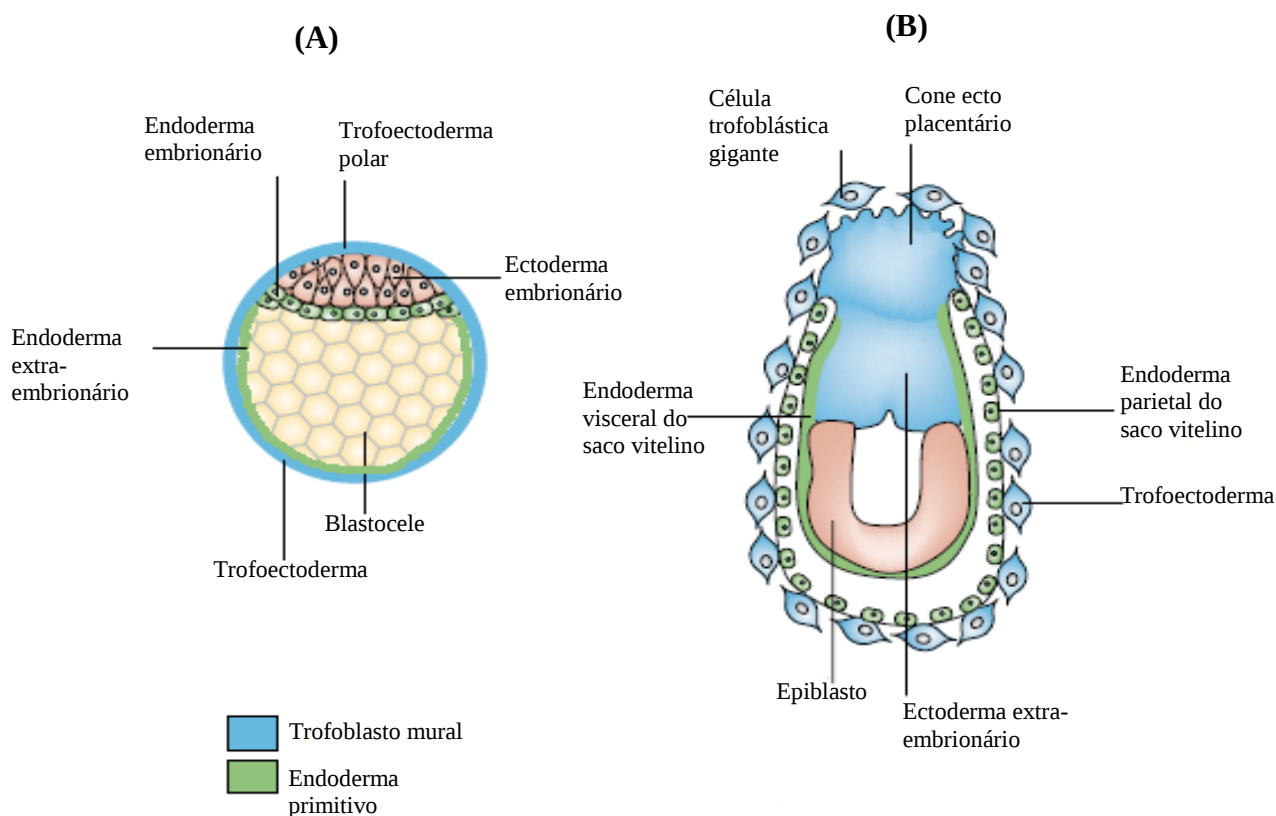


Figura 3- Esquema representativo do desenvolvimento embrionário inicial em camundongo. Em A evidencia-se à estrutura blastocística, aos 6 dias de desenvolvimento embrionário, no qual pode-se observar as células do endoderma e ectoderma embrionários que compõe a massa celular interna. Verifica-se também o endoderma extraembrionário do qual derivará o saco vitelino e a cavidade central da blastocele. Em B caracteriza-se, aos 7,5 dias de desenvolvimento embrionário, o surgimento de células trofoblásticas gigantes e as regiões resultantes da proliferação do trofoblasto acima do disco germinativo: ectoderma extraembrionário e cone ectoplacentário. O segundo originará a placenta principal ou corioalantoide. Além disso, verifica-se a formação de dois endodermas: um parietal e localizado acompanhando o contorno externo do trofoectoderma, e o outro visceral que se situa revestindo o epiblasto e ectoderma extra-embrionário. Ambos formam o saco vitelino (também denominada placenta vitelina) bem como delimitam uma cavidade, ou seja, a cavidade do saco vitelino. Figura modificada de Rossant e Cross (2001).

Em relação ao trofoblasto mural, Cross et al. (1994) reforçam que a referida parede trofoblástica, delimitadora do blastocisto, assume funções especializadas que serão

essenciais à implantação além da produção de hormônios necessários ao reconhecimento materno e manutenção da gestação.

Nesse sentido, a implantação é fundamental para que a gestação seja bem sucedida, sendo necessário uma receptividade uterina adequada e coordenada ao estágio de ativação do blastocisto (SHIMIZU et al., 2005), o qual inicia com a perda da zona pelúcida (ORSINI; DONOVAN, 1971), que pode ocorrer pela digestão enzimática induzida por secreções uterinas (em camundongos e hamsters) ou mediante a produção de emissões trofoblásticas as quais atravessam esta zona, o que culmina com a sua desintegração (cobaio) (ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993), seguindo-se da interação apositiva entre blastocisto e útero; formações edematosas uterinas, acarretando em modificações no aspecto da luz deste último além da reação decidual que ocorre mediante a ancoragem do blastocisto (ORSINI; DONOVAN, 1971; LEE; DEMAYO, 2004).

Tais eventos ocorrem de maneira distinta dependendo do tipo de interação entre a membrana trofoblástica e o tecido uterino endometrial luminal, podendo a implantação ser classificada como cêntrica, quando há apenas uma interação de aposição entre o blastocisto e útero, ocorrendo em coelhos, cachorros, vacas, ovelhas, porcos e muitos marsupiais; excêntrica quando o epitélio luminal uterino sofre mudanças conformacionais para envolver o trofoblasto, antes de uma eventual invasão trofoblástica, verificando-se este tipo em ratos, camundongos e hamsters; intersticial, no qual se observa invasão do trofoblasto por meio do epitélio luminal e estoma endometrial cujo intuito seria promover íntima aproximação entre o suprimento sanguíneo materno com os vasos embrionários em desenvolvimento. Ocorre no homem e no cobaio (*Guinea pig*). Como consequência dos dois últimos tipos, verifica-se a presença de reação decidual na qual ocorre proliferação, diferenciação e mudanças morfológicas das células endometriais (WIMSATT, 1975; LEE; DEMAYO, 2004).

Assim, em decorrência de tal classificação, o blastocisto, em camundongos e ratos, interage com as células endometriais do lúmen uterino e implanta-se no lado antimesometrial, sendo os eventos desencadeadores verificados pela fagocitose das células endometriais luminais pelo trofoblasto, o que favorece a sua penetração por meio do epitélio luminal e lâmina basal. Por essa disposição, o cone ectoplacentário desenvolve-se em orientação mesometrial (CARSON et al., 2000; LEE; DEMAYO,

2004; HERINGTON; BANY, 2009). Já no cobaio (porquinho da Índia), a implantação processa-se pelas projeções de células trofoblásticas murais contendo arranjo morfológico sincicial (sinciciotrofoblasto) as quais projetam-se e invadem o espaço entre a lâmina basal luminal e o epitélio endometrial ou diretamente no estroma subjacente de modo a promover uma penetração transepitelial (ENDERS, 2000).

Esse mecanismo implantacional do cobaio foi estudado por Orsini e Donovan (1971) ao descreverem as mudanças morfológicas do útero de cobaios, os quais tiveram os cornos uterinos gestantes corados com o azul de pontamina, sendo este considerado um sistema revelador que intensificava a marcação azul, em preparações histológicas, justamente nas regiões submetidas à implantação e decidualização. Os resultados demonstraram que, aos seis dias e nove horas de gestação, formavam-se zonas edematosas uterinas bem como foi verificada a presença de um blastocisto implantado na região antimesometrial do útero e, aos sete dias e nove horas, um precoce cone ectoplacentário desenvolvia-se em localização mesometrial, sendo as marcações com o referido corante intensificadas na medida em que se sucediam os dias de gestação.

Além disso, pesquisas ultra estruturais e moleculares revelaram que por ocasião da implantação, a fase de aposição é estabelecida pelo contato direto entre as microvilosidades tanto das células trofoblásticas quanto das células epiteliais endometriais luminais as quais formam complexos interdigitantes integrados (HEDLUND; NILSSON, 1971) que só se desfazem na etapa de adesão, situação em que os epitélios embrionários e maternos distam apenas em 20 nanômetros (SCHLAFKE; ENDERS, 1975). A invasão posterior do trofoectoderma até o tecido conectivo subepitelial endometrial resulta numa série de modificações deste último que culminará com a formação de uma decídua primária (WELSH; ENDERS, 1987).

Assim, em todas as etapas da implantação, moléculas glicoproteicas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos são produzidos e expressos nas membranas plasmáticas do trofoblasto e do epitélio endometrial, podendo-se citar os proteoglicanos de heparan sulfato os quais configuram-se essenciais para a adesão do blastocisto (FARACH et al., 1987; ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993). Do mesmo modo, tem sido reportado que moléculas como o fator inibidor da leucemia (LIF), fatores estimuladores de colônias, fator de crescimento epidermal (EGF), fator transformador do crescimento (TGF- α e

TGF- β), estrogênio e progesterona encontram-se fortemente implicados no desencadeamento da implantação, desenvolvimento placentário; e remodelação dos tecidos uterinos, este último, em decorrência do fenômeno da decidualização (SURVEYOR et al., 1998; BETANCOURT-ALONSO et al., 2006).

A principal característica relacionada à formação do tecido que constituirá a decídua ocorre mediante profundas alterações de forma, organização e metabolismo pelas quais sofrem os fibroblastos oriundos do estroma endometrial (ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993), podendo-se citar ainda outras modificações as quais são coadjuvantes, mas importantes neste processo: à hipertrofia de células endoteliais, proliferação do epitélio endometrial, presença de infiltrado de grandes linfócitos granulares (células granulares endometriais) e macrófagos (ENDERS, 1991).

Inicialmente, a reação decidual se estabelece nas camadas estromais adjacentes ao concepto implantado, denominando-se como decídua primária a qual é avascular e, portanto, menos permeável ao intercâmbio de macromoléculas; e encontra-se situada na câmara anti-mesometrial da luz uterina. Esta zona primária é envolvida por camadas de fibroblastos não transformados - constituindo aglomerados de células pré-decíduais – as quais, em algumas espécies, podem estar separadas da decídua primária por grande quantidade de fibroblastos compactados e fibrinoides constituindo a formação de uma cápsula envolvente. Em seguida, com o subsequente desenvolvimento, a referida reação decidual, acentua-se na zona primária e irradia-se para outros locais, fato este que favorece o surgimento de uma zona decidual secundária, culminando, posteriormente, em expansões para a porção mesometrial uterina, formando uma decídua de mesmo nome. Estas últimas são ricamente vascularizadas, fato este que possibilita as células trofoblásticas gigantes passarem a ter contato direto com o sangue e células do sistema imune materno. Deste modo, como na maioria das espécies de roedores, a placenta corioalantoide se estabelece no lado mesometrial, as reações deciduais nessas regiões tendem a ser mais complexas e evidentes (MOSSMAN, 1987; HERINGTON; BANY, 2009).

A decídua basal refere-se ao tecido uterino transformado situado abaixo do blastocisto, ao passo em que todo o estroma reativo as modificações deciduais que envolvem diretamente o concepto é reconhecido como decídua capsular, sendo as demais

modificações deciduais ao longo do útero denominada como decídua verdadeira ou parietal (MOSSMAN, 1987; ENDERS, 1991; HERINGTON; BANY, 2009). Nas referidas regiões, as transformações dos fibroblastos em células deciduais resultam de diversas alterações estruturais e funcionais nas quais verificam-se células com formato redondo, poliédrico e por vezes irregular, projeções celulares pediculares da membrana plasmática que podem envolver lâminas basais bem como aumentar a capacidade de englobar glicogênio e gotículas lipídicas, sendo tais células relacionadas à síntese de colágeno (WEWER et al., 1985; ENDERS, 1991; CROSS, 1998). No tocante aos aspectos ultra-estruturais, podem ser citados grande quantidade de cisternas do retículo endoplasmático rugoso, aumento do número de mitocôndrias e presença de núcleo esférico contendo um nucléolo proeminente (ABRAHAMSOHN, 1983; WELSH; ENDERS, 1985; ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993).

Além disso, no microambiente da matriz extracelular uterina, observam-se modificações nas fibras colágenas que, apesar de reduzirem em quantidade, passam a se tornar irregulares e espessas (ALBERTO-RINCON et al., 1989). Este aumento de espessura correlaciona-se a maior síntese de colágeno a qual encontra-se sob o controle dos glicosaminoglicanos, de modo que estas macromoléculas também participam do processo de decidualização e, por conseguinte, auxiliam na ancoragem blastocística bem como possibilitam ambiente adequado para o desenvolvimento placentário (PARRY et al., 1978; FLINT et al., 1984). Estas ações são potencializadas mediante a produção, pelas células deciduais, de TGF- α (HAN et al., 1987), prostaglandinas, fator estimulador de colônia granulócito-monócito (GM-CSF), colágeno tipo IV, laminina, ácido hialurônico e glicosaminoglicanos sulfatados (CARSON et al., 1987) de modo a controlar a invasão trofoblástica, o subsequente desenvolvimento embrionário e ainda favorecer a placentação corioalantoide (ENDERS, 1991; ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993).

Com efeito, é importante indicar ainda que, após o estabelecimento da implantação e a concomitante reação decidual, complexas transformações estruturais e moleculares irão ocorrer tanto na extremidade em que prolifera o cone ectoplacentário quanto naquela ocupada pelo embrioblasto, de modo que, inicialmente, optou-se por apresentar os aspectos primordiais relativos à origem das membranas fetais e seus anexos, desenvolvimento placentário e em seguida, aqueles conhecimentos verificados por

ocasião da embriogênese. No entanto, antes das exposições supracitadas e como forma de sedimentar os conhecimentos já obtidos, segue-se a demonstração, por microscopia de luz promovida por Herington e Bany (2009), de um saco gestacional contendo um conceito implantado, o cone ectoplacentário e as regiões mesometriais e antimesometriais da decídua uterina, em estudo que caracterizou as sinalizações moleculares relacionadas à gestação em camundongo, conforme se observa na figura a seguir:

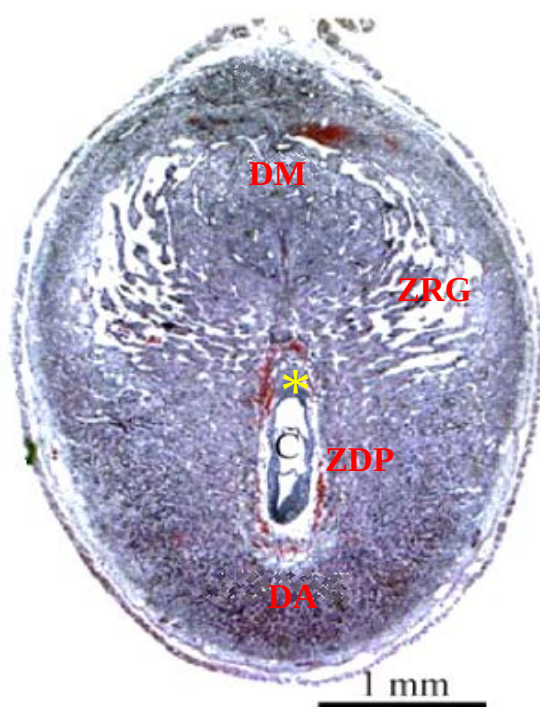


Figura 4- Saco gestacional de camundongo aos sete dias e cinco horas de desenvolvimento embrionário revelando as regiões uterinas da decídua antimesometrial (DA), zona de decídua primária (ZDP) e decídua mesometrial (DM). Esta última, possui duas sub-regiões onde, na primeira delas, verificam-se células deciduais ricas em glicogênio, o que confere uma zona esparsa e constituída por excesso desse polissacarídeo (ZRG). A outra, apresenta células estromais indiferenciadas. Observar ainda, o blastocisto (conceito) representado por C e direcionado para a porção anti-mesometrial do útero, ao passo que o cone ectoplacentário (*) situa-se em localização diametralmente oposta. ZRG: zona rica em glicogênio. Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). Figura modificada de Herington e Bany (2009).

3.4.1 Origem das membranas fetais em roedores, placentação vitelínica, inversão e funções do saco vitelino

Conforme descrito anteriormente, sabe-se que da massa celular interna derivam células hipoblásticas primitivas - cuja proliferação resulta nos endodermas parietal e visceral que comporão o saco vitelino e delimitarão a cavidade deste último -; células ectodérmicas extraembrionárias que podem originar tanto o cone ectoplacentário (ou ectoderma de Träger) como o ectoderma extraembrionário (ou ectoderma verdadeiro), onde o primeiro desenvolver-se-à em placenta principal ou corioalantoide; e ectoderma embrionário o qual apresenta células capazes de sofrerem diferenciações nas três camadas germinativas do embrião ou originar o mesoderma extraembrionário que por sua vez, será fundamental para o surgimento do âmnio, alantoide e saco vitelino (CROSS, 1998; SCHLAFFER et al., 2000).

Essas diferenciações, oriundas de sucessivas divisões mitóticas e modificações fenotípicas em cada compartimento que se estabelece, mediante modificações espaciais do botão gestacional, possibilitam à formação das membranas fetais e alterações estruturais embrionárias, o que culmina com a manutenção da gestação. Dentro desta perspectiva, a cavidade da blastocele – uma vez revestida pelo endoderma do saco vitelino -, continua a acumular quantidades crescentes de líquido acarretando em consequência, expansão do embrião o qual pode ser designado como blastocisto expandido. Concomitantemente, o mesoderma inicia sua formação derivando-se das células ectodérmicas embrionárias e começa a se interpor entre estas últimas e o endoderma embrionário para constituir o mesoderma embrionário. Neste local, o referido mesoderma ramifica-se em duas camadas idênticas as quais passam a definir uma cavidade reconhecida como exoceloma ou celoma extraembrionário, sendo que tal conformação induz um mecanismo expansivo e proliferativo das duas camadas mesodérmicas além do âmbito embrionário, caracterizando-as como mesodermas extraembrionários, onde uma camada revestirá o trofoblasto mural (trofoectoderma) acarretando na formação da somatopleura ou córion ao passo que a outra camada mesodérmica entrará em aposição com o endoderma visceral do saco vitelino constituindo a esplancnopleura (PERRY, 1981; MOSSMAN, 1987).

Durante a fase da gastrulação, o córion desenvolve a formação de pregas ou dobramentos que passam a circundar o disco embrionário em uma cavidade amniótica fechada, de modo que tal modificação espacial relaciona-se com a proliferação de células amnioblásticas as quais derivam do ectoderma embrionário. A cavidade assim produzida possui um assoalho de células amnioblásticas – contínuas com o epiblasto - e um teto formado pelo córion que sofrerá fusão em uma região conhecida como mesoâmnio (PERRY, 1981; CROSS, 1998; PEREIRA et al., 2011).

O âmnio circunda todo o embrião com exceção do anel umbilical e confere proteção mecânica ao organismo embrionário quando produz o fluido amniótico. A delgada membrana amniótica possui revestimento mesodérmico extraembrionário e reconhecida capacidade filtrante para fluidos e eletrólitos bem como possibilita proteção contra patógenos infecciosos e toxinas (PERRY, 1981; SCHMIDT, 1992; CALVIN; OYEN, 2007). Além disso, estudos recentes em medicina reprodutiva humana trazem a importante descoberta de células tronco pluripotentes oriundas da membrana ectodérmica amniótica (FAUZA, 2004; EVANGELISTA et al., 2008; IANCHERAN et al., 2009) onde tais células possuem baixa imunogenicidade e elevada capacidade proliferativa e imunomodulatória, sendo portanto, aptas a diferenciação em muitos tipos de órgãos cujas proteínas órgãos-específicas já foram demonstradas em estudos *in vitro* (BANAS et al., 2008; WOLBANK et al., 2009).

Neste contexto, Tamagawa et al. (2004) reportaram a pluripotencialidade de células tronco amnióticas em estudos *in vitro*, utilizando-se da formação de corpos embrionários quiméricos camundongo/humano, segundo os quais foram verificados que tais células apresentavam a capacidade de sofrerem diferenciações em células hepáticas, pulmonares, do trato digestivo, epiteliais, neurais, hematopoiéticas ou poderiam simplesmente serem programadas para originar os folhetos germinativos: ectoderma, mesoderma e endoderma.

Adicionalmente, o mecanismo amniogênico em roedores miomorfos e histicomorfos resulta de um processo de cavitação pela localização interna do embrioblasto no blastocisto, sendo também observado mecanismo similar em camundongos por ocasião da formação da cavidade pró-amniótica e mais acentuadamente quando dobramentos específicos ocorrem no epiblasto proximal. Já na amniogênese

humana, células ectodérmicas e mesodérmicas achatadas surgem para envolver o organismo embrionário. Estes fenômenos, em conjunto, fazem com que o embrião sofra um arqueamento em direção a cavidade do saco vitelino. Como consequência disto, o disco embrionário localiza-se entre a cavidade amniótica e o saco vitelino, fato este que corrobora para que, com o desenvolvimento subsequente, várias células epiblasticas proliferem e realizem migração específica para o plano mediano da porção caudal do embrioblasto formando a linha primitiva. Esta estrutura possibilita a identificação do eixo cefálico-caudal do embrião (MOSSMAN, 1987; EAKIN; BEHRINGER, 2004; PEREIRA et al., 2011).

Nessa linha, células epiblasticas sofrem transição epitélio-mesenquimal e geram precursores endodérmicos e mesodérmicos pelo surgimento de células mesoendodermiais (mesentoderma) (LAWSON et al., 1991; BURDSAL et al., 1993; BEDDINGTON; ROBERTSON, 1999). É evidente que mesodermas embrionários e extraembrionários serão formados, sendo este último, importante para a composição das membranas fetais. Outras células do mesentoderma possuem a competência para formar o ectoderma amniótico, ectoderma embrionário, endoderma e células germinativas primordiais. Desta forma, o que determinará a formação das diferentes linhagens oriundas das células epiblasticas será justamente a localização em que tal célula se encontra bem como pelo estímulo induzido por proteínas, cujo controle gênico situa-se na dependência de qual tipo deva ser gerado naquele momento específico. Como exemplo, pode-se citar que células epiblasticas situadas no epiblasto posterior ou póstero-lateral, encontram-se envolvidas na diferenciação em mesoderma amniótico, ao passo que na linha primitiva células epiblasticas originam mesodermas extraembrionários (GARDNER; ROSSANT, 1979; PEREIRA et al., 2011).

Para Bianchi et al. (1993) e Eakin e Behringer (2004), em camundongos, todo o mesoderma deriva de células epiblasticas ectodérmicas que convergem para a linha primitiva, ao passo que em humanos, existem evidências que um mesoderma primitivo surge bem antes do aparecimento da referida linha e que tal estrutura mesenquimal origina-se por meio da diferenciação específica do endoderma embrionário.

O sulco primitivo é derivado da invaginação de células do epiblasto tornando possível a saída de algumas células em direção ao hipoblasto. A pequena depressão

gerada por este sulco prolonga-se até a extremidade cefálica da massa celular interna numa estrutura referida como nó primitivo. Algumas células epiblasticas da linha primitiva deslocam células do hipoblasto originando a endoderme embrionária. As que permanecerem no epiblasto formando o alicerce da cavidade amniótica originarão o ectoderma embrionário. No entanto, a maioria das células do epiblasto da linha primitiva se diferencia em células mesenquimais para a produção do mesoderma extraembrionário (NODEN; DE LAHUNTA, 1985; GILBERT, 2003; PEREIRA et al., 2011).

A dinâmica embrionária também cursa devido aos dobramentos específicos craniocaudais e laterais cujas conformações espaciais das membranas supracitadas culminam com a origem das cavidades do corpo. Conforme já descrito, o mesoderma que se associa ao epiblasto e trofoectoderma denomina-se somático ou parietal, ao passo que aquele justaposto ao hipoblasto e endoderma caracteriza-se como visceral ou esplâncnico. Por conseguinte, o mesoderma somático originará as porções parietais do peritônio e pleura da mesma forma que o visceral determinará as respectivas regiões serosas. Além disso, mediante tais dobramentos, uma parte da cavidade do saco vitelino fica envolvida pelo embrião em formação, isolando-se da restante, formando, desta forma o intestino primitivo o qual será dividido nas partes anterior, média e posterior conforme se alinhe nas respectivas posições cranial, média e caudal do embrião em formação. Interessantemente, uma porção do intestino posterior prolonga-se como um divertículo no celoma extraembrionário, ou seja, esta nova cavidade possui forma de T e passa a ocupar um espaço dentro do referido celoma, sendo reconhecido como alantoide e constituído por endoderma e mesoderma visceral (PERRY, 1981; FLÉCHON et al., 2004).

Esse pedúnculo alantoidiano se projetará na direção do cone ectoplacentário, o que levará, neste local, ao desenvolvimento subsequente da placenta corioalantoide (MESS; CARTER, 2007). Adicionalmente, ressalta-se que a cavidade alantoidiana pode receber a urina fetal além de uma parte da alantoide está vinculada a origem da bexiga bem como cabe frisar ainda que a capacidade angiogênica proporcionada pelo mesoderma que compõe este anexo fetal faz surgir artérias e veias umbilicais (PERRY, 1981; JOLLIE, 1990; SCHLAFFER et al., 2000).

A origem do cordão umbilical relaciona-se a partir do pedúnculo embrionário o qual encontra-se deslocado ventralmente e se liga tanto ao saco vitelino quanto ao âmnio.

Essa estrutura possui a importante função de promover o intercâmbio nutricional da mãe para o feto, além da eliminação de excretas no sentido inverso (RODRIGUES et al., 2013).

Oliveira (2004) caracteriza o cordão umbilical como um conjunto de vasos e ductos envolvidos no transporte de substâncias maternas necessárias ao desenvolvimento embrionário. Ao descrever esta estrutura em mocós, mostrou que estava constituído por duas artérias, uma veia e o ducto alantoide, envoltos por uma substância de aspecto gelatinoso (geléia de Wharton). Além desses vasos observou-se a presença de uma artéria e uma veia vitelina, distribuídas ao longo da membrana coriovitelínica.

Com relação ao saco vitelino, este é formado por um segmento parietal, adjacente ao trofoblasto e visceral, próximo ao embrião. Ambos os endodermas, em diferentes estágios gestacionais, exercem funções placentárias, fato este que os capacitam como estruturas acessórias de desenvolvimento embrionário bem como tornam intercambiáveis as nomenclaturas de placenta vitelina. Em consequência disto, a placenta vitelina parietal pode ser caracterizada pela presença de células endodérmicas, separadas do trofoblasto por uma espessa membrana basal, referida como membrana de Reichert. Pela conformação bilaminar de ectoderma e endoderma, a membrana parietal também recebe a denominação de onfalopleura bilaminar. É importante enfatizar ainda que um segmento do endoderma parietal encontra-se revestindo a superfície discoidal da placenta corioalantoide numa região conhecida como superfície fetal da placenta principal. Este mesmo endoderma parietal repousa sobre uma lâmina basal de Reichert que o separa do espongiotrofoblasto da placenta principal (MOSSMAN, 1987; HAAR; ACKERMAN, 1970; JOLLIE, 1990).

Diante da importância estrutural e funcional que é incumbida ao epitélio endodérmico parietal, Jollie (1968) realizou um estudo minucioso sobre a estrutura fina do saco vitelino parietal em ratas gestantes nos períodos de 12 a 22 dias pós-fecundação por meio da microscopia eletrônica de transmissão. Para tanto, três grupos experimentais foram formados, segundo os quais administraram-se ferritina no primeiro, dióxido de Tório (torotaste) no segundo e uma mistura destas substâncias no último grupo. Os resultados mais impactantes demonstraram um aumento de nove micrômetros na espessura da membrana de Reichert - durante o intervalo de tempo analisado -, aspecto

fibrilar no tocante a análise estrutural e ainda demonstrou locais fenestrados ou espaços os quais tornavam essa membrana descontínua. O endoderma parietal apresentou a constatação de aumento no número de gotículas lipídicas, cisternas do retículo endoplasmático rugoso além de material eletrodense. Dentre as substâncias injetadas, verificou-se que a ferritina era incorporada pelas células trofoblásticas, endoderma parietal e membrana de Reichert, fato este ratificador que no revestimento endodérmico da placenta principal, uma rota de transferência de substâncias era estabelecida podendo, inclusive, atingir o organismo fetal. Tal evento não ocorreu com relação ao dióxido de Tório, onde a referida molécula foi detectada no trofoblasto e endoderma subjacente, porém não incorporada na membrana de Reichert e, conseqüentemente, essa substância não alcançava a cavidade do saco vitelino, chegando-se a conclusão do papel de barreira seletiva conferida à membrana basal. Para este autor, a maior porção da membrana parietal relaciona-se ao trofoblasto mural adjacente, sendo reconhecida como saco vitelino parietal capsular, pois se encontra em aposição a decídua capsular.

A membrana de Reichert pode ser visualizada - pela microscopia de luz - mediante sua afinidade por corantes ácidos ou que contenha prata, citando-se como exemplo, as colorações de Masson e ácido periódico de Shiff (P.A.S) respectivamente, os quais destacam os principais constituintes dessa membrana: o colágeno compactado e algumas moléculas de natureza glicoproteica (WISLOCKI et al., 1946).

Wislocki e Padykula (1953) descreveram a topografia da onfalopleura bilaminar em estudo conduzido com embriões de ratos Norway do dia dez até o vigésimo primeiro dia de gestação. Nesta pesquisa, dois endodermas parietais foram caracterizados, sendo uma camada promotora do revestimento da superfície da placenta corioalantoide e outra, associada ao trofoblasto mural da decídua capsular. Em ambos os casos, uma membrana basal de Reichert localizava-se entre as células endodérmicas parietais e o trofoblasto, de modo que, a referida descrição topográfica acrescida da característica hialina da membrana basal corroboraram com as informações proporcionadas por Mossman (1937).

Os aspectos funcionais inferidos ao endoderma parietal foram verificados em ensaios *in vitro* utilizando-se de sacos gestacionais oriundos de ratos Wistar de 12 a 16 dias de gestação. Para a constatação da síntese proteica, fragmentos do endoderma parietal foram incubados com aminoácido radioativo [^{14}C] prolina, seguida de medições

radioativas de ^{14}C incorporado e taxa de produção de 4-hidroxi [^{14}C] prolina. A biossíntese do colágeno foi realizada com o auxílio do composto [^{14}C] lisina. Dessa forma, os autores do experimento puderam constatar que as células endodérmicas parietais do saco vitelino participavam da biossíntese da membrana de Reichert (CLARK et al., 1975).

A placenta vitelina visceral apresenta uma disposição trilaminar, cuja nomenclatura de esplancopleura extraembrionária justifica-se pela composição de endoderma visceral, mesoderma extraembrionário e membrana basal visceral subjacente (HAAR; ACKERMAN, 1970; MOSSMAN, 1987; JOLLIE, 1990). Sabe-se que a referida camada intermediária possui desempenho proliferativo, capaz de gerar uma expansão que delimitará o celoma extraembrionário, sendo esta cavidade responsável por envolver o embrião e reduzir a circunferência descrita pelo saco vitelino (AMOROSO; PERRY, 1963; PERRY, 1981; ENDERS; BLANKENSHIP, 1999).

Interessantemente, muitos genes expressos com exclusividade no endoderma visceral possuem a ampla capacidade de fornecer subsídios essenciais ao desenvolvimento embrionário (COPP, 1995; FARRINGTON et al., 1997). Pesquisas moleculares detectaram que a diferenciação da placenta vitelina visceral necessita da expressão do gene *evx-1* (SPYROPOULOS; CAPECCHI, 1994) e que o fator transcricional GATA-4 encontra-se relacionado a indução de que no mesoderma subjacente forme-se ilhotas sanguíneas (local da hematopoiese inicial) bem como ocorra o desenvolvimento da vascularização vitelínica (SOUDAIS et al., 1995). Genes classicamente isolados em amostras de fígado foram detectados como sendo inicialmente expressos no endoderma visceral, podendo-se citar os fatores nucleares hepáticos: alfa, beta e gama (*HNF-3 α* , *HNF-3 β* e *HNF-3 γ*) (COSTA, 1994; LAI et al., 1990). Estes interagem com moléculas sinalizadoras e ativadoras de outros genes como a Sonic hedgehog e peptídeos BMP promovendo um sinergismo no desenvolvimento da notocorda e definições indutivas dos eixos corporais do embrião (ECHELARD et al., 1993; RIDDLE et al., 1993). Além disso, sinalizações moleculares oriundas do endoderma visceral são capazes de influenciar a morte celular programada de um pequeno segmento do ectoderma embrionário durante o processo de formação da cavidade amniótica e ainda há especulações referentes ao aspecto indutor de proteínas

que irão favorecer a degeneração da onfalopleura bilaminar (o endoderma parietal que circunscreve a delimitação promovida pelo trofoblasto mural), o que resulta na inversão do saco vitelino (JOLLIE, 1990; COUCOUVANIS; MARTIN, 1995).

De acordo com Mossman (1987) a característica mais marcante evidenciada nas membranas fetais de roedores consiste na inversão do saco vitelino, onde o trofoectoderma, membrana de Reichert e endoderma parietal sofrem desintegração apoptótica de modo a resultar na exteriorização do endoderma visceral que passa a fazer interface com o tecido uterino, cuja orientação endodérmica situa-se em posição oposta à futura placenta corioalantoide. Consequentemente, o desenvolvimento de uma placenta vitelina invertida ocorrerá apenas em espécies nas quais exista a persistência do saco vitelino ao longo da gestação.

A forma mais primitiva de inversão pode ser encontrada em lagomorfos, insetívoras e alguns morcegos. No entanto, os roedores desenvolveram uma forma extrema de sistema de membranas, aptas aos processos absortivos, pela presença de uma placenta vitelina invertida, evidenciada pela destruição completa da onfalopleura bilaminar, ao mesmo tempo em que uma placenta principal encontra-se em formação. Quando não há degeneração, a inversão é referida como incompleta ou inexistente (JOLLIE, 1968; JOLLIE, 1990).

Os mecanismos absortivos e alterações estruturais do endoderma visceral de camundongos foram analisados por Schlüter (1978) após injeção subcutânea de azul de trypan no organismo materno. Postulou-se que este corante vital inativava enzimas líticas, capazes de digerirem substâncias oriundas da mãe para a posterior transferência ao embrião. Para efeito de comparação, células endodérmicas viscerais de animais nos quais não se administrou o referido corante, foram utilizados como controle do experimento. Por meio da microscopia eletrônica de transmissão, foram observadas modificações estruturais nas células endodérmicas viscerais 12 horas após a administração do azul de trypan. Grande vacúolo único contendo matriz clara e gotículas escuras puderam ser evidenciadas na posição apical do citoplasma das células estudadas. Após 24 horas, grandes áreas citoplasmáticas apresentaram indícios de autodigestão e restos de organelas celulares. O autor pode concluir que as alterações morfológicas promovidas pelo corante

poderiam causar efeitos teratogênicos ao embrião, mediado pelas células endodérmicas do saco vitelino invertido.

A inversão total do saco vitelino foi determinada por Fischer e Floyd (1972) mediante trabalho de placentação utilizando o esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), avaliados do décimo terceiro dia até o final da gestação e por Vale et al. (2013) cuja dinâmica do saco vitelino foi acompanhada do sexto dia até o final da gestação em preás. Em ambos estudos, foram realizadas análises por meio da microscopia de luz, ensaios imunohistoquímicos e adicionalmente realização de microscopia eletrônica de varredura e transmissão na pesquisa de Vale e colaboradores. Os referidos autores puderam destacar que na medida em que se desenvolvia uma placenta corioalantoide labiríntica, uma rápida proliferação de células endodérmicas parietais e membrana de Reichert ocorriam tanto na superfície da placenta principal quanto na camada de endoderma parietal que circunscrevia todo o embrião. A partir do vigésimo terceiro dia de gestação no esquilo da Mongólia e no décimo quarto dia de gestação em preás, verificou-se a ruptura da camada de endoderma parietal associada ao trofoblasto mural, membrana basal e endoderma parietal de modo a restar um endoderma visceral em aposição ao útero, cujo arranjo espacial propiciava uma maior interação entre as prováveis emissões de secreções glandulares uterinas com uma membrana endodérmica visceral extremamente suscetível ao direcionamento do aparato ora absorvido para o organismo embrionário.

Por diversas ocasiões existem falhas no desenvolvimento pleno do saco vitelino parietal, degeneração do trofoblasto mural em contato com a decídua capsular correspondente ou deficiência na estrutura trofoblástica até mesmo no momento da implantação. Nestes casos culmina-se com a ruptura da onfalopleura bilaminar e exposição do epitélio endodérmico visceral a luz uterina e a todo o seu conteúdo. Tal situação remete a condição de inversão total do saco vitelino (JOLLIE, 1968; JOLLIE, 1990).

Mediante tal processo de inversão, células endodérmicas viscerais passam a se tornarem aptas a absorver várias substâncias presentes na luz uterina, muitas delas podendo chegar ao feto por transferência seletiva e difusão simples. Como exemplo cita-se a passagem de imunoglobulinas da mãe para o feto. O epitélio vitelínico pode

constituir também uma barreira seletiva entre o compartimento uterino e fetal como forma de proporcionar a manutenção da integridade entre os dois organismos em questão, fato este já bem estabelecido em muitas pesquisas que analisam a estrutura fina dessas células (KING, 1982).

De acordo com Anderson (1959) e Jollie (1990) a inversão do saco vitelino se processa quando a decídua capsular perde porções de células estromais até serem diluídas completamente. Posteriormente, degenera-se a superfície parietal do saco vitelino e as células trofoblásticas murais. As células do endoderma visceral apresentam aspecto colunar alto e as vilosidades dessa esplancnopleura aumentam em número e tamanho.

Lambson (1966) utilizou-se de ratas Sprague-Dawley gestantes visando à rota de absorção, armazenamento e eliminação de ferritina exógena previamente administrada bem como objetivou caracterizar os principais aspectos morfofisiológicos envolvidos neste processo. Para tanto, desenvolveu análise da estrutura fina do saco vitelino por meio de técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Observou que aos dezesseis dias de gestação a organização estrutural do saco vitelino estava composta de uma monocamada de células endodérmicas parietais sustentadas por uma membrana basal de Reichert. Após o trofoblasto mural, podia ser evidenciada a decídua capsular, em seguida a luz e epitélio uterino. O epitélio endodérmico visceral encontrava-se apoiado por uma membrana basal que por sua vez era sustentado por uma fina capa fibrosa. Em seguida uma membrana basal serosa separava as estruturas citadas das células mesoteliais que faceavam o celoma extraembrionário. Após o referido período gestacional, ocorria a ruptura da decídua capsular bem como da onfalopleura bilaminar, caracterizando a inversão total do saco vitelino. Assim, o endoderma visceral tornava-se exposto ao conteúdo uterino e mostrava-se cada vez mais propício a absorção da ferritina.

No tocante aos aspectos funcionais atribuíveis ao saco vitelino, cabe ressaltar que o mesoderma extraembrionário - subjacente ao endoderma visceral -, constitui o local de origem dos vasos vitelínicos cuja principal característica situa-se no aporte nutricional direcionado ao embrião/feto bem como no referido mesênquima, evidencia-se o primeiro sítio de ilhotas sanguíneas dotadas de capacidade hematopoiética. Neste local, é evidente o desenvolvimento de eritrócitos em contínuo processo maturativo, segundo o qual a intensa produção hemoglobínica tornam as hemácias efetivas em promover o transporte

de oxigênio. Nesta membrana fetal desenvolvem-se também células linfóides e da linhagem mielóide (MOSSMAN, 1987; JOLLIE, 1968; JOLLIE, 1990).

Nesse sentido, Haar e Ackerman (1970) realizaram pesquisas de vasculogênese e eritropoiese no endoderma visceral do saco vitelino por meio da microscopia de luz e eletrônica de transmissão, utilizando-se para tal, de camundongos CBA obtidos entre sete e onze dias de gestação. Os resultados demonstraram que durante o desenvolvimento embrionário formava-se uma camada de mesoderma abaixo da membrana basal que sustentava o endoderma visceral e em determinadas áreas ocorriam proliferações de células mesodérmicas achatadas originando massas celulares denominadas cordões angioblásticos. Já a única camada de células do mesoderma voltada em direção ao celoma extraembrionário transformava-se em células mesoteliais. Consequentemente, os cordões angioblásticos encontravam-se separados do endoderma visceral por uma incompleta membrana basal e do mesotélio, por uma membrana basal serosa. Algumas células da periferia dos cordões angioblásticos proliferavam e se diferenciavam em células endoteliais produzindo a vascularização do saco vitelino. Já as células remanescentes se diferenciavam em primitivos eritroblastos, reticulócitos e hemácias.

Em relação à origem de precursores imunocíticos (linfócitos) no saco vitelino visceral, Haar (1977) desenvolveu um estudo *in vitro* cultivando 14 sacos vitelínicos provenientes de camundongos CBA/J aos nove dias de gestação. Para atingir tal objetivo, cultivou as amostras em meio mínimo essencial (MEM) suplementado com soro humano a 10% por três dias. Após esta etapa, as amostras foram removidas e fixadas em glutaraldeído a 3% acrescido de tampão fosfato 0,1 Molar (M) em pH 7,3. Em seguida, utilizou-se o tetróxido de ósmio para pós-fixação sendo realizados cortes muito finos com o auxílio de um ultramicrotomo. As amostras foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo para posterior estudo em microscópio eletrônico. Os resultados revelaram células endodérmicas viscerais dotadas de numerosas microvilosidades, vesículas de pinocitose, complexo de Golgi e mitocôndrias. O epitélio visceral separava-se do mesoderma subjacente por uma espessa membrana basal visceral. Em determinados locais do mesoderma observaram-se espaços delimitados por endotélio formando a luz dos vasos vitelínicos, cujos precursores de hemácias e linfócitos já podiam ser evidenciados. O autor desta pesquisa ainda pode concluir que linfoblastos e linfócitos

diferenciados estavam sendo originados na placenta vitelina visceral e que a presença dessas células em amostras *in vivo* era pouco frequente, devido ao fato de que nesta condição, os precursores linfocíticos podiam migrar rapidamente para o fígado e timo no organismo fetal.

Muitos pesquisadores já postularam por meio de ensaios *in vitro* e estudos da estrutura fina do endoderma visceral, mediante microscopia eletrônica de transmissão, que macromoléculas como carboidratos, lipídios e principalmente proteínas são englobadas por este epitélio em vesículas de pinocitose, seguidas da interação com organelas lisossômicas, cuja ação das enzimas hidrolíticas promoverão a digestão intracelular nas respectivas unidades básicas de cada molécula que por sua vez, poderão ser facilmente transferidas ao embrião e este se tornar apto a nova síntese das respectivas macromoléculas. Esta característica é especialmente importante quando a circulação vitelínica e a placenta corioalantoide ainda não estiverem estabelecidas, até mesmo devido ao fato do endoderma embrionário não ser capaz de captar substâncias essenciais ao desenvolvimento do embrião e, por conseguinte, no desenvolvimento inicial, o saco vitelino configura-se essencial neste processo (BECK et al., 1967; FREEMAN; LLOYD, 1983; LLOYD, 1990).

Baseando-se nessa premissa, a placenta vitelina visceral foi alvo de estudo funcional de capacidade absorptiva em ratos no dia 8,5 de desenvolvimento embrionário. Utilizou-se, para tal, dois grupos amostrais em cultivo celular, sendo o primeiro representado pelo embrião e saco vitelino separados no meio, em decorrência de dissecação prévia; e o segundo, constituído pelo saco gestacional em que o embrião e endoderma visceral apresentavam relações anatômicas íntegras. Nos dois grupos acrescentou-se aminoácidos livres e marcados com hidrogênio radioativo trítio (leucina-[³H] e metionina-[³H]) além destes mesmos aminoácidos radioativos ligados a proteínas (leucina-[³H] ligada à proteína e metionina-[³H] ligada à proteína). Após esta etapa, seguiu-se de medições espectrais mediante cálculo prévio do clearance destes compostos em frações solúveis e insolúveis dos folhetos embrionários bem como no endoderma da placenta vitelina. Os resultados revelaram que no primeiro grupo, houve incorporação pelo embrião e endoderma visceral apenas dos aminoácidos marcados com trítio que se encontravam na forma livre. No segundo grupo, emissões intensas de radiação foram

observadas, no botão gestacional, dos aminoácidos livres e um menor percentual incorporado foi atribuído as proteínas que continham estes mesmos aminoácidos marcados, fato este que levou ao autor do trabalho a corroborar que o endoderma visceral atuava de forma fundamental na absorção e transferência embrionária dos aminoácidos livres. No tocante as proteínas, estas eram digeridas pelo epitélio visceral e transferidas ao organismo embrionário, onde neste último ocorriam reações de reconstrução proteica contendo os respectivos aminoácidos radioativos (BECKMAN et al., 1996).

Em experimentos realizados por Chan e Wonh (1978), demonstrou-se um mecanismo de transporte ativo de sódio situado nas células endodérmicas viscerais em embriões de ratos Wistar do dia 17 a 21 de gestação. Ensaio *in vitro* utilizando câmaras especialmente construídas para medidas de correntes de circuito curtas e diferença de potencial transepitelial, tornaram possíveis os rastreamentos do fluxo de sódio bidirecional, favorecido no sentido de mãe para feto. Neste estudo, afirmou-se ainda que o transporte ativo de sódio através do epitélio visceral contribuiu para a formação do líquido amniótico. Este importante trabalho ratificou as informações produzidas por King (1982) quando este sinaliza que tanto o endoderma parietal quanto o visceral podem conferir uma barreira seletiva entre os compartimentos uterino e fetal por meio da manutenção de gradientes iônicos e osmóticos.

O intercâmbio de imunoglobulinas da classe IgG do sentido materno para o fetal ocorre via placenta principal em primatas, fato este diferente do que se verifica em roedores, onde, neste caso, tal transferência de imunidade passiva se dá por meio da placenta vitelina visceral (PENTŠUK; VAN DER LAAN, 2009). Existe ainda, indícios consistentes de que, no endoderma visceral, ocorre a síntese de colesterol que pode se constituir na molécula base para a produção de hormônios esteroides, verificando-se também, desenvolvimentos de membranas citoplasmáticas (WOOLLETT, 2005) além da demonstração que em ratos, o saco vitelino visceral sintetiza proteínas séricas tais como albumina e alfafetoproteína (NAHON et al., 1987).

De fato, as diversas características funcionais promovidas pelo saco vitelino conferem especial atenção a este anexo fetal, seja com relação ao aspecto placentário atribuível ou até mesmo como fonte de células totipotentes hematopoiéticas cujos empregos em terapias gênicas e ensaios citogenéticos amplificam as possibilidades de

pesquisas no tocante ao referido endoderma (JOLLIE, 1968; HAAR, 1977; KING, 1982; NAHON et al., 1987; JOLLIE, 1990; WOOLLETT, 2005; FREYER; RENFREE, 2009; PENTŠUK; VAN DER LAAN, 2009).

Desta forma, antes das posteriores exposições referentes a placentação corioalantoide bem como ao desenvolvimento embrionário, torna-se importante descrever os conhecimentos já obtidos com relação ao presente tópico conforme se observa nas figuras cinco e seis a seguir:

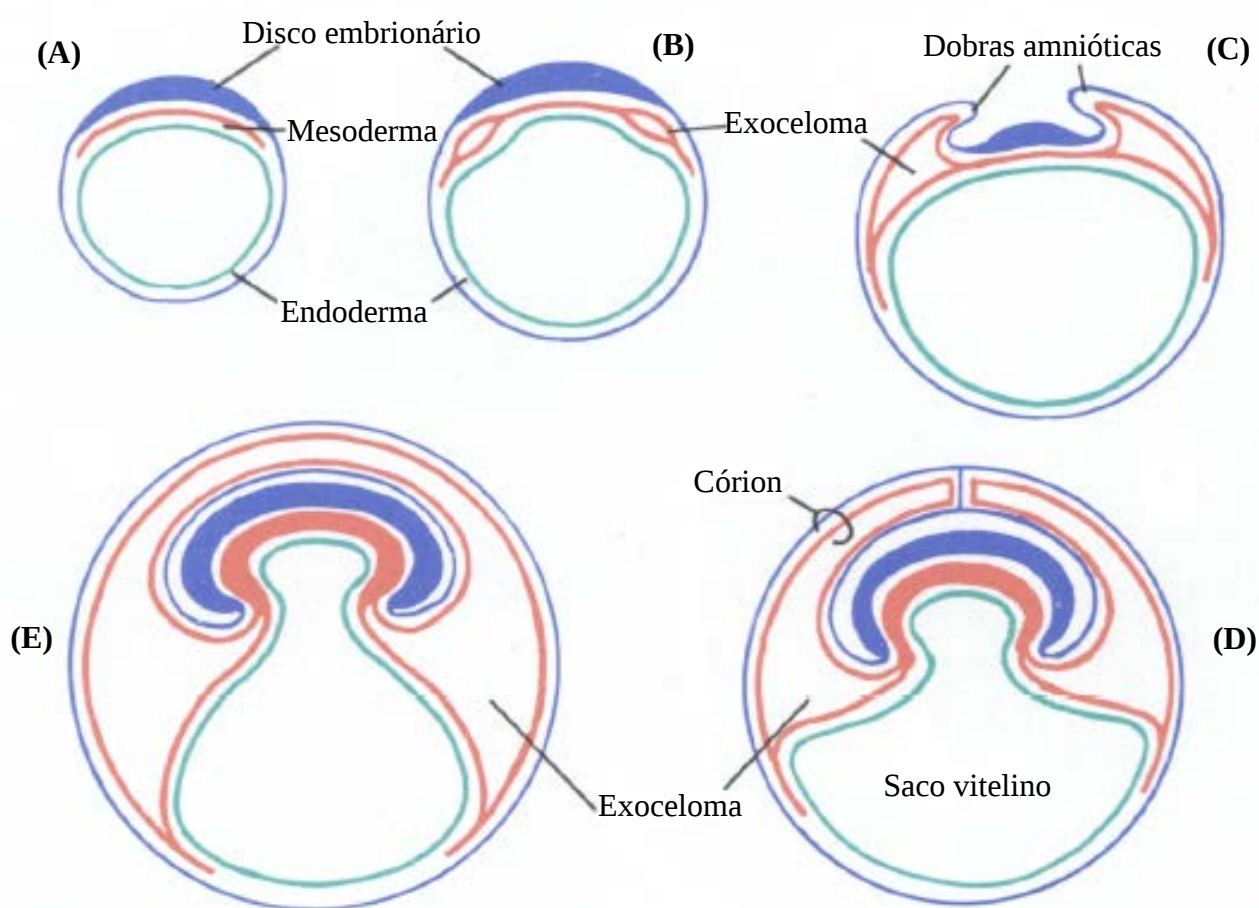


Figura 5- Representação esquemática do desenvolvimento das camadas germinativas, as relações com o embrião e formação de cavidades como ocorre em porcos na gestação inicial. Em (A) observa-se a localização do embrioblasto e início do surgimento do mesoderma. Em (B) evidencia-se a bifurcação mesodérmica que culminará com o celoma extraembrionário (exoceloma). Em (C) verifica-se o aparecimento de dobras amnióticas em processo de cavitação. Em (D) e (E) nota-se a presença do córion e o exoceloma, este último constituindo uma grande cavidade. Figura modificada de Perry (1981).

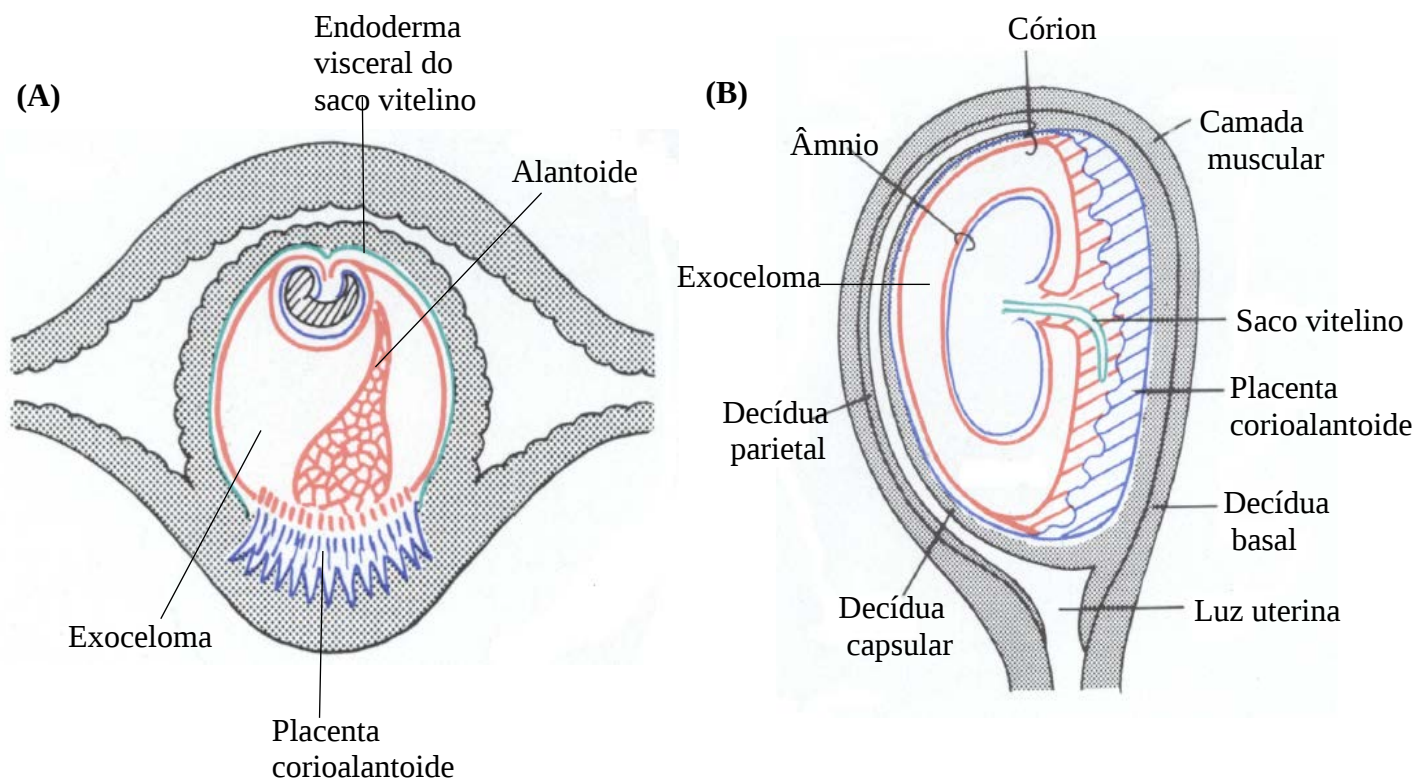


Figura 6- Relações espaciais anatômicas evidenciadas no modelo gestacional do cobaio (A) e humano (B) em gestações nas fases intermediárias. Em A, observa-se, em verde, o endoderma visceral do saco vitelino envolvendo toda a estrutura do botão gestacional numa situação verificada após à inversão do saco vitelino. Verificar ainda as localizações espaciais do embrião, placenta principal (corioalantoide), alantoide e grande cavidade exocelomática. Em B, verificam-se as disposições das decíduas uterinas, âmnio, córion, placenta, exoceloma e um saco vitelino cujo tamanho é bastante reduzido. Figura modificada de Perry (1981).

3.4.2 Placentação corioalantoide e desenvolvimento embrionário

O surgimento da alantoide é fator preponderante para o estabelecimento da placenta principal, segundo o qual, evidencia-se a formação de expansões mesodérmicas deslocando-se de regiões posteriores do embrião, as quais sofrerão processos de fusão com o córion na região específica do cone ectoplacentario. De modo igualmente importante, nota-se que o principal tipo celular do órgão placentário consiste naquelas da linhagem trofoblástica cujos aspectos estruturais e funcionais garantem as aproximações necessárias entre as vascularizações maternas e fetais (COPP, 1979; CROSS, 2000; ROSSANT; CROSS, 2001).

Essa característica anteriormente citada, em humanos, relaciona-se com a invasão trofoblástica, a qual é acompanhada por uma reação decidual concomitante, gerando-se ainda uma diferenciação espacial e temporal do trofoectoderma que culminará com a origem de células progenitoras citotrofoblásticas capazes de seguirem duas vias de diferenciação: a primeira produzindo trofoblasto viloso e a segunda, extraviloso. A via trofoblástica vilosa se estabelece mediante progenitores citotrofoblásticos capazes de se fusionarem com células do mesmo tipo, sendo tais agregados incapazes de sofrerem citocinese, o que resulta numa massa celular multinucleada ou sinciciotrofoblasto. Este último desenvolve grande capacidade no tocante a realização de trocas gasosas, nutricionais e de eletrólitos na interface materno fetal além de estarem envolvidos na síntese da gonadotrofina coriônica humana (hcG) e hormônio lactogênico placentário (hPL), promovendo-se, portanto, a manutenção da gestação. Já no caso do destino das células trofoblásticas extravilosas, estas podem originar duas subpopulações: as células trofoblásticas extravilosas intersticiais cuja capacidade de invasão na decídua uterina é potencializada e as células trofoblásticas extravilosas endovasculares que encontram-se intimamente envolvidas nos processos de remodelagem das artérias espirais maternas, fato este que pode contribuir para a formação dos canais de sangue materno (KAR et al., 2007; NAKAMURA, 2009; FU et al., 2013).

Em roedores, processos de expansão do cone ectoplacentario fazem com que alguns grupos celulares sofram mecanismos de endoreduplicação originando, por sua vez, células trofoblásticas gigantes primárias, as quais facilitam a invasão uterina pelo

embrião. Após esta etapa, novas diferenciações do ectoderma de Trägger possibilitam o surgimento de camadas celulares trofoblásticas cujo aspecto espongiiforme denota a nomenclatura de espongiotrofoblasto (ou trofoespongio) além de células gigantes secundárias que assim como as primárias, participam da manutenção da junção placentária com a decídua. Já as células do espongiotrofoblasto, atuam em numerosas funções de síntese de glicoproteínas específicas da gestação, secreções de hormônios relacionados à prolactina, estocagem de glicogênio e produção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF2) (YAMAMOTO et al., 1998; SCHORPP-KISTNER et al., 1999; SCHREIBER et al., 2000; BARAK et al., 2007).

No decorrer do desenvolvimento e após a fusão da alantoide com o córion, alterações estruturais destes anexos resultam em dobramentos do córion como forma de se produzir uma área específica em que os vasos sanguíneos fetais possam se desenvolver e encontrarem-se próximos ao sangue materno. Tal condição culminará com o surgimento de ramificações e bifurcações do trofoblasto associado aos vasos fetais de modo a gerar uma complexa área cuja configuração espacial denota o aspecto de labirinto. Assim, já existem pesquisas moleculares que ratificam fatores sinalizadores e indutores da formação do labirinto placentário – produzidos pelo endotélio fetal –, dentre eles podendo-se citar HGF, EGF, LIF, PDGFB e WNT-2 (SCHMIDT et al., 1995; UEHARA et al., 1995; THREADGILL et al., 1995; SIBILIA; WARE et al., 1995; BARAK et al., 2007). Esta importante região de troca materno fetal possui muitas células sinciotrofoblásticas que envolvem os vasos fetais e invadem os vasos sanguíneos maternos da decídua uterina associada, destruindo a referida rede vascular materna, cuja consequência disto, corrobora com a formação dos canais de sangue materno ou lacunas maternas.

Para tanto, o labirinto desenvolve-se, suportado estruturalmente, pelo espongiotrofoblasto, onde, este último, consiste em camadas de células trofoblásticas esponjosas não sinciciais e situadas entre o labirinto e as células trofoblásticas gigantes externas. Além disso, os vasos maternos passam por meio do espongiotrofoblasto via grande seio arterial central no qual as células endoteliais destes vasos sofrem erosões pelas células trofoblásticas espongiiformes e são substituídas por estas últimas, fato este capaz de contribuir para que o sangue materno flua entre pequenos espaços tortuosos do

labirinto e entre em contato direto com as vilosidades do sinciciotrofoblasto e, desta forma, aproximações entre os sangues dos dois organismos envolvidos maximizem as possibilidades de trocas gasosas e nutricionais (ROSSANT; CROSS, 2001; BARAK et al., 2007).

Esse aspecto funcional altamente vinculado à placenta principal estabeleceu estudos anatômicos com o intuito de se verificar as relações das principais regiões onde coexistem as interações materno fetais (CROSS et al., 1994; BURTON et al., 2001). Seguindo-se esta linha de raciocínio, Georgiades et al. (2002), em artigo de revisão, desenvolveram estudos comparativos entre a placentação humana e em camundongo, principalmente destacando-se os aspectos primordiais em que ambas detêm similaridades. Para tanto, os autores enfatizam, nos dois objetos de estudo, que existem três regiões anatomicamente e fisiologicamente distintas que se tornam aparentes, quando o plano de secção utilizado para o estudo é perpendicular à superfície fetal da placenta corioalantoide. A primeira região em questão denomina-se labirinto em camundongo e placenta fetal em humanos, segundo as quais existem canais de sangue materno – estes revestidos por células trofoblásticas sinciciais – e vasos sanguíneos fetais. No âmbito macroscópico, ambas são placentas discoidais e apresentam um cordão umbilical constituído por veias e artérias que saem do organismo fetal e se conectam na superfície fetal da placenta principal.

A segunda região que faceia a borda materna da placenta principal é referida como placa basal (ou sitio de implantação) e zona juncional (zona basal, trofoespongio ou zona espongiotrofoblástica) em humanos e camundongos, respectivamente. Constituem locais isentos de vasos fetais, porém encontram-se atravessadas por canais de sangue materno nos quais geram-se fluxos de entrada e saída deste sangue para o labirinto (BROSENS et al., 1967; BULMER et al., 1988; GEORGIADES et al., 2002). É importante destacar que após o revestimento desta segunda região tem-se uma camada de células trofoblásticas gigantes secundárias, não se encontrando uma zona análoga em humanos (MUNTENER; HSU, 1977; CROSS, 2000).

Já a terceira região refere-se aos tecidos uterinos que estão em contato direto com as células trofoblásticas gigantes em camundongos e na placa basal em humanos. Tais tecidos maternos são conhecidos como decídua basal, sendo, em humanos, constituída

por células decíduais e camadas miometriais subjacentes (base ou suporte placentário), fato este que não ocorre em camundongos, pois a invasão trofoblástica nestes últimos não chega a atingir camadas musculares (BROSENS et al., 1967; GEORGIADES et al., 2002).

Desse modo, para a adequada compreensão das relações anatômicas supracitadas, no tocante as regiões específicas da placenta corioalantoídiana, cujo intuito visa à posterior correlação com os resultados obtidos em fêmeas de preás, torna-se importante a apresentação das figuras sete e oito.

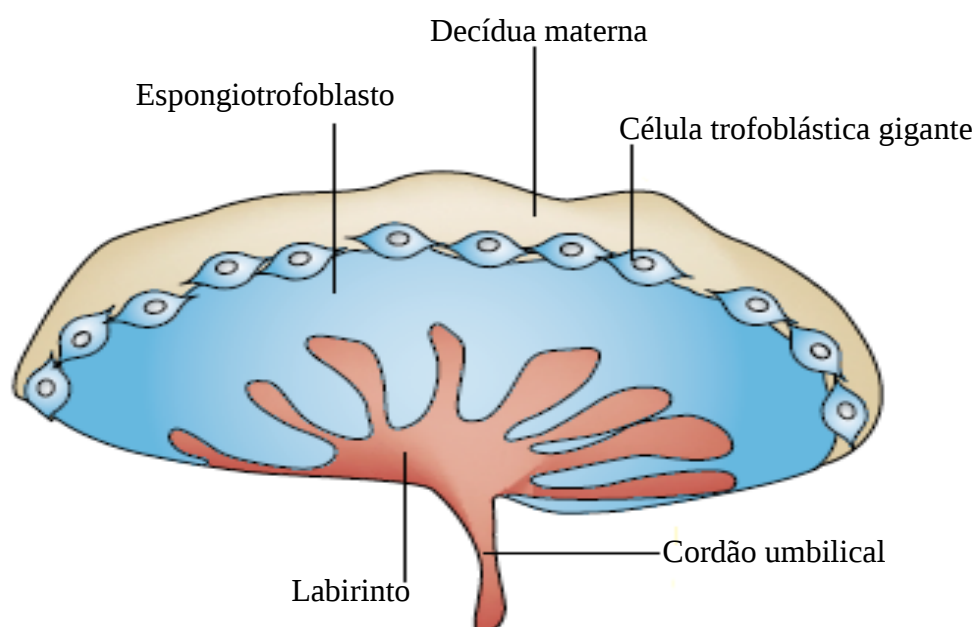


Figura 7- Representação da placenta corioalantoide em camundongos no dia 12.5 de desenvolvimento embrionário. Notar o formato discoidal desta placenta e as regiões em que se desenvolvem o espongiotrofoblasto, células trofoblásticas gigantes e labirinto. Figura modificada de Rossant e Cross (2001).

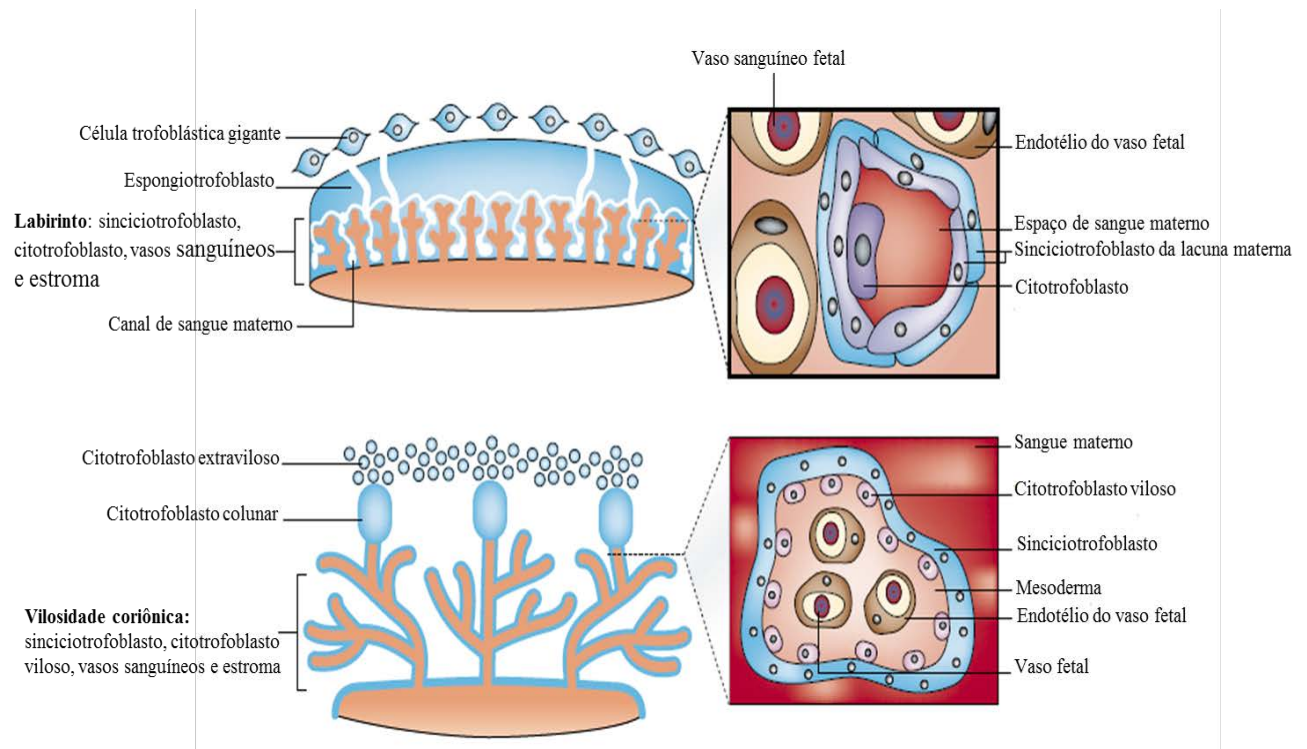


Figura 8- Esquema representativo das interações materno fetais nas regiões do labirinto e vilosidades coriônicas em camundongos e humanos respectivamente. Verificar os tipos celulares envolvidos em cada região citada, sendo a cor azul representativa das células derivadas do trofoblasto e a cor laranja, indicando tecidos derivados do mesoderma (vasos sanguíneos e estroma). Em camundongo, notar a grande proximidade em que as lacunas maternas encontram-se dos vasos sanguíneos fetais, ao passo que, em humanos, a estrutura trofoblástica e mesênquima subjacente encontram-se imersos em sangue materno. Figura modificada de Rossant e Cross (2001).

Em roedores a placentação é dita hemocorial, pois a barreira que separa o sangue fetal do materno consiste em endotélio capilar fetal, membrana basal e uma ou mais camadas de trofoblasto. Disso resulta, classificações quanto as camadas trofoblásticas envolvidas como é o caso do cobaio, que possui uma única camada de sinciotrofoblasto (hemocorial), fato este divergente das três camadas de sinciotrofoblasto que se verificam em ratos e camundongos (hemotricorial) (MOSSMAN, 1987; ENDERS, 1965; ENDERS et al., 1998).

Nesse contexto, as variações morfológicas das áreas interhemáticas tornaram-se alvo de importante revisão literária promovida por Enders et al. (1998), onde no caso da condição hemocorial, os autores enfatizam que o trofoblasto encontra-se em contato direto com o sangue materno. Ressaltam ainda que, em se tratando das placentas hemotricoriais – como evidenciado no roedor *Lemmus sp* –, geralmente se verifica descontinuidade da camada sinciciotrofoblástica mais externa (T1), sendo que esta encontra-se em contato direto com o canal de sangue materno e pode associar-se com células trofoblásticas gigantes por meio de junções do tipo GAP. A camada sincicial intermediária (T2) possui muitos receptores de superfície, vesículas endocíticas e numerosos desmossomos, estes últimos responsáveis pela manutenção da disposição trilaminar de sinciciotrofoblasto. Finalmente a camada mais interna (T3) resulta naquela que mantém contato com o vaso sanguíneo fetal e configura-se, portanto, uma barreira seletiva para macromoléculas (KING; HASTINGS, 1977; SOARES et al., 1996).

Enders et al. (1999) demonstraram as referidas regiões de interação materno fetal do labirinto placentário em camundongos, ratos e no porquinho da Índia por meio da microscopia de luz. Nos dois primeiros, verificaram que as camadas T3 e T2 eram constituídas por sinciciotrofoblasto e encontravam-se próximas dos vasos fetais enquanto a T1 fora representada por células do citotrofoblasto que, ao longo da gestação, evoluíram para células trofoblásticas gigantes, cuja camada descontínua conferia uma barreira funcional para o sangue materno. Já com relação ao porquinho da Índia, os autores puderam caracterizar a placenta principal como sendo dotada de lóbulos os quais continham o labirinto e neste último, uma única camada sinciciotrofoblástica estava imersa em sangue materno, ou seja, separava os vasos fetais das lacunas maternas caracterizando uma placentação hemomonocorial.

Estudos de placentação ainda mais específicos foram desenvolvidos por Oliveira et al. (2008) utilizando-se de preás fêmeas como unidade experimental mediante análises macroscópicas, técnicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura e transmissão. Nesta pesquisa, os autores estabeleceram, na análise macroscópica, a presença de uma placenta corioalantoide situada no lado antimesometrial do útero. Na fase inicial da gestação, a placenta consistiu em espongiotrofoblasto destituído de vasos sanguíneos e posteriormente, observou-se uma estrutura discoidal com bordas decíduais definidas

apresentando espongiotrofoblasto, labirinto e subplacenta. Na gestação avançada à placenta se mostrou altamente lobulada, vilosa com o labirinto sendo a área mais proeminente das trocas materno-fetais. Nesse momento, o espongiotrofoblasto e a subplacenta estavam reduzidos de tamanho. Padrões de crescimento celular revelaram inicialmente camadas de citotrofoblasto com nítidos contornos celulares apoiados no mesênquima fetal. A essas células, seguiu-se o sinciciotrofoblasto direcionado para os canais de sangue materno. No início da gestação, observou-se confluência entre a subplacenta e a placenta corioalantoide, característica modificada com o subsequente desenvolvimento embrionário no qual a subplacenta constituía um distinto órgão, porém reduzida bastante em extensão concomitante ao final da gestação.

As características da subplacenta corroboram que seja uma zona especializada de córion entre o disco placentário e a decídua basal, ou seja, sua origem remota ao ectoderma extraembrionário. Mediante tal localização, esta estrutura ocupa o assoalho da escavação central que por sua vez, constitui uma região de aglomerados teciduais de mesênquima (mesoderma extraembrionário) situados aproximadamente no centro da placenta. O desenvolvimento da subplacenta torna-se possível devido a dobramentos lamelares de citotrofoblastos na escavação central que posteriormente geram processos proliferativos e expansivos de sinciciotrofoblastos para as laterais da escavação bem como para a superfície decidual. Além disso, postula-se que a subplacenta apresente funções de liberação de substâncias gonadotróficas, seja uma fonte de material sincicial trofoblástico para uma invasão uterina eficaz bem como represente um importante local para absorção de proteínas (MOSSMAN, 1937; DAVIES et al., 1961; CARTER et al., 2006).

Dessa forma, pela referida importância supracitada da subplacenta, Davies et al. (1961) acompanharam o desenvolvimento desta estrutura, do dia 15 até os 45 dias de gestação em cobaias, utilizando-se para tal, de técnicas de histologia convencional além da coloração com o ácido periódico de Shiff (PAS). Inicialmente, os autores do trabalho verificaram que entre a subplacenta e placenta principal encontra-se um plano tecidual de mesênquima capaz de produzir vasos sanguíneos fetais para a região de citotrofoblasto lamelar da subplacenta, não sendo encontradas lacunas maternas nesses locais. A placenta corioalantoide apresentou-se constituída por dois tipos de sinciciotrofoblastos, sendo que

um deles possuía muitas irregularidades (sincício grosseiro) e encontravam-se apenas lacunas maternas e outro tipo, mais organizado (sincício fino), continha canais de sangue materno e vasos fetais. No décimo quinto dia de gestação, observaram-se, na subplacenta, camadas citotrofoblásticas, altamente basofílicas e contendo numerosas figuras de mitose, revestindo a escavação central em forma de V. Externamente ao citotrofoblasto, evidenciou-se espessa camada de sinciciotrofoblasto repleto de vacuolização citoplasmática e numerosas granulações ricas em glicogênio conforme foi detectado pela reação ao PAS. No vigésimo quinto dia gestacional até o quadragésimo quinto foram observados crescimento progressivo e aumento da espessura da subplacenta, a qual demonstrou ainda predomínio de sinciciotrofoblasto contendo abundância glicogênica, porém resultando negativo para lipídeos e atividade da fosfatase alcalina por meio das colorações do Sudan Black e aquela que evidencia a atividade da referida enzima mediante uso do substrato glicerolfosfato, respectivamente. Além disso, os autores desta pesquisa ainda demonstraram importantes relações anatômicas conforme se observa na figura a seguir:

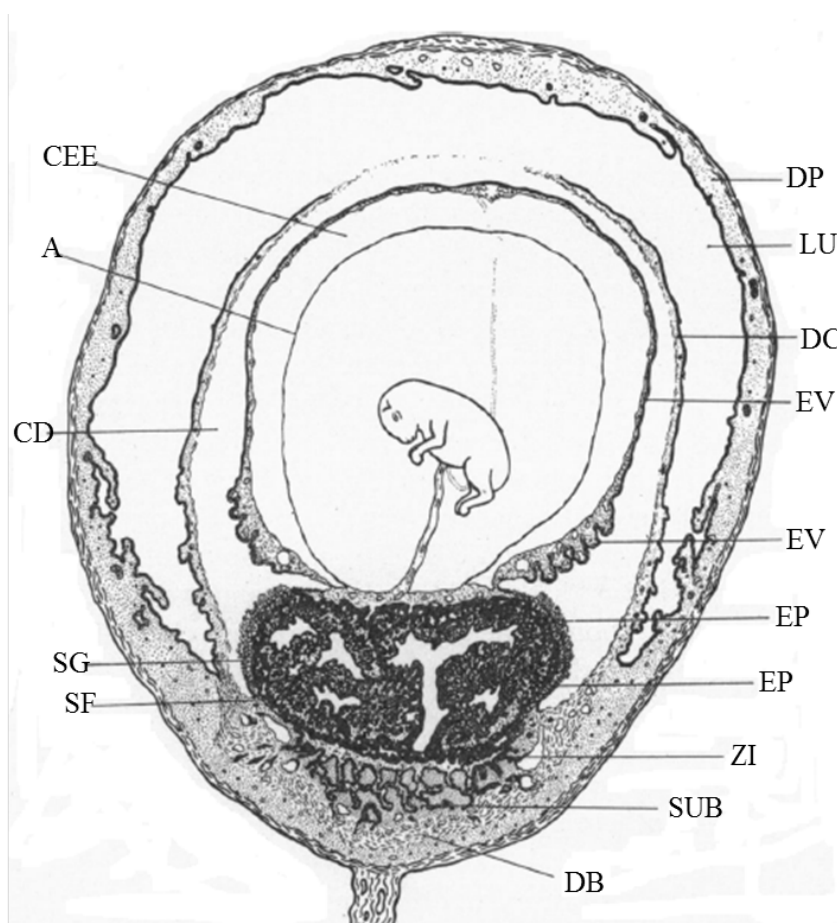


Figura 9- Diagrama de uma secção do saco gestacional no cobaio aos 35 dias de gestação. Observar as localizações da subplacenta (SUB), celoma extraembrionário (CEE), âmnio (A), cavidade decidual (CD), sincícios grosseiros (SG) e finos (SF), decídua basal (DB), zona intermediária (ZI), endoderma parietal (EP) e visceral (EV) do saco vitelino, decídua capsular (DC), luz do útero (LU) e decídua parietal (DP). Figura modificada de Davies et al. (1961).

A organização histológica da placenta principal do *Myocastor coypus* foi descrita por Hillemann e Gaynor (1961) por meio da microscopia de luz, análise macroscópica e ensaios imunohistoquímicos. Nesta pesquisa, foi verificado que a área do disco placentário que se irradia no local da inserção do cordão umbilical encontra-se recoberta por âmnio, sendo o referido cordão composto por uma veia e uma artéria vitelínicas além de uma veia e uma artéria alantoidianas. A placenta corioalantoide apresentou-se

discoideal, extremamente lobulada e com uma extensa área representada pelo labirinto. Este situava-se nas regiões lobulares as quais separavam-se umas das outras por estreitas regiões de interlóbulo. Seguindo-se de uma análise mais apurada, os autores desse artigo classificaram cada lóbulo placentário como sendo organizado em três regiões ou zonas: uma mais externa constituída por espongiotrofoblasto, uma zona intermediária - representada pelo labirinto - e uma central. Esta última era composta por extensa e ramificada rede integrada de artérias tributárias maternas e veias fetais. A zona labiríntica possuía numerosos e delgados canais vasculares que se estenderiam para as demais zonas. Apresentavam ainda formações sinciotrofoblásticas arranjadas de forma bastante complexa demonstrando aspecto de tubos trofoblastos tortuosos integrados com extensa rede vascular. Finalmente a zona externa espongiotrofoblástica era composta de ectoderma coriônico sincicial residual por onde passavam ramos dos vasos arteriais umbilicais, cuja redução a capilares migrariam para a região do labirinto. O sangue materno era coletado na região espongiotrofoblástica e devolvido para as veias maternas.

Essas pesquisas citadas ratificam a importância de se conhecer como se organizam e interagem as membranas fetais, seus aspectos funcionais e pequenas diferenças anatômicas que possam ocorrer em animais da ordem Rodentia. Tais características são reforçadas por Mess (2003) que faz questão de enfatizar as transformações evolucionárias da placenta corioalantoide revelando relações intra e supraordinárias de vários roedores. Por esse motivo, muitas espécies aproximam-se, em similaridade, ao modelo gestacional humano enquanto outras, afastam-se. Como exemplo, pode-se reiterar que a placenta principal de roedores, na grande maioria das espécies, é hemocorial, no entanto condições endoteliocoriais podem ser vistas em pequeno número de espécies da ordem em questão. Nesta última condição, ocorre a persistência do endotélio das artérias maternas na região invadida pelas células sinciciais trofoblásticas. Em placentas hemocoriais, a região em que se verifica vasos sanguíneos do embrião e lacunas maternas é chamada zona íntima ou labirinto, contrastando com aquelas áreas isentas de vasos embrionários que por sua vez é denominada ectoplacenta, espongiotrofoblasto, trofoblasto basal ou pré-placental.

A placenta corioalantoide do *Petromus typicus* torna-se levemente lobulada a partir de estágios intermediários da gestação, cujo labirinto possui constante crescimento, desenvolvimento e é envolvido pela ectoplacenta. O fluxo sanguíneo materno é radial

dirigindo-se do labirinto para a ectoplacenta, onde esta última é confluenta com veias maternas na superfície externa da placenta. Em estágios avançados da gestação, os canais de sangue materno da zona íntima atingem 50 micrômetros de diâmetro e dois milímetros de comprimento. Adjacentes a estes canais, vasos capilares fetais caracterizam-se pela presença de endotélio e membrana basal associada. Os dois sistemas sanguíneos separam-se por fina camada de sinciciotrofoblasto (condição hemomonocorial) e estas células possuem numerosas microvilosidades direcionadas para o sangue materno. Já para o *Octodon degus*, verifica-se, na gestação inicial, uma região labiríntica situada no centro da placenta, sendo aquela parcialmente envolvida pela ectoplacenta. Nesta importante zona íntima, capilares fetais interconectados mostram-se extremamente próximos das lacunas maternas, as quais demonstram muitos processos de anastomose. Foram observados ainda condição hemomonocorial, presença de vasos maternos orientados para a superfície externa do órgão placentário e que o endotélio dos capilares fetais não eram fenestrados. Com relação à subplacenta, esta sofria um mecanismo de involução que fora detectado pelo seu desaparecimento ao final da gestação em *Petromus typicus*, divergindo do que ocorrera no *Octodon degus* em que esta estrutura mantinha o aspecto de distinto órgão ao longo de toda a gestação (MESS, 2001; MESS, 2003).

King e Mossman (1974) desenvolveram estudos de placentação em duas espécies de roedores: *Jaculus jaculus* e *Zapus hudsonius*. Para tanto, fizeram-se valer de técnicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura utilizando-se sacos gestacionais em período equivalente à metade da gestação. De posse dos resultados, os autores puderam destacar que nas referidas espécies o disco embrionário apresentou disposição mesometrial, a amniogênese foi estabelecida pela formação de dobramentos que resultaram na formação de uma cavidade peculiar denominada epaminiótica e a inversão do saco vitelino, fenômeno este caracterizado pela degeneração da onfaloopleura bilaminar e a consequente aproximação do endoderma visceral em relação aos tecidos uterinos, foi verificada tardiamente, pois ocorreu no início da fase fetal. Interessantemente, o fato que mais chamou a atenção foi o processo de formação da placenta corioalantoide, segundo o qual iniciou-se pelo desenvolvimento de células citotrofoblásticas seguidas pela formação do sincício equivalente. No entanto, estas camadas rapidamente involuíam, deixando de estarem presentes na gestação intermediária. Neste caso, células gigantes trofoblásticas

migravam para o mesoderma alantoidiano para formar canais de sangue materno no labirinto placentário. Em *Jaculus jaculus* as complexas vilosidades do saco vitelino associadas aos canais arteriais que se desenvolviam faziam com que o sangue materno fosse direcionado para a região do labirinto. Em *Zapus hudsonius* a interação materno-fetal foi classificada como hemomonocorial, onde a única camada que separava os sangues dos dois organismos estava representada por células trofoblásticas gigantes.

Assim, conforme se pode evidenciar, o órgão placentário possibilita o sucesso gestacional por estabelecer condições de manutenção, proteção e crescimento do feto. As transferências nutricionais e trocas de gases respiratórios, de resíduos metabólicos e íons bem como o estímulo ao desenvolvimento de imunidade humoral, que se estabelece no organismo em desenvolvimento, ratificam a extrema importância da placenta corioalantoide (MOSSMAN, 1987; BARAK et al., 2007; ENDERS, 2009; DAMIANO, 2010). Há ainda a proteção fetal frente ao sistema imune materno por mecanismos de tolerância imunológica que envolvem ausência na expressão de moléculas do complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe II (MHC II) por parte das células trofoblásticas as quais se limitam a sintetizarem moléculas incomuns do MHC Classe I, acarretando na expressão de moléculas do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) não típico (CROSS et al., 1994). Como resultado, já foi verificado que células do citotrofoblasto humano expressavam em sua membrana citoplasmática o Antígeno Leucocitário Humano tipo G (HLA-G) que por sua vez, protegia esta célula contra a ação daquelas denominadas “Natural Killer” (NK) produzidas pelo estroma endometrial (BURT et al., 1991). Associado a isto, citocinas produzidas pelo útero são capazes de favorecer o desenvolvimento trofoblástico, como é o caso do Fator Estimulador de Colônia 1 (CSF-1) (PAMPFER et al., 1991).

A transferência de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, além da eliminação de catabólitos fetais no sentido inverso são possíveis graças ao desenvolvimento e expansão das numerosas vilosidades do sinciciotrofoblasto principalmente nas áreas do labirinto. O feto, por sua vez, necessita obter água e outras substâncias hidrofílicas para estabelecer os seus mecanismos funcionais fisiológicos bem como manter a integridade homeostática (DAMIANO, 2010). Para tanto, moléculas proteicas denominadas aquaporinas (AQP) formam canais hidrofílicos transmembrânicos nas células cito e sinciciotrofoblásticas de

modo a favorecer esse processo (EDWARDS et al., 1993; STULC et al., 1997). Assim, as aquaporinas 0, 1, 2, 4, 5, 6 e 8 por terem permeabilidade seletiva a água são denominadas de “clássicas”, porém as AQP 6 e AQP 8 apresentam também permeabilidade a ânions e ureia respectivamente (AGRE et al., 1998; YASUI et al., 1999; CARBREY; AGRE, 2009). Os tipos classificáveis como “aquaglicerolporinas” constituem as AQP 3, 7, 9 e 10, as quais mostram importante permeabilidade a água, ureia e glicerol, sendo o tipo 9 também envolvido na captação de soluções neutras tais como monocarboxilatos, purinas e pirimidinas (ISHIBASHI et al., 1998; TSUKAGUCHI et al., 1998).

Esse equilíbrio configura-se vital para que haja uma associação adequada entre os dois organismos ao longo da gestação, cuja versatilidade placentária ainda se encontra na dependência de genes específicos e proteínas relacionáveis. Neste sentido, qualquer disfunção no referido mecanismo da interação materno fetal bem como na estrutura da placenta poderá ocasionar distúrbios como abortos espontâneos, restrições do crescimento fetal e pré-eclâmpsia (ORNOY et al., 1981; ZHOU et al., 1993; KREBS et al., 1996). Diante disto, sabe-se que genes como PPAR γ e PPAR δ são fundamentais para o desenvolvimento da placenta e tais segmentos de ácido nucléico encontram-se ligados a importantes fatores transcricionais, onde devido a essa associação, regiões ligantes de outros genes alvo são ativadas gerando por sua vez, estímulos de numerosos fatores de transcrição auxiliares como numa clássica reação em cadeia. Tudo isto culminará com a efetividade da invasão trofoblástica, fusão entre o córion e alantoide bem como o estabelecimento funcional da placenta principal (BARAK et al., 2007).

Os referidos eventos supracitados favorecem o desenvolvimento embrionário, onde, em decorrência da formação da linha primitiva, o disco embrionário bilaminar passa a apresentar uma disposição trilaminar. Isso ocorre porque células epiblasticas da linha primitiva dão origem a células mesenquimatosas que irão constituir o mesoderma intra-embrionário, o qual se expandirá até a consequente união com o mesoderma extra-embrionário que recobre o córion, âmnio e saco vitelino (MOORE; PERSAUD, 2004). Este endoderma visceral, quando situado em posição distal à placenta principal, pode ser referendado como saco vitelino anterior, cuja expansão assimétrica em direção aos tecidos uterinos define o lado anterior do embrião. Tal cinética morfofisiológica resulta da produção de genes pelo saco vitelino, como aqueles relacionáveis a superfamília do

TGF β bem como de genes *Cer-I*, *Lefty 1* e *Dkk 1*. Estes três últimos produzem efeitos inibitórios em outros genes produzidos na linha primitiva (*Nodal* e *Wnt 3*) (LU et al., 2001), de modo que, o efeito global gerado será justamente o desenvolvimento da linha primitiva restrita ao plano mediano do disco embrionário e que a adição de células epiblasticas, nessa linha, de modo a espessá-la, ocorrerá na extremidade caudal embrionária (KIMURA et al., 2000; PEREA-GOMEZ et al., 2001; PEREA-GOMEZ et al., 2004).

Em relação a esse processo, células mesenquimais oriundas do nó primitivo (espessamento de células epiblasticas na extremidade cefálica da linha primitiva) migram no sentido cefálico e formam o processo notocordal, cujo contínuo desenvolvimento alcança uma pequena área de células endodérmicas colunares que, por sua vez, é reconhecida como placa precordal. Assim, na região específica em que tais estruturas se formam, as respectivas camadas germinativas (ectoderma e endoderma) sofrem fusão, o que resulta no estabelecimento da membrana bucofaríngea, ou seja, futuro local da cavidade oral. Além disso, células mesenquimais da linha primitiva migram – no sentido cefálico – lateralmente ao processo notocordal bem como envolvem a placa precordal, sendo esta última estrutura (acrescida do referido mesoderma) responsável pelo surgimento da área cardiogênica, fato este que culmina com o estabelecimento dos primórdios do coração. A membrana cloacal (futuro ânus) que se desenvolve caudalmente em relação a linha primitiva, constitui uma estrutura circular e bilaminar, pois possui ectoderma e endoderma fundidos de modo a não favorecer a interposição mesodérmica entre eles (COOK, 1988).

Por outro lado, o processo notocordal (formado por células mesenquimais) desenvolve uma luz (canal notocordal) e prolonga-se na direção da placa precordal, sendo este mecanismo dotado de contínuas transformações em que se formam aberturas no assoalho do canal notocordal e, posteriormente, tais espaços abertos sofrem coalescência para a origem da placa notocordal que a princípio se configura numa lâmina celular achatada contendo um sulco inicial. Disso resulta o consequente processo de dobramento da referida placa, cuja consequência será a formação de uma estrutura mesodérmica tubular ou bastonetiforme reconhecida como notocorda, esta última envolvida como

estrutura base para a formação dos ossos do crânio e da coluna vertebral (esqueleto axial) (ROBB; TAM, 2004).

Uma vez formada, a notocorda possui notória capacidade de induzir diferenciações celulares na camada ectodérmica acima dela e por este processo, começa a ser formada células epiteliais bastante especializadas que proliferam formando uma placa alongada, reconhecida como placa neural (de natureza neuroectodérmica). Desta forma, na medida em que a notocorda se alonga, as células ectodérmicas da placa neural acompanham o crescimento daquela estrutura, porém se estabelecendo como uma placa achatada a qual se estende até a membrana orofaríngea. Subsequentemente, ocorrem invaginações celulares de modo a favorecer o surgimento do sulco neural que se estabelece no plano mediano ao longo de todo o desenvolvimento longitudinal da referida placa. Neste mecanismo, fatalmente se geram pregas neurais justamente nas regiões mais elevadas, as quais se tornam mais desenvolvidas na extremidade cefálica do embrião. Posteriormente, eventos complexos envolvendo transdução de sinais moleculares fazem com que essas pregas neurais se fusionem, gerando-se uma formação tubular, ao mesmo tempo em que estas se separam de uma longa camada ectodérmica - que passa a ser um epitélio de superfície - e ainda ocorrem migrações neuroectodérmicas da estrutura tubular recém-formada as quais geram aglomerados celulares que se tornam compactados e passam a ocupar um espaço entre o ectoderma de superfície e o referido tubo. Tais eventos relacionam-se as origens do tubo neural, epiderme e crista neural, respectivamente (BEDDINGTON; ROBERTSON, 1998; WURST; BALLY-CUIF, 2001).

Os variados mecanismos que corroboram de maneira integrada com a gastrulação, neurulação e embriogênese resultam em interações indutivas onde determinado tecido ou camada germinativa conduz a uma modificação no curso do desenvolvimento de outra ou ambas são afetadas de modo que um tipo celular específico prolifera e torna-se comprometido na diferenciação de um tecido, órgão ou sistema. Seguindo-se esta linha de raciocínio, experimentos realizados em anfíbios retrataram um importante local na região dorsal do embrião, denominado blastoporo, o qual possuía atividades indutivas no ectoderma. Se este local indutor fosse retirado de um animal e enxertado na posição ventral de outro embrião, verificar-se-ia o estabelecimento de um eixo secundário

contendo tubo neural - que posteriormente formaria o sistema nervoso central -, sistema nervoso periférico e algumas estruturas envolvidas na formação do nariz, olho e vários tecidos glandulares (SASAI; DE ROBERTIS, 1997). Além disso, verificou-se, em humanos, que a formação da vesícula óptica é essencial para que ocorra a diferenciação ectodérmica de uma pequena porção da região anterior embrionária e, desta forma, o cristalino diferencia-se (MOORE; PERSAUD, 2004).

Concomitantemente e em âmbito molecular, verificam-se que substâncias sinalizadoras da classe do TGF- β , em especial o BMP-4, possui forte influência sobre o mesoderma que, por sua vez, se subdivide em paraxial, cujo crescimento possui aspecto de coluna longitudinal e em seguida, diferencia-se em corpos cuboidais ou somitos; mesoderma intermediário e mesoderma lateral, sendo este último o responsável por recobrir o saco vitelino e âmnio (SAWADA et al., 2001).

A formação dos somitos assim como ocorre com relação as outras estruturas anteriormente citadas, ocorrem em períodos específicos do desenvolvimento embrionário e dependem da liberação de moléculas sinalizadoras pelas células indutivas, pela interação entre os componentes da matriz extracelular e/ou pelo contato direto entre as células envolvidas no processo de diferenciação de modo que tais interações estão limitadas no tempo e no espaço. Assim sendo, relata-se, em camundongos, que a partir do oitavo dia de desenvolvimento embrionário, células pluripotentes epiblasticas da linha primitiva transformam-se em células mesodérmicas pré-somíticas pelo estímulo do fator de transcrição Hes 7 que por sua vez, encontra-se sob o controle do FGF que é sintetizado na região posterior do embrião (NIWA et al., 2007; SAGA, 2012). Estes estímulos desencadeiam-se em forma de gatilho e propagam-se como se fossem ondas ativadoras seguidas de processos inibitórios mínimos ao final de cada frequência estimuladora, cujas características cíclicas parecem estar sob o controle da Fgf8 (PERANTONI et al., 2005). Interessantemente, o efeito global encontra-se relacionado a manutenção das células mesodérmicas em um estado quiescente de células mesenquimais imaturas, as quais podem sofrer transição para um estado epitelial rígido, em formato de blocos cuboides, os quais passam a formar estruturas pares em ambos os lados do tubo neural na dependência do estímulo concomitante do Notch com o respectivo receptor (DALE et al., 2003; DUBRULLE et al., 2001). Tal desenvolvimento segue-se na direção céfalocaudal sob o

controle da Mesp 2 (MORIMOTO et al., 2005) e irão promover a formação dos ossos do crânio, coluna vertebral, costelas, esterno e músculos associados (MOORE; PERSAUD, 2004).

Como se pode observar, muitos eventos na cinética embrionária são encadeados mediante a morfogênese que se mostra mais proeminente quando se iniciam os dobramentos embrionários nos planos mediano e horizontal (COOKE, 1999). Assim, tal morfocinética ventral produz as pregas cefálica e caudal, sendo que na primeira, evidencia-se um encéfalo em desenvolvimento, a membrana bucofaríngea, um coração primitivo deslocando-se para o celoma pericárdico (situado em posição ventral) e uma aposição de pequena parte do endoderma do saco vitelino que formará o intestino anterior, este último, separando-se do estomodeu (primórdio da boca) pela membrana bucofaríngea. No tocante a prega caudal, o seu desenvolvimento resulta do crescimento da porção mais distal do tubo neural (futura medula espinhal), podendo-se visualizar ainda a eminência caudal, a cloaca - que servirá de molde para a formação do reto- e o estabelecimento do intestino posterior, oriundo de absorções do endoderma vitelínico. Após tais formações, podem ser caracterizadas as extremidades do tubo neural, que são estruturas abertas inicialmente e reconhecidas como neuroporos; os quatro pares de arcos faríngeos, sendo o primeiro deles relacionado à formação do maxilar; os brotos dos membros superiores e em seguida, dos posteriores, as fossetas ópticas (futura orelha interna) e os placoides do cristalino (KAUFMAN, 1992).

Assim, buscou-se trazer à tona, todas essas informações concernentes ao desenvolvimento embrionário como forma de fornecer subsídios para o entendimento da embriogênese no préa, acarretando, certamente, em meios fidedignos para a posterior apresentação dos resultados na espécie em questão bem como no tocante ao acompanhamento da fase fetal e demonstração de dados morfométricos.

3.5 Proteoglicanos e glicosaminoglicanos sulfatados em animais

Desta forma, os diversos mecanismos supracitados dependem de sinais intra e intercelulares bem como pela integração da transmissão informacional com os componentes da MEC. Disso resulta, em destaque, a participação de macromoléculas

como os proteoglicanos e glicosaminoglicanos, os quais localizam-se, preferencialmente, no espaço extracelular de muitos órgãos e tecidos, segundo os quais há o desempenho de numerosas funções (COUCHMAN; PATAKI, 2012). No entanto, ainda não é inteiramente determinado se todas as matrizes extracelulares apresentam riqueza, em termos de concentração, de moléculas glicoproteicas desta natureza bem como inexistem informações sobre a existência de um padrão pré-estabelecido ou intensamente variável no tocante a distribuição de GAGs (ASPBERG, 2012). Além disso, estudos já contribuíram para a detecção de tais componentes em membranas de organelas intracelulares, envolvidas em processos secretórios, como é o caso dos verificáveis em mastócitos, células endodérmicas e endoteliais. Similarmente, foram reportadas a presença de GAGs no núcleo de muitos tipos epiteliais e mesenquimais, cujos aspectos funcionais ainda permanecem desconhecidos (RÖNNBERG et al., 2012).

Essas lacunas existentes motivaram a quantificação desses polissacarídeos sulfatados e conseqüente tentativas de inferência funcional em órgãos reprodutivos de preás durante duas fases específicas do ciclo estral e, especialmente, no transcorrer gestacional, o qual pode vir a estimular uma maior atenção sobre as referidas macromoléculas como possíveis marcadores da gestação, de desenvolvimento específico de uma determinada membrana fetal, cinética embrionária, inversão do saco vitelino em roedores e até mesmo como indicadores futuros de algumas doenças.

Os proteoglicanos constituem componentes heterogêneos, cujas distribuições pericelulares e em matrizes extracelulares, ratificam a sua versatilidade, mediante diversidade protéica e múltiplas possibilidades de interações covalentes com os glicosaminoglicanos sulfatados (HARDINGHAM; FOSANG, 1992).

Tais ligações configuram-se aptas a ocorrer pela presença de domínios protéicos, oriundos de éxons separados que se fundem especificamente, os quais contribuem para a formação de regiões específicas, no cerne protéico, capazes de possibilitarem a ancoragem de unidades repetitivas de resíduos sacarídicos (RUOSLAHTI, 1988).

Além disso, sabe-se que a parte protéica do PG varia em tamanho podendo constituir uma molécula pequena com peso de 11.000 dáltons até estruturas complexas de 220.000 dáltons (BOURDON et al., 1985; DOEGE et al., 1987). Tais porções podem se ligar a um ou mais de 100 GAGs, os quais compartilham elétrons em ligação-O ou -N,

sendo o primeiro caso, característico quando a cadeia de açúcar liga-se a hidroxila da serina ou treonina do segmento protético enquanto, na outra condição, as subunidades polissacarídicas estão ligadas ao grupamento amino do ácido aspártico conforme se verifica na figura 10.

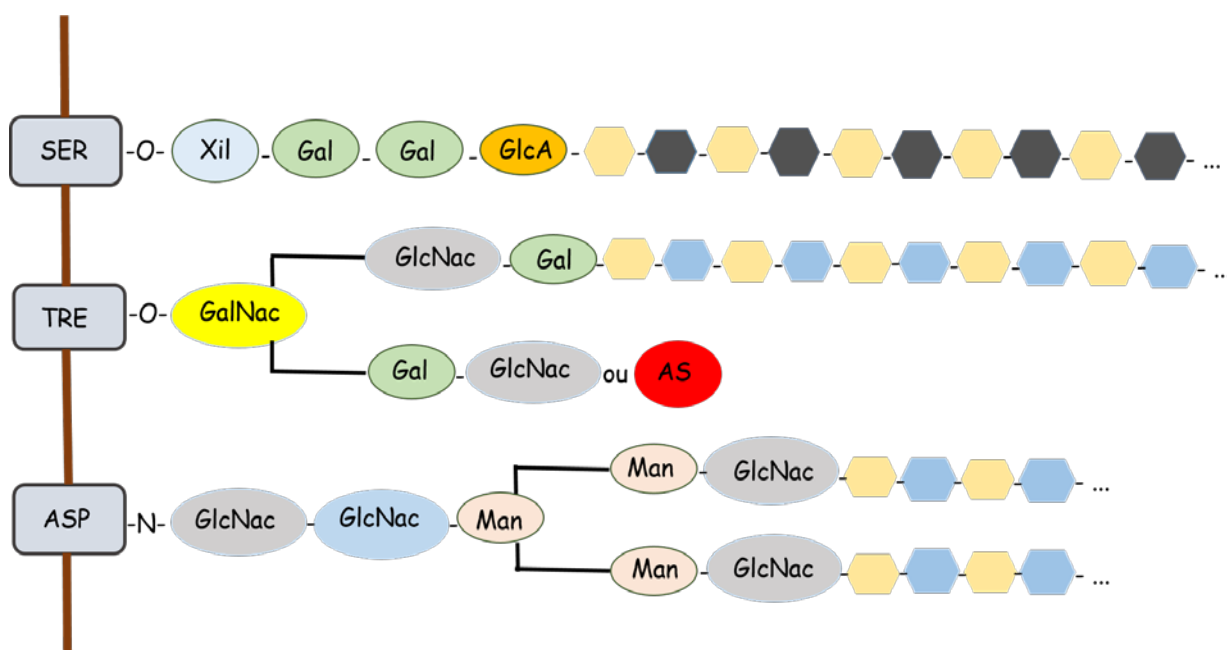


Figura 10- Representação esquemática dos tipos de ligações que os glicosaminoglicanos realizam para agregarem-se a estrutura protéica do proteoglicano. Nesta figura, a proteína em questão encontra-se verticalmente representada e contém três regiões importantes, nas quais aminoácidos específicos interagem com os GAGs, respectivamente, de cima para baixo: serina, treonina (onde a ligação covalente com o GAG ocorre na hidroxila da porção terminal destes aminoácidos) e ácido aspártico (este liga-se covalentemente ao respectivo GAG mediante ligação covalente do nitrogênio do grupamento aminoterminal). SER: serina; TRE: treonina; ASP: ácido aspártico; Xil: xilose; Gal: galactose; GlcA: ácido glicurônico; GalNac: N-acetil galactosamina; GLcNac: N-acetil glucosamina; AS: ácido siálico; Man: manose; : hexosamina; : ácido urônico; : D-galactose. Figura modificada de Hardingham e Fosang (1992).

É interessante notar que os proteoglicanos presentes na matriz extracelular, apesar das diferentes funções atribuíveis, encontram-se aptos a criarem compartimentos específicos de permeabilidade à água, cuja característica hidrofílica daqueles geram

desequilíbrios osmóticos em muitas regiões bem como um influxo direcionado de íons, capazes de interferirem na atividade de células circunvizinhas, e ainda gerarem um efeito resultante de manutenção da hidratação da MEC (HARDINGHAM; BAYLISS, 1990).

No tocante aos aspectos estruturais, alguns PGs possuem uma reduzida parte protéica e várias ramificações de GAGs que se ligam ao referido segmento, como é o caso do serglicim (PG19), sendo a sua função global, atribuível aos polissacarídeos sulfatados que irradiam da proteína em questão. Outras moléculas maiores apresentam domínios protéicos tanto para a ligação com GAGs quanto para ancora-las na superfície celular como componentes transmembrânicos (exemplo: proteoglicanos de heparam sulfato) e ainda, existem domínios capazes de intensa adesão aos componentes da MEC tais como o colágeno e fibronectina, podendo-se citar os proteoglicanos encontrados em fibroblastos, o decorim (PG40 ou PG II) e aqueles proteoglicanos de ácido hialurônico encontrado em cartilagens (RUOSLAHTI, 1988). A figura 11 retrata os tipos de PGs anteriormente citados.

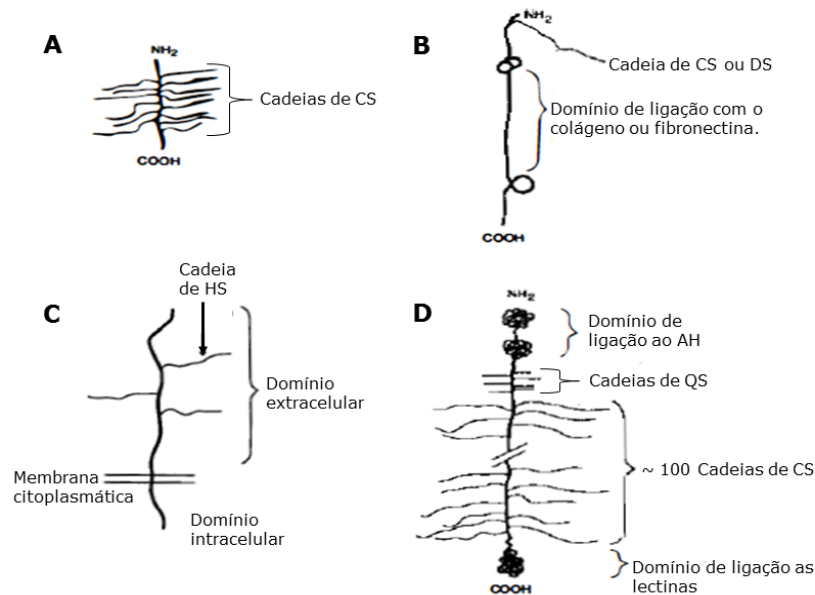


Figura 11- Exemplificação de proteoglicanos típicos. Em A: serglicin, o qual possui reduzida cadeia protéica ligada a 14 moléculas de condroitim sulfato. Em B: evidencia-se um filamento protéico contendo região de ligação a glicosaminoglicanos e outra ricamente constituída pelo aminoácido leucina, este último envolvido na ligação com o colágeno e fibronectina. Em C: destaca-se um proteoglicano de heparan sulfato com domínios extra e intracelulares. Em D: verifica-se a presença de um longo proteoglicano encontrado em cartilagens e dotado de domínios de ligação ao ácido hialurônico (região superior da figura), região de ligação a cadeias de queratam sulfato, numerosas cadeias aderidas de condroitim sulfato e uma porção terminal de interação à matriz extracelular (domínio de ligação a lectinas). CS: condroitim sulfato; DS: dermatam sulfato; HS: heparan sulfato; AH: ácido hialurônico; QS: queratam sulfato. Figura modificada de Ruoslahti (1988).

3.5.1 Proteoglicanos constituintes da matriz extracelular

O agregam revela uma macromolécula complexa, de elevado peso molecular – cerca de 220kD para a porção protéica- encontrada na forma de estruturas monoméricas

(COUCHMAN; PATAKI, 2012), as quais estão conectadas ao ácido hialurônico de forma não covalente, e as unidades assim estabelecidas aglutinam-se mediante ação estabilizadora de glicoproteínas. O condroitim sulfato constitui o principal GAG constitutivo do PG e tal carboidrato representa 90% do peso total da molécula, sendo as demais estruturas acessórias representadas pelo queratam sulfato e oligossacarídeos ligados covalentemente nas formas -O ou -N ao segmento protéico. A referida complexidade protéica encontra correlação com os três domínios formados, os quais demonstram grande estabilidade e conservação em termos de sequência de aminoácidos bem como pelo arranjo tridimensional em disposição terciária e quaternária. O domínio G1 associado a proteína de ligação possui natureza similar a superfamília das imunoglobulinas, com dobramentos peculiares, capazes de reconhecimento e adesão celulares além de estímulos imunológicos inespecíficos. O domínio G2 demonstra segmentos protéicos em arranjos circulares que se adequam a interação com o ácido hialurônico, sendo o G3 relacionado a integração com moléculas de adesão presentes na MEC (GOETINCK et al., 1987; RUOSLAHTI, 1988; PERKINS et al., 1989).

A molécula de agregam encontra-se expressa em grande quantidade nas articulações e detém similaridades estruturais com o versicam, ricamente detectado nas matrizes extracelulares de vasos sanguíneos calibrosos. Em tais substâncias, o domínio G3 possui uma região de lectina capaz de reconhecer ligantes, cujo componente terminal da molécula pode ser a fucose ou galactose. Além disto, encontra-se um subdomínio similar ao fator de crescimento endodermal (EGF) que, por sua vez, pode modular a atividade metabólica de condrócitos e fibroblastos ou constituir elemento de ligação as proteínas da MEC (HALBERG et al., 1988; SIEGELMAN et al., 1990). A figura 12 denota as características supracitadas.

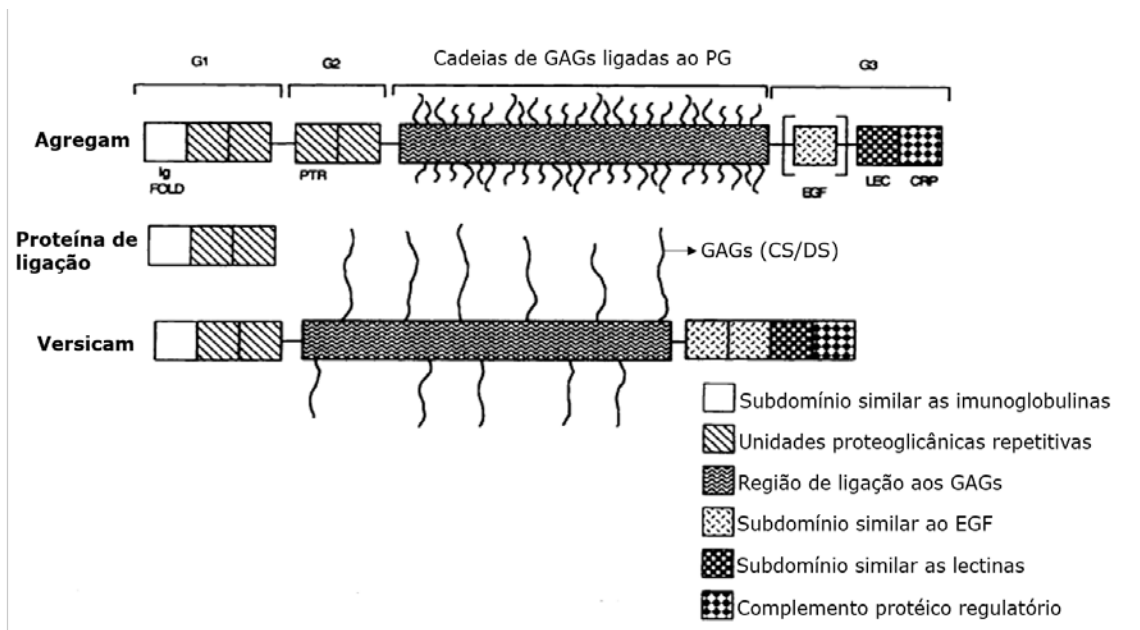


Figura 12- Aspectos estruturais dos proteoglicanos agregam e versicam. Nesta figura destacam-se os domínios G1, G2 e G3 e seus subdomínios característicos. Figura modificada de Ruoslahti (1988). GAGs: glicosaminoglicanos; PG: proteoglicano; Ig fold: região imunoglobulínica capaz de realizar dobramentos específicos; PTR: unidade protéica repetitiva; EGF: fator de crescimento epidermal. Figura modificada de Hardingham e Fosang (1992).

3.5.2 Proteoglicanos ricos em leucina

A figura 13 retrata, estruturalmente, os três principais proteoglicanos que participam da organização da MEC e, por conseguinte, de grande parte do tecido conectivo: biglicam, decorim e fibromodulina. Os dois primeiros, respectivamente, possuem um domínio anterior em que se inserem duas e uma cadeia de condroitim ou dermatam sulfatos; um segmento intermediário protéico constituído por 12 repetições residuais de 24 aminoácidos, sendo o principal deles a leucina. O biglicam apresenta uma porção terminal que pode interagir com a MEC em diversos locais, excetuando-se aqueles que apresentem colágenos tipos I e II (HARDINGHAM; FOSANG, 1992).

Esta característica diverge da observada nas moléculas de decorim e fibromodulina, devido a presença de sítios de ligações as fibas colágenas citadas bem

como pela interação com a fibronectina e fator transformador do crescimento beta (TGF- β) como ocorre neste último proteoglicano. Tais macromoléculas são fundamentais para a organização estrutural do tecido conectivo, sendo as deficiências de transcrição do decorim e/ou dos outros dois tipos, associado a uma ausência de resposta a interleucina 1 β , capazes de gerarem, por sua vez, desordens do tecido em questão e alterações morfológicas e funcionais de fibroblastos (VOGEL et al., 1984; PULKKINEN et al., 1990).

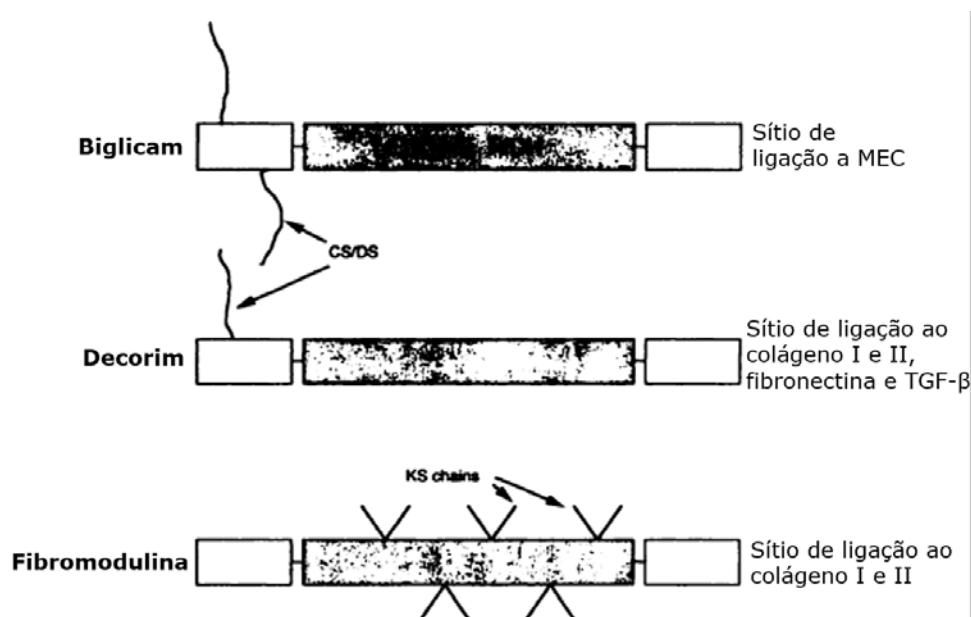


Figura 13- Ilustração comparativa entre os proteoglicanos ricos em leucina. As áreas escurecidas nos domínios centrais referem-se as repetições deste aminoácido. As cadeias de queratam sulfato interagem com os grupamentos amino da leucina na molécula de fibromodulina. Duas cadeias de condroitim ou dermatam sulfatos conectam-se na porção anterior do biglicam, ao passo que no decorim, uma cadeia de um destes GAGs liga-se covalentemente. A porção final dessas glicoproteínas ligam-se de forma específica a constituintes da matriz extracelular. CS: condroitim sulfato; DS: dermatam sulfato; KS: queratam sulfato. Figura modificada de Hardingham e Fosang (1992).

3.5.3 Proteoglicanos de superfície celular

Uma família de glicoproteínas polimórficas contendo cadeias de glicosaminoglicanos, constituídos pelo heparam e condroitim sulfatos, capazes de funcionarem como moléculas integrais, as quais se ligam -via heparam sulfato-, a moléculas de colágeno tipo I, III e IV, fibronectina, trombospondina, tenascina, estas oriundas de membranas basais (quando produzidas por células epiteliais) ou de matrizes extracelulares intersticiais (quando produzidas por células mesenquimais), constituem os sindecans (BERNFELD et al., 1984; ALBELDA; BUCK, 1990).

Sua estrutura revela um curto domínio terminal citoplasmático, uma parte transmembrânica e uma grande porção da molécula voltada para o meio extracelular. Além disto, o padrão predominate de heparam ou condroitim sulfatos será determinado pelas citocinas e fatores de crescimento da MEC, onde o tipo de GAG determinará o padrão de interação da célula ao meio intersticial. Neste sentido, o sindecam 1 mostra-se de extrema importância para o desenvolvimento maturativo de linfócitos B, pois em estágios blásticos, tais células necessitam estarem ancoradas aos elementos da MEC tanto no estroma medular quanto no timo. Da mesma forma, o grau diferenciado dos plasmócitos e a consequente capacidade de fixação e liberação de imunoglobulinas são correlacionadas e favorecidas pelo proteoglicano em questão (SANDERSON et al., 1989; BERNFIELD et al., 1992). A organização dos tecidos epiteliais em camadas bem como a morfologia característica das células que compõem este epitélio são influenciadas pelo sindecam 1, o qual mantém a integridade do citoesqueleto, β 1-integrina, E-caderina e F-actina (RAPRAEGER et al., 1985; TAKEICHI, 1991).

O CD44 (antígeno Hermes, PGp-1, H-CAM, receptor da matriz extracelular III, Hutch-1, GP90) configura-se numa glicoproteína integral expressa na superfície de células da linhagem hematopoiética, endotelial, células epiteliais, nervosas e fibroblastos. No caso dos linfócitos, somente um seletivo grupo efetor produz tal proteoglicano que, por sua vez, participa da ativação celular mediante estimulação antigênica. Na porção estrutural, glicosaminoglicanos como heparam e condroitim sulfatos, ou ambos, bem como oligossacarídeos e cadeias lactosamínicas podem estar ligadas ao PG por meio de ligações -O ou -N (HALBERG et al., 1988; STAMENKOVIC et al., 1991).

Em relação aos fenômenos hemostáticos, ressalta-se a importância da trombosmodulina, um proteoglicano de 57kD, encontrado no endotélio vascular com segmentos moleculares dotados de atividade anticoagulante, sendo o seu núcleo protéico responsável pela ativação da forma zimogênica da proteína C (ESMON, 1989; BOURIN et al., 1990) e a cadeia única, anexa de condroitim sulfato, inibe a antitrombina III, fato este que acarreta redução da trombina circulante bem como do fibrinogênio. A estrutura multimérica transmembrânica revela um domínio terminal dotado de natureza hidrofóbica (terminação amino ou NH_2), outro contendo predomínio dos aminoácidos serina e treonina, que possuem capacidade de ligação covalente ao condroitim sulfato, um domínio constituído por seis repetições de segmentos similares ao EGF além de uma pequena região carboxi terminal citosólica (HARDINGHAM; FOSANG, 1992). A figura a seguir retrata, comparativamente, os três principais proteoglicanos da superfície celular.

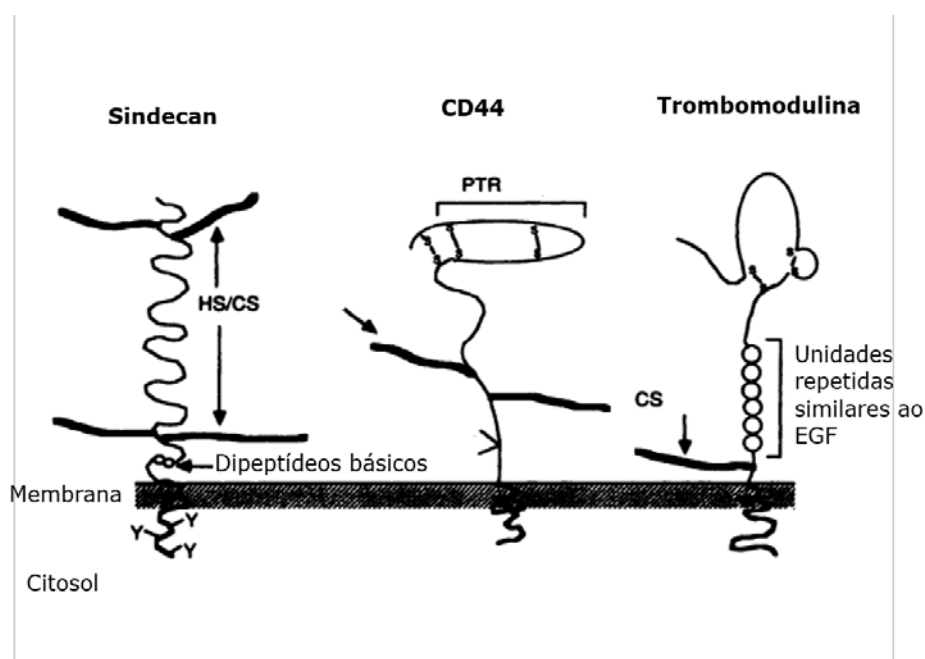


Figura 14- Características estruturais de proteoglicanos da superfície celular. O sindecan possui quatro cadeias de heparan ou condroitim sulfatos aderidas a estrutura protéica no domínio extracelular e dois pequenos segmentos protéicos, um transmembrânico e outro citosólico. Neste último, encontra-se muitos resíduos de tirosina (Y). O CD44 apresenta duas cadeias de condroitim ou heparan sulfatos, um segmento anterior constituído por proteínas em alfa hélice (PTR) e uma porção carboxil terminal intracelular. Já a trombosmodulina possui regiões anteriores dispostas em hélice, uma sequência intermediária de unidades repetitivas similares ao EGF e uma única cadeia de condroitim sulfato aderida ao ectodomínio. HS: heparan sulfato; CS: condroitim sulfato; EGF: fator de crescimento epidermoide; DS: dermatam sulfato; KS: queratam sulfato. Figura modificada de Hardingham e Fosang (1992).

3.5.4 Proteoglicanos que modulam fatores de crescimento

A porção protéica do decorim apresenta afinidade de ligação com o fator transformador do crescimento beta (TGF- β) e este último estimula a expressão de novas moléculas do decorim e biglicam bem como regula a biossíntese das cadeias de GAGs. Neste contexto, um dos receptores integrais de membrana para o TGF- β refere-se ao betaglicam que, conforme descrito, favorece a ação agonista daquele fator, exercendo, pois, um mecanismo indireto na regulação dos dois proteoglicanos anteriormente citados. Além disto, é importante notar que moléculas de heparam sulfato do sindecam exibem elevada afinidade de ligação para fatores de crescimento de fibroblastos a e b (aFGF e bFGF), fatores estimuladores de colônias granulócito-monócito (FSC-GM), interleucina 3 (IL-3) e interferon gama (INF- γ), e tais ligações fornecem, na MEC, um reservatório para suprir a demanda destes fatores (RUOSLAHTI; YAMAGUCHI, 1991; SHINTANI et al., 2006).

3.5.5 Distúrbios relacionados as alterações nas concentrações de proteoglicanos

Nessa perspectiva, os proteoglicanos ricos em heparam sulfato interagem com fatores de crescimento de fibroblastos, via receptores de alta afinidade, cujo resultado alcança ativações intracelulares de fosforilações sucessivas pelas ações de tirosinas quinases (PELLEGRINI et al., 2000; SCHLESSINGER et al., 2000) de modo a possibilitar o controle morfogênico e a consequente diferenciação tecidual (NAHMAD; LANDER, 2011). Além disso, a referida interação entre agonista e receptor geram efetores específicos, capazes de afetar, inclusive a expressão de genes como wingless (Wnt) e hedgehog, os quais atuam em cooperação e produzem proteínas sinalizadoras que influenciam as delimitações territoriais e polarizações embrionárias (COUCHMAN; PATAKI, 2012).

Associado a isso, deficiências na síntese do heparam sulfato, mais especificamente, distúrbios na N-sulfatação, deleções em epimerases e/ou O-sulfotransferases podem acarretar em reduções na síntese de heparina, deficiência

funcional de mastócitos (FORSBERG et al., 1999), agenesia renal e letalidade perinatal (BULLOCK et al., 1998; LI et al., 2003).

Desta forma, vale ressaltar ainda a importância do sindecam e glipicam, com suas cadeias de heparam sulfato associadas, na promoção do potencial totipotente bem como no comprometimento com a diferenciação, em determinada linhagem, das células tronco embrionárias (Stem cells) (TAMM et al., 2012). Os sindecans 1 e 2 associam-se com a ativação dos mecanismos de reparo tecidual, ao passo que a deficiência do tipo 4 pode acarretar em lesões neuronais do sistema nervoso central (BERNFELD et al., 1999; ECHTERMEYER et al., 2001). O glipicam 3, quando expresso em altas concentrações, mantém correlação positiva com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, sendo, pois, um proteoglicano em potencial para servir como marcador desta neoplasia (ALLEGRETTA; FILMUS, 2011). Já a presença de mutações no gene que codifica o glipicam 6, possibilita o aparecimento da omodisplasia, uma doença autossômica recessiva em que se observam dismorfismos na face e crânio (CAMPOS-XAVIER et al., 2009).

Estudos moleculares e de microscopia eletrônica já evidenciaram que células epiteliais, fibroblastos, células de Schwann e hepatócitos apresentam abundância de proteoglicanos de heparam sulfato e tais macromoléculas ligam-se a filamentos de actina no citoesqueleto dessas células criando um microambiente propício para a transdução de sinais e consequente manutenção da polaridade celular. O polímero em questão, contém sequências alternadas de ácido idurônico e glicurônico (FRANSSON et al., 1983), cujo resultado seria a associação das células entre si e com os constituintes da matriz extracelular, resultando num efeito global de controle da migração celular, característica esta evidente, em especial, na embriogênese (IOZZO, 1988).

Nesse sentido, se houver alterações no quantitativo de PGs e GAGs pode se sobressair a formação de uma célula neoplásica, inclusive mediante as propriedades indutoras do ciclo celular promovidas pelo condroitim sulfato – associado a tumores epiteliais e mesenquimais – e aquelas, cujo efeito seriam de redução da mitose, pelo menor aporte de nutrientes e íons, como é o caso do heparam sulfato. No entanto, este GAG, quando sulfatado erroneamente pode estar associado a neoplasias como mieloma

múltiplo, hepatoma humano e carcinoma de células mamárias (verificado em camundongos) (STAMATOGLU; KELLER, 1982; IOZZO, 1988).

Partindo-se dessa premissa, Merle et al. (1999) avaliaram os efeitos do decorim (DCN) na migração de células neoplásicas do osteossarcoma MG-63 humano. Para tanto, realizaram-se extrações deste proteoglicano dos ossos longos de bovinos, da pele e cartilagem de bezerras. As células tumorais foram cultivadas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino. Para os testes de migração, usou-se equipamento haptotático, o qual era constituído por duas câmaras, uma inferior e outra posterior que, por sua vez, eram separadas por uma membrana de oito micrômetros que continha em seu revestimento: vitronectina, colágeno tipo I, fibrinogênio e fibronectina. As células tumorais que migrassem teriam que atravessar esta membrana para posterior coloração em sistemas específicos de detecção. Amostras controles foram aplicadas com o auxílio de fator nuclear (FN) que estimulava o processo migratório, seguido das análises utilizando-se o FN associado ao DCN cutâneo (decorim com cadeia de dermatam sulfato), FN acrescido ao DCN ósseo (decorim com cadeia de condroitim sulfato), FN homogeneizado com DCN de origem cartilaginosa (decorim com cadeia de condroitim e dermatam sulfatos), e por fim, FN inserido juntamente com uma mistura dos referidos tipos de DCN mais a enzima condroitinase ABC. Os resultados revelaram que as melhores inibições, no tocante as migrações das células tumorais, seguiram-se a sequência: DCN pele > DCN cartilagem > DCN osso. Além disso, nas amostras em que foram acrescidas a enzima, verificaram-se reduções significativas na inibição migratória, o que veio ratificar a importância da cadeia glicosaminoglicânica no desempenho funcional da glicoproteína em estudo.

3.5.6 Características dos glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos são polímeros de cadeia linear formados por repetições de dissacarídeos, os quais contém uma hexosamina (D-glicosamina ou D-galactosamina) unida, mediante ligação glicosídica, a um ácido urônico (ácido D-glicurônico ou L-idurônico) ou a um açúcar neutro como a D-galactose. Excetuando-se o ácido hialurônico, verificam-se variáveis graus de sulfatações nas unidades básicas que se

repetem na cadeia dos GAGs, fato este que juntamente com os radicais carboxílicos contidos nas moléculas de ácido urônico, conferem elevada densidade de cargas negativas e consequente hidrofiliabilidade a estrutura polissacarídica (COUCHMAN; PATAKI, 2012). A figura 15 promove destaque aos aspectos estruturais dos principais glicosaminoglicanos.

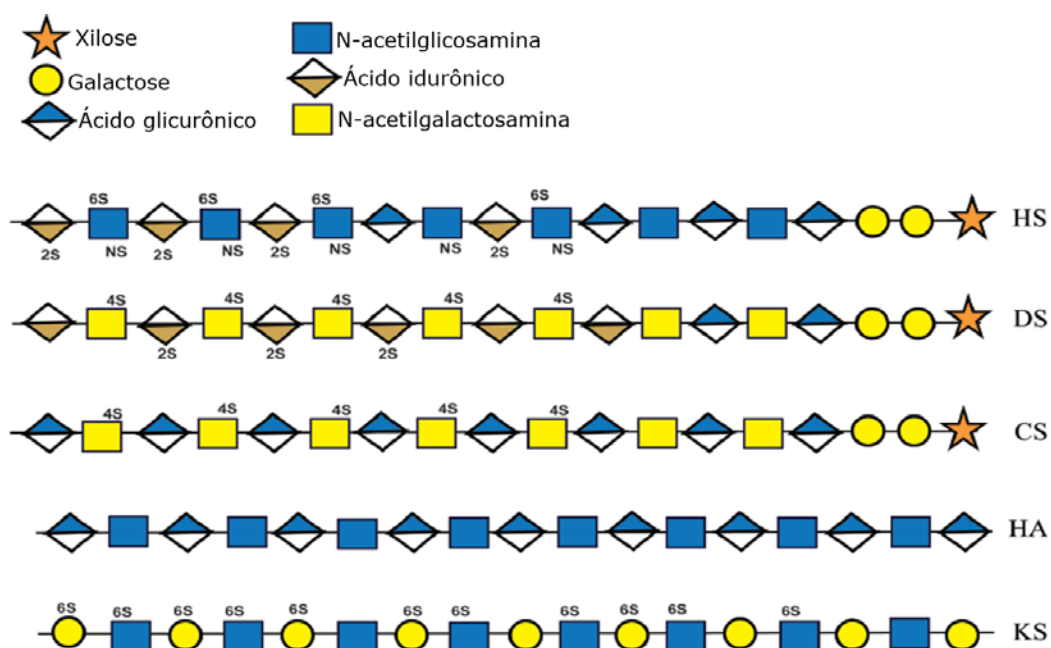


Figura 15- Composição estrutural linear dos principais glicosaminoglicanos. A molécula de heparan sulfato apresenta resíduos de N-acetilglicosamina que sofre desacetilação e posterior sulfatação no nitrogênio (NS). Além disso, tais resíduos encontram-se sulfatados em ligação 6-O (6S), ou seja, o enxofre do grupamento sulfato liga-se covalentemente ao oxigênio próximo ao carbono seis da N-acetilglicosamina. Ainda relativo ao heparan, verifica-se a sulfatação 2-O (2S) nos ácidos idurônicos constituintes do composto. O dermatan sulfato possui sulfatações 4-O (4S) nas moléculas de N-acetilgalactosamina e 2-O (2S) nos ácidos idurônicos. O condroitim sulfato apresenta acréscimos de grupamentos sulfatos 4-O (4S) apenas nos resíduos de N-acetilgalactosamina. No ácido hialurônico não se observam sulfatações. Por fim, o queratan sulfato revela substituições fosfáticas nas unidades dissacarídicas de galactose e N-acetilglicosamina. HS: heparan sulfato; DS: dermatan sulfato; CS: condroitim sulfato; HA: ácido hialurônico; KS: queratan sulfato. Figura modificada de Couchman e Pataki (2012).

Conforme descrito, heparan, dermatan e condroitim sulfatos detêm similaridades, no início da cadeia linear, ao apresentarem uma molécula de xilose, dois

resíduos de galactose e uma de ácido glicurônico. A partir deste ponto, o heparan sulfato apresenta repetições dissacarídicas de N-acetilglicosamina e ácido glicurônico até meados da estrutura polimérica. Em seguida, evidenciam-se reações de epimerização, segundo a qual há conversão do ácido glicurônico em idurônico. Os domínios de N-acetilglicosamina sofrem acréscimos de grupamentos sulfato no nitrogênio da referida hexosamina bem como sulfatações ligadas ao oxigênio que se associa ao carbono da posição seis do açúcar em questão. Os ácidos idurônicos, por sua vez, estão sulfatados em ligações 2-O. O arranjo estrutural do condroitim sulfato revela repetições de ácido glicurônico e N-acetilgalactosamina com adições de sulfato no oxigênio próximo ao carbono quatro deste último açúcar. Para o dermatan, uma maior complexidade se verifica devido a uma parte da molécula apresentar repetições entre N-acetilgalactosamina e ácido glicurônico e outra, demonstrar a forma epimerizada do referido ácido, ou seja, ácido idurônico. Nestas últimas repetições citadas, verificam-se sulfatações, respectivamente, em ligações covalentes 4-O e 2-O. Já o queratim sulfato possui unidades dissacarídicas constituídas por galactose e N-acetilglicosamina com sulfatações em ligações 6-O em ambos os açúcares, ao passo que, no caso do ácido hialurônico observam-se resíduos repetitivos de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina isentos de adições de grupamentos sulfatos (FRASER et al., 1997; THELIN et al., 2012; COUCHMAN; PATAKI, 2012).

Nesse sentido, por meio das características estruturais observadas, fica evidente que a principal diferença existente entre o condroitim e dermatan sulfatos reside na presença do ácido idurônico neste último. A reação de epimerização que converte o ácido glicurônico em idurônico decorre da ação de duas enzimas: dermatan epimerase 1 e 2. Interessantemente, evidencia-se que no ácido resultante da transformação, múltiplas formas de conformações espaciais tornam-se possíveis, fato este que produz como efeito global, maior flexibilidade da cadeia polissacarídica (figura 16), a qual passa a agregar funções diversas (THELIN et al., 2013). Tais propriedades irão influenciar os processos de migrações, diferenciações e proliferações celulares, angiogênese, regulação das atividades de citocinas e fatores de crescimento, diferenciação e maturação de células tronco (NAIRN et al., 2007) e ainda estímulo a clivagem e formação do endoderma embrionário e vitelínico (THELIN et al., 2013). Além disto, em condições patológicas,

verificam-se como atuações do ácido idurônico o estímulo, em reações inflamatórias, ao processo de reparo tecidual e o recrutamento quimiotático de células inflamatórias pela ligação deste ácido a P-selectina e aumento de expressão de moléculas de adesão (ICAM-1) (TROWBRID; GALLO, 2002; MALAVAKI et al., 2008). Possui um efeito protetor contra a aterosclerose já verificado em estudos *in vitro* nos quais observou-se uma inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade carreadoras de colesterol (CAMEJO et al., 1998). No caso de neoplasias como o carcinoma hepatocelular e de células escamosas reconhecidas por linfócitos T correlacionaram-se a incidência destes as elevadas concentrações do referido ácido, inclusive pelo aumento das reações de epimerização. É importante destacar ainda que o desenvolvimento da célula tumoral irá depender também do padrão de sulfatação da cadeia do glicosaminoglicano, onde a monossulfatação 6-O dissacarídica, em excesso, mantém conexão com o processo neoplásico, enquanto a 4-O predomina nos tecidos normais (NAKAO et al., 2000).

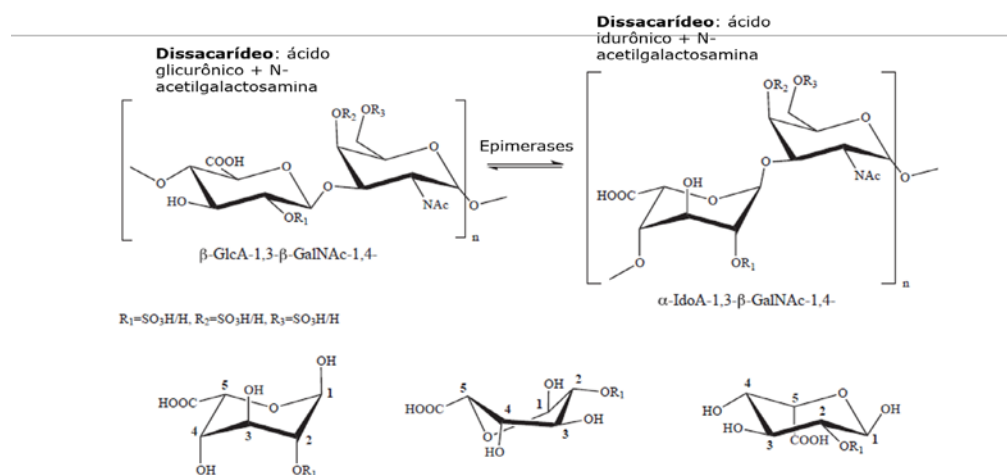


Figura 16- Representação esquemática da formação do ácido idurônico. A figura superior retrata o equilíbrio químico promovido pela epimerase, a qual catalisa a transformação do ácido beta glicurônico em alfa idurônico, quando ambos estão em ligações glicosídicas com a N-acetilgalactosamina. R1, R2 e R3 constituem os radicais substitutivos nas moléculas em questão. Finalmente, destaca-se, na imagem inferior, as variações conformacionais possíveis do ácido idurônico. Figura modificada de Thelin et al. (2013).

Em termos de importância, vale destacar também as características funcionais do ácido hialurônico, que devido a intensa ionização dos seus grupamentos carboxílicos, no pH extracelular, resulta num efeito osmótico capaz de controlar a homeostase da água bem como servir como lubrificante biológico ideal. Este fato favorece também a regulação e distribuição das proteínas plasmáticas (SCOTT, 1992). Interessantemente, a síntese deste ácido ocorre, predominantemente, na membrana celular por meio de construções lineares de unidades dissacarídicas, as quais passam a se estender no espaço pericelular. Assim, um determinado percentual ficará retido na membrana, sendo os demais incubidos de formar um pool circulante e outro fazendo parte da matriz extracelular (ITANO; KIMATA, 1996). Por conseguinte, verifica-se riqueza de concentração na pele, ossos e demais tecidos de sustentação, músculos, intestinos e estômago. Ademais, foram reportadas concentrações elevadas do referido ácido no cordão umbilical, fluído sinovial, pulmões e rins (REED et al., 1988; LAURENT; FRASER, 1992). Na superfície das células forma uma espécie de âncora que facilita a interação com outras, em especial, os imunócitos, fato este capaz de proteger o organismo contra autoreatividade do sistema imune adaptativo e ainda impedir a infecção por vírus. Além disto, pela ligação ao CD44, muitas vias de diferenciação celular são ativadas. Quanto as doenças associadas, destacam-se os processos inflamatórios e neoplásicos, onde as células envolvidas em cada distúrbio, interagem com matrizes extracelulares enriquecidas com ácido hialurônico (FRASER et al., 1997).

Finalmente, nos tecidos uterinos e órgãos placentários, glicosaminoglicanos como ácido hialurônico, dermatam, condroitim, queratam e heparam sulfatos distribuem-se de forma variável e diversificada, cujas correlações com os aspectos fisiológicos encontram-se representados nas tabelas um e dois descritas a seguir:

Tabela 1- Glicosaminoglicanos (GAGs) encontrados nos tecidos uterinos de mamíferos eutérios e sua relação com a fisiologia no órgão. CS= condroitim sulfato, DS= dermatam sulfato, HS= heparam sulfato, AH= ácido hialurônico. Adaptada de Oliveira et al. (2013).

Espécie	Tecido	GAGs	Fisiologia	Referência
Camundongos	Cérvix	-Condroitim sulfato. -Dermatam sulfato. -Heparam sulfato.	-Sofrem alterações durante o ciclo estral. -São hormônio dependentes. -Envolvidos no processo de renovação tecidual, com degradação e nova síntese de seus componentes.	GOMES et al. (2007).
Ratas albinas	Cérvix gestante	Infusão intracervical de hialuronidase: redução significativa de CS/DS e HS. A redução no AH ocorre na lâmina própria dos tecidos e vasos sanguíneos.	A infusão intracervical de hialuronidase promove uma redução significativa na concentração de GAGs sulfatados.	SOUZA et al. (2014).
Ratas ovariectomizadas	Cornos uterinos e Cérvix	-DS, HS e AH presente em ambos os tecidos. -Uso de estrógeno está associado ao aumento do DS. -Tratamento com progestágeno: redução do HS nos cornos e aumento do HS na cérvix. -Uso associado de estrógeno e progesterona: aumento dos GAGs sulfatados.	-Modulados pelos hormônios sexuais.	KOFOED et al. (1972), (1977); SIMÕES et al. (2012).
Ratas	Cornos uterinos	AH: aumenta no dia em que ocorre a implantação embrionária. Outros GAGs permanecem constantes nos primeiros cinco dias de gestação.	AH: biossíntese acompanhada da resposta decidual no endométrio e pode promover a implantação embrionária.	CARSON et al. (1987).
Ratas	Cérvix	- GAGs encontrados: DS, HS e AH. - Maior quantidade de GAGs na fase de estro. - DS predominante no estro e o HS no proestro.	A variação hormonal relacionada ao estro pode afetar a cérvix uterina, via efeito na produção de heparam e dermatam sulfatos.	CUBAS et al. (2010).
Ratas e Mulheres	Cérvix (gestação a termo)	AH: biossíntese aumenta próximo ao parto, atingindo o pico no dia deste.	Aumento devido a transcrição do RNAm HAS2 realizada próximo ao parto, sugerindo regulação de AH na cérvix.	STRAACH et al. (2005).
Coelha	Útero de fêmeas tratadas com estrógeno	Principais GAGs: CS, HS e DS.	O tratamento com estrógeno aumenta a síntese de GAGs sulfatados no útero, reflexo da proliferação deste tecido, devido a ação hormonal.	MUNAKATA et al. (1984).

Coelha	Miométrio a partir de fêmeas ovariectomizadas	CS: predomínio seguido pela presença de DS, HS e AH e uma pequena quantidade de glicoproteínas ácidas.	A diferença na composição dos GAGs entre as camadas uterinas sugere que estas apresentem papéis muito diferentes na reprodução.	ENDO et al. (1978).
	Útero	Predomínio de HS, seguido por DS, AH e CS.		ENDO; YOSIZAWA, 1975.
Mulheres	Endométrio	Predomínio do CS. DS e HS em menor quantidade.	Durante o ciclo menstrual os GAGs estariam envolvidos no crescimento e remodelamento do endométrio.	NASCIUTTI et al. (2006).
	Cérvix (gestante)	O colágeno e GAGs sulfatados foram elevados neste tecido.		MYERS et al. (2008).

Tabela 2- Glicosaminoglicanos (GAGs) encontrados no tecido placentário de mamíferos eutérios e sua relação com a fisiologia no órgão. CS=condroitim sulfato, DS=dermatam sulfato, HS=heparam sulfato, AH=ácido hialurônico. Adaptada de Oliveira et al. (2013).

Espécie	Tecido	GAGs	Fisiologia	Referência
Humana	Placenta jovem Placenta a termo	-Placenta jovem: CS e condroitim não sulfatado encontrados em maior quantidade. -Placenta a termo: grande quantidade de GAGs sulfatados, seguidos pelo aumento do DS e HS.	Mudanças nas concentrações dos GAGs, no decorrer da maturação placentária estaria relacionado ao papel destas moléculas na regulação do transporte placentário.	LEE et al. (1973).
Humana	Placenta a termo	-Ácido Hialurônico, Condroitim 6-sulfato, Condroitim 4-sulfato. -Pequena porção de DS e HS localizados entre a interface materna e fetal.	DS e HS proporcionam a formação de uma barreira eletroquímica contra a passagem de células imunocompetentes da mãe para o feto.	CALATRONI; DI FERRANTE, 1969.
Humana	-Placenta no primeiro trimestre -Placenta a termo	-Principais GAGs: CS e AH localizados no estroma placentário; DS e HS associados aos vasos sanguíneos fetais e superfície sincicial.	Manutenção da integridade estrutural placentária e possivelmente no processo de homeostase sanguínea.	WASSERMAN et al. (1983).
Humana	Placenta em pacientes com pré-eclâmpsia	Marcante diferença no padrão de sulfatação dos GAGs.	Possível ligação entre a pré-eclâmpsia e as alterações nos GAGs placentários.	WARDA et al. (2008).
Ovina	Placentoma	Ácido Hialurônico predominante nas fases iniciais e meio de gestação.	Mecanismo regulatório do ácido hialurônico determinante no processo de maturação placentária e no crescimento fetal	OTT et al. (1997).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os animais e suas respectivas amostras biológicas foram obtidos no CEMAS (Centro de Multiplicação de Animais Silvestres) da UFERSA (Universidade Federal Rural do Semi-Árido), registrado junto ao IBAMA como criadouro científico sob o número 1478912, cujo objetivo consiste em fomentar pesquisas, promover meios de conservação e manutenção de espécies silvestres criadas em cativeiro. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, processo nº 23091.010264/2015-90) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO, nº 47731-1).

4.1 ANIMAIS AMOSTRADOS

Em condição prévia, alocaram-se 45 fêmeas não gestantes de preás, em boxes específicos, para um período de adaptação de 20 dias, sendo favorecido o bem-estar animal (Figura 17). Em seguida, deste local, selecionaram-se 15 fêmeas para a formação de três grupos experimentais contendo cinco fêmeas em cada box específico de 5,0m x 4,0m. Estes animais foram diferenciados, nos respectivos boxes, mediante pintura com tinta capilar negra (Velaton® - Phitoterapia Biotogenia Laboratorial Ltda), em diferentes posições anatômicas, realizadas na seguinte ordem: região torácica direita (fêmea um), torácica esquerda (fêmea dois), região pélvica direita (fêmea três), pélvica esquerda (fêmea quatro) e dorsal (fêmea cinco). Todos receberam, diariamente, ração para roedores, frutos, grãos de soja, milho e água *ad libitum*.

Após novo período adaptativo (dez dias), foram adicionados um macho em cada recinto, fato este que resultou nas realizações diárias da citologia vaginal com a finalidade de detectar a presença de espermatozoides e o consequente estabelecimento do início do período gestacional após 24 horas do encontro do gameta masculino. Assim, na medida em que as fêmeas gestavam, estas eram separadas do box em que se encontravam e transferidas para outro, o qual era isento de macho bem como de outra fêmea com mesma marcação específica. Desta forma, as gestações foram acompanhadas, sendo

agendadas as datas das coletas para realização de procedimento cirúrgico e consequente retirada dos sacos gestacionais e sistema reprodutor feminino.

Seguindo-se essa premissa, foram coletadas amostras de uma fêmea no quinto dia de gestação, uma no décimo e outra no décimo quinto, sendo este intervalo caracterizado como início da gestação. Já no caso da condição intermediária obtiveram-se duas fêmeas no vigésimo, duas fêmeas aos 25 dias, uma no trigésimo e outra no trigésimo quinto dia de gestação. Por fim, uma fêmea foi analisada no quadragésimo dia, outra aos 45 dias, duas aos 50 dias e outras duas no quinquagésimo quinto dia da gestação, sendo o referido intervalo definido como final da gestação. As amostras coletadas neste processo foram separadas em dois grandes grupos, sendo que no primeiro deles, cada porção do sistema reprodutor feminino, placenta e subplacenta era acrescida em tubos individuais (previamente identificados) contendo acetona PA com a finalidade de deslipidação das amostras para posterior extração e quantificação dos glicosaminoglicanos de cada estrutura mencionada. Do mesmo modo, as amostras oriundas do segundo grupo foram separadas e colocadas em tubos individuais contendo solução de paraformaldeído 4% tamponado destinado à fixação de amostras, as quais foram submetidas ao processamento histológico por meio do uso de colorações de rotina bem como pela utilização de reações imunohistoquímicas para vimentina, Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), ácido hialurônico (AH), condroitim (CS), dermatam (DS) e heparam sulfatos (HS). O glutaraldeído 2,5% destinou-se a fixação das amostras, as quais sofreram processamento subsequente segundo técnicas de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

Adicionalmente, do primeiro box em que se integrou as fêmeas de préas no início do experimento, retirou-se cinco fêmeas, cujo intuito foi de promover a cópula destas e acompanhar a duração da gestação; dez fêmeas foram utilizadas para a determinação do ciclo estral, por meio da citologia vaginal, sendo cinco destas, transferidas para um box que continha um macho (este encontrava-se preso em gaiola de dimensões 107x68x75cm como forma de se evitar a fecundação) e as outras fêmeas restantes foram acrescidas em recinto específico, o qual era isento deste último. Ao todo, foram acompanhados dois ciclos completos em cada animal.

Além disso, adicionou-se um macho no box que continha as 15 fêmeas remanescentes, sendo a cópula e o estabelecimento da gestação, condições primordiais

para o desenvolvimento da última parte do experimento: promoção da análise morfométrica dos embriões com 20, 25, 30 e 35 dias além dos fetos nos dias 40, 45, 50, 55 e recém-nascidos.

Vale ressaltar ainda que para os estudos de placentação vitelínica, corioalantoide e desenvolvimento embrionário foram acrescentadas amostras remanescentes de sacos gestacionais de preás oriundos de experimento anterior (número 23091.0019775/10-24), o qual gerou a dissertação de mestrado intitulada: “Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás *Galea spixii* Wagler, 1831”. Por conseguinte, blastocistos de oito e nove dias de gestação; embriões aos 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19 e 22 dias gestacionais; amostras de placentas vitelinas e corioalantoides nos dias 12, 14, 16, 17 e 38 dias pós-concepção foram processadas, analisadas e inseridas nos resultados como forma de contribuir para o enriquecimento do presente trabalho.

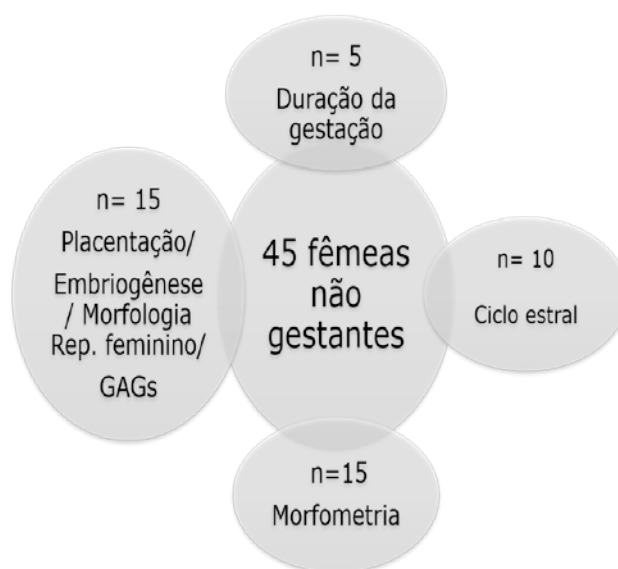


Figura 17 – Representação da distribuição dos animais amostrados ao longo do experimento. Fonte: acervo do pesquisador.

4.2 CITOLOGIA VAGINAL

Os esfregaços vaginais foram confeccionados coletando-se fluido vaginal com o auxílio de um swab estéril embebido previamente em solução salina a 0,9%. Esse procedimento foi realizado diariamente, no período das 6:00 as 7:00 horas da manhã de forma a garantir uniformidade no estabelecimento do primeiro dia de gestação bem como para a caracterização do ciclo sexual. O material coletado foi distendido em lâmina de vidro e deixado à temperatura ambiente para secagem. Em seguida, realizaram-se colorações utilizando corante panótico rápido Instant-Prov (New Prov®) de acordo com as recomendações preconizadas pelo fabricante.

No caso das 15 fêmeas que foram separadas em três boxes, acrescidas de um macho e destinadas as posteriores coletas dos sacos gestacionais e sistema reprodutor feminino, as amostras positivas para células espermáticas (Figura 18) culminaram com a separação da respectiva fêmea do box na qual se encontrava, evitando desta forma, o estresse gerado pela coleta e ainda o contato com o macho.

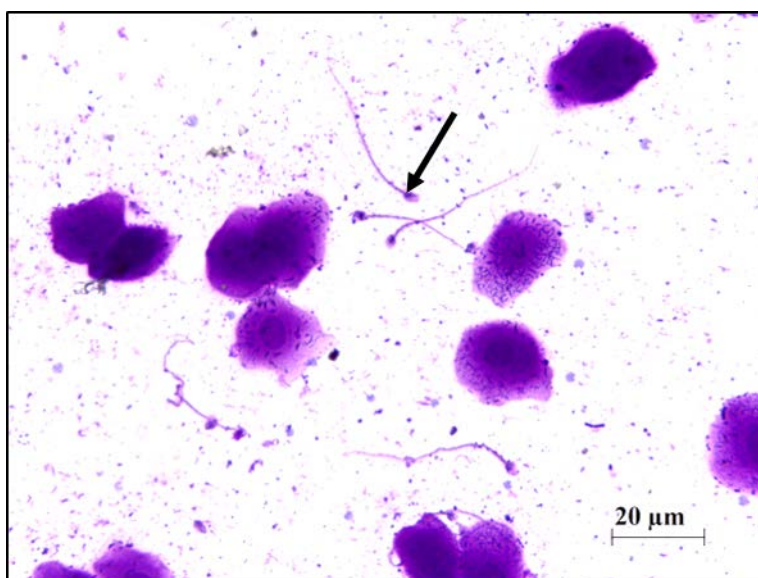


Figura 18 – Confirmação da cópula pela presença de espermatozoides na citologia vaginal. Após 24 horas, considerou-se o primeiro dia de gestação. Coloração panótica rápida. Fonte: acervo do pesquisador.

Para a análise do ciclo estral, considerou-se como o primeiro dia do ciclo aquele período em que determinada fêmea encontrava-se no estro, segundo o qual, apresentava vulva edemaciada e predomínio de células superficiais na citologia. Assim, em cada lâmina citológica corada, foram analisados diversos campos microscópicos, nos quais eram contabilizadas as escamas anucleadas, células superficiais nucleadas, intermediárias, parabasais, basais de modo a se obter um total de 100 células. Além disto, por meio do estabelecimento de cruzes, observou-se, qualitativamente, os leucócitos, bactérias e filamentos de muco; sendo uma, duas e três cruzes, relacionadas com pequena, moderada e grande quantidade, respectivamente.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA O ESTUDO DO CICLO ESTRAL

A análise de variância (ANOVA) para os dados de porcentagem dos diferentes tipos celulares, no exame colpocitológico de preás, foi realizada pelo método dos quadrados mínimos (Da Silva, 1993) usando os modelos lineares gerais do software estatístico Statistical Analysis System (SAS, 1999) para determinar o efeito da presença do macho e da fase do ciclo estral. As comparações entre médias foram realizadas utilizando-se o teste de Tukey. Os dados foram expressos em porcentagem média $\pm$ erro padrão e o nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$. Posteriormente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk ($P = 0,1528$).

A ANOVA foi baseada no seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + F_j + I_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

onde Y_{ijk} é a k -ésima análise colpocitológica realizada no i -ésimo grupo experimental durante a j -ésima fase do ciclo estral, μ é a média geral; M_i é o efeito fixo do i -ésimo tratamento (i = macho ausente, macho presente); F_j é o efeito fixo da j -ésima fase do ciclo estral (j = proestro, estro, metaestro, diestro); I_{ij} é o efeito aninhado da j -ésima fase do ciclo estral dentro do i -ésimo tratamento; ε_{ijk} é o efeito residual que inclui todas as demais fontes de variação não consideradas no modelo.

O efeito da presença do macho sobre a duração de cada fase do ciclo estral foi determinado aplicando-se o teste T de Student por meio da utilização do SAS. Inicialmente, os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-

Wilk e quanto à homocedasticidade das variâncias. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em logaritmo de base decimal.

4.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO-CIRÚRGICO

Os animais utilizados para obtenção de amostras biológicas oriundas da gestação e ainda aqueles em que se objetivou extrair representatividade de cada segmento do sistema reprodutor feminino no tocante ao quantitativo de glicosaminoglicanos em duas fases distintas do ciclo estral foram pesados e posteriormente pré-medicados com a associação de cloridrato de xilazina (1 mg. Kg^{-1}) e cloridrato de cetamina (15 mg. kg^{-1}) por via intramuscular. Após 10 minutos, a eutanásia foi realizada mediante sobredose anestésica de tiopental (150 mg. kg^{-1}) seguida da administração de cloreto de potássio $2,56 \text{ mEq. Kg}^{-1}$ ambos por via intravenosa. Subsequentemente, realizou-se uma incisão longitudinal mediana de forma que se pudesse obter os sacos gestacionais, sistema reprodutor feminino, embriões e fetos.

4.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Realizaram-se fotodocumentações macroscópicas com o auxílio de câmera digital (Nikon D7200[®]) em placentas corioalantoides, membranas fetais, sistema reprodutivo feminino, sacos gestacionais, embriões e fetos, sendo tais amostras obtidas a fresco e também por injeção de látex Neoprene 650 centrifugado. É importante denotar que alguns sacos gestacionais e embriões foram previamente fixados em paraformaldeído a 4% tamponado, cujo intuito objetivou aumentar a rigidez do material e facilitar o procedimento fotográfico. No caso dos animais nos quais injetou-se o látex, perfundiou-se a artéria uterina com látex de cor branca e na veia uterina, de cor azul com o objetivo de promover destaque para a placenta e saco vitelino. Para a análise do desenvolvimento embrionário, utilizou-se lupa estereoscópica trinocular (Opticam[®]).

4.6 DETERMINAÇÕES DOS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS EMBRIONÁRIOS/FETAIS

Conforme descrito, embriões e fetos com idades anteriormente destacadas, foram pesados em balança analítica (Shimadzu AUW220D®) e posteriormente mensurados com paquímetro digital (Mitutoyo®) e fio de algodão. Tais medições, dadas em gramas ou milímetros, levaram em consideração os seguintes parâmetros: peso (em gramas), *Crown-rump* (correspondendo, em linha reta, à distância do crânio à base da cauda), comprimento total (partindo-se da margem anterior das narinas à extremidade da cauda), cefálico (caracterizado da margem anterior das narinas à articulação com o occipital), céfalo-caudal (medido do crânio a base da cauda, seguindo-se a curvatura dorsal), da cauda; circunferência cefálica (medição de circunferência partindo-se de um olho até o outro), diâmetro biparietal (verificado como uma medida, em linha reta, de um olho ao outro), diâmetro do olho, comprimento do olho; comprimentos da orelha, dos membros torácicos e pélvicos, da tíbia e do rádio-ulna, das unhas dos membros torácico e pélvico bem como a largura das unhas destes membros; comprimento dos dentes incisivos superiores e inferiores além dos perímetros abdominal e torácico (medidas das circunferências circunscritas abdominais e torácicas respectivamente).

Vale destacar que medidas como comprimento da orelha foram avaliadas em embriões a partir de 25 dias, enquanto aquelas relacionadas aos comprimentos da tíbia, rádio/ulna, comprimento e largura das unhas dos membros pélvicos e torácicos, ocorreram a partir de embriões com 30 dias. Já para a determinação do comprimento dos dentes incisivos superiores e inferiores, fetos com 35 dias representaram condição limítrofe para a mensuração, ao passo que, para as demais análises, todos os períodos de desenvolvimento foram utilizados (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e recém-nascidos).

Após a realização das referidas mensurações, foram feitas análises de regressão (com o auxílio do programa Origin 8) e caracterizações, de cada variável estudada, de acordo com o tipo de função que esta última determinava, sendo plotados, pois, gráficos de funções linear, quadrática, cúbica, exponencial e sigmoide.

4.7 MATERIAL PARA MICROSCOPIA DE LUZ

O processamento histológico foi realizado no laboratório de Morfofisiologia dos Animais Domésticos e Silvestres e no núcleo de pesquisa do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS), ambos situados na UFERSA, sendo a metodologia empregada baseada em técnicas de histologia preconizadas por Tolosa et al. (2003) com adaptações em função da natureza do material.

Foram processados ovários, tubas uterinas, corpo e cornos uterinos, cérvices, vagina, vulva, sacos gestacionais, embriões, cordão umbilical, placenta e subplacenta. Estas estruturas foram acondicionadas, de forma individual, em frascos contendo paraformaldeído 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,4 durante 24 horas como forma de garantir a fixação. Após esta etapa, cada material foi colocado em cassetes histológicos previamente identificados, seguidos da imersão em etanol 50% “*overnight*” e posterior desidratação em uma série de concentrações crescentes de álcoois (60%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), por uma hora cada. A diafanização foi obtida pela utilização de dois banhos de xilol com duração de uma hora cada. No tocante à parafinização, os materiais foram submetidos a três banhos de parafina histológica (Synt[®], granulada com ponto de fusão 58°C a 62°C, lote: 138199), com intervalo de permanência em cada banho de uma hora. Subsequentemente, o material foi incluído em uma nova parafina a 58°C para obtenção dos blocos e consequente produção dos cortes com espessura de cinco micrômetros em micrótomo (LEICA RM 2125 RT[®]). Os cortes foram então aderidos em lâminas de vidro e deixados em estufa a 60°C “*overnight*”. Posteriormente, foram realizadas colorações das lâminas seguindo a técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (P.A.S) para análise em microscópio óptico (LEICA DM 500[®]) sendo as imagens analisadas e fotomicrografadas.

4.7.1 Reações imunohistoquímicas para o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e vimentina

Para as reações imunohistoquímicas, optou-se pela reação do PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) na verificação da capacidade mitogênica do embrião e

de células endodérmicas viscerais; e a vimentina, utilizada para evidenciar os vasos vitelínicos deste epitélio e regiões do labirinto placentário. Ambas as reações se basearam em detecções de moléculas específicas a partir de reações antígeno/anticorpo.

Os cortes do saco gestacional após serem aderidos em lâminas silanizadas foram imersos em concentrações decrescentes de etanol para posterior bloqueio da peroxidase endógena pela utilização de peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos. Após esta etapa, o material foi imerso em tampão citrato a 0,1 M e pH 6 e submetido a irradiações por micro-ondas a 700 MHz durante 15 minutos. Posteriormente, realizaram-se lavagens do material em tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,4, sendo em seguida, adicionado proteína Dako para bloquear reações inespecíficas.

A reação do PCNA e vimentina foi evidenciada pela incubação do material com anticorpo monoclonal de camundongo anti-PCNA humano (PC 10, sc-56, diluição 1:800; Santa Cruz Biotechnology, California, U.S.A) e anticorpo monoclonal de camundongo anti-vimentina humano (V9, sc-6260, diluição 1:200; Santa Cruz Biotechnology, California, U.S.A) respectivamente em câmara úmida a 4°C “*overnight*”. Desta forma, revelaram-se estas reações pela incubação com anticorpo secundário, representado por anticorpo conjugado com a biotina e posterior adição do complexo avidina e substrato cromogênico (diaminobenzidina), sendo 30 minutos a duração desta última etapa. As lâminas foram montadas com o uso de Permount® (Fisher Scientific).

4.7.2 Imunolocalização dos GAGs nos tecidos: ovarianos, tubáricos, vaginais, uterinos, placentários e subplacentários

Os cortes de cinco micrômetros do sistema reprodutor e órgão placentário foram aderidos em lâminas previamente silanizadas, sendo realizada, em seguida, a desparafinização em xilol, reidratação em concentrações decrescentes de etanol (100 a 15%) e ainda imersão em tampão fosfato por cinco minutos (PBS; 137 mμ NaCl/2.7 mμ KCl/4.3 mμ Na₂HPO₄/1.4 mμ KH₂PO₄; pH 7.3). A exposição antigênica dos tecidos analisados foi realizada em tampão citrato (10 mM pH 6,0 a 60° C por 5 minutos) e posteriormente, duas lavagens em PBS foram realizadas. Para bloqueio da peroxidase endógena e reações inespecíficas foram utilizadas solução de metanol com 3% de

peróxido de hidrogênio (durante 10 minutos) e reagente imunológico (RUO) ABC Elite VECTASTAIN (Vector Laboratories) respectivamente. Subsequentemente, as lâminas contendo os cortes aderidos foram incubadas com anticorpo primário a 4°C por 20 horas em câmara úmida, condição esta que possibilitou a realização da expressão tecidual dos glicosaminoglicanos mediante utilização posterior de anticorpos contra os seguintes antígenos: condrotin sulfato (Anticorpo monoclonal [CS-56], Abcam), heparan sulfato (Anticorpo monoclonal [SPM255], Abcam), dermatam sulfato (Anticorpo policlonal de coelho, Sigma-Aldrich) e ácido hialurônico (Anticorpo policlonal de ovelha, Abcam). Finalmente, as quatro últimas etapas consistiram na incubação do referido material com anticorpo secundário universal (Anti-Mouse/Anti-Rabbit/Anti-Goat IgG (H+L), Universal Pan-Specific, Vector Laboratories) por 45 minutos, amplificação do sinal por meio da adição do complexo avidina-biotina (kit Vectastain Elite ABC®, Vector Laboratories), visualização da reação mediante o uso do Vector NovaRed® e montagem das lâminas com o auxílio do VectaMount Permanent® (Vector Laboratories).

As imagens mais representativas decorrentes das marcações imunohistoquímicas foram analisadas e registradas em microscópio óptico (LEICA DM 500®).

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

4.8.1 Microscopia eletrônica de varredura

As análises por meio da microscopia eletrônica foram realizadas no laboratório de histologia do setor de anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e no laboratório de microscopia eletrônica do Centro de Pesquisas em Ciências Vegetais do Semiárido Nordestino (CPVSA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Um blastocisto aos seis dias de gestação, dois embriões com idades de 25 e 30 dias, sacos gestacionais aos 15, 20, 35, 40 e 45 dias, dois ovários gestantes e um não gestante, útero, vagina e vulva foram fixados em glutaraldeído 2,5% tamponado com fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,4 e lavados em tampão de fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,4. Em seguida, realizou-se a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% tamponado com fosfato

de sódio 0,1 M e pH 7,4, por duas horas. Finalizada a pós-fixação, as amostras foram submetidas a três lavagens na solução tampão anteriormente citada e duas, com água destilada. Subsequentemente, realizou-se tratamento com ácido tânico 1% e desidratação em série de álcoois (etanol) com diferentes concentrações (50%, 70%, 90% e 100%).

As etapas finais do referido processamento consistiram na secagem em aparelho de ponto crítico - utilizando gás carbônico (CO₂) -, montagem do material em suporte do ponto de amostra (Stub) e recobrimento metálico com ouro por “*sputtering*”, para observação em microscópio eletrônico de varredura (LEO VP® 435 – Carl-Zeis, Oberkochen, Germany) na USP e TESCAN® vega 3 LMU na UFERSA, sendo as imagens mais representativas, eletromicrografadas.

4.8.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Para análise ultraestrutural, utilizaram-se fragmentos com 0,5 cm² da placenta vitelina (em região de aposição entre os endodermas visceral e parietal) bem como da placenta corioalantoide, no décimo quinto dia da gestação, para visualização das células cito e sinciciotrofoblásticas. Estes foram fixados em glutaraldeído a 2,5% tamponado e pós-fixados em tetróxido de ósmio. Após este procedimento, os fragmentos foram lavados em solução tampão de fosfato de sódio e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico: 50%, 70%, 80%, 90% e 100%.

Os fragmentos foram submetidos a lavagens em óxido de propileno sob rotação e depois, imersos em óxido de propileno e resina Spurr. Finalmente, foram colocados em contato com resina Spurr pura, em moldes específicos, para polimerização. Obtidos os blocos, foram realizados cortes semifinos com 0,4 µm de espessura em ultramicrotomo automático (Ultracut R, Leica Microsystems - Germany), corados com azul de Toluidina a 1% para identificação de regiões específicas de interesse para o trabalho de forma a possibilitarem a realização dos cortes ultrafinos.

Posteriormente, cortes de 0,07 µm de espessura foram coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila saturado a 2% e citrato de chumbo a 0,5%. O material foi analisado em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268D, FEI Company, The Netherlands; Mega View III câmera, Soft Imaging, Germany).

4.9 EXPRESSÃO DOS GAGS

4.9.1 Extração dos glicosaminoglicanos

O material coletado para análise qualitativa e quantitativa dos GAGs (ácido hialurônico, condroitim, dermatam e heparam sulfatos) consistiram em órgãos como ovários, tubas uterinas, cornos uterinos, cérvices, vaginas, vulvas, placentas e subplacentas, os quais foram acondicionados em tubos específicos contendo acetona PA e, em seguida, deixados para secagem por meio da evaporação do referido solvente à temperatura de 28°C após a realização de duas trocas da acetona.

Posteriormente, cada amostra supracitada foi triturada e macerada em gral e pistilo, cujo intuito foi a obtenção de pó finamente granular. Este procedimento tornou possível a adequada pesagem de cada material, sendo as determinações de 5mg para cada ovário ou tuba uterina, e as de 20mg para as demais estruturas. Tal condição favoreceu a reação proteolítica da prozima, a qual foi adicionada num volume específico de 200µL em cada frasco de material macerado, sendo esta reação ocorrida em banho maria (QUIMIS®) à 60°C por 48 horas. A enzima em questão foi previamente preparada mediante a utilização desta - numa concentração de 3mg/mL-, seguida da sua diluição numa solução de Tris à 99% (Tris HCL 0,05M em pH 8,0 diluída em NaCl 0,15M).

Após esta etapa, as amostras foram colocadas em banho de gelo e sofreram a adição de 150µL de ácido tricloroacético à 90% (TCA) por 20 minutos de modo a propiciar a precipitação de ácidos nucléicos e peptídeos. Em seguida, realizou-se a centrifugação em centrífuga refrigerada (Solab SL-701®) sob uma força G de 5000 por 20 minutos à 10°C, sendo o precipitado resultante descartado e ao sobrenadante, após mensuração do volume remanescente, adicionado solução de metanol PA na proporção de dois volumes deste álcool para cada volume de amostra.

Finalmente, após um período de 24 horas, cada amostra foi congelada com o auxílio de nitrogênio líquido e acoplada de imediato em liofilizador (Terroni LS 3000®) por três dias ou até completa secagem, sendo enviados, em banho de gelo (4°C), ao Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (BIOPOL-UFRN), onde processou-se a eletroforese. O protocolo de

extração foi padronizado pelo BIOPOL/UFRN mediante adaptações de Medeiros et al. (2000) e Bezerra et al. (2004).

4.9.2 Eletroforese de polissacarídeos em gel de agarose

O processamento para este método de separação consistiu na ressuspensão das amostras em 15µL de água destilada para ovários e tubas, e 30µL deste diluente, para os demais órgãos. Seguiu-se a eletroforese em gel de agarose mediante o método preconizado por Jaques et al. (1968) e modificado por Dietrich e Dietrich (1976). O referido gel foi preparado à 0,55%, cuja solução diluidora foi o tampão 1,3 diamino propano acetato 0,05M, pH 9,0 (PDA) e a solução resultante foi deixada para solidificação em lâmina de vidro à temperatura de 26°C. Estava pronto, então, o meio específico para aplicação das amostras e solução padrão (solução com concentração de 1mg/ml contendo uma mistura de condroitim, dermatam e heparam sulfatos).

Para esta técnica, as amostras foram organizadas por órgão e por idade. Desta forma, órgãos como ovários, tubas uterinas, cornos, corpos, cérvices, vaginas, vulvas e placentas, nos quais foram obtidos uma quantidade maior de idades gestacionais – do dia cinco até os 55 dias de gestação, com intervalo de cinco dias cada e perfazendo-se um total de 11 amostras -, foram aplicados em géis de agarose que recobriam lâminas grandes com capacidade para até doze aplicações. No caso da subplacenta, foi possível a obtenção de oito idades gestacionais – do vigésimo dia até os 55 dias, com intervalo de cinco dias cada -, sendo as respectivas aplicações ocorridas também em lâminas grandes. Além disto, realizou-se estudo comparativo entre duas fases do ciclo estral: estro e diestro. Para tanto, em cada fase, realizou-se a separação e quantificação dos GAGs em órgãos reprodutivos (ovários, tubas, cornos, corpos, cérvices, vaginas e vulvas), sendo que as aplicações foram realizadas em géis que recobriam lâminas grandes ou pequenas, cuja capacidade para até oito aplicações era possível. Seguiu-se tais aplicações, de cada órgão e de cada idade, sempre se obedecendo uma mesma sequência: iniciava-se da direita para à esquerda, da menor idade gestacional para a maior, finalizando-se, na última aplicação, com a utilização da solução padrão.

A lâmina preparada foi colocada em cuba de eletroforese horizontal que, por sua vez, continha dois suportes de agarose para repouso da lâmina, em área central, onde era

acrescido à benzina PA; e duas regiões opostas que continham os eletrodos positivo e negativo, capazes de gerarem um campo elétrico, mediante ação de uma fonte de corrente elétrica, de modo a proporcionar a migração dos GAGs ao longo do gel. Estes locais opostos da cuba continham solução de PDA. Todo o sistema era resfriado à 4°C com a utilização de gelo sintético e submetido a uma voltagem de 5V/cm por 50 minutos, tempo este suficiente para a corrida das amostras e solução padrão.

Decorrido este período, as lâminas foram retiradas da cuba e colocadas em recipiente contendo solução de brometo de cetiltrimetilamônio à 0,1% (Cetavlon) durante 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi seco com o auxílio de calor e ventilação para as etapas subsequentes de coloração e descoloração utilizando-se do azul de toluidina à 0,1% e uma solução contendo ácido acético 1% em álcool etílico 50%, respectivamente, sendo o gel aderido na lâmina, deixado para secagem em temperatura ambiente. As lâminas contendo os géis secos e corados foram escaneadas para digitalização das imagens e análise dos resultados.

Deste modo, as frações que contiveram polissacarídeos sulfatados desenvolveram coloração roxa característica, devido à capacidade de interação entre os grupamentos sulfatos e o azul de toluidina. Os açúcares assim obtidos foram caracterizados baseando-se em suas corridas ao longo do gel e comparados frente a solução padrão de concentração conhecida.

4.9.3 Quantificação dos GAGs em cada amostra

No tocante a quantificação dos GAGs, realizou-se o tratamento das imagens digitais pós-escaneadas com o auxílio do programa ImageJ win64 versão 1.45, o qual possibilitou a inversão das imagens e equalização de histogramas compatíveis com cada área selecionada, que correspondia a região de cada banda eletroforética separada, traduzida como intensidade de pixels, em termos de Unidades Arbitrárias de Densitometria (UAD). Tais valores médios, possibilitaram a verificação do comportamento quantitativo, ao longo da gestação bem como entre duas fases do ciclo estral (estro e diestro), dos glicosaminoglicanos sulfatados por meio de gráficos de modo a possibilitar inferências relativas a este processo.

5 RESULTADOS

Os resultados que se seguem foram sequenciados em sintonia aos objetivos propostos como forma de proporcionar as principais informações referentes aos processos reprodutivos, que ocorrem na espécie em questão, e ainda fornecer subsídios que auxiliem ou melhorem a sua sustentabilidade.

5.1 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DO APARELHO REPRODUTOR FEMININO EM PREÁS

O sistema reprodutor feminino de preás apresentou-se composto por um par de ovários, tubas uterinas; dois cornos uterinos, o corpo do útero, cérvix, vagina e vulva (Figura 19).

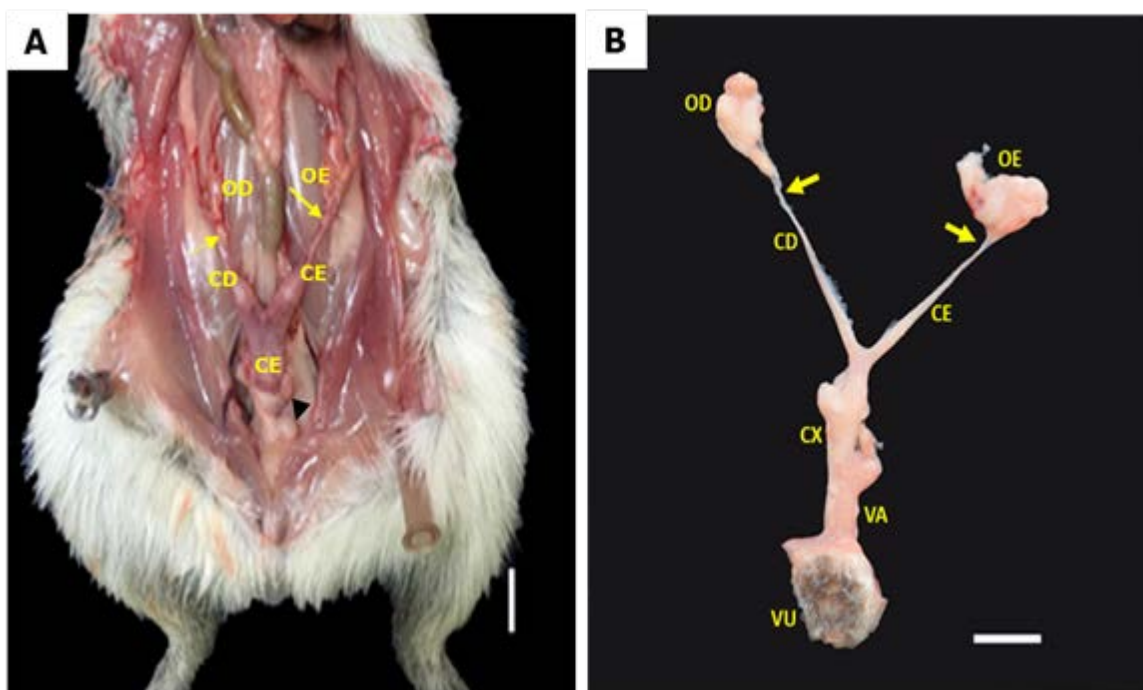


Figura 19 – Sistema reprodutor feminino de preás *in situ* (figura A) e *ex situ* (figura B). OD: ovário direito; OE: ovário esquerdo; tubas uterinas (setas); CD: corno uterino direito; CE: corno uterino esquerdo; CX: cérvix uterina; VA: vagina; VU: vulva. Cabeça de seta na figura A: bexiga urinária. Barra das figuras A e B: 1cm. Fonte: Acervo do pesquisador.

Os ovários encontravam-se conectados a parede abdominal pelo ligamento mesovário, apresentaram morfologia variando do elipsoide a irregular, superfície rugosa, coloração rosa - contendo muitas regiões pálidas, em decorrência do envoltório parcial de tecido adiposo, - e estavam localizados na região sublombar, caudalmente aos rins.

Aparentemente não houve diferença na estrutura de ovários gestantes quando comparados aos de fêmeas não gestantes (Figuras 20A, B, C, D, E, F, G, H e I). Ambos apresentaram a túnica albugínea que revetiu o epitélio germinativo (Figura 20A), um proeminente corpo lúteo e folículos em diferentes estádios maturativos, incluindo os primordiais (Figura 20E), antrais (Figuras 20A, D, E e I) e maduros (Figuras 20A, B, C, D, E, F, G e I). Neste último, evidenciou-se um ócito sustentado pelas células foliculares do *cumulos oophorus* e envolto por células da corona radiata (figura 20G e I).

O folículo primordial localizou-se na região cortical e apresentou-se constituído por um ovócito que continha um núcleo grande, esférico e com nucléolo evidente, sendo tal gameta envolto por camada simples de células foliculares achatadas (Figura 21A).

Em seguida, pela proliferação das células foliculares, a estrutura do folículo passou de uni para multilaminar. Paralelamente, surgia uma camada amorfa que envolveu o oócito -zona pelúcida- (Figura 21D) e por meio das células foliculares, acumulou-se certa quantidade de líquido (Figura 21B e D) que, por sua vez, induziu a formação de uma cavidade também denominada antro folicular, nos folículos antrais (Figura 21B). Subsequentemente, verificou-se uma reorganização das células foliculares que passaram a apoiar o oócito (*cumulos oophorus*) e envolve-lo (corona radiata) (Figuras 21C e D) bem como do estroma para formar as tecas foliculares (Figura 21F).

Nos folículos maduros, foram observados corpúsculos polares, os quais apresentaram pequeno diâmetro e encontravam-se imersos no líquido folicular, nas proximidades do oócito (Figura 21D e F).

Outra situação merecedora de destaque foi a presença das regiões cortical e medular, esta última dotada de extenso leito vascular (Figura 21E).

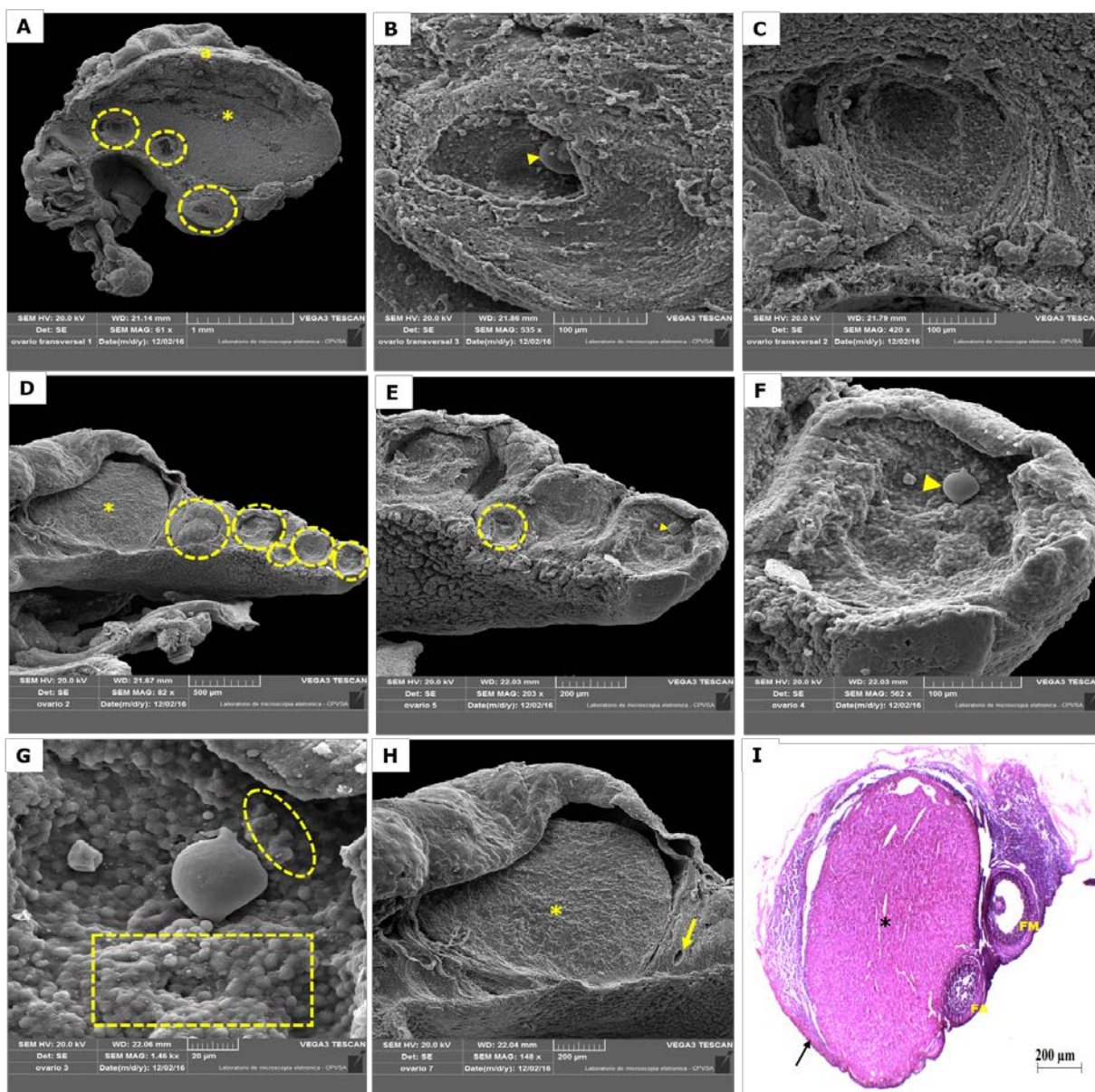


Figura 20– Ovários de preás, oriundos de fêmea não gestante (Figuras A, B e C) e gestante (Figuras D, E, F, G, H e I) em corte transversal. A: observa-se um grande corpo lúteo (*), folículos ovarianos em diferentes estágios maturativos (elipses tracejadas) e a túnica albugínea (a). As figuras B e C representam grandes aumentos de dois folículos ovarianos da figura anterior, sendo possível, na primeira, a detecção de um oócito no interior folicular; ao passo que em C, não se evidenciou tal gameta feminino. As figuras D, E, F, G e H caracterizaram, em aumentos microscópicos crescentes, um corpo lúteo (*), folículos em diferentes estágios de maturação (elipses tracejadas), sendo o destaque promovido na figura E compatível com folículo primordial. As figuras E, F e G destacaram um folículo maduro contendo o oócito (cabeça de seta) sustentado pelas células da granulosa que, possivelmente, encontrou-se representada, em sua porção inferior, pelo *cumulus oophorus* (células foliculares identificadas pelo retângulo tracejado) e envolvido pela corona radiata (camadas de células foliculares destacadas na elipse tracejada). Em H: destacou-se o corpo lúteo (*) e um vaso sanguíneo (seta). Em I: notou-se um proeminente corpo lúteo (*), a albugínea (seta) e dois folículos ovarianos, sendo um deles maduro (FM) e o outro antral (FA). Figuras A, B, C, D, E, F, G e H: microscopia eletrônica de varredura. Figura I: microscopia de luz com corte histológico corado em hematoxilina e eosina (HE). Fonte: Acervo do pesquisador.

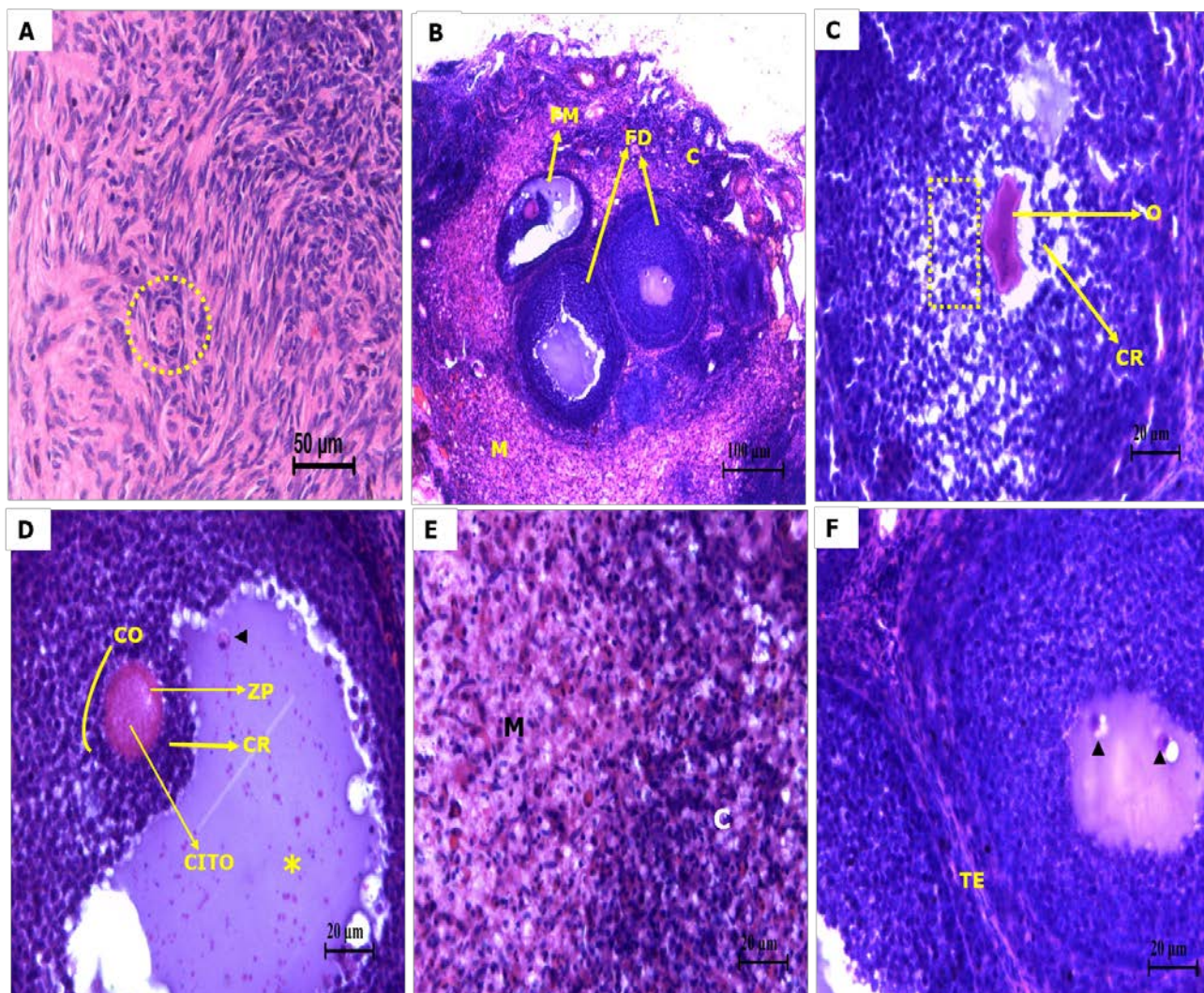


Figura 21– Ovários de préas, oriundos de fêmeas gestantes em início de gestação. A: evidencia-se, em destaque, um folículo primordial (círculo tracejado). B: observam-se três folículos ovarianos, sendo um deles maduro (FM) e dois em desenvolvimento (FD). Notar ainda as regiões de córtex (C) e medula (M) ovarianas. C: estrutura de um folículo ovariano maduro. Notar a presença do oócito (O), células foliculares do *cumulos oophorus* (retângulo tracejado) e da corona radiata (CR). Em D: folículo maduro apresentando: células do *cumulos oophorus* (CO), da corona radiata (CR), líquido folicular (*), corpúsculo polar (cabeça de seta). Verificar também a zona pelúcida (ZP) e citoplasma (CITO) do oócito. E: regiões do córtex (C) e medula (M) do ovário. Em F: neste folículo maduro evidenciou-se dois corpúsculos polares (cabeças de seta) e a região da teca (TE). Figuras A, B, C, D, E e F: microscopia de luz com corte histológico transversal corado em hematoxilina e eosina (HE). Fonte: Acervo do pesquisador.

As tubas uterinas gestantes foram caracterizadas como pequenos ductos convolutos, divididos nos segmentos: istmo, ampola e infundíbulo, que promoviam a conexão entre os ovários e cornos uterinos.

Histologicamente, as tubas apresentaram uma mucosa dotada de numerosas dobras longitudinais na região do infundíbulo. Seu revestimento consistiu de epitélio colunar simples e de uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo. Além desta, a parede da tuba era composta de uma camada circular de músculo liso e uma serosa de lâmina visceral de peritônio (Figuras 22C, D, E e F).

O istmo apresentou discretos processos digitiformes da mucosa, projetados para a luz do órgão, cujo revestimento constituiu-se por epitélio cilíndrico simples que se apoiava em tecido conjuntivo frouxo, seguido por espessa camada muscular lisa que continha fibras bem organizadas (Figura 22A). Já a região da ampola, apresentou poucas projeções mucosas e uma muscular bem desenvolvida (Figura 22B).

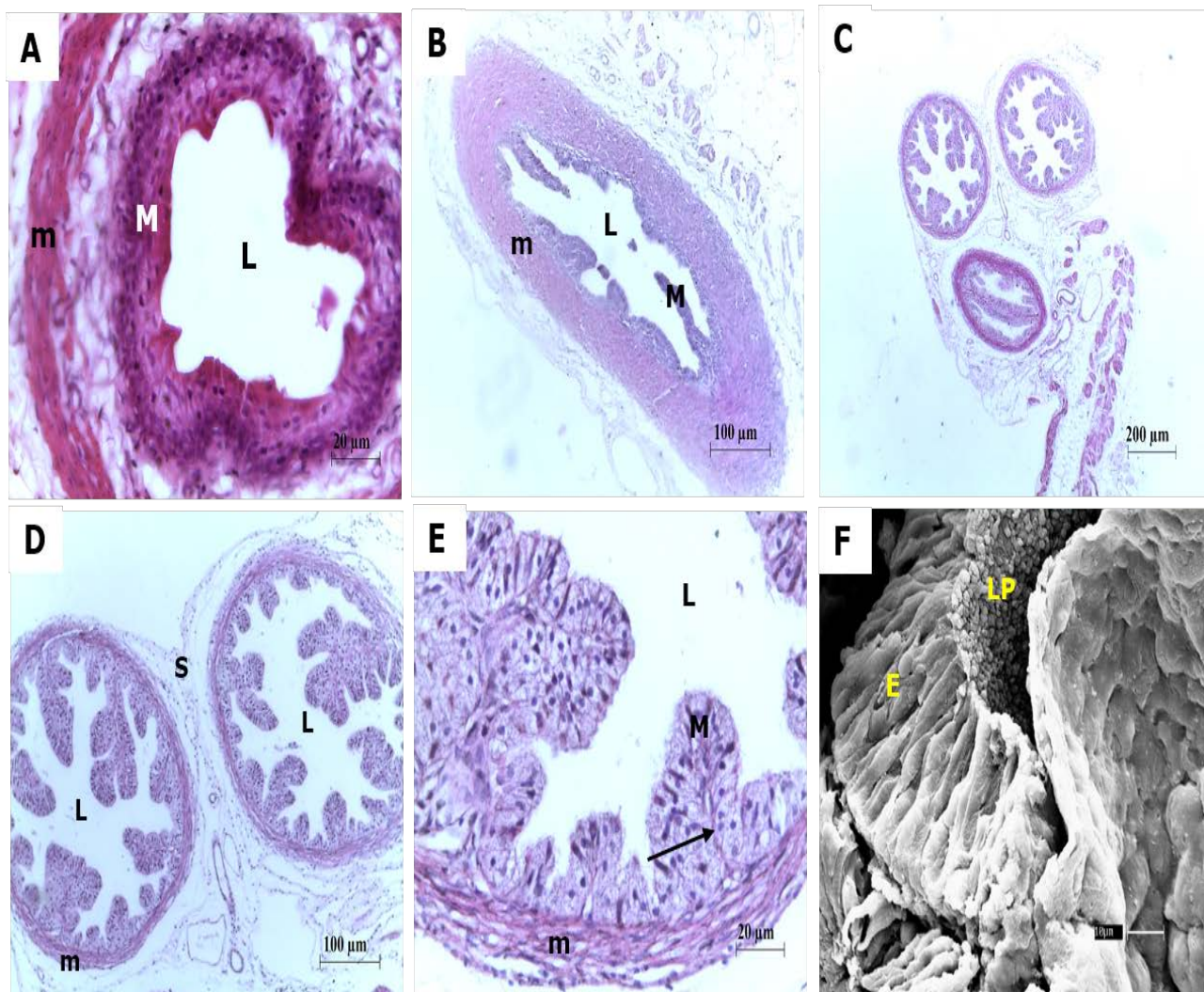


Figura 22– Tubas uterinas oriundas de fêmeas gestantes de preás. Em A (início da gestação): notar a luz do oviduto (L), a mucosa (M) e camada muscular (m) na região do istmo. Em B (meio da gestação): evidenciam-se projeções da mucosa direcionadas para a luz da tuba na região da ampola. As figuras C, D, E e F representam tubas no final da gestação na região do infundíbulo. Notar a crescente formação tortuosa das dobras da mucosa e a serosa (S) que envolve a estrutura tubular. E e F: detalhe das dobras da mucosa no qual se evidencia o epitélio (E), a lâmina própria que o sustenta (seta na figura E e LP na figura F) e a muscular (m). Figuras A, B, C, D e E: cortes histológicos transversais corados em hematoxilina e eosina (HE). Figura F: microscopia eletrônica de varredura. Fonte: Acervo do pesquisador.

No caso do útero de preá, este localizou-se em região sublombar, caudal aos rins, estendendo-se até a pelve, onde se aproximou dorsoventralmente da bexiga urinária e apresentou-se constituído por dois longos cornos uterinos retilíneos, os quais convergiam para a formação de uma câmara única, porém separada em regiões direita e esquerda do corno, em decorrência da presença de um septo de tecido conjuntivo. Disto resultou a presença de dois óstios independentes que se comunicavam com uma cérvix única, a qual, por sua vez, continha um óstio que se abria na vagina.

A dissecação do útero não gestante a fresco e ainda os achados obtidos por meio da microscopia eletrônica de varredura estabeleceram que o referido septo dividia o corno em duas porções, direita e esquerda, não sendo verificado corpo do útero (Figuras 23A, B e C). A cérvix, em análise ultraestrutural, mostrou-se intensamente pregueada (Figuras 23A, C e D).

Ademais, num saco gestacional, aos 30 dias de gestação, observaram-se estruturas uterinas transformadas pela reação decidual, em decorrência da invasão blastocística e estabelecimento placentário. Disto resultou na formação das decíduas basal – situada abaixo da placenta corioalantoide – e parietal, que contornava o saco vitelino visceral (Figura 23E).

A análise histológica revelou que os cornos uterinos, em posição distal à cérvix, possuíam revestimento epitelial, na luz do órgão, o qual era constituído por células epiteliais cilíndricas, em arranjo pseudoestratificado, que apoiavam-se em tecido conjuntivo frouxo (Figuras 24A, B, C, D, E, F, G, H e I). Tal conformação manteve-se constante ao longo da gestação, excetuando-se o calibre tubular que aumentou de forma acentuada.

No caso dos cornos uterinos situados proximalmente à cérvix, verificou-se que o epitélio evidenciado foi unilaminar e cilíndrico (Figuras 25A, B, C, D, E e F) que era sustentado por tecido conjuntivo frouxo (Figuras 25B, C, E, F, H e I), sendo este último apoiado por conjuntivo denso não modelado (Figuras 25E e F). O septo foi revestido, externamente, por epitélio prismático simples e internamente, constituído por conjuntivo frouxo (Figuras 25G, H e I). Desta forma, as duas cavidades formadas tornavam-se propícias ao acúmulo de secreções uterinas, em especial, o muco (Figura 25G e H).

A cérvix, em corte transversal na região do óstio cervical externo – que termina no fórnix e finalmente se comunica com a vagina-, apresentou uma luz contendo pregas revestidas por epitélio cilíndrico simples mucosecretor, sustentado em tecido conjuntivo frouxo que, por sua vez, envolvia glândulas tubulosas. Além disto, observou-se uma tendência ao aumento proliferativo das células secretoras conforme a gestação progredia (Figuras 26A, B, C, D, E, F, G, H e I).

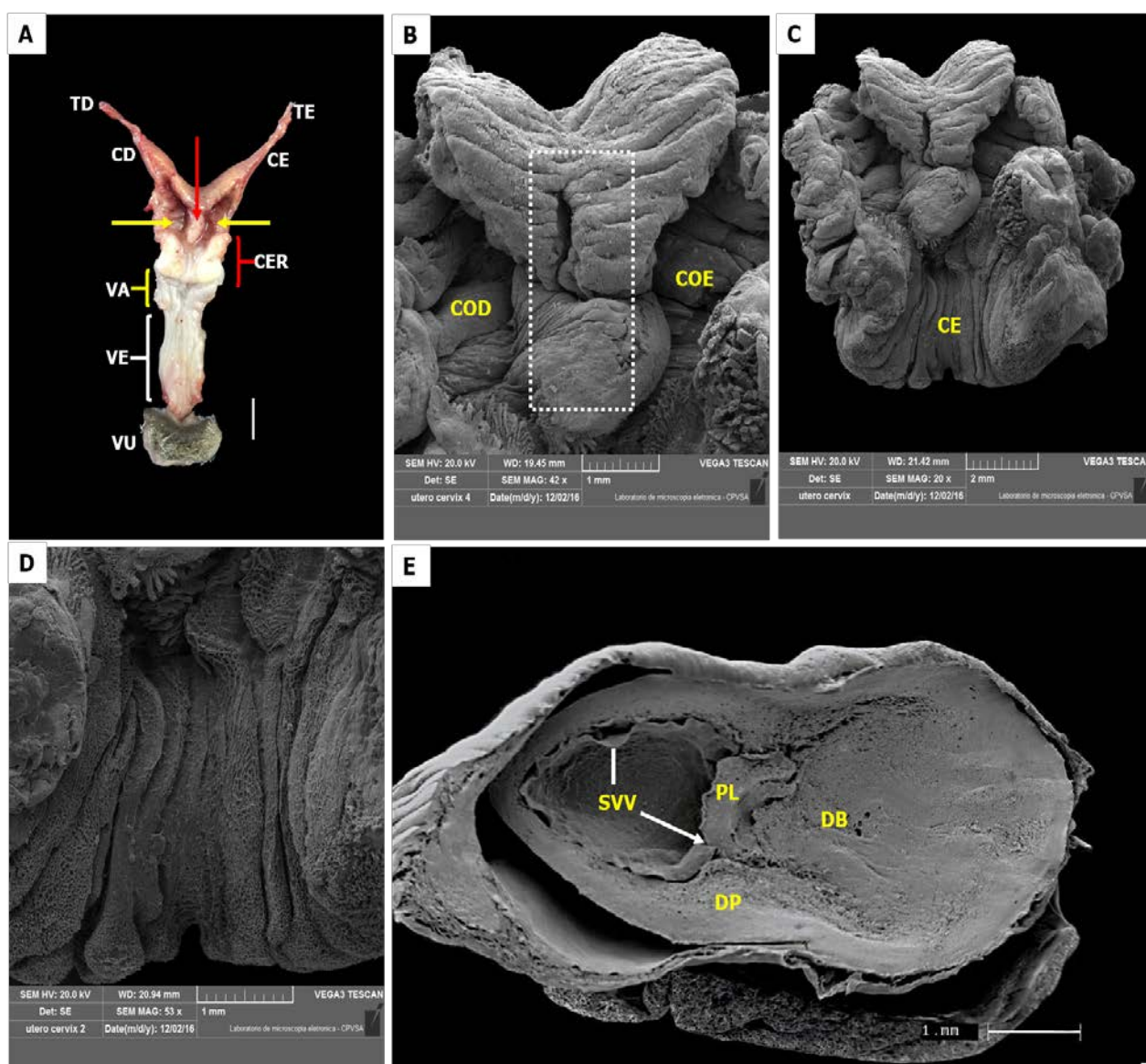


Figura 23– Útero de preás, oriundos de fêmeas não gestantes (figuras A, B, C e D) e saco gestacional contendo estruturas uterinas (figura E). Em A: representação do aparelho reprodutor feminino dissecado para facilitar o entendimento dos seus componentes. TD: tuba uterina direita; TE: tuba uterina esquerda; CD: corno uterino direito; CE: corno uterino esquerdo; CER: cérvix; VA: vagina; VE: vestibulo da vagina; VU: vulva. Notar também o septo uterino (seta vermelha) o qual divide o útero em dois cornos, direito e esquerdo (setas amarelas). Figuras C e D: detalhe do septo uterino (retângulo tracejado) e os cornos do útero assim formados (COD: corno do útero direito e COE: corno do útero esquerdo). Figuras C e D: observou-se a cérvix uterina (CE) contendo muitas dobras. Em E: saco gestacional aos 30 dias onde pode ser observada a disposição espacial do saco vitelino visceral (SVV) e sua inserção (seta) na placenta corioalantoide (PL). Notar ainda a localização da decídua basal (DB) e parietal (DP). O SVV mantém estreita relação com a PL e o útero caracterizando uma estrutura anatômica favorável aos processos absorptivos. Figura A: fotodocumentação macroscópica do parelho reprodutor feminino. Barra: 1cm. Figuras B, C, D e E: Microscopia eletrônica de varredura. Fonte: Acervo do pesquisador.

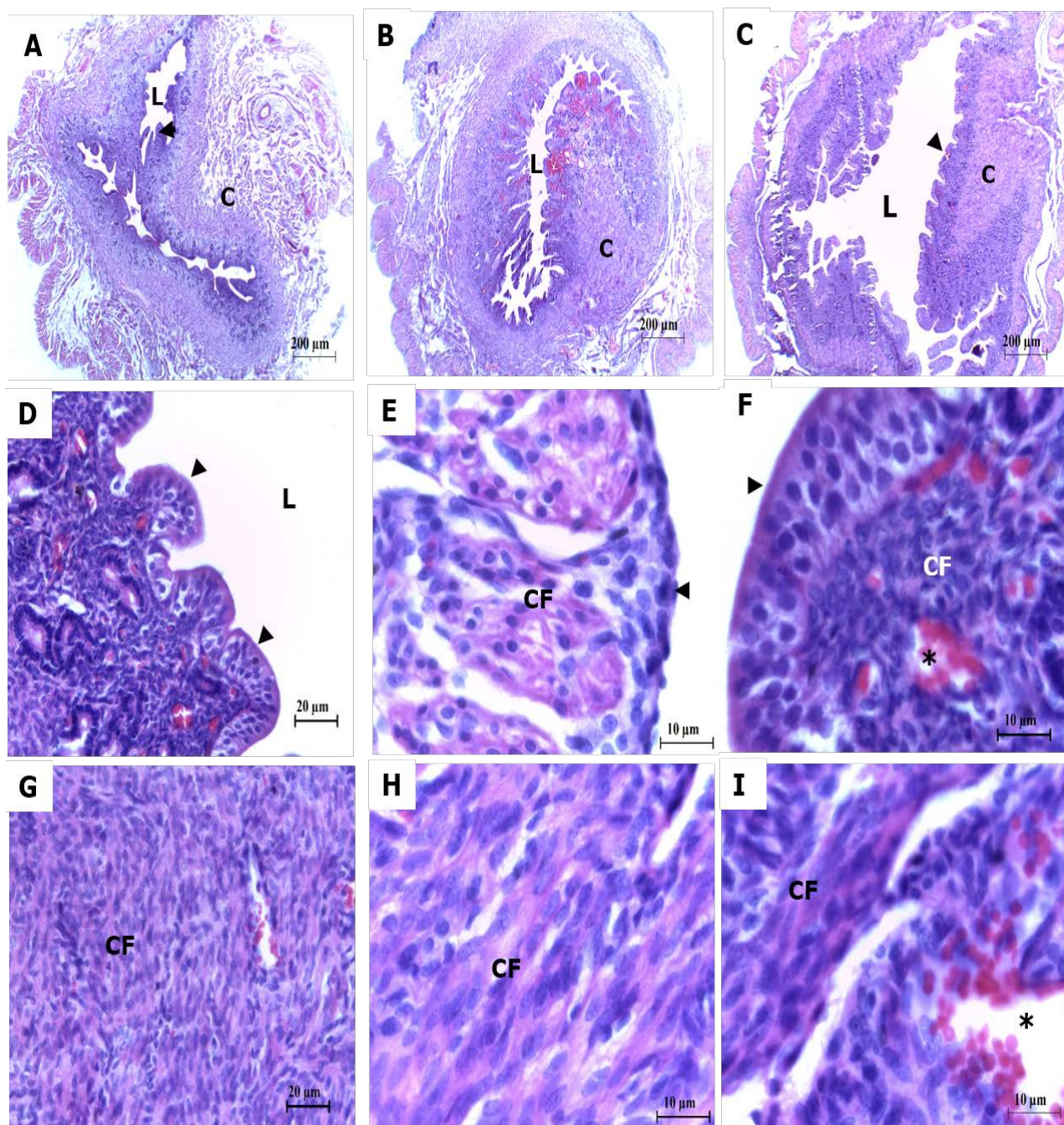


Figura 24– Microscopia de luz com coloração em hematoxilina e eosina (HE) dos cornos uterinos em região distal à cérvix (corte transversal) em início (figuras A, D e G), meio (figuras B, E e H) e fim (figuras C, F e I) da gestação. Figuras A, B e C: observar a luz do órgão (L), o epitélio de revestimento (cabeça de seta) e conjuntivo (C) associado. A arquitetura tecidual permanece sem alterações ao longo da gestação. Notar, nas figuras D, E, F, G, H e I, o epitélio de revestimento (cabeça de seta) e tecido conjuntivo frouxo (CF) que o sustenta. Figuras F e I: o * representa vasos sanguíneos no conjuntivo. Fonte: Acervo do pesquisador.

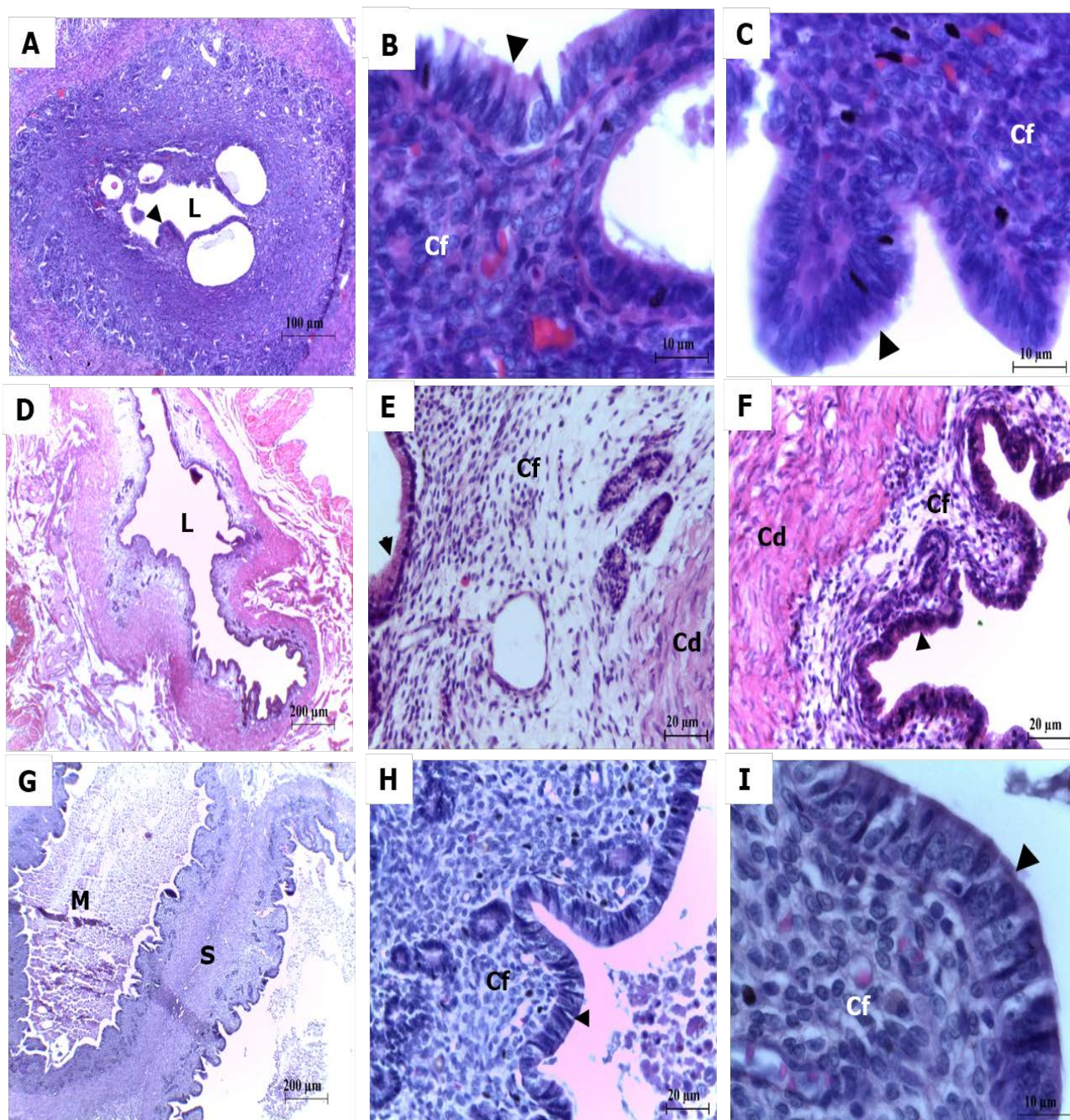


Figura 25– Microscopia de luz com coloração em hematoxilina e eosina (HE) do corno uterino em região proximal à cérvix (corte transversal). Figuras A, B e C: observar a luz do órgão (L), o epitélio de revestimento (cabeça de seta) e conjuntivo frouxo (Cf) associado. Figuras D, E e F: notar o epitélio de revestimento (cabeça de seta), conjuntivo frouxo (Cf) e denso não modelado (Cd). Figuras G, H e I: verificar o septo (S) de tecido conjuntivo frouxo (Cf) que divide o corno do útero em duas câmaras, nas quais acumulam-se secreções (M). As cabeças de setas referem-se ao epitélio que reveste os dois lados do septo. Fonte: Acervo do pesquisador.

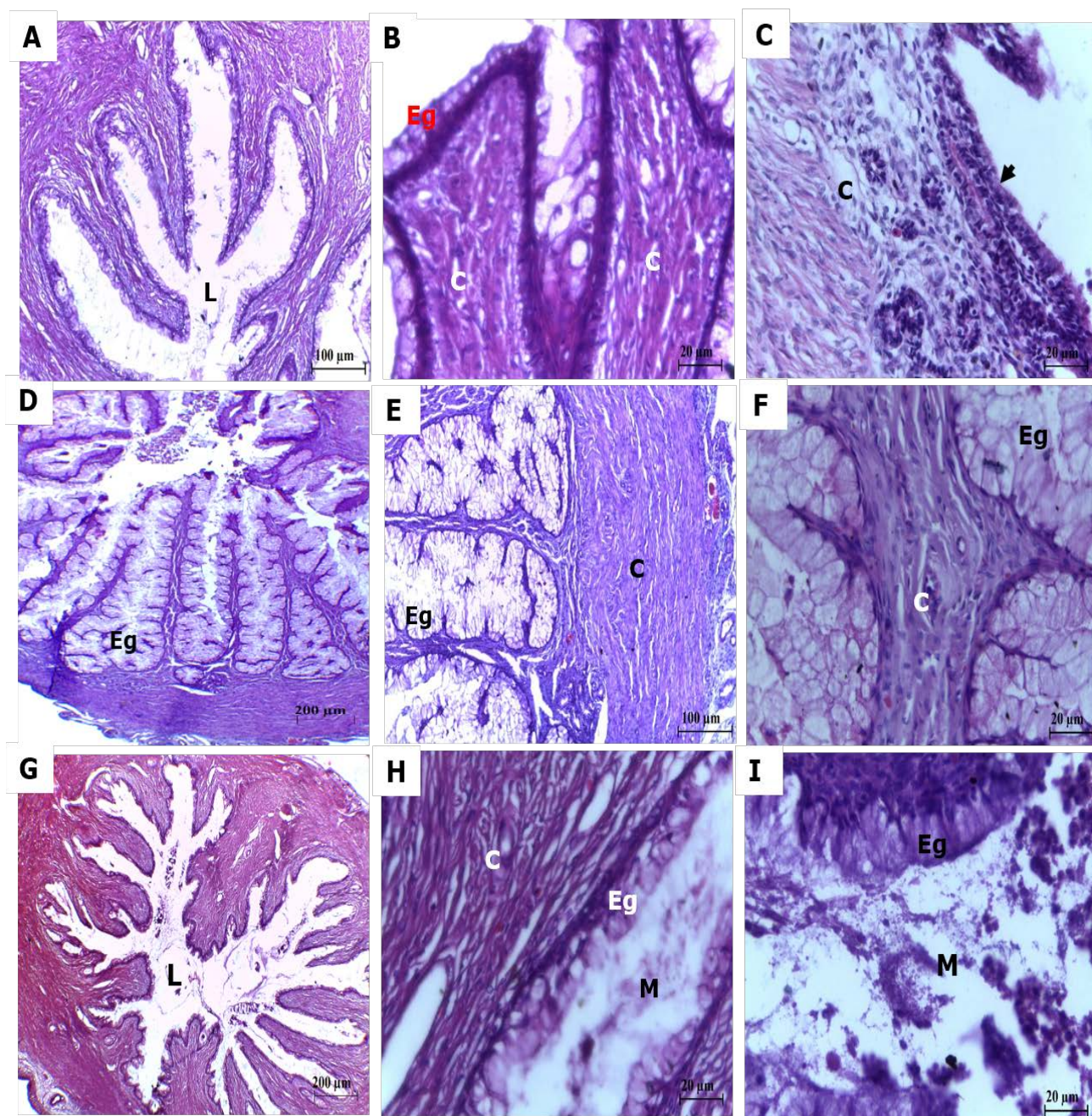


Figura 26– Microscopia de luz com coloração em hematoxilina e eosina (HE) da cérvix uterina (corte transversal) em início (figuras A, B e C), meio (figuras D, E e F) e fim (figuras G, H e I) da gestação. Figuras A, B e C: observar a luz do órgão (L), o epitélio de revestimento (cabeça de seta), conjuntivo frouxo (C) associado e camada unilaminar de epitélio glandular (Eg). Do meio para o fim da gestação verificou-se tendência ao aumento do desenvolvimento do tecido glandular secretor. Eg: epitélio glandular. C: conjuntivo. M: muco. Fonte: Acervo do pesquisador.

Seguindo-se a estrutura tubular do colo uterino, observou-se, em continuidade, a vagina, a qual, em sua região proximal, apresentou a região do fórnix vaginal e juntamente com a uretra continuavam-se, em tubo comum (seio urogenital ou vestibulo

vaginal), até a superfície externa da genitália (Figura 27A). A região vestibular apresentou-se extremamente pregueada conforme se verifica ultraestruturalmente nas figuras 27C. A região da cérvix comunicou-se com a vagina mediante a presença de um óstio único (Figura 27B). Já a vulva, apresentou-se constituída pelo clitóris e lábios vulvares (Figuras 28A, B, C e D).

A microscopia de luz revelou que o vestíbulo da vagina apresentou revestimento interno de epitélio cúbico simples, seguidos de glândulas imersas em tecido conjuntivo frouxo (Figuras 27D e E) além de musculatura estriada esquelética em disposição circular (Figuras 27D, F e G). Ao final da gestação, observou-se riqueza de epitélio glandular e intensa produção de muco como se verifica nas figuras 27H e I.

Em relação a genitália externa foi possível observar o clitóris (Figura 28A), a abertura vulvar ou orifício vaginal, o qual era circunscrito pelos lábios vulvares e, na porção inferior, a comissura posterior (Figuras 28B e C).

A microscopia de luz dos lábios vulvares revelou epitélio glandular, conjuntivo frouxo e musculatura estriada esquelética (Figuras 28D e E).

Na região do clitóris verificou-se a presença de formações cartilaginosas, cujos agrupamentos de condrócitos estiveram delimitados por camadas simples de melanócitos (Figuras 28F e G).

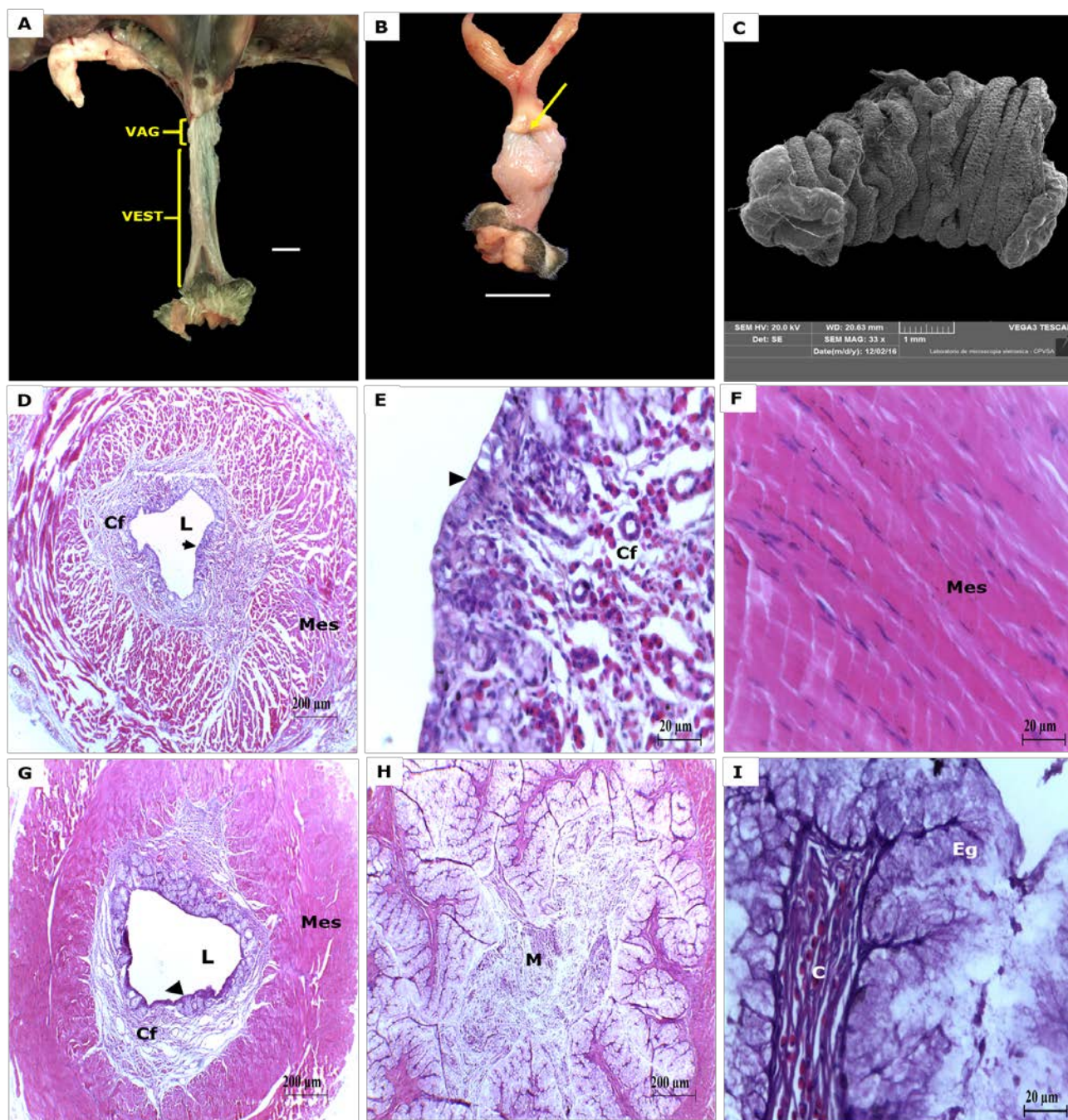


Figura 27– Macroscopia da vagina e vestibulo (figuras A e B), análise ultraestrutural do vestibulo (figura C) em fêmeas não gestantes e histologia convencional do vestibulo vaginal no início (figuras D, E e F), meio (figura G) e fim (figuras H e I) da gestação. A: verificar a vagina (VAG) e seu vestibulo (VEST). Este último, apresentou-se extremamente pregueado conforme se verifica nas figuras B e C. Em B: verificou-se o óstio (seta) que promove a comunicação entre a cérvix e a vagina. Além disto, ao longo da gestação, verificou-se a presença da luz do vestibulo (L), o epitélio de revestimento (cabeças de setas), a musculatura estriada esquelética (Mes) e a riqueza de epitélio glandular (Eg) com atividade secretória ao final da gestação como se observa pela intensa produção de muco (M). Notar ainda, na figura I, a lâmina própria de tecido conjuntivo (C) que sustenta o epitélio secretor anteriormente citado. Figuras A e B: macroscopia. Barras: 1cm. Figuras B e C: microscopia eletrônica de varredura. Figuras D, E, F, G, H e I: microscopia de luz com coloração em hematoxilina e eosina (HE). Fonte: Acervo do pesquisador.

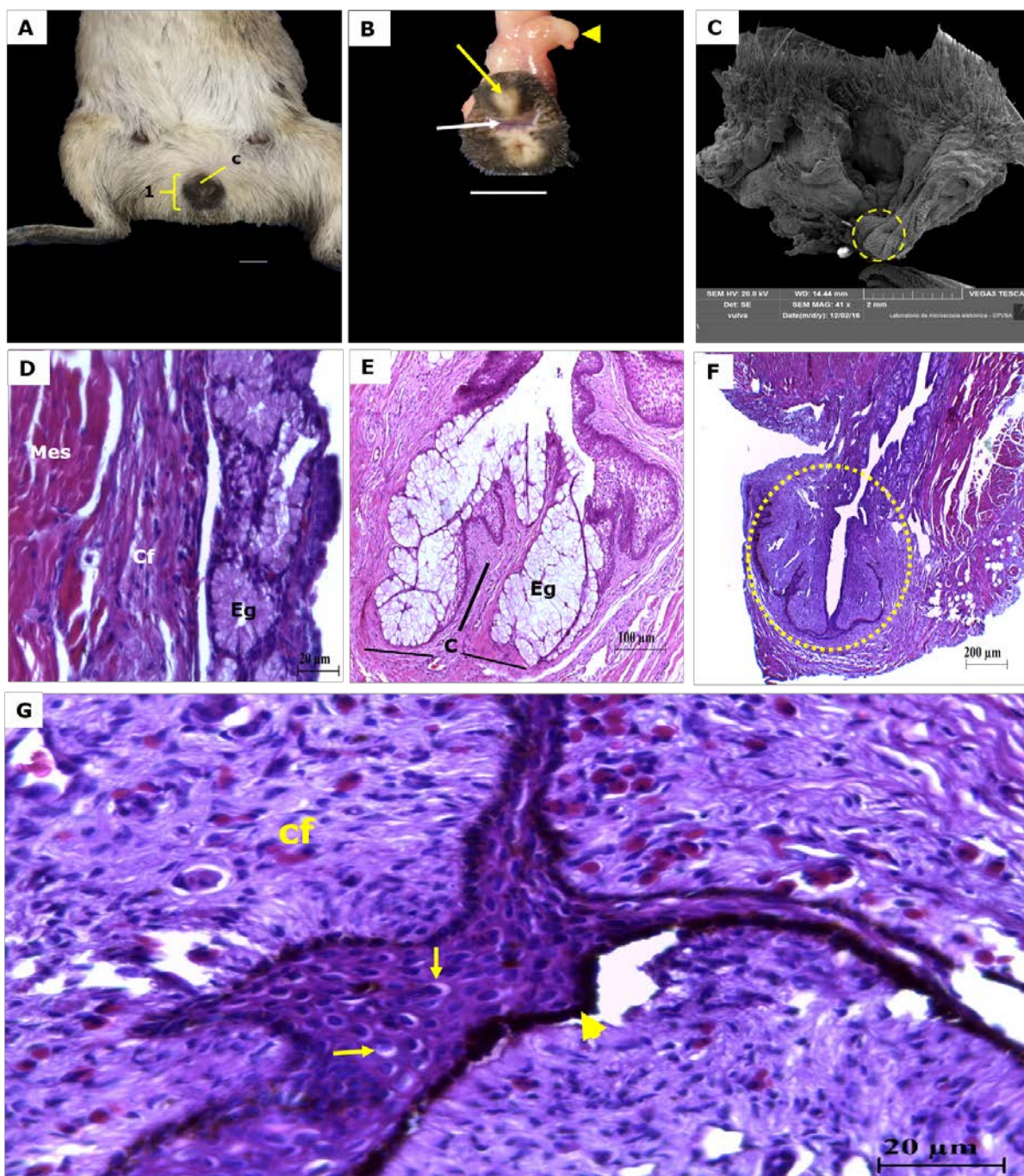


Figura 28– Vulva de preás em fêmea gestante. A: notar o aspecto macroscópico da genitália externa. 1: vulva e c: clitoris. B: detalhe do canal uretral situado no clitoris (seta amarela), canal vaginal (seta branca) e bexiga (cabeça de seta). C: detalhe tridimensional da vulva indicando a sua abertura (orifício vaginal) e região de comissura posterior (elipse tracejada). D: região vulvar apresentando epitélio glandular (Eg), conjuntivo frouxo (Cf) e musculatura estriada esquelética (mes). E: notar a riqueza de epitélio glandular (Eg) e tecido conjuntivo frouxo associado (C). As figuras F e G referem-se a região do clitoris onde verificou-se a presença de tecido conjuntivo frouxo e formação cartilaginosa (setas), as quais estiveram delimitadas por camada unilaminar de melanócitos (cabeça de seta). Figuras A e B: macroscopia. Barras: 1cm. Figura C: microscopia eletrônica de varredura. Figuras D, E, F e G: microscopia de luz com coloração em hematoxilina e eosina (HE). Fonte: Acervo do pesquisador.

5.2 DURAÇÃO DA GESTAÇÃO E NÚMERO DE PARIÇÕES

A duração da gestação em preás apresentou média de 59 dias e desvio padrão de 2,7487 nas cinco fêmeas utilizadas para este fim, parindo de um (20%) a dois filhotes (80%).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL EM PREÁS

A espécie em análise (dez fêmeas do outro experimento) apresentou ciclo sexual poliétrico contínuo, cujo período médio foi $14,8 \pm 0,73$ dias (12-16) (n=5) para as fêmeas mantidas em contato com o macho e $14,6 \pm 0,75$ dias (13-17) (n=5) para aquelas isentas do efeito deste último, não sendo verificadas diferenças estatísticas significativas ($P>0,05$) entre as fêmeas dos dois grupos analisados (Tabela 3).

Por outro lado, comparando-se cada fase do ciclo com a respectiva duração e ainda os dois grupos experimentais, verificou-se que a presença do macho influenciou, significativamente, a fase de diestro, a qual se apresentou mais longa ($4,0 \pm 0,63$ dias) como se observa na tabela 3.

Tabela 3 – Efeito da presença do macho sobre a duração das fases do ciclo estral (média $\pm$ erro padrão, dias) de preás.

Fase do ciclo estral	Grupos experimentais	
	Macho presente	Macho ausente
Proestro	4,0 $\pm$ 0,55	3,0 $\pm$ 0,89
Estro	3,2 $\pm$ 0,49	4,0 $\pm$ 0,55
Metaestro	3,6 $\pm$ 0,68	5,2 $\pm$ 0,58
Diestro *	4,0 $\pm$ 0,63	2,4 $\pm$ 0,24
Ciclo estral	14,8 $\pm$ 0,73	14,6 $\pm$ 0,75

*P<0,05

O ciclo estral foi também caracterizado por meio da análise descritiva de acordo com o padrão da citologia esfoliativa do epitélio vaginal bem como dos elementos figurados associados como leucócitos, filamentos de muco e bactérias como demonstra o parágrafo a seguir.

Nesse sentido, denominaram-se as células descamativas vaginais como sendo, em ordem decrescente de maturação: células superficiais anucleadas (escamas anucleadas), contendo morfologia poligonal, citoplasma eosinofílico, delimitado e ausência de núcleo - muitas vezes podendo serem encontradas granulações basofílicas resultantes da cariorrexe (fragmentação nuclear) – (Figuras 29B, C e D) ; células superficiais nucleadas, dotadas de formato poligonal, limites citoplasmáticos bem definidos, citoplasma levemente basofílico ou eosinofílico e núcleo pequeno, contendo cromatina finamente granulosa (Figura 29B) ou acentuadamente condensada (picnose nuclear) (Figura 29D); células intermediárias, possuindo forma variando do redondo ao poligonal, citoplasma basofílico, limites celulares pouco definidos, núcleo pequeno, porém maior do que na célula superficial, e cromatina finamente granular (Figuras 29A, E, F, G, H e I); células parabasais, caracterizadas por serem basofílicas, redondas e de moderada relação

núcleo/citoplasma (Figuras 29A, E, F, G, H e I); células basais, redondas, acentuadamente basofílicas, diminutas em tamanho e com elevada relação núcleo/citoplasma (Figuras 29G, H e I).

O início do proestro caracterizou-se pelo predomínio de células parabasais e intermediárias bem como pela presença de bactérias e leucócitos (Figura 29A), sendo o final deste período, similar a fase estrogênica.

Durante o estro, observaram-se numerosas células superficiais, cujos percentuais, por diversas ocasiões, ultrapassavam 80%, no tocante a celularidade deste tipo. Nesta fase, houve predomínio das escamas anucleadas em detrimento das superficiais nucleadas (Figuras 29B, C e D). Outro aspecto importante consistiu na ausência de leucócitos e presença de bactérias, estas últimas em pequeno número ou até mesmo não sendo visualizadas em alguns esfregaços citológicos (Figura 29D).

Posteriormente, na fase de metaestro, verificaram-se grande quantidade de células intermediárias, neutrófilos e bactérias, seguidas de regular quantidade de células parabasais (Figuras 29E e F).

Por fim, no diestro, verificou-se a predominância de células basais, parabasais e intermediárias. Os esfregaços apresentaram-se com o aspecto “sujo” mediante intensa produção de muco vaginal bem como pela grande quantidade de neutrófilos e bactérias (Figuras 29G, H e I).

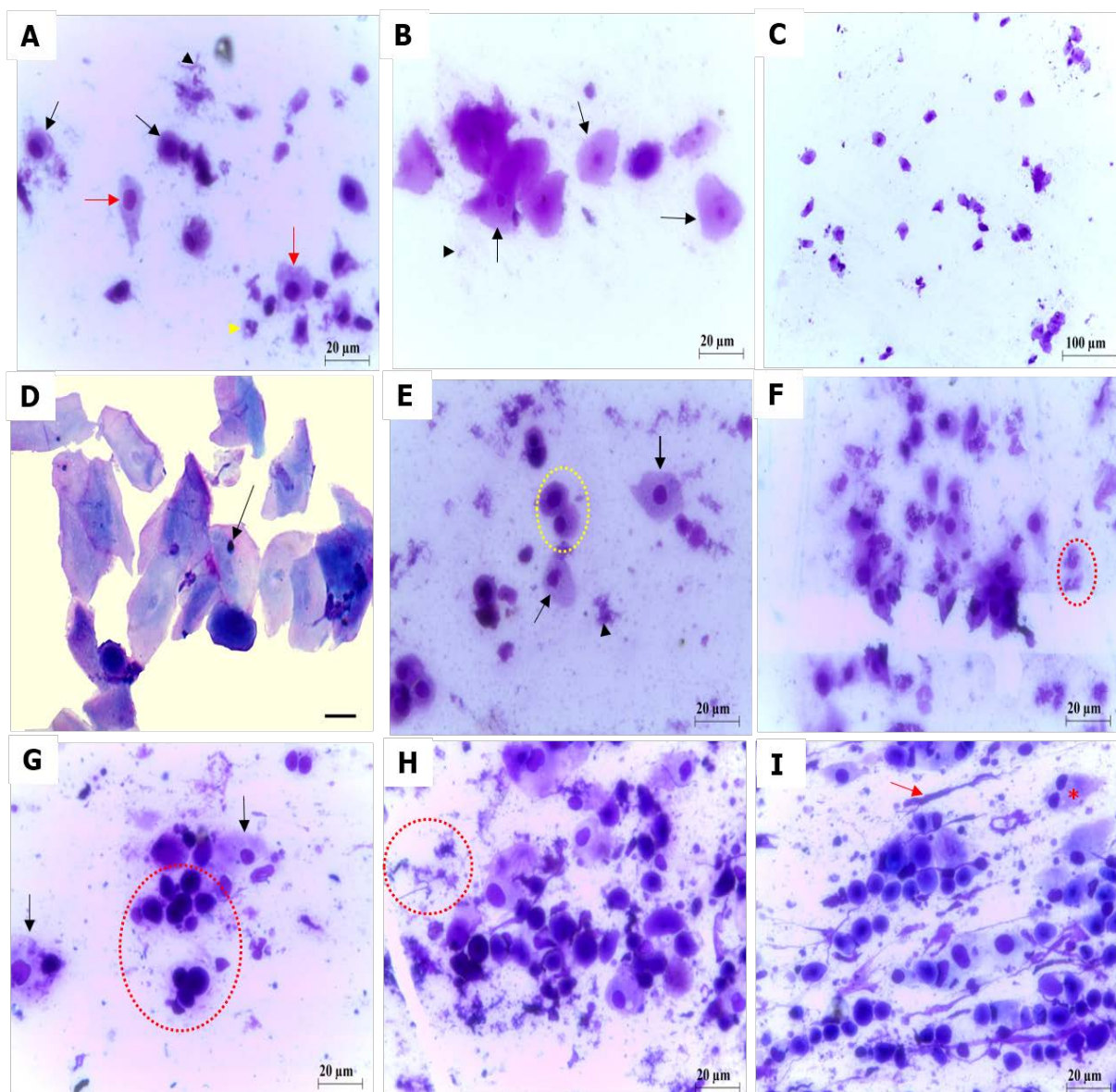


Figura 29– Fases do ciclo estral em fêmeas de preás. Em A: Proestro inicial. Observam-se células parabasais (setas pretas) e intermediárias (setas vermelhas) como predominantes desta fase. Notar ainda a presença de bactérias (cabeça de seta preta) e um neutrófilo (cabeça de seta amarela). Figuras B, C e D: Estro. Em B: evidenciam-se três células superficiais nucleadas contendo cromatina finamente granular (setas) e o restante, constituído por células superficiais anucleadas (escamas anucleadas). Observar ainda a presença de bactérias (cabeça de seta). Em C: no transcorrer do estro, ocorre aumento da descamação de células superficiais, presença de bactérias e ausência de leucócitos. Em D: notar o predomínio das escamas anucleadas e apenas uma célula superficial contendo núcleo picnótico (seta). Tal esfregaço apresentou fundo limpo, ou seja, isento de bactérias e leucócitos. Barra desta figura: 20µm. As figuras E e F remetem a fase de metaestro em estágio inicial e avançado, respectivamente. Em E: verificar duas células parabasais justapostas (elipse tracejada), duas células intermediárias (setas) e bactérias (cabeça de seta). Em F: nota-se o predomínio de células intermediárias, de diferentes tamanhos, seguidas das células parabasais. As bactérias e leucócitos também estiveram presentes, sendo dois destes últimos, representados pela elipse tracejada. As figuras G, H e I caracterizaram o diestro. Em G: observar duas células intermediárias (setas) e o aparecimento de células basais (elipse tracejada), as quais predominaram nesta imagem. Seguiu-se, nas figuras H e I, aumento progressivo na quantidade de células profundas (basais) e a presença de bactérias (elipse tracejada na figura H), filamentos de muco (seta na figura I), numerosos neutrófilos e uma célula intermediária binucleada (* na figura I) além de células parabasais. Os esfregaços citológicos vaginais foram corados mediante coloração panótica rápida. Fonte: Acervo do pesquisador.

Além disso, por meio do cálculo percentual das médias gerais dos tipos celulares identificados pela citologia vaginal, foi possível observar, na fase de estro, que os percentuais de escamas anucleadas e superficiais nucleadas ($59,42 \pm 1,48$ % e $15,84 \pm 0,79$, respectivamente) representaram mais de 70% da celularidade total, ao passo que no diestro, as células profundas (parabasais e basais), cujos percentuais médios foram $30,65 \pm 1,06$ % e $18,67 \pm 0,87$ %, respectivamente, estiveram constituindo quase a metade de todas as células identificadas e contabilizadas nessa fase. Ademais, as fases de proestro e metaestro demonstraram-se semelhantes no que se refere a celularidade encontrada, sendo as médias de células superficiais nucleadas maiores no proestro e as intermediárias, superiores no metaestro (Figura 30).

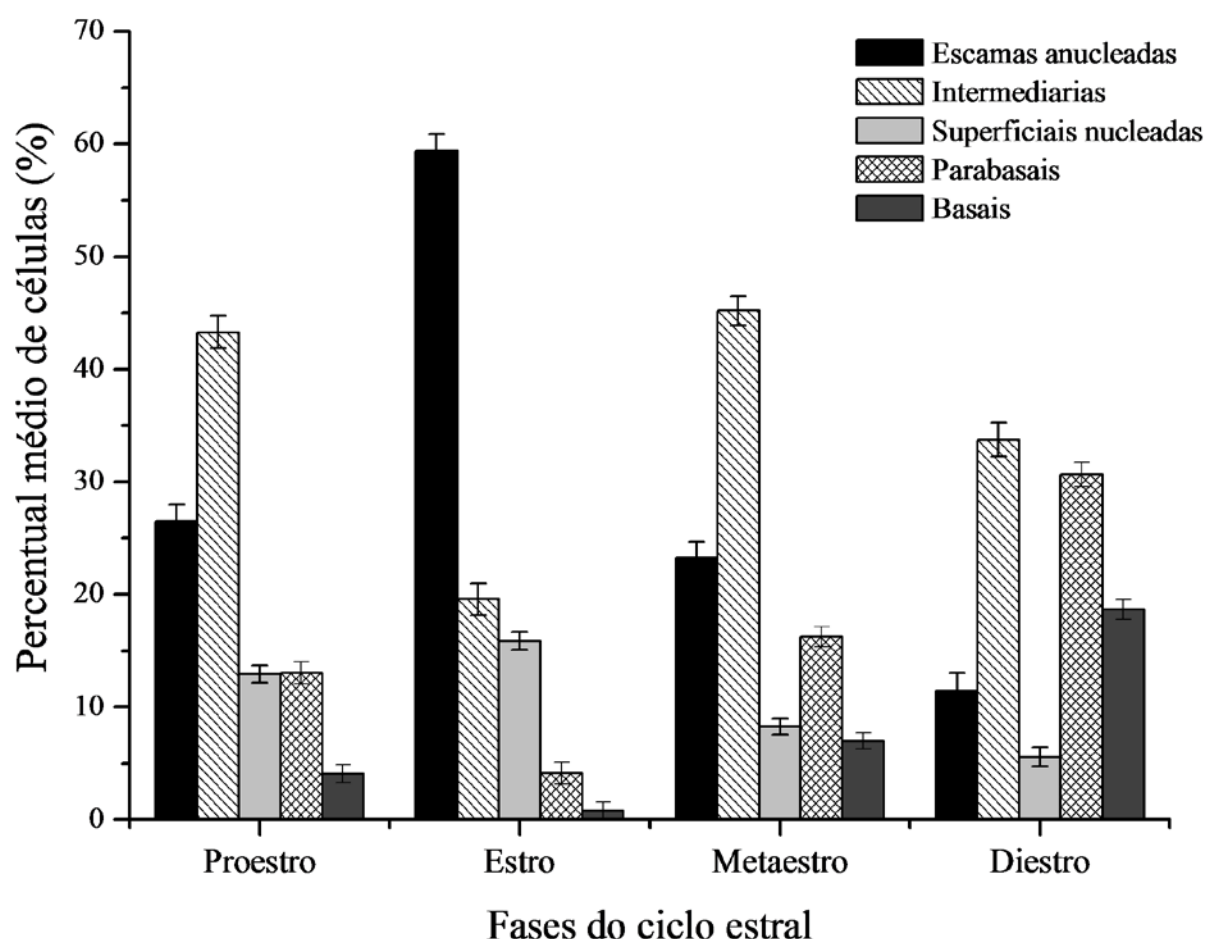


Figura 30 – Percentual médio geral dos diferentes tipos celulares identificados pelo método colpocitológico durante as fases do ciclo estral de preás.

5.3.1 Avaliação do ciclo estral em preás após análise estatística

A contagem (porcentagem) de escamas anucleadas sofreu efeito significativo ($P<0,05$) da interação entre tratamento (macho ausente, macho presente) e fase do ciclo estral (Figura 31). A diferença entre os tratamentos foi observada no proestro, com as fêmeas mantidas na presença do macho ($35,05\pm1,97\%$) apresentando uma porcentagem média de escamas anucleadas superior à daquelas privadas da presença do macho ($18,00\pm2,28\%$). No estro foram registrados os maiores valores médios em ambos os tratamentos, $59,19\pm2,21\%$ para as fêmeas mantidas com o macho e $59,65\pm1,97\%$ para aquelas sem a presença deste último. O grupo com o macho presente apresentou menor valor médio de escamas anucleadas na fase diestro ($14,55\pm1,97\%$). Por outro lado, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos no proestro ($18,00\pm2,28\%$) e diestro ($8,33\pm2,55\%$) para o grupo em que o macho esteve ausente.

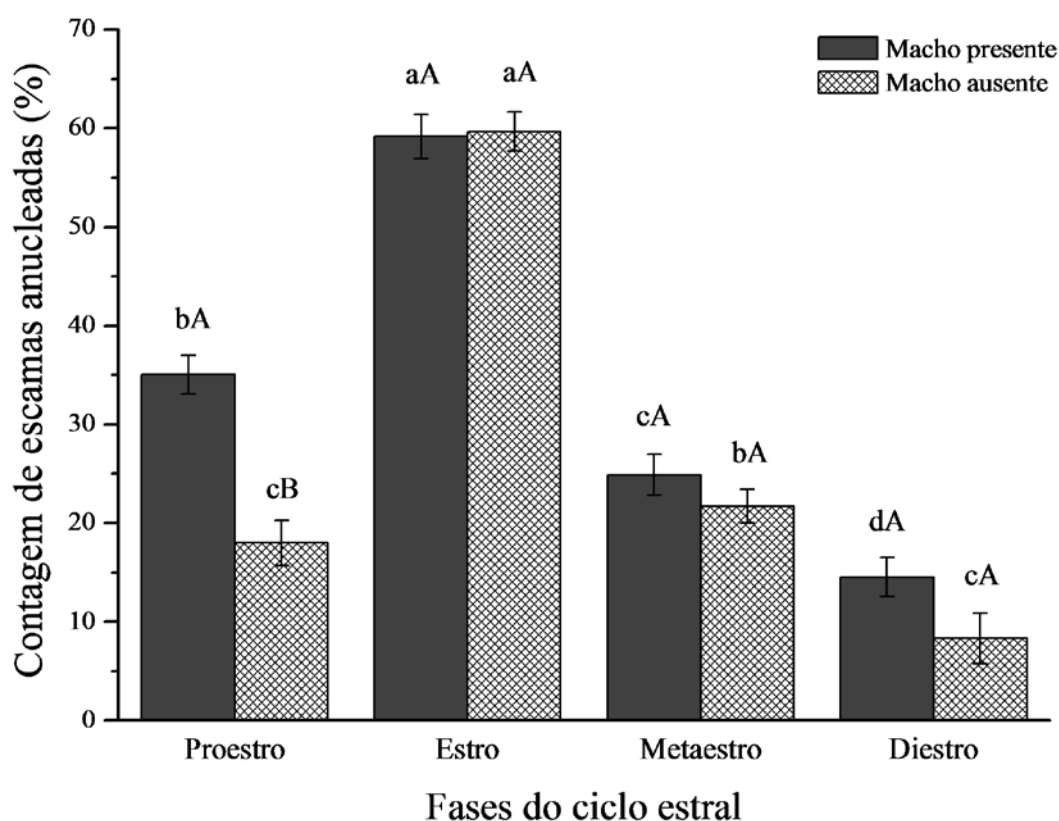


Figura 31 – Efeito do macho sobre a contagem média de escamas anucleadas pelo método colpocitológico em preás nas diferentes fases do ciclo estral. Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada grupo experimental (macho presente, macho ausente) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais dentro de cada fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro, diestro) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

As células intermediárias também sofreram efeito significativo ($P<0,05$) da interação entre tratamentos e fase do ciclo estral (Figura 32). No proestro, as fêmeas mantidas isoladas do macho apresentaram uma porcentagem média ($48,73\pm 2,17\%$) significativamente superior àquela encontrada no grupo com o macho presente ($37,85\pm 1,88\%$). Naquele grupo, não foi observada diferença significativa no valor médio de células intermediárias entre as fases proestro e metaestro ($46,34\pm 1,65\%$), sendo a menor média obtida no estro ($18,45\pm 1,88\%$). No grupo de fêmeas mantidas na presença do macho não foram encontradas diferenças significativas para esse tipo celular entre o proestro ($37,85\pm 1,88\%$), metaestro ($44,05\pm 1,98\%$) e diestro ($30,75\pm 1,88\%$), sendo o estro a fase com a menor média ($20,69\pm 2,10\%$).

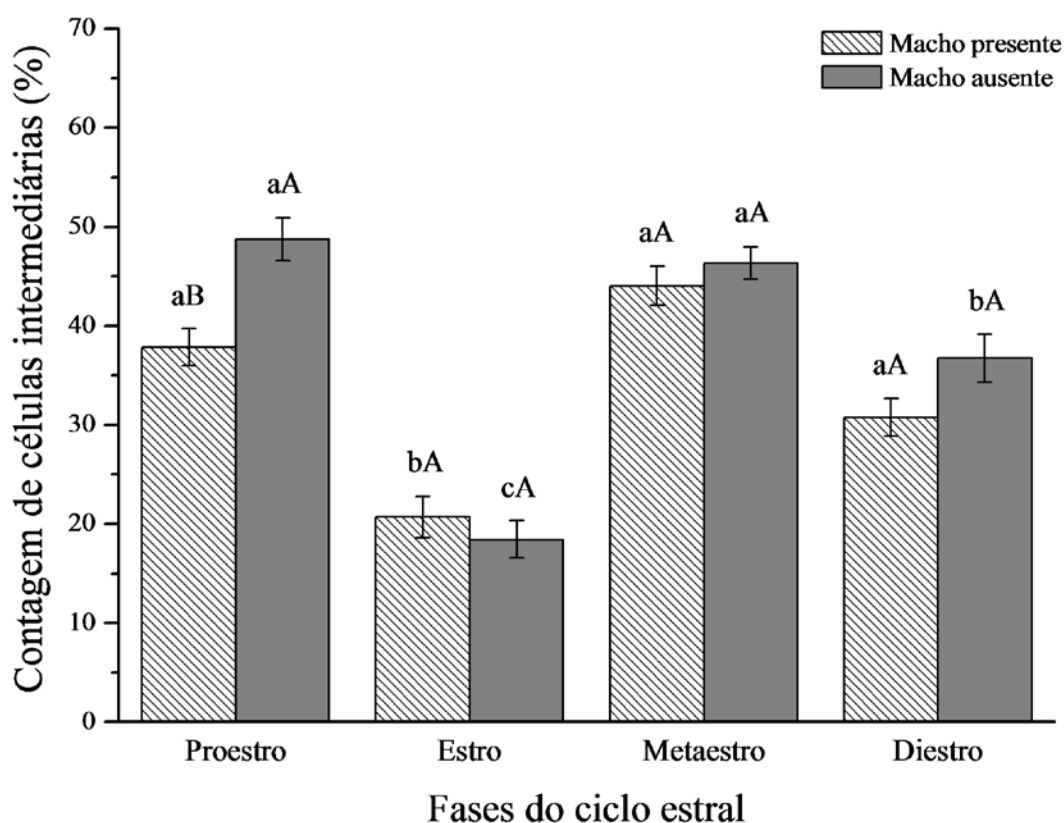


Figura 32 – Efeito do macho na contagem média de células intermediárias pelo método colpocitológico em preás nas diferentes fases do ciclo estral. Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada grupo experimental (macho presente, macho ausente) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais dentro de cada fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro, diestro) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

As células superficiais nucleadas, parabasais e basais sofreram efeito significativo da fase do ciclo estral ($P<0,05$). A proporção média de células superficiais nucleadas foi significativamente mais elevada durante as fases proestro ($12,94\pm0,80$ %) e estro ($15,84\pm0,79$ %), não diferindo entre si. O estro ainda foi marcado pela menor percentagem média de células parabasais ($4,10\pm0,97$ %) e basais ($0,72\pm0,79$ %). Por outro lado, o diestro foi caracterizado pela maior percentagem média de células parabasais ($30,65\pm1,06$ %) e basais ($18,66\pm0,86$ %). A percentagem média de células parabasais não diferiu entre o proestro ($13,03\pm0,99$ %) e o metaestro ($16,23\pm0,89$ %) conforme se observa na figura 33.

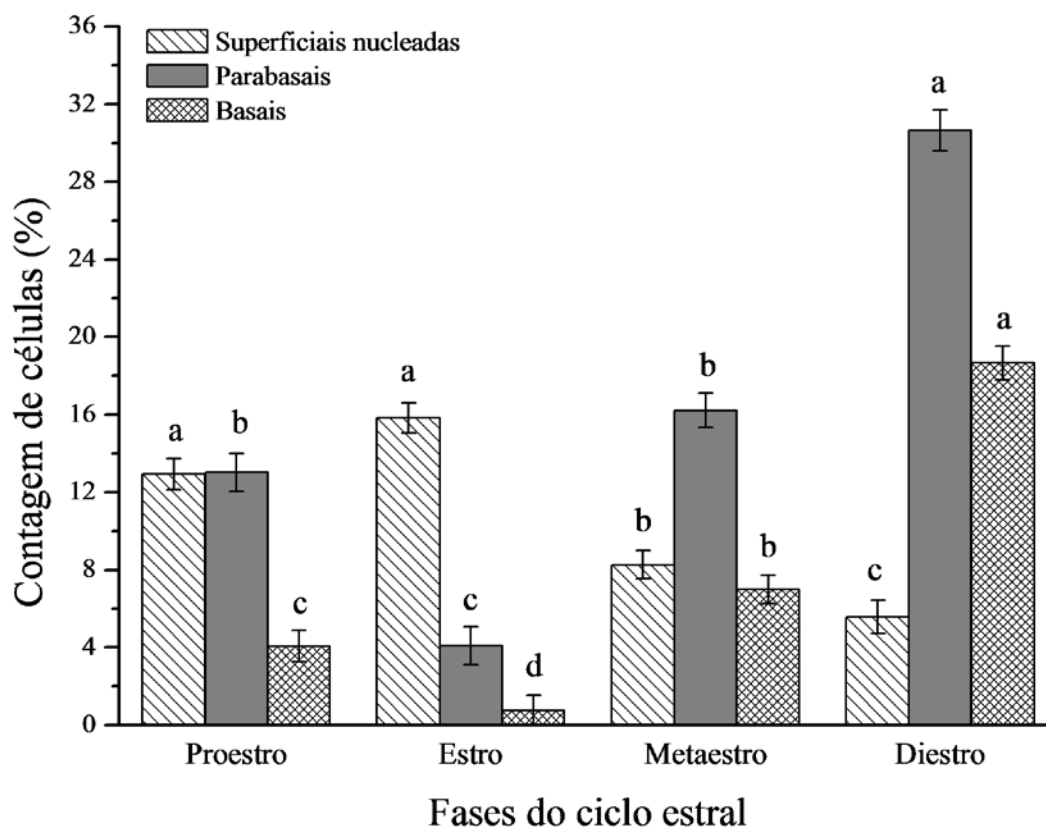


Figura 33 – Contagem média de células superficiais nucleadas, parabasais e basais pelo método colpocitológico em preás nas diferentes fases do ciclo estral. Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada tipo celular (superficiais nucleadas, parabasais e basais) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

5.4 PLACENTAÇÃO VITELÍNICA E CORIOALANTOIDE

O processamento de um saco gestacional aos 13 dias de gestação possibilitou o entendimento da organização da placenta vitelina, a qual era constituída pelos endodermas parietal e visceral que, por sua vez, delimitavam a cavidade do saco vitelino. No entanto, não foi possível a observação do trofoblasto mural, membrana de Reichert subjacente e endoderma parietal, os quais estariam relacionados a composição da onfalopleura bilaminar. Tal condição poderia estar relacionada ao processamento do material, levando-se em conta a fragilidade das membranas fetais e a dificuldade em se manter de forma inalterada todos os componentes do saco gestacional.

Por outro lado, a amostra em questão poderia encontrar-se numa situação durante a inversão do saco vitelino, fato este que indicaria ser a referida onfalopleura o primeiro complexo de membrana a sofrer processo de degeneração, restando, pois, o endoderma parietal, que após posterior desaparecimento, possibilitaria o desenvolvimento e expansão do endoderma visceral, caracterizando-se, assim, a inversão completa do saco vitelino.

Desta forma, independente da explicação real para o arranjo anatômico observado foi a possibilidade de se estabelecer como condição primordial para a caracterização de uma condição anterior à inversão, a persistência de pelo menos um dentre os três componentes que compõem a onfalopleura bilaminar, neste caso o endoderma parietal (Figura 34A).

Conforme descrito, não se descarta que algumas disposições anatômicas observadas sejam oriundas de artefatos gerados pelo processamento histológico, porém a análise de dois sacos gestacionais no décimo quarto dia de gestação revelaram desorganização e desprendimento de células endodérmicas parietais que recobriam o útero bem como o contorno promovido pelo trofoblasto mural e superfície fetal da placenta corioalantoide (Figura 34B).

É importante destacar que a partir do décimo quinto dia não mais se evidenciou onfalopleura bilaminar, fato este que vem corroborar que a inversão do saco vitelino ocorre aos 14 dias de gestação. Após este período, destacaram-se expansões do embrião e placenta principal, além do endoderma visceral que circunscrevia todo o contorno da decídua parietal. Com efeito, criou-se um mecanismo de aposição entre o endoderma

visceral e útero como forma de otimizar o intercâmbio de substâncias entre mãe e embrião, situação esta verificada pela completa exposição do epitélio visceral ao conteúdo secretado pelas glândulas uterinas (Figuras 34C e D).

Além disso, evidenciaram-se relações de aposição entre os endodermas localizados próximos à placenta corioalantoide (vale lembrar que esta interface formada resulta de aproximações entre o endoderma visceral e o parietal, este último representando o epitélio que recobre a placenta corioalantoide e que não degenera após a inversão) favorecendo, pois, a interpretação de importante região para as trocas de substâncias, constituindo vias bidirecionais entre placenta e embrião (Figuras 34E, F, G, H e I).

Nestes locais as células endodérmicas viscerais possuíam formato colunar, núcleos situados na posição basal e numerosas vilosidades em arranjo de tufo ou vilos, como verificado no vigésimo dia de gestação (Figuras 34E, F e G) e aos 25 dias de gestação (Figuras 34H e I), os quais apresentaram maiores intensificações das formações vilosas nos dias 35 da gestação (Figuras 35A e B) de acordo com o que se observou nas microscopias de luz e varredura respectivamente.

O endoderma parietal, remanescente a inversão, foi aquele que se situou recobrendo à superfície fetal da placenta principal, porém sem entrar em contato direto com esta última, pois encontrou-se interposto por uma membrana basal de Reichert a qual se apresentou positiva para a reação do ácido periódico de Shiff (P.A.S) como observado na figura 35C. Pela microscopia eletrônica de varredura, observou-se que a referida membrana era contínua, relativamente espessa e com aspecto amorfo (Figura 35D). Nestes locais, as células endodérmicas apresentaram formato colunar e numerosas vilosidades ao longo do disco placentário, cuja aproximação ao endoderma visceral foi evidente (Figuras 34E, F, G, H e 35A e E).

A esplancnopleura foi caracterizada pela presença de células endodérmicas viscerais que repousavam sobre uma membrana basal visceral (Figuras 34F e H). Externamente a este endoderma, evidenciou-se uma segunda membrana basal revestindo as células mesoteliais que margeavam o celoma extraembrionário, sendo denominada membrana basal serosa (Figura 34E e H). A reação imunohistoquímica para vimentina promoveu marcação específica para células mesenquimais envolvidas na organização da vascularização vitelínica juntamente com a membrana basal visceral que, por sua vez,

promovia a sustentação das formações vilosas direcionadas para o epitélio parietal da placenta principal (Figura 34H e I). No caso da superfície que recobria a placenta principal verificou-se reação para vimentina com marcação intensa e específica para a membrana de Reichert e de forma inespecífica para as células endodérmicas parietais que se apoiavam naquela membrana (Figura 34H).

As células endodérmicas viscerais mostraram-se heterogêneas com relação à superfície externa das membranas citoplasmáticas, quando analisadas em locais proximais ou distais à placenta corioalantoide. Na região peri-placentária, observaram-se numerosas projeções da membrana celular nas células endodérmicas, as quais variaram de formas curtas a longas e cujo aspecto possuiu similaridade a pseudópodes, podendo-se inferir, neste caso, que tal epitélio apresentou elementos primordiais de dinâmica motora (Figura 35H). Já em locais distantes ao disco placentário, evidenciou-se um endoderma visceral dotado de células pequenas com formato redondo ou oval, núcleo também situado em posição basal (Figura 35F) e superfície externa lisa (Figura 35G).

A aparência vilosa do endoderma visceral principalmente nas regiões próximas a placenta principal foi ratificada também pela macroscopia em sacos gestacionais de préas obtidos a termo e processados mediante perfusão com látex Neoprene 650 centrifugado (Figura 35I).

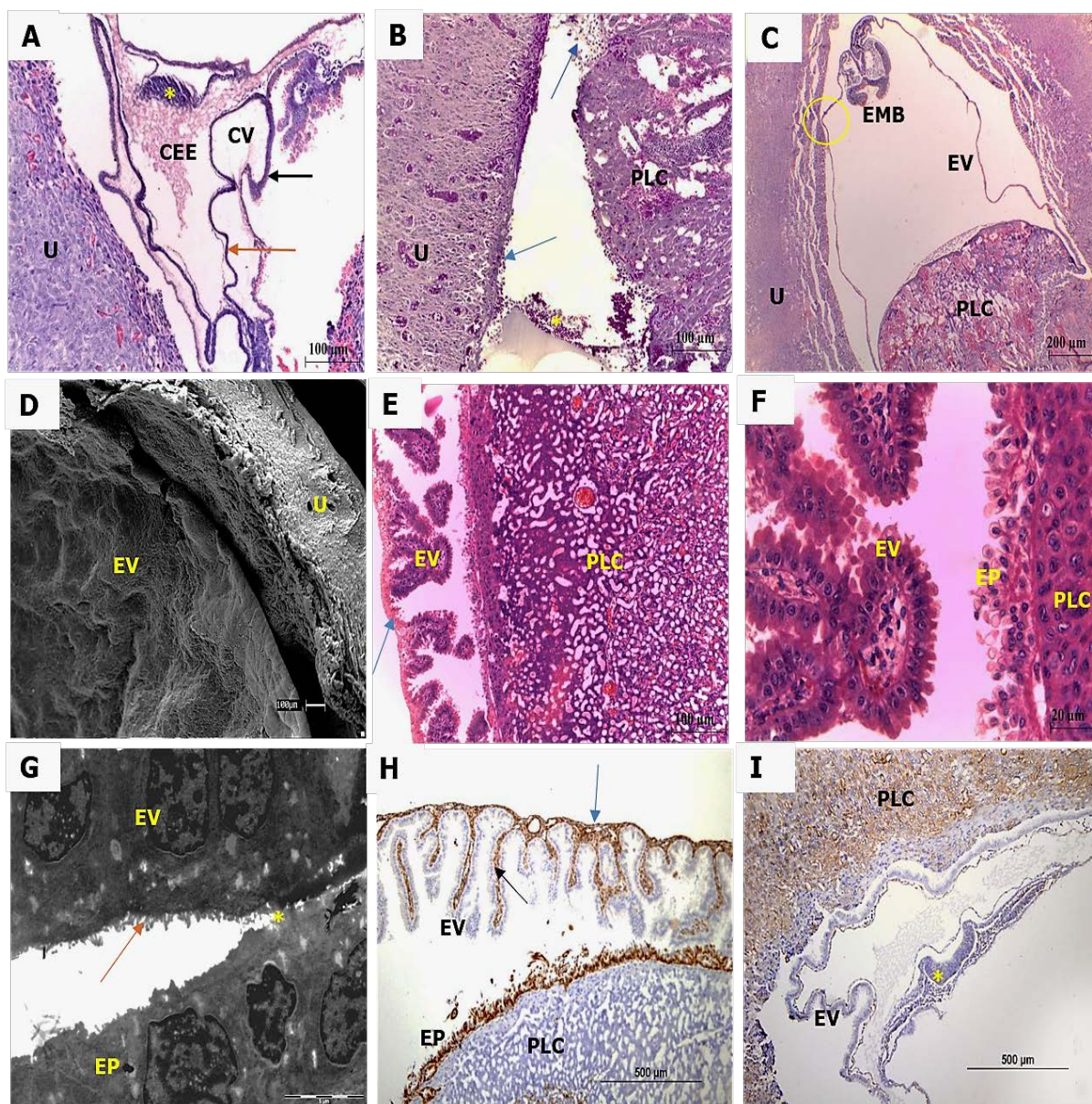


Figura 34— Placentação vitelina em gestação inicial e intermediária. Em A: notar a presença do embrião (*), aos 13 dias de gestação, inserido no interior da cavidade amniótica e recoberto pelo ectoderma do âmnio; o útero (U) e a cavidade do celoma extraembrionário (CEE). Observar ainda os endodermas visceral (seta vermelha) e parietal (seta preta) delimitando a cavidade do saco vitelino (CV). Em B, verifica-se, aos 14 dias, descontinuidade e desorganização do endoderma parietal que recobre o útero (U) e placenta corioalantoide (PLC). Desta forma, as células endodérmicas ainda aderidas a tais estruturas são apontadas pelas setas azuis. Após a inversão, aos 15 dias, destaca-se, na figura C, expansões do endoderma visceral, o qual envolve o embrião e mantém íntima relação com os tecidos uterinos (círculo amarelo), fato este também demonstrado na figura D. As figuras E, F e G (aos 20 dias de gestação), H e I (aos 25 dias) referem-se as relações de aposição que se estabelece entre os endodermas parietal (EP) e visceral (EV) em região próxima à placenta principal (PLC). O endoderma visceral forma numerosas vilosidades e arranjo em tufos ou vilos que se aproximam do endoderma parietal. Notar ainda, nas figuras E e H, representadas pelas setas azuis, a membrana basal serosa. Em H, a seta preta destaca a vascularização vitelina e membrana basal visceral associada. As figuras A, B, C, E e F foram processadas por histologia convencional e coradas por hematoxilina e eosina (HE). Em I: notar a reação positiva para a vimentina na placenta principal e a localização do embrião (*). H e I: reação imunohistoquímica para vimentina. Figura D: microscopia eletrônica de varredura e figura G: microscopia eletrônica de transmissão. Fonte: Acervo do pesquisador.

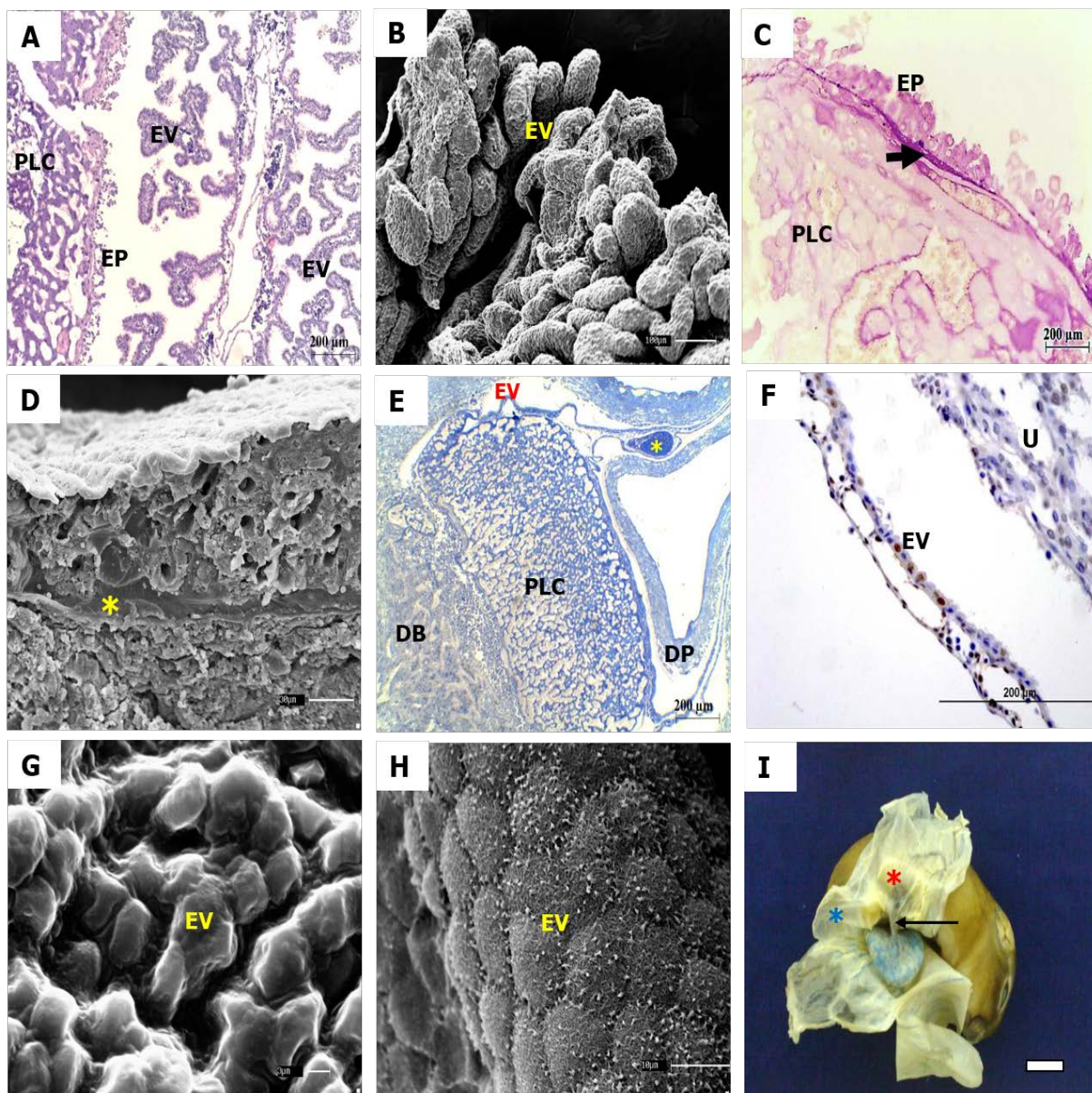


Figura 35– Placentação vitelina em gestação avançada. Em A e B: observar a expansão das formações vilosas do endoderma visceral (EV) aos 35 dias de gestação. Em C (40 dias de gestação): verifica-se, em destaque, a membrana de Reichert (seta espessa), a qual separa a placenta principal (PLC) do endoderma parietal (EP) que permanece após a inversão. Esta membrana apresentou-se contínua e com aspecto amorfo (Figura D). Em E: notar o desenvolvimento da placenta principal (PLC), aos 40 dias de gestação, a qual contribui para as aproximações do endoderma visceral e embrião (*) a referida placenta. Evidenciar ainda a decíduas basal (DB) e parietal (DP). As figuras F e G (aos 45 dias de gestação) indicam regiões distantes da placenta principal em que células endodérmicas viscerais apresentaram-se com superfície externa bastante lisa. Na figura H (quadragésimo quinto dia de gestação), verificou-se uma situação oposta, onde células endodérmicas viscerais demonstraram superfície externa dotada de numerosas projeções similares a pseudópodes. Em I: saco gestacional obtido a termo. Evidenciou-se o cordão umbilical (seta) promovendo conexão entre o feto e placenta corioalantoide (estrutura discoidal destacada em azul). O saco vitelino visceral (* vermelho) apresentou aparência vilosa em locais próximos da placenta principal e lisa em regiões distais do referido órgão (* azul). U: útero. Figura A: histologia corada por hematoxilina e eosina (HE). Figura C: histologia corada pelo ácido periódico de Schiff (P.A.S). Figura E: histologia corada pelo azul de toluidina (AT). Figuras B, D, G e H: microscopia eletrônica de varredura. Figura I: macroscopia mediante perfusão com látex neoprene 650. Barra desta figura: 1cm. Fonte: Acervo do pesquisador.

Com relação a placenta principal, observou-se, aos 10 dias de gestação, muitas áreas de sangue materno intercaladas com camadas de citotrofoblasto, espongio e sinciotrofoblasto, cuja predominância já assinalava este último (Figura 36A). No décimo segundo dia, verificou-se que a proliferação trofoblástica foi mais intensa na região do cone ectoplacentário e expandia-se até os endodermas parietal e visceral que estiveram delimitando a cavidade do saco vitelino e ao mesmo tempo contribuindo para o surgimento de outra cavidade: o celoma extraembrionário (Figura 36B). Assim, no referido intervalo de dois dias, a placenta permanece desorganizada estruturalmente, porém modificando de formato, que passa do elíptico achatado ao ovalado, mediante um maior preenchimento do espaço proporcionado pela luz uterina.

Aos 14 dias, a placenta corioalantoide começou a apresentar forma discoidal e continha duas extremidades afiladas nas quais partiam epitélio endodérmico visceral que se projetava, internamente, de modo a envolver o embrião. Em disposição externa, verificou-se o endoderma parietal que acompanhava o contorno promovido pelo visceral e ainda recobria toda a placenta principal. Nesta fase, tal órgão placentário demonstrou arranjos cito e sinciotrofoblastos que sinalizaram os primórdios do labirinto (Figura 36C) bem como tornou-se evidente, aos quinze dias de gestação, o pedúnculo placentário que inseria a placenta no estroma decidualizado (Figura 36D). Neste local, células mesenquimais fusiformes com limites celulares indistintos e anisocitose coexistiram com os agregados multinucleados sinciciais que caracterizaram o sinciotrofoblasto (Figura 36E) e células citotrofoblásticas (Figura 36F), sendo ambas as linhagens de origem coriônica, dotadas de elevada relação núcleo/citoplasma, macronúcleolos únicos e citoplasma densamente corado.

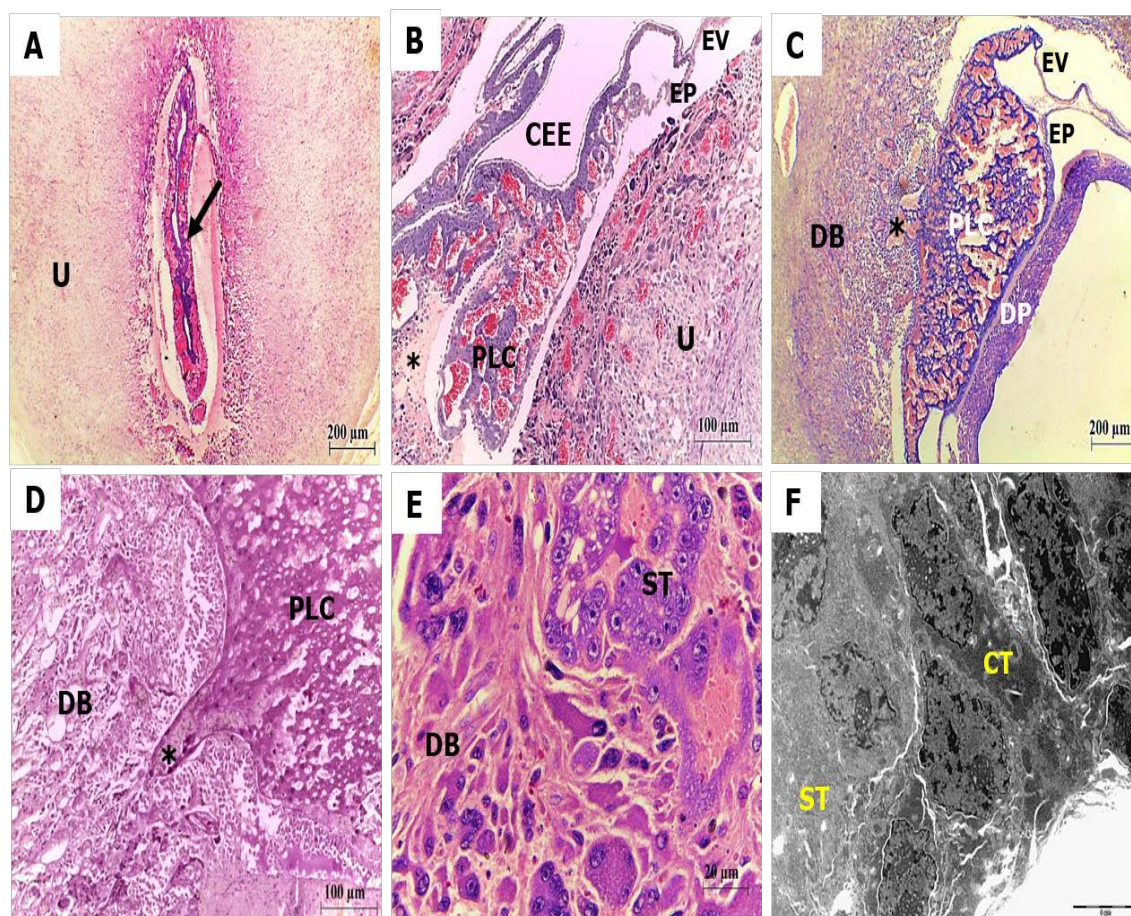


Figura 36– Placentação corioalantoide no início da gestação. Em A: corte transversal do saco gestacional, aos 10 dias de gestação, demonstrando uma placenta principal imatura, contendo várias áreas de sangue e camadas trofoblásticas desorganizadas. O formato evidenciado foi elíptico e achatado. Em B: notar, aos 12 dias de gestação, o aumento da proliferação trofoblástica da placenta principal (PLC), principalmente no local de inserção desta com a decídua basal (*). Observar ainda as localizações dos endodermas parietal (EP) e visceral (EV) do saco vitelino, os quais contribuem para a delimitação de outra cavidade: o celoma extraembrionário (CEE). Em C: corte transversal de um saco gestacional aos 14 dias de gestação. Notar o estabelecimento da forma discoidal da placenta (PLC), o local de inserção desta na decídua basal (*) bem como as suas extremidades afiladas das quais partem os endodermas parietal (EP) e visceral (EV), sendo todas as estruturas citadas delimitadas pela decídua parietal (DP). Em D: observar a ancoragem da placenta principal (PLC) na decídua basal (DB) por meio do pedúnculo placentário (*). Em E: verificar a proximidade das células sinciotrofoblásticas (ST) com o estroma da decídua basal (DB). Em F: observou-se o sinciotrofoblasto (ST) e célula citotrofoblástica (CT) oriunda de uma região da figura anterior. As figuras D, E e F constituíram amostras aos 15 dias de gestação. Figuras A, B, C, D e E: histologia convencional e coloração por hematoxilina e eosina (HE). Figura F: microscopia eletrônica de transmissão. Acervo do pesquisador.

Entre os dias 16 e 17 da gestação verificou-se um aumento acentuado de tamanho do órgão placentário (localizado no lado anti-mesometrial do útero) acarretando em aproximações do embrião (inicialmente no lado mesometrial) e endoderma visceral a

referida placenta como se verifica nas figuras 37A e B. Esta última figura proporcionou a observação de duas áreas bem definidas, sendo o lado convexo do disco constituído por espongiotrofoblasto intercalado por numerosos canais de sangue materno e a metade posterior, representada por arranjos anastomosados, os quais delimitavam vasos fetais e lacunas maternas, sendo, pois, um verdadeiro labirinto contendo áreas de trocas materno fetais.

No vigésimo dia da gestação, verificou-se, em destaque, as relações anatômicas observadas entre o disco placentário e a decídua basal, sendo a ancoragem daquela no estroma endometrial, promovida pelo pedúnculo placentário. A placenta principal apresentou regiões bem definidas do espongiotrofoblasto que constituía a superfície fetal desta placenta, o labirinto, o qual continha os principais locais destinados as trocas entre mãe e embrião e finalmente a subplacenta, que se configurou numa estrutura lobular, situada entre o labirinto e decídua basal (Figura 37C).

Em termos de organização da vascularização, a região do labirinto não esteve completamente estruturada nesta fase (aos 20 dias) e o quantitativo vascular de ambos os organismos ainda não se mostrou tão numeroso (aos 25 dias de gestação), como se comprovou na reação imunohistoquímica para vimentina (Figuras 37D e E), quando comparado ao trigésimo dia, período este em que se verificou o desenvolvimento predominante do labirinto, o qual passou a ocupar grande parte do volume placentário (Figura 37F).

A subplacenta, aos 35 dias, apresentou aspecto lobular e localizou-se entre a placenta e decídua basal, mais especificamente na base da placenta corioalantoide, onde se encontra a escavação central (Figura 37G). Esta última reflete um espaço vazio delimitado por laterais compostas de tecido conjuntivo extraembrionário. Este mesênquima, então, passa a ser revestido por camadas citotrofoblásticas, as quais são sustentadas por sinciciotrofoblastos expansivos das referidas laterais até a superfície decidual (Figura 37H). As células citotrofoblásticas deste órgão apresentaram contornos celulares bem definidos, basofilia citoplasmática, elevada relação núcleo/citoplasma, nucléolos únicos e grandes, cromatina nuclear finamente granular e normocitose, o que contribuiu para a caracterização de camadas homogêneas no que se refere a celularidade. Já o sinciciotrofoblasto caracterizou-se pela presença de grandes agregados celulares, por

vezes contendo amoldamento nuclear, nucléolo evidente, limites celulares mal definidos, eosinofilia citoplasmática e numerosos vacúolos citosólicos (Figura 37H).

No caso da análise macroscópica oriunda da obtenção de um saco gestacional colhido a fresco, aos 40 dias de gestação, destacou-se a presença de uma placenta discoidal, cuja coloração intensamente vermelha, refletiu o contínuo aumento do aporte vascular direcionado a este órgão (Figura 37I).

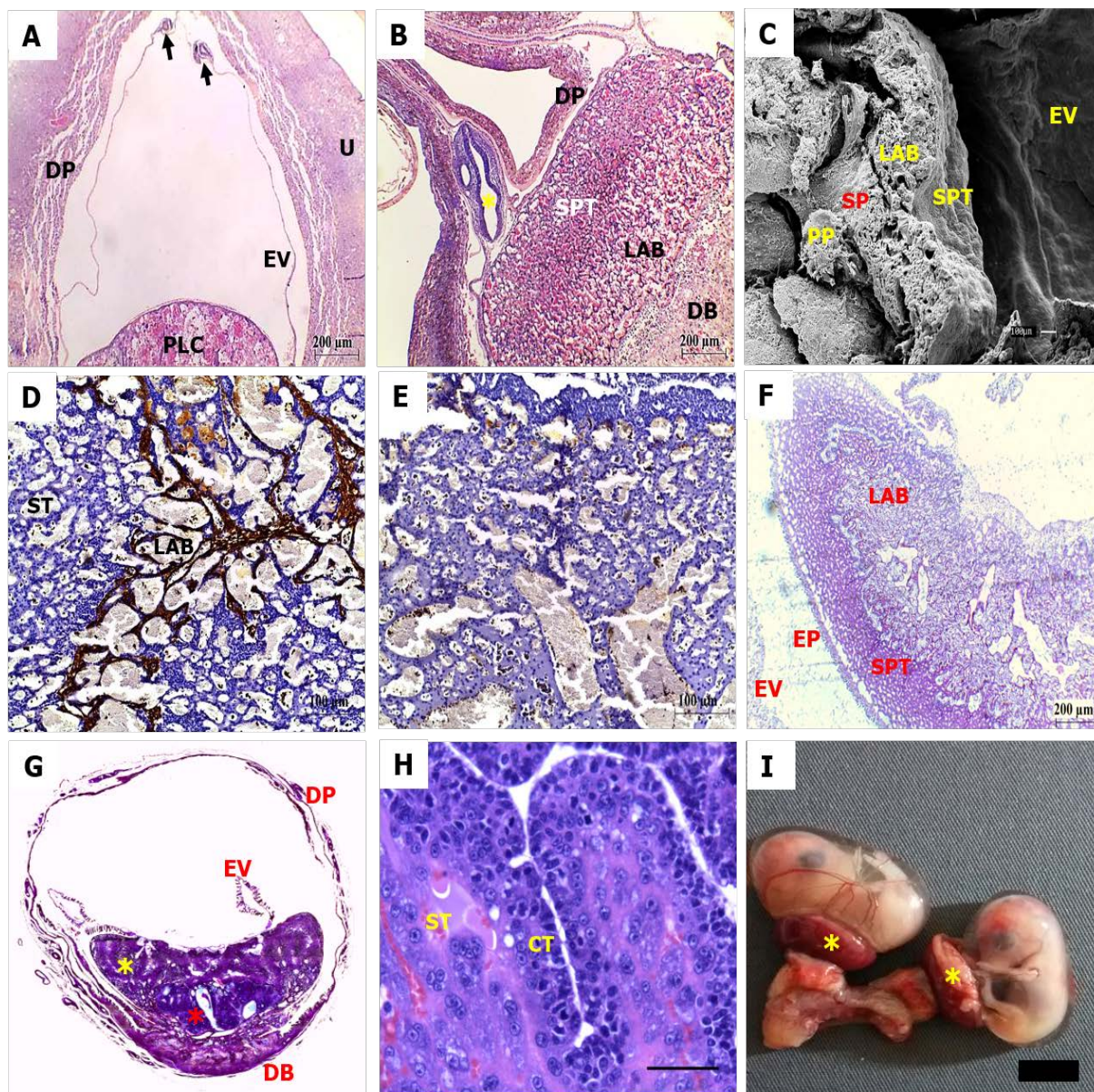


Figura 37– Placentação corioalantoide em gestação intermediária e início da avançada. Em A: corte transversal do saco gestacional, aos 16 dias de gestação, demonstrando uma placenta principal discoidal (PLC), o endoderma visceral do saco vitelino, o útero (U), decídua parietal (DP) e dois embriões (setas). Em B: aos 17 dias de gestação, evidenciou-se um aumento pronunciado no tamanho do órgão placentário (PLC), resultando em aproximações do embrião (*) e endoderma visceral associado. Notar ainda a decídua parietal (DP), basal (DB) e duas regiões placentárias discerníveis: o espongiofoblasto (SPT) e labirinto (LAB). Em C: no vigésimo dia de gestação, observar as relações anatômicas entre a decídua basal (DB) e placenta corioalantoide (PLC), sendo esta última constituída por espongiofoblasto (SPT), labirinto (LAB) e subplacenta (SP). A inserção da placenta na referida decídua ocorre pela formação do pedúnculo placentário (PP). Verificar ainda o endoderma visceral (EV). Em D: caracterizou-se a região do labirinto placentário, aos 25 dias de gestação, o qual apresentou imunorreatividade para a vimentina. Em E: controle negativo para a reação imunohistoquímica evidenciada na figura anterior. Em F: no trigésimo dia gestacional, evidenciou-se o desenvolvimento predominante do labirinto (LAB), o qual passou a ocupar grande parte do volume placentário. Verificar também a presença do espongiofoblasto (SPT), endoderma visceral (EV) e parietal (EP) do saco vitelino. Em G: destacou-se uma visão geral do saco gestacional, aos 35 dias de gestação, onde podem ser observadas as decíduas parietal e basal, o endoderma visceral (EV), a placenta corioalantoide (*) amarelo) e subplacenta (* vermelho). Em H (grande aumento da região subplacentária da figura anterior): verificar o processo de crescimento da subplacenta, os quais demonstram invaginações de camadas citotrofoblásticas (CT), as quais se apoiam em pronunciados sincitiotrofoblastos (ST). Em I: demonstraram-se dois sacos gestacionais, aos 40 dias de gestação, nos quais evidenciaram-se duas placentas corioalantoideas discoidais em amostras obtidas a fresco. Figuras A, B, F, G e H: histologia convencional e coloração pela hematoxilina e eosina (HE). Figura C: microscopia eletrônica de varredura. Figura D: imunohistoquímica para vimentina. Figura E: controle negativo da reação da figura anterior. Figura I: macroscopia. Barra desta figura: 1cm. Fonte: Acervo do pesquisador.

Desta forma, com o subsequente desenvolvimento, observou-se, no trigésimo oitavo dia de gestação, uma placenta principal, a qual passou a apresentar formações lobulares contendo, em cada lóbulo, uma zona externa espongiotrofoblástica (formada por ectoderma coriônico cujo citoplasma é vacuolado e intensamente basofílico), uma zona intermediária composta pelo labirinto e outra central, sendo tal formação separada de outros lóbulos por uma área mesenquimatosa também conhecida como interlóbulo (Figura 38A). No dia em questão, verificou-se redução significativa da região espongiotrofoblástica, a qual passou a margear a superfície fetal da placenta corioalantoide (Figura 38B).

Aos 40 dias, destacou-se ainda a verificação de grandes vasos fetais, situados no labirinto placentário, cuja distância para um canal de sangue materno (lacuna materna) se limitava a apenas uma camada de sinciciotrofoblasto, fato este que possibilitou a classificação da barreira interhemática como hemomonocorial (Figura 38C).

A reação imunohistoquímica para vimentina apresentou, do quinquagésimo dia em diante, intensa marcação específica, na região do labirinto placentário (Figura 38E), sendo este local reconhecidamente como o principal reduto de trocas gasosas e substâncias necessárias ao desenvolvimento do conceito (Figuras 38D, E e F).

Seguiu-se ainda marcação específica e crescente para a presença do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) no endoderma parietal, espongio e sinciciotrofoblasto, sendo a reação verificada pela coloração nuclear, em marron, no ensaio imunohistoquímico produzido e indicando-se tratar de células em intensa atividade mitótica (Figura 38G).

Finalmente, demonstrou-se, macroscopicamente, os aspectos morfológicos da placenta principal, a termo, tanto em amostra processada pela perfusão de látex neoprene 650 como naquela obtida à fresco (Figuras 38H e I).

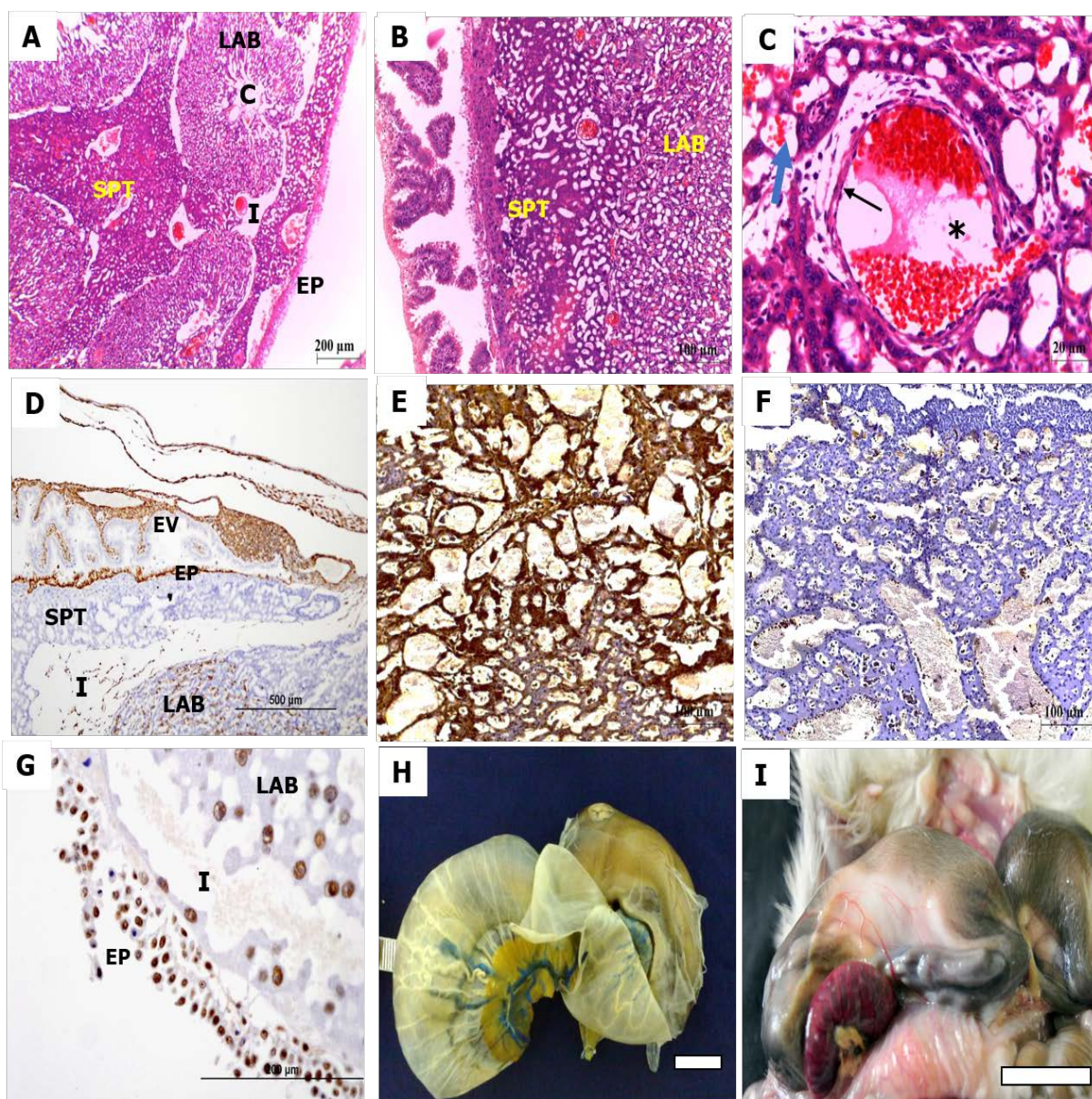


Figura 38– Placentação corioalantoide em gestação avançada. Em A: Verificar, aos 38 dias de gestação, o elevado grau de organização da estrutura placentária, a qual apresentou formações lobulares organizadas em: centro do lóbulo (C), labirinto (LAB) e regiões de interlóbulo (I). Notar ainda a escassez de espongiofoblasto (SPT), também demonstrado na figura B. Em C: aos 40 dias de gestação, na região do labirinto placentário, verificou-se a presença de um grande vaso fetal, contendo numerosos eritrócitos em sua luz (*) bem como o contorno produzido pelo seu endotélio (seta preta). Muitos canais de sangue materno localizaram-se nas proximidades, sendo um deles, destacado pela seta espessa em azul. Em D: promoveram-se destaques aos endodermas visceral (EV), parietal (EP), espongiofoblasto (SPT), interlóbulo (I) e labirinto placentário (LAB), em amostra colhida aos 45 dias de gestação. Notar a marcação positiva, em marrom, para a vimentina. Em E: evidenciou-se, aos 50 dias de gestação, intensa vascularização, na região do labirinto placentário, fato este demonstrado pela reação da vimentina. Em F: controle negativo da reação imunohistoquímica evidenciada na figura anterior. Em G: Demonstrou-se, aos 55 dias de gestação, reação positiva para o PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) pela marcação específica, em marrom, do núcleo das células situadas no labirinto (LAB) e endoderma parietal (EP). I: interlóbulo. As figuras H e I caracterizaram sacos gestacionais obtidos a termo em amostra colhida mediante injeção de látex Neoprene e a fresco, respectivamente. Barras destas figuras: 2cm. Figuras A, B e C: histologia convencional e coloração por hematoxilina e eosina (HE). Figuras D e E: reação imunohistoquímica para vimentina. Figura G: reação imunohistoquímica para o PCNA. Fonte: acervo do pesquisador.

5.5 EMBRIOGÊNESE E DESENVOLVIMENTO FETAL

Inicialmente, o blastocisto possuiu forma arredondada ou oval e encontrou-se inserido na câmara de implantação da luz uterina. Sua localização ocorreu na região mesometrial do útero e o consequente processo de implantação foi caracterizado como intersticial. Aos seis dias de gestação verificou-se, por meio de análise tridimensional, a estreita relação de aposição com os tecidos maternos (Figuras 39A e B).

No oitavo dia, evidenciou-se, na estrutura esférica blastocística, o desenvolvimento de uma cavidade central, a qual preenche-se com líquido e foi denominada blastocèle. Num dos seus pólos, desenvolveram-se proliferações de células embrioblásticas (massa celular interna), as quais formaram o assoalho da referida cavidade e denotavam que a expansão gradual iria se direcionar para o interior desta. Externamente, o blastocisto foi constituído pelo trofoectoderma (ou trofoblasto mural), e apresentou, na posição mais externa da mesma extremidade em que se localizou o embrioblasto, proliferação de células trofoectodérmicas (cone ectoplacentário) responsáveis pelo futuro desenvolvimento da placenta corioalantoide (Figura 39C).

Aos nove dias de gestação, evidenciou-se um blastocisto alongado ou cilíndrico, o qual apresentou-se revestido externamente pelo trofoblasto mural e internamente, por células do hipoblasto (Figuras 39D e E). No décimo dia, desenvolveram-se proliferações de células ectodérmicas amnioblásticas que envolveram o embrioblasto e ao mesmo tempo delimitavam a cavidade amniótica (Figuras 39F e G), resultando em projeções da massa celular interna para o centro dessa cavidade, possibilitando, pois, o estabelecimento dos primórdios do embrião aos 12 dias de gestação (Figura 39H).

No décimo quarto dia de gestação, o embrião passou a diferenciar suas três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma embrionários. Da mesma forma os três folhetos extraembrionários foram visíveis e discerníveis, o que também contribuiu para uma estrutura linear e trilaminar do embrião (Figura 39I).

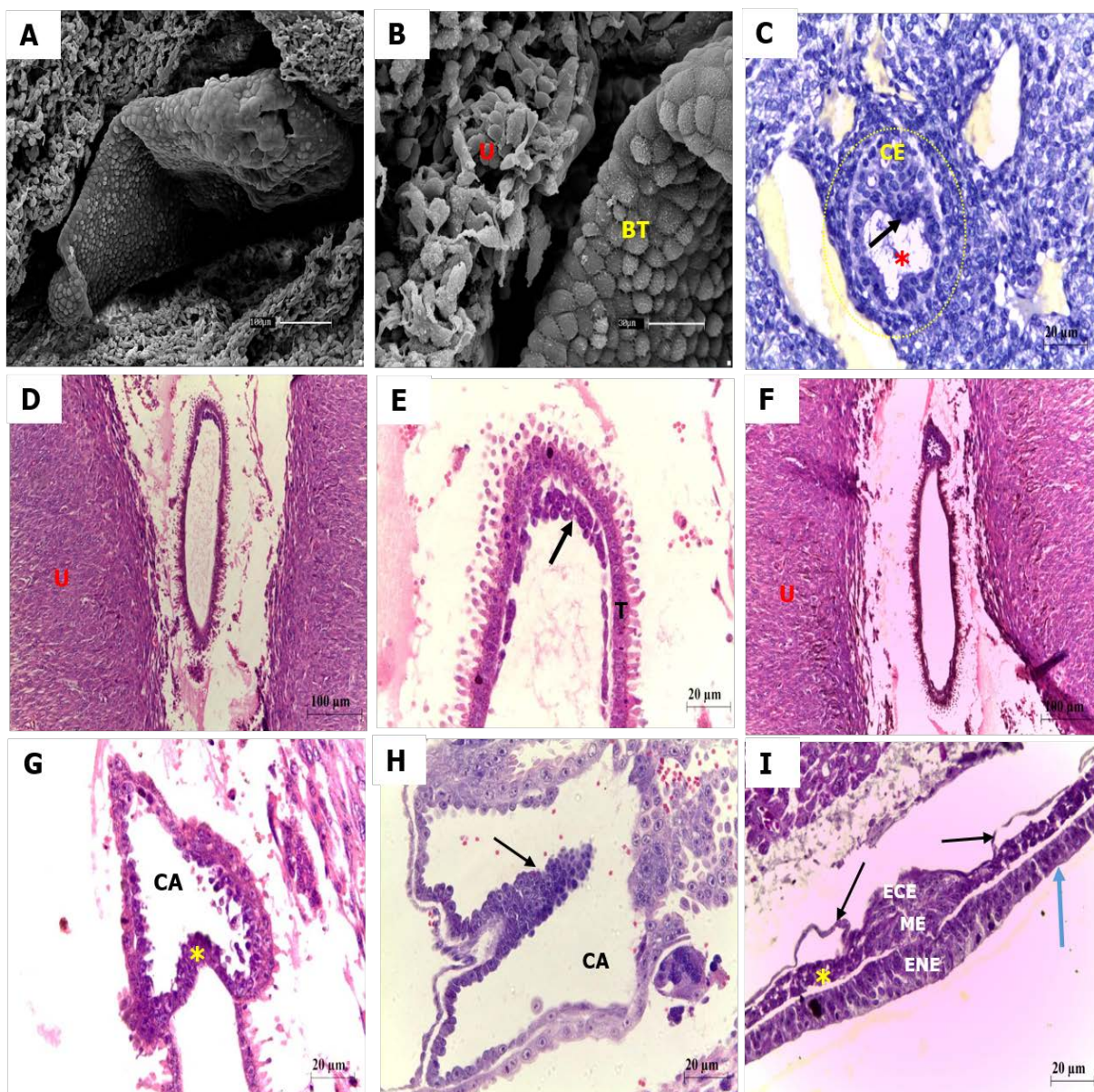


Figura 39– Desenvolvimento embrionário inicial em preás. Em A e B: aos seis dias de gestação, evidenciar o blastocisto inserido na câmara de implantação da luz uterina. Em C: aos oito dias, a estrutura blastocística permanece arredondada ou oval, sendo o seu revestimento externo composto por trofoectoderma (trofoblasto mural) e no seu centro, desenvolve-se uma cavidade denominada blastocele (*). Num dos pólos, evidenciaram-se proliferações de células embrioblásticas (massa celular interna) (seta) e ainda proliferações de células do trofoblasto nos limites externos desse pólo (cone ectoplacentário) (CE). Figuras D e E (9 dias de gestação): a forma do blastocisto torna-se alongada, com revestimento externo constituído por trofoblasto mural (T) e interno, por células hipoblásticas (seta). Figuras F e G (10 dias de gestação): notar a formação da cavidade amniótica (CA) e desenvolvimento do embrioblasto (*). Figura H (12 dias de gestação): observar o aumento proliferativo do embrioblasto (massa celular interna) (seta) no interior da cavidade amniótica (CA). Figura I (14 dias de gestação): notar a diferenciação dos três folhetos embrionários (camadas germinativas): ectoderma embrionário (ECE), mesoderma embrionário (ME) e endoderma embrionário (ENE). Evidenciar ainda o ectoderma extraembrionário (setas pretas), o mesoderma extraembrionário (*) e endoderma extraembrionário (seta azul). Figuras A, B: microscopia eletrônica de varredura. Figura C: histologia convencional corada em azul de toluidina (AT). Figuras D, E, F, G, H e I: histologia convencional e coloração por hematoxilina e eosina (HE). Fonte: Acervo do pesquisador.

No entanto, com a chegada do décimo quinto dia gestacional, observaram-se dobramentos embrionários que sinalizaram o início da formação do tubo neural, mediante invaginação prévia do ectoderma embrionário (sulco neural) como pode ser evidenciado na figura 40A. Nesta fase, o endoderma visceral foi proeminente, resultado da diferenciação do hipoblasto nos endodermas parietal e visceral do saco vitelino. Porém, apenas o visceral foi observado por se tratar de um período pós-inversão do saco vitelino.

Aos dezesseis dias, detectou-se a delaminação do mesoderma lateral em somático (adjacente ao ectoderma embrionário) e esplâncnico (vizinho ao mesoderma embrionário) como pode ser verificado na figura 40B. No décimo sétimo dia, notou-se o aparecimento da vesícula auditiva (situada na lateral do embrião) e do mielencéfalo, o qual promove maior complexidade morfológica ao embrião (Figura 40C).

O décimo oitavo dia de gestação cursou com diferenciações importantes do sistema nervoso: o aparecimento do diencéfalo e mielencéfalo bem como de órgãos sensoriais como o auditivo (pela presença de um par de vesículas auditivas) e o óptico, mediante formação da vesícula óptica, a qual foi constituída pela retina e cristalino (Figura 40D). Além disto, invaginações na região bucofaríngea culminaram com o surgimento do estomodeu (primórdios da boca), conforme encontra-se demonstrada na figura 40E.

Verificou-se, aos 19 dias, um embrião extremamente encurvado ventralmente, fato este que dificultava o discernimento das características morfológicas dos membros torácicos e pélvicos. As três vesículas encefálicas já estavam presentes (prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo) bem como os placóides do cristalino e saliência cardíaca (Figura 40G). Acrescido a isto, observaram-se, aos 20 e 22 dias de gestação, a saliência auricular, início da formação do focinho, presença do sulco labial e membros torácicos e pélvicos em formato de nadadeiras. A face embrionária ainda se encontrou voltada para a proeminência cardíaca, caracterizando o formato em “C”, peculiar para esta fase de desenvolvimento (Figuras 40H e I).

As referidas curvaturas nos dias supracitados estavam acompanhadas por um maior desenvolvimento da cabeça em relação ao resto do corpo (Figuras 40G, H e I); a pele, até então, foi considerada lisa e transparente, fato este que possibilitou a visualização de numerosos vasos sanguíneos na região da cabeça (Figura 40I); a cauda apresentou-se longa e com uma pequena curvatura na posição distal (Figuras 40G, H e I).

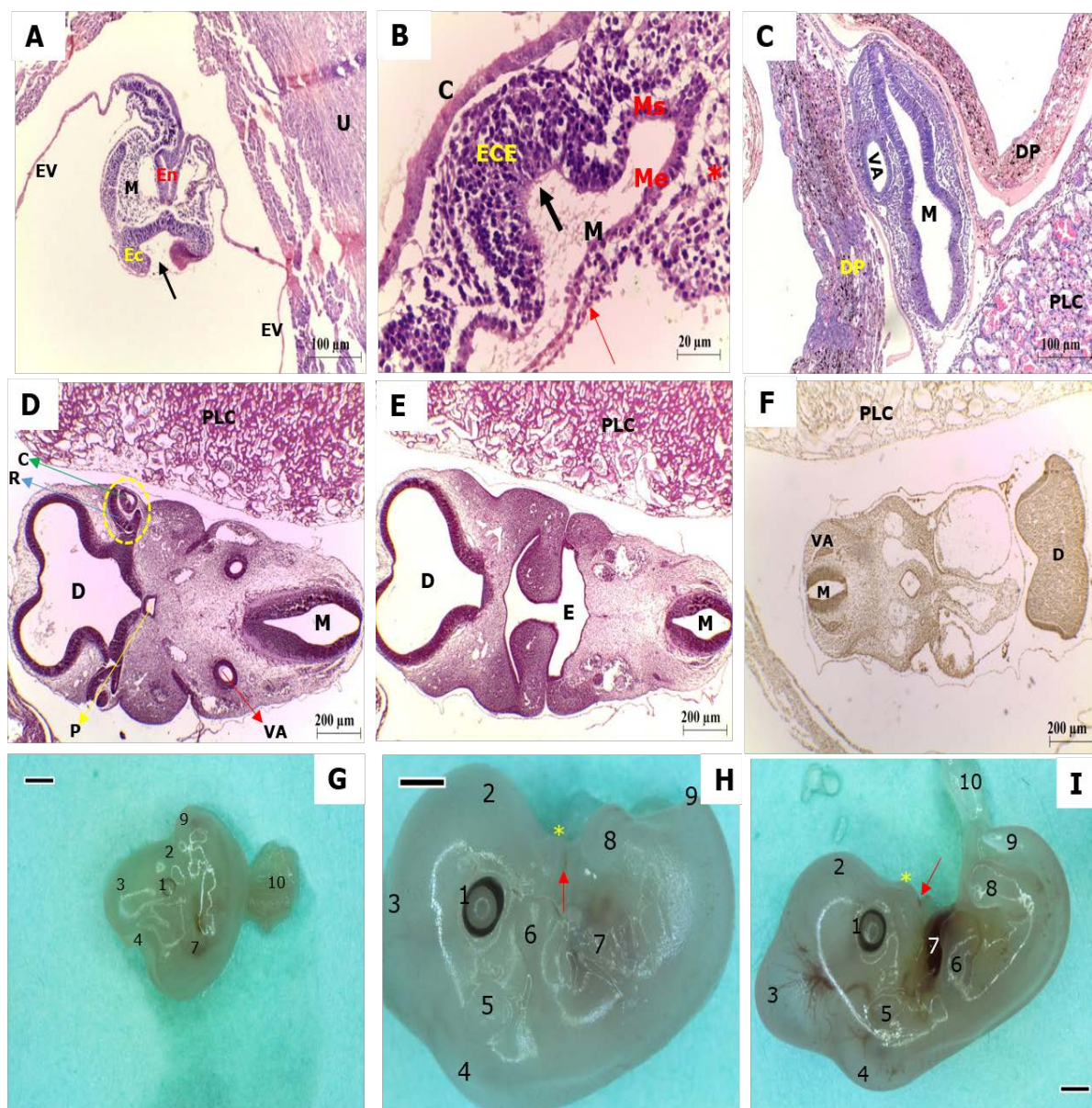


Figura 40– Embriogênese intermediária pré-ads. Em A (embrião aos 15 dias de gestação): verificar a estrutura embrionária, cujos dobramentos sinalizam a formação do tubo neural (seta) e retrataram o ectoderma embrionário (Ec), mesoderma embrionário (M) e endoderma embrionário (En). EV: endoderma visceral. U: útero. Em B (embrião aos 16 dias de gestação): Evidenciar uma camada de ectoderma coriônico (C), o ectoderma embrionário (ECE) e a formação de uma invaginação que resulta na origem do sulco neural (seta preta). O mesoderma embrionário (M) é visualizado logo abaixo da estrutura anteriormente citada. Notar ainda a diferenciação do mesoderma em: somático (Ms) e esplâncnico (Me). Os endodermas embrionários e extraembrionários são identificados pela seta vermelha e *, respectivamente. U: útero. Em C (embrião aos 17 dias de gestação): notar o aparecimento do mielencéfalo (M) e uma vesícula auditiva (VA) na lateral do embrião. As figuras D, E e F representam embriões no décimo oitavo dia de gestação. Em D: verificou-se a presença do diencéfalo (D), vesícula óptica (estrutura destacada pelo círculo tracejado em amarelo), a qual foi composta pela retina (R) e cristalino (C). Notar ainda, na figura E, uma invaginação, resultando na formação do estomodeu (E). Em F: reação intensa para o PCNA, em todas as células que compõem o embrião bem como na placenta corioalantoide (PLC). Em G (embrião aos 19 dias de gestação): observar a acentuada curvatura ventral e pequena protuberância da saliência cardíaca (7). Figuras H e I (embriões aos 20 e 22 dias de gestação, respectivamente): notar o formato de nadadeira dos membros torácicos (6) e pélvicos (8), o início da formação do focinho (*) e sulco labial (setas vermelhas). Figuras A, B, C, D e E: cortes transversais de sacos gestacionais, seguidos de processamento histológico e coloração com hematoxilina e eosina (HE). Figura F: reação imunohistoquímica para o PCNA. Figuras G, H e I: fotodocumentação macroscópica com o auxílio de lupa estereoscópica. Barra das figuras: 1cm. Significado das numerações: 1 (placóide do cristalino); 2 (prosencefalo); 3 (mesencefalo); 4 (rombencéfalo); 5 (saliência auricular); 6 (membro torácico); 7 (saliência cardíaca); 8 (membro pélvico); 9 (cauda); 10 (cordão umbilical). Fonte: Acervo do pesquisador.

Aos 25 dias de gestação evidenciou-se maior proporcionalidade da cabeça em relação ao resto do corpo, redução da curvatura dorsal, membros torácicos e pélvicos em formato de nadadeiras e a saliência auricular demonstrou indícios de desenvolvimento inicial do pavilhão auricular externo (Figura 41A).

Já o trigésimo dia de gestação revelou um embrião dotado de raios digitais (primórdios dos dedos) e o contorno circular externo do placóide do cristalino sugeriu se tratar do início da formação das pálpebras, esta última verificada pela microscopia eletrônica de varredura (Figura 41B).

O trigésimo quinto dia denotou similaridades quando comparadas a data anterior, no entanto, por se tratar de uma amostra analisada a fresco e observada em lupa estereoscópica, não foi possível a visualização das pálpebras, já que, nesta fase, o embrião apresentou-se opaco (Figura 41C).

A fase fetal iniciou-se a partir do quadragésimo dia de gestação, a qual foi caracterizada pelo crescimento dos pêlos bem como a formação das unhas. Nesta data, as regiões do corpo estavam bem definidas, os ossos dos membros torácicos e pélvicos estavam diferenciados, sendo nos primeiros observados quatro dígitos e nos segundos, três (Figuras 41D, E, F, G, H e I). As orelhas e os olhos apresentaram-se formados e estes últimos ainda se encontravam fechados e continham manchas perioculares de tonalidade clara, cuja cor aproximava-se do branco (Figura 41D). A pelagem apresentou-se curta, fina e com a face ventral clara e o restante do corpo constituído por uma mistura de cores cinza, preta e marrom. No caso da cauda, verificou-se que esta era curta e afilada, sendo tal padrão mantido até o final da gestação. As características citadas foram similares as observadas aos 45 dias de gestação (Figura 41E).

Aos 48 e 50 dias de gestação, verificaram-se início da abertura dos olhos e aumento do crescimento dos pelos, os quais adquiriram tonalidade mais clara de acordo com o que se pode observar nas figuras 41F e G, respectivamente.

Finalmente, aos 55 e 60 dias da gestação, observaram-se abertura completa dos olhos, presença de manchas perioculares e pós-auriculares brancas, pêlos grandes e espessos, cuja coloração mostrou-se característica da espécie; e medidas morfométricas atingindo os maiores valores no tocante as detecções quantitativas (Figuras 41H e I).

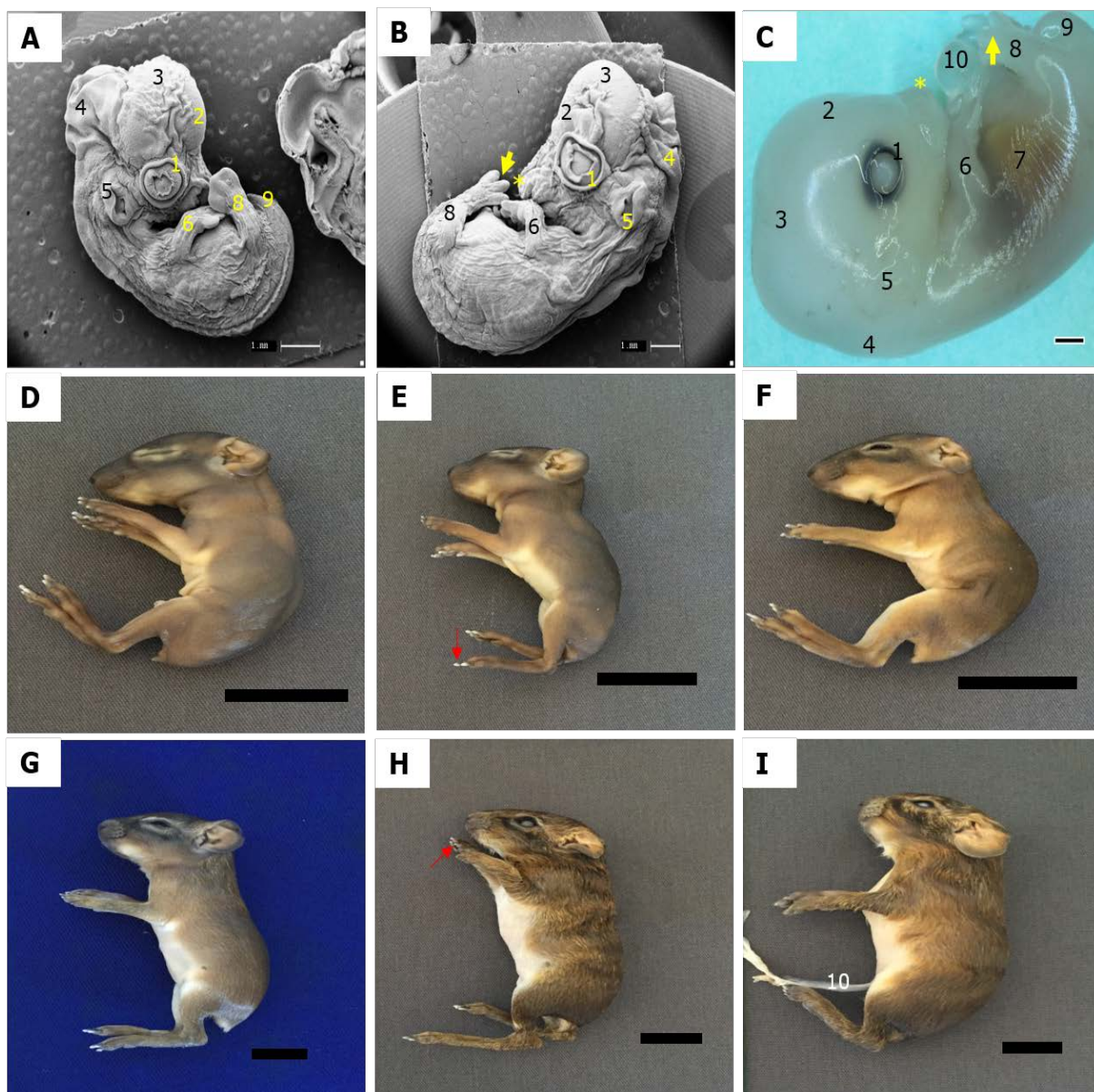


Figura 41– Embriogênese avançada e desenvolvimento fetal em preás. Em A: embrião aos 25 dias de gestação apresentando-se encurvado e com os membros em formato de nadadeiras. Figuras B e C (embriões aos 30 e 35 dias de gestação, respectivamente): notar a presença dos raios digitais (seta) e formação do focinho (*). Figuras D, E, F, G, H e I (fetos aos 40, 45, 48, 50, 55 e 60 dias de gestação, respectivamente): o contínuo desenvolvimento caracterizou-se pela formação das unhas, a partir do quadragésimo dia gestacional (seta apontada na figura E), crescimento dos pelos, aparecimento dos coxins palmares, estes a partir dos 55 dias de gestação (seta da figura H). Notar ainda que a abertura dos olhos dar-se-á também no dia gestacional anteriormente citado. Figuras A e B: microscopia eletrônica de varredura. Figura C: fotodocumentação macroscópica com o auxílio de lupa estereoscópica. Barra da figura: 1cm. Figuras D, E, F, G, H e I: fotodocumentação macroscópica com o auxílio de câmera digital. Barra das figuras: 2cm. Significado das numerações: 1 (placóide do cristalino); 2 (prosencéfalo); 3 (mesencéfalo); 4 (robencéfalo); 5 (saliência auricular); 6 (membro torácico); 7 (saliência cardíaca); 8 (membro pélvico); 9 (cauda); 10 (cordão umbilical). Fonte: Acervo do pesquisador.

5.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA EMBRIONÁRIA E FETAL

A caracterização morfométrica possibilitou o equacionamento dos parâmetros estudados mediante estabelecimento de funções específicas que determinaram uma maior conformidade dos dados em cada curva ou reta gráfica explicativa.

Neste sentido e nas figuras a seguir, agruparam-se os gráficos segundo critérios baseados em medidas gerais de determinação, cujos exemplos foram o peso, comprimento total e *Crown-rump* (Figura 42); similaridades anatômicas como comprimento cefálico, céfalo-caudal, circunferência cefálica e diâmetro biparietal (Figura 43) bem como comprimento torácico, pélvico, das unhas dos membros torácicos e pélvicos e largura das unhas (Figura 45); estruturas contidas na região da cabeça como comprimento do olho, da orelha, dos dentes incisivos superiores e inferiores, diâmetro do olho (Figura 44); regiões dos membros anteriores, posteriores e comprimento da cauda (Figura 46).

Desta forma, a primeira figura em questão possibilitou o entendimento que o parâmetro peso seguiu uma função exponencial, dotada de aumento contínuo e progressivo, ao longo da gestação, cujo crescimento acentuava-se cada vez mais, sobretudo a partir do quadragésimo quinto dia de gestação (Figura 42A).

O comprimento total demonstrou aumento contínuo, porém, representado por uma parábola com concavidade para baixo, fato este que possibilitou afirmar que houve pequeno decrescimento na taxa de variação (Figura 42B). Já o *Crown-rump* pôde ser explicado por uma função cúbica e constituída por três situações distintas: aumento contínuo e acentuado até o trigésimo dia, seguido pelo aspecto quase linear de crescimento progressivo do dia 30 ao 45 além da tendência a estabilização do parâmetro em estudo após este intervalo (Figura 42C).

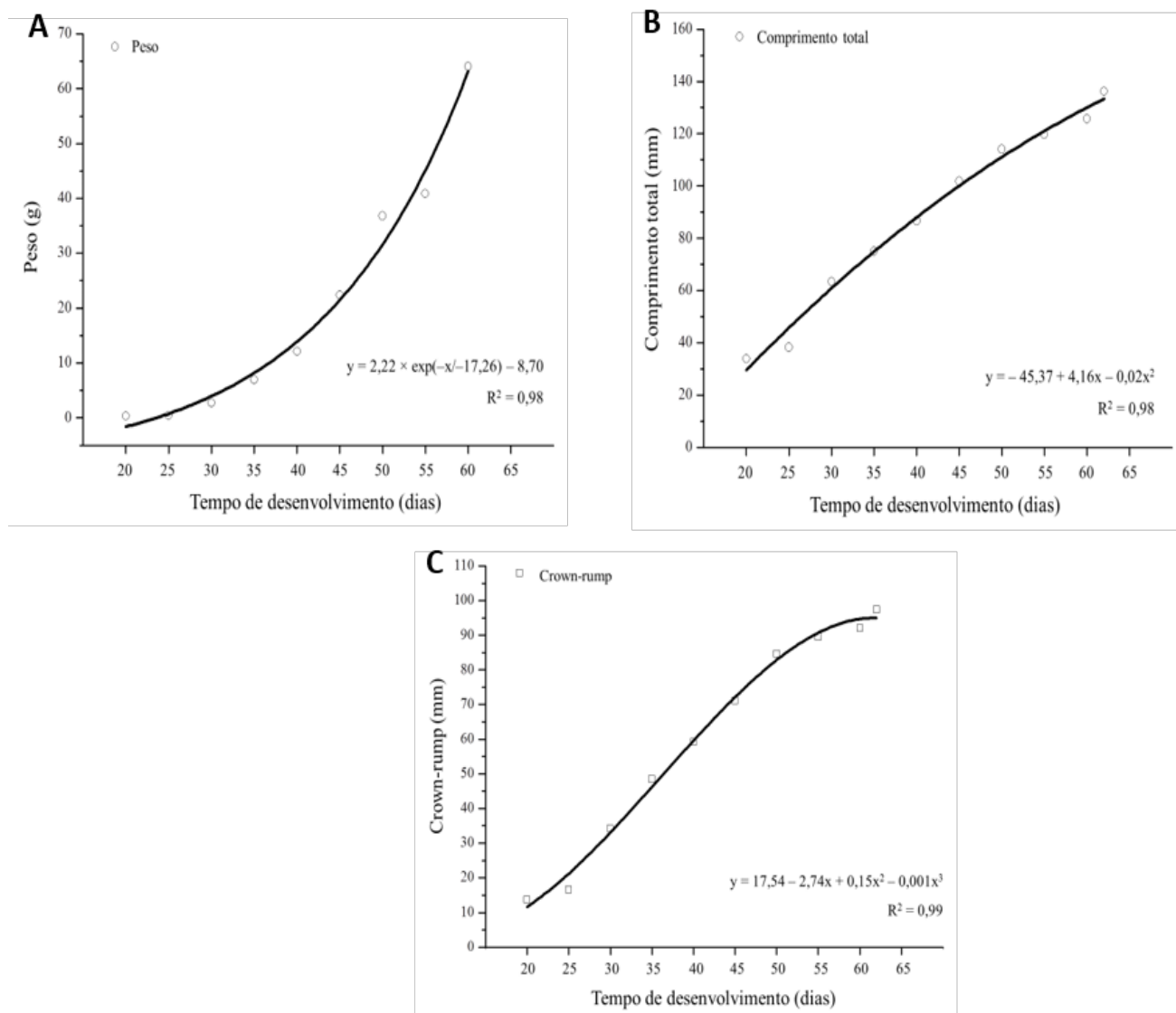


Figura 42– Variação do peso (em gramas), comprimento total e *Crown-rump*, em milímetros, de embriões e fetos de preás segundo a idade gestacional. Fonte: Acervo do pesquisador.

As variáveis analisadas na figura 43 constituíram funções quadráticas dotadas de arcos parabólicos com concavidade para baixo e comportamentos similares no tocante ao decaimento das taxas de variação. Desta forma, na figura 42A observou-se um aumento contínuo e moderado do comprimento cefálico, evidenciado pela menor inclinação das retas tangentes aos pontos de aferição da curva, em relação ao eixo das abscissas.

Nas figuras 43B e D, observaram-se comportamentos similares entre as curvas, com aumentos contínuos do comprimento céfalo-caudal e diâmetro biparietal,

respectivamente, destacando-se o intervalo entre os dias 25 e 30, nos quais perceberam-se as maiores variações dos respectivos valores aferidos. Já na figura 43C, verificou-se um aumento contínuo e acentuado da circunferência cefálica, com diminuição gradativa, no que se refere ao ritmo do crescimento, o qual tendeu à estabilização, do referido parâmetro, a partir do quadragésimo quinto dia.

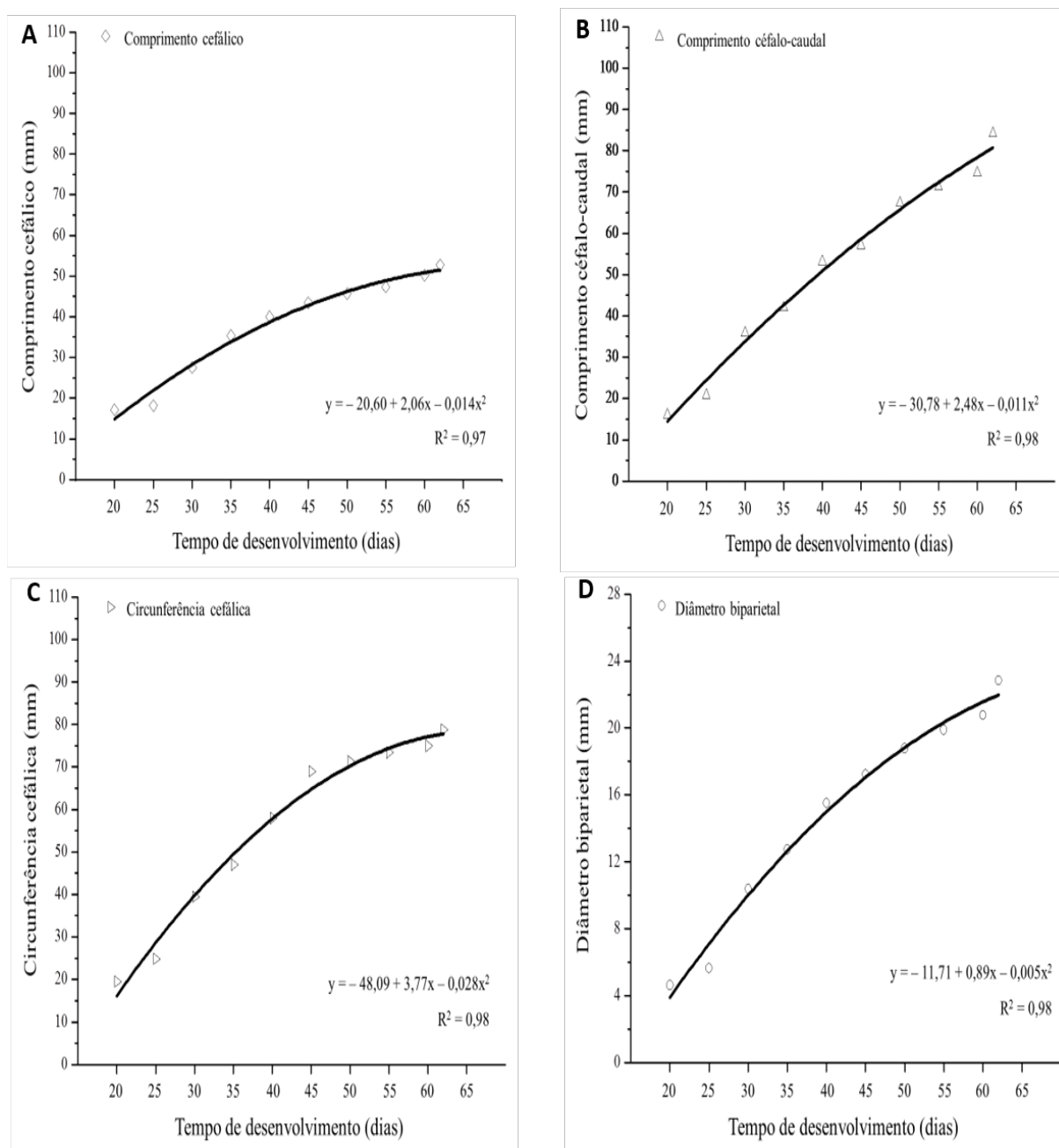


Figura 43– Variação do comprimento cefálico, céfalo-caudal, circunferência cefálica e diâmetro biparietal, em milímetros, de embriões e fetos de preás segundo a idade gestacional. Fonte: Acervo do pesquisador.

O comprimento do olho revelou aumento contínuo e acentuado até o trigésimo quinto dia, ao passo que, após o referido período, houve decréscimo significativo na variação, das medições realizadas, cuja tendência a estabilização ficou evidente (Figura 44A). Com relação ao diâmetro do olho, a maior variação do crescimento ocorreu entre os dias 25 e 30 da gestação, com aferições subsequentes evidenciando um ritmo mais lento no tocante ao referido desenvolvimento (Figura 44B).

Para o comprimento da orelha, o crescimento demonstrou-se acentuado, sendo o intervalo entre o quadragésimo e quadragésimo quinto dias, período no qual se observou a maior variação no desenvolvimento do parâmetro em análise (figura 44C). Na figura 44D, observou-se que os incisivos inferiores sempre apresentaram maiores determinações morfométricas quando comparadas aos incisivos superiores, observando-se uma maior taxa de variação entre os dias 40 e 45, para as duas variáveis em questão.

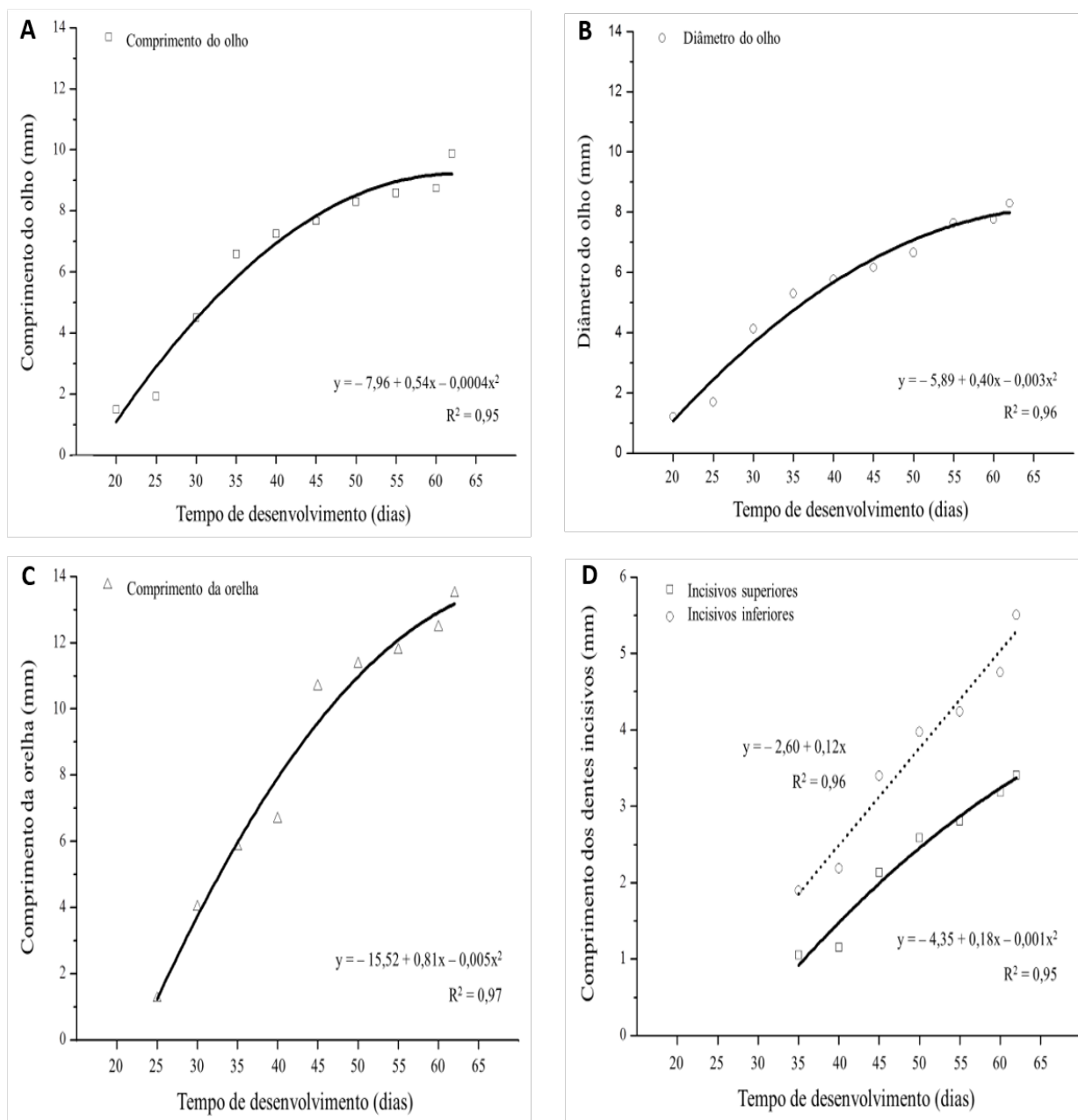


Figura 44– Variação do comprimento do olho, diâmetro do olho, comprimento da orelha e comprimento dos dentes incisivos superiores e inferiores, em milímetros, de embriões e fetos de preás segundo a idade gestacional. Fonte: Acervo do pesquisador.

Analisando-se a figura 45A percebeu-se que o comprimento do membro torácico apresentou pequena variação do crescimento entre os dias 20 e 25, o qual acentuou-se uniformemente nos demais dias gestacionais analisados. O comprimento do membro pélvico refletiu menores variações do crescimento entre os dias 20 e 25 e 60 e 65, ao

passo que nos intervalos compreendidos entre os dias 25 e 30 e 35 e 40 constituíram as maiores variações do desenvolvimento do parâmetro em destaque (Figura 45B).

As dimensões de comprimento e largura das unhas dos membros torácico e pélvico, demonstraram que o comprimento se desenvolveu mais do que a largura, sendo ambas as dimensões sempre maiores nos membros pélvicos (Figuras 45C e D).

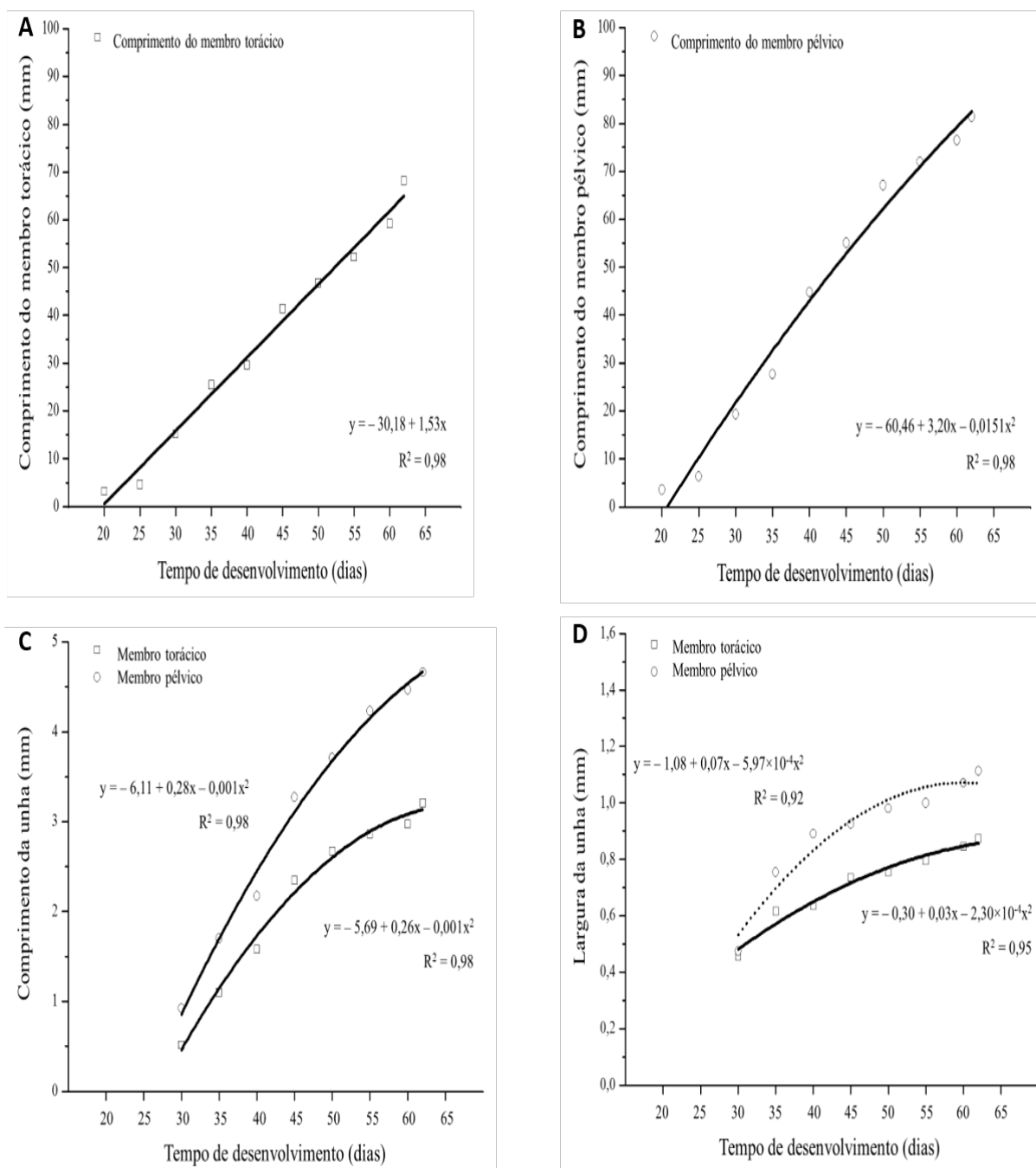


Figura 45– Variação do comprimento torácico, pélvico, das unhas dos membros torácicos e pélvicos bem como da largura das unhas, em milímetros, de embriões e fetos de preás segundo a idade gestacional. Fonte: Acervo do pesquisador.

A função sigmoide que determinou o comprimento da cauda revelou que o crescimento desta variável apresentou um ritmo bastante lento do dia 20 até o trigésimo, sendo, após este último, detectado um aumento acentuado da variável em análise, no intervalo entre os dias 35 e 45 da gestação. Após tal período, seguiu-se um decaimento da variação, verificado pela tendência à estabilização da curva conforme se verifica na figura 46A.

No tocante ao gráfico observado na figura 46B, verificou-se uma variação equivalente da tíbia e do rádio/ulna, do dia 30 ao 45, verificando-se neste último, valores muito próximos para os dois parâmetros estudados e, após este intervalo, detectou-se um decaimento significativo na variação dos valores do rádio/ulna, tendendo a estabilizar-se, enquanto a tíbia continuou com ritmo semelhante de crescimento, excetuando-se os últimos 5 dias, intervalo no qual observou-se uma variação significativa.

Com relação a figura 46C, observou-se um crescimento contínuo e acentuado do perímetro torácico, com um pico de variação entre os dias 40 e 45 e uma redução do ritmo do crescimento nos últimos 5 dias da gestação.

Por fim, o crescimento do perímetro abdominal foi moderado, do dia 20 ao 25, acentuando-se após este período e estendendo-se até os 50 dias de gestação, diminuindo bruscamente a variação do crescimento do dia 50 ao 55, e deste último dia em diante, observou-se um aumento acentuado, permanecendo desta forma até o final da gestação (Figura 46D).

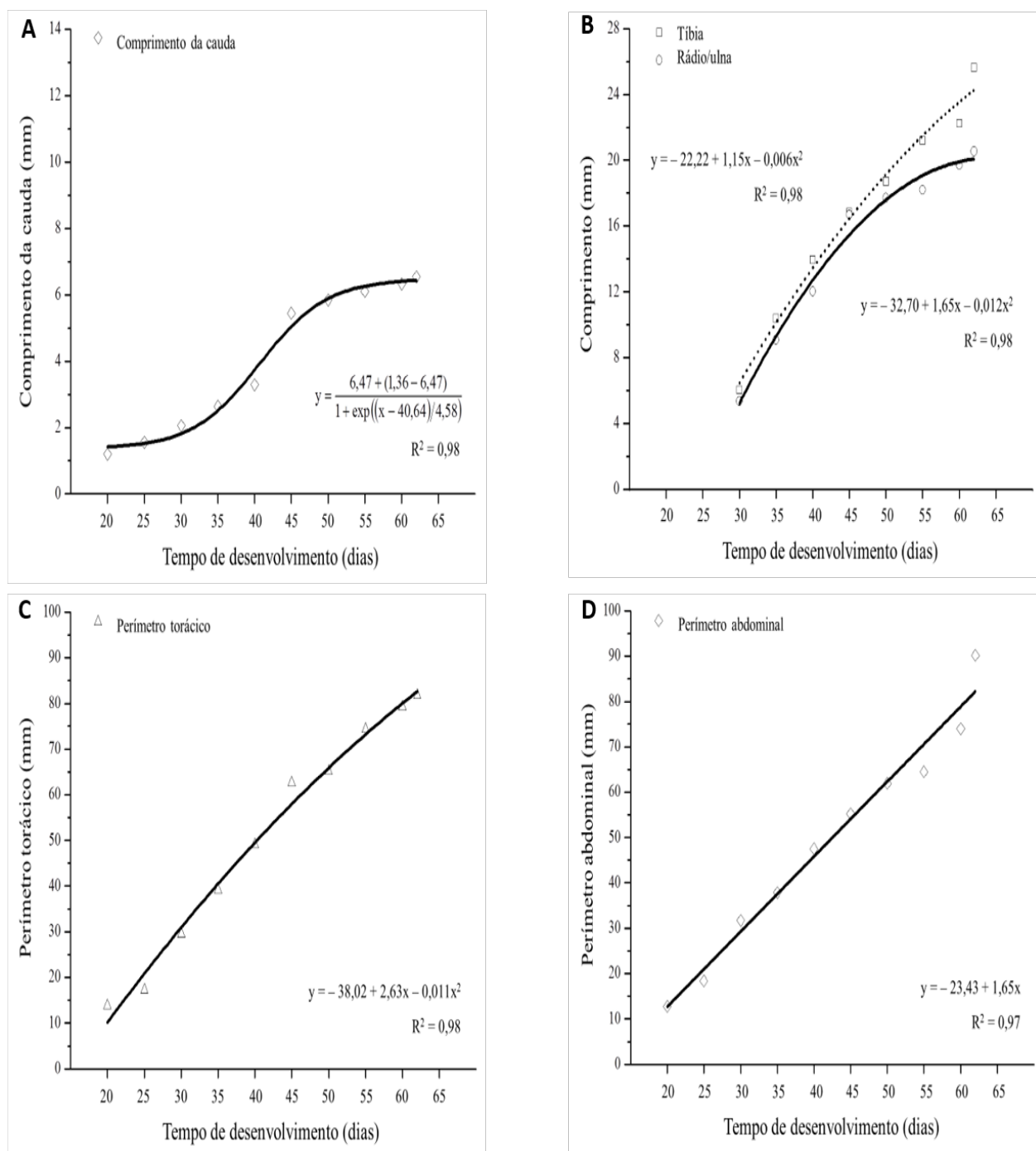


Figura 46– Variação do comprimento da cauda, da tíbia e do rádio/ulna, em milímetros, de embriões e fetos de preás segundo a idade gestacional. Fonte: Acervo do pesquisador.

5.7 EXPRESSÕES DOS GLICOSAMINOGLICANOS (GAGS) E SUAS RELAÇÕES COM OS ÓRGÃOS REPRODUTIVOS, PLACENTÁRIOS E DUAS FASES DO CICLO ESTRAL (ESTRO E DIESTRO)

A realização da eletroforese foi realizada para separação dos GAGs, nos dias de gestação preconizados, em cada órgão analisado, bem como contribuiu para que se pudesse ter informação quantitativa entre duas fases do ciclo estral: estro e diestro. Tal metodologia auxiliou ainda a verificação do período gestacional em que houve maior produção de GAGs e desta forma, a imunolocalização destes compostos foi realizada apenas no referido período.

No entanto, pela técnica da eletroforese, não foi possível o processo de separação de cada glicosaminoglicano contido nas amostras – salvo duas exceções - em estudo para a posterior comparação com a solução padrão previamente conhecida em termos de concentração, visto que não se verificaram formações de bandas distintas.

Nesse sentido e diferentemente do que ocorreu para as amostras, todas as corridas eletroforéticas realizadas demonstraram separações completas entre as moléculas de condroitim, dermatam e heparam sulfatos do padrão, verificadas pela formação de três bandas bem definidas. Entretanto, usou-se tal solução de referência apenas para controlar as corridas realizadas e comparações subjetivas relacionáveis com as amostras testadas, já que estas últimas foram analisadas e quantificadas como a soma de todos os polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria (UAD) pelos motivos já elencados.

Pelo exposto, os resultados a seguir foram demonstrados por órgão reprodutivo, placenta e subplacenta, ao longo de todo o período gestacional, seguido de quantificações das bandas eletroforéticas. Ao final destes resultados, deixou-se evidente um comparativo entre os valores de UAD e os órgãos do sistema reprodutor e placentário.

Diante disso, com relação aos ovários, verificou-se um aumento progressivo na quantidade de GAGs do dia cinco até o vigésimo (58,781; 59,052; 62,121 e 64,253 UAD, respectivamente) seguido de pequenas variações nos dias 25, 35 e 40 (64,224; 66,526 e 65,707 UAD) além de picos de concentração nos dias 30, 45 e 50 (69,327; 72,725 e 70,245 UAD) conforme se observa na figura 47B e qualitativamente na figura 47A.

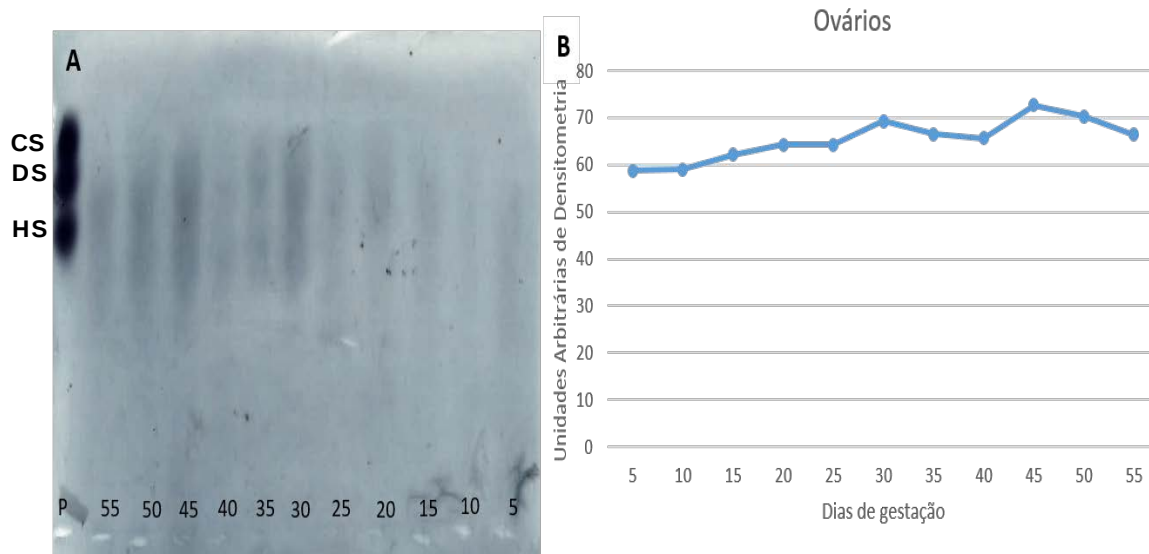


Figura 47– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em ovários de fêmeas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.

Analisando-se as tubas uterinas, demonstrou-se que houve um grande aumento na concentração de GAGs - entre os dias 10 e 15 -, partindo-se de 69,192 para 78,959 UAD, sendo este último valor o mais representativo da quantidade máxima de polissacarídeos identificáveis para este órgão. Seguiu-se ainda duas elevações, em menor magnitude, na gestação intermediária – entre os dias 25 e 30, cujos valores passaram de 72,326 para 75,739 UAD – e gestação avançada (entre os dias 40 e 45), nos quais detectou-se aumento na produção de polissacarídeos sulfatados de 70,734 para 75,885 UAD (Figura 48B).

Além disto, subjetivamente, pode-se inferir, mediante análise da figura 48A, que o glicosaminoglicano predominante em todo o período gestacional foi o dermatam sulfato, sendo o segundo tipo mais frequente representado pelo heparam sulfato, cuja produção foi evidenciada nos dias cinco, 10, 15, 20, 25, 30 e 55 dias, ao passo que pequenas quantidades de condroitim sulfato foram verificadas nos dias 35 e 40 da gestação.

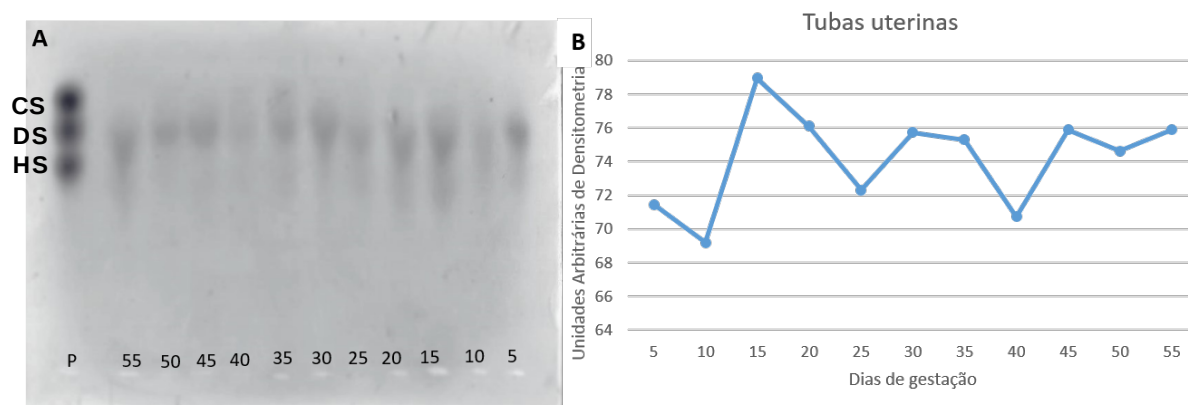


Figura 48– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em tubas uterinas de fêmeas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.

As concentrações relativas de GAGs nos cornos uterinos apresentaram valores elevados quando comparados com as demais estruturas analisadas (Figura 49A), sendo o maior deles na ordem de 92,164 UAD, verificado no quinquagésimo dia de gestação e o menor deles resultou em 75,457 UAD, aferido aos 25 dias. No entanto, excetuando-se este menor valor, os demais apresentaram pequena variação entre si e tal homogeneidade foi refletida em gráfico plotado, cujo aspecto quase retilíneo foi demonstrado na figura 49B.

Nos dias 20, 35 e 50 houve produção quase que exclusiva de dermatam sulfato, sendo possível inferir também que tal glicosaminoglicano foi predominante na maioria dos dias gestacionais estudados de acordo com o que se verifica na figura 49A.

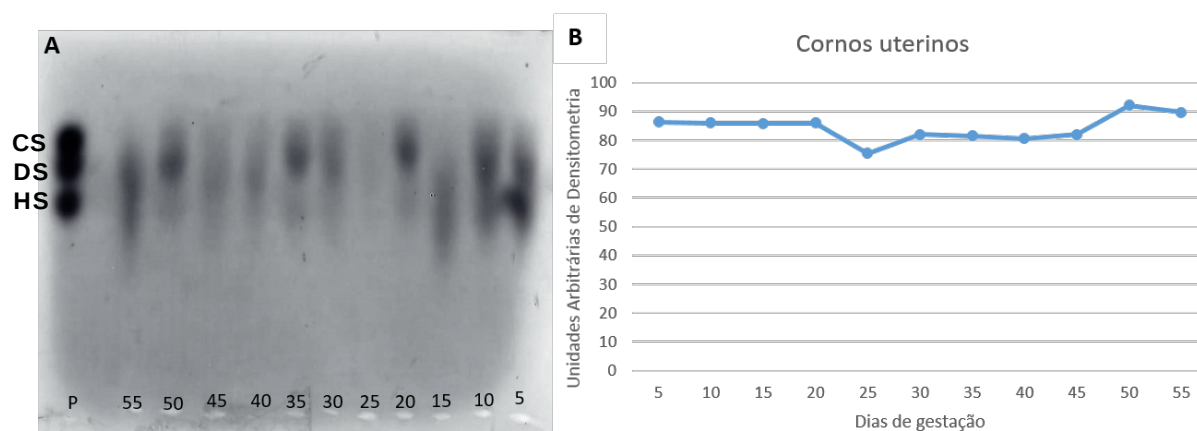


Figura 49– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em cornos uterinos de fêmeas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.

Em relação ao corpo do útero, verificou-se, de modo qualitativo, que nos dias 10, 15 e 20 da gestação o glicosaminoglicano sulfatado em maior concentração foi o heparam sulfato (Figura 50A) e este açúcar contribuiu para que o referido intervalo apresentasse as maiores medições de UAD: 93,731; 92, 161 e 91,050. Interessantemente, ainda houve um aumento brusco no quantitativo de GAGs do dia cinco para o dia 10 da gestação (de 56,450 para 93,731 UAD) seguido de uma estabilização com elevação gradual de concentrações relativas entre os dias 40, 45, 50 e 55 (68,267; 70,710; 73,140 e 75,033 UAD) em cujo gráfico demonstrou-se uma reta levemente inclinada e, por conseguinte, dotada de baixo coeficiente angular (Figura 50B).

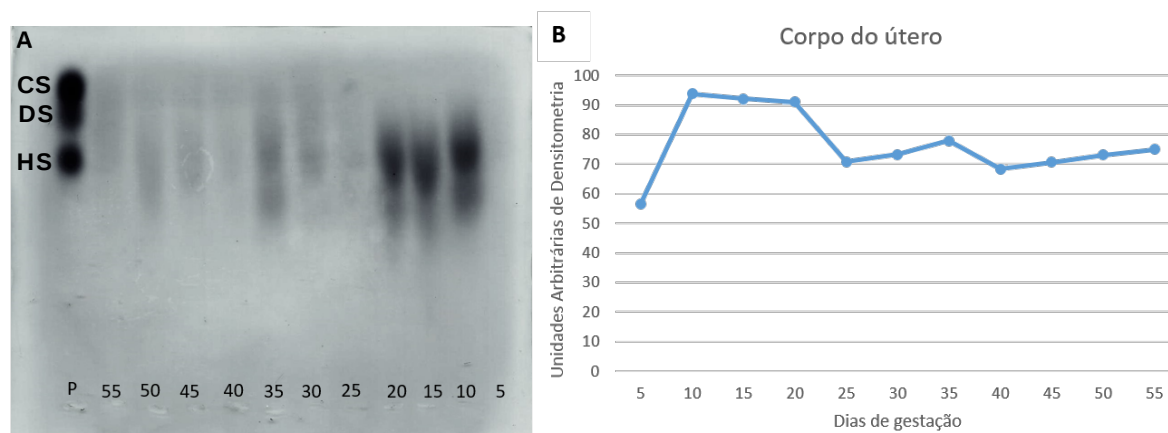


Figura 50– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em corpos do útero de fêmeas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.

Os dias cinco, 10, 15 e 20 foram responsáveis pelas maiores produções de GAGs, na cérvix uterina (ver figura 51A), os quais atingiram UAD na ordem de 91,623; 95,853, 95,784 e 99,332, sendo este último o maior valor isolado quando comparado com as demais estruturas em período gestacional. Posteriormente, seguiu-se uma queda na produção de polissacarídeos sulfatados do vigésimo dia para o vigésimo quinto (99,332 para 71,751 UAD), um aumento cinco dias depois (71,751 para 81,662 UAD) além de diminuições progressivas do dia 30 até o 45 da gestação e novo aumento entre os dias 50 e 55 (Figura 51B). Infelizmente não ficou discernível os tipos de GAGs durante o período de maior produção, porém, no último dia gestacional analisado, ficou claro que dermatam e heparam sulfatos constituíram os polissacarídeos predominantes, conforme se observa na figura 51A.

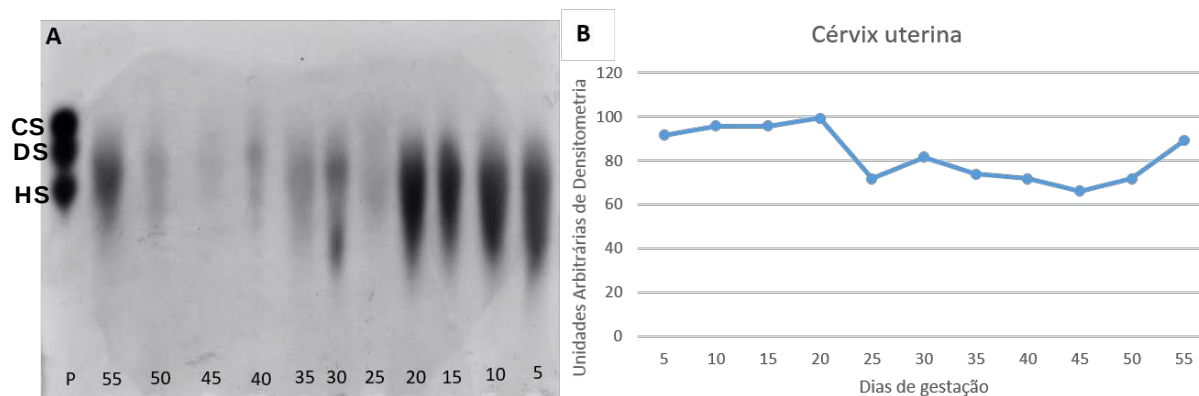


Figura 51– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em cérvix uterinas de fêmeas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.

Esse glicosaminoglicano também apresentou maior concentração, durante os dias de gestação estudados, em amostras de vaginas, as quais demonstraram bandas relativamente distinguíveis (Figura 52A). Estimativas subsequentes de concentração revelaram valores muito próximos, sendo que os extremos inferiores e superiores se situaram em 65,610 e 65,921 UAD respectivamente, curiosamente representando o primeiro e último dia de gestação (Figura 52B).

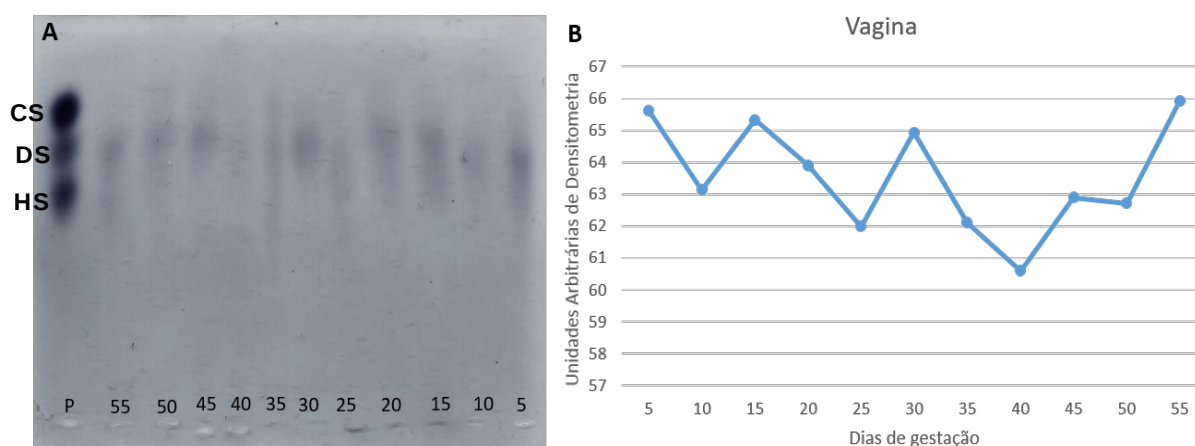


Figura 52– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em vaginas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.

A eletroforese das amostras de vulva denotou, no vigésimo quinto dia gestacional, bandas isoladas de dermatam sulfato, fato este que o elencou como o GAG de maior expressividade, no referido período, como se verifica na figura 60A. Ademais, observou-se que a maior produção de polissacarídeos sulfatados ocorreu na gestação intermediária, ou seja, entre os dias 25 e 40, resultando nos valores 67,523; 66,306; 63,777 e 68,213 UAD de acordo com a figura 53B.

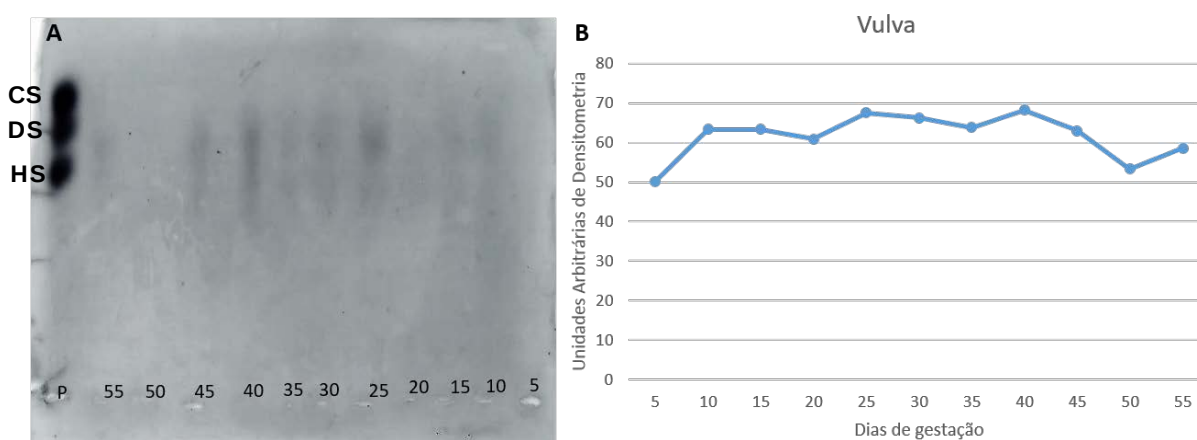


Figura 53– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em vulvas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.

As amostras testadas de placenta e subplacenta produziram os menores resultados quantitativos de GAGs quando comparados as demais estruturas supracitadas; os aumentos e diminuições também apresentaram comportamento irregular ao longo da gestação, porém mantidos numa faixa estreita de concentração (Figuras 54A, 54B e 55A e 55B) excetuando-se um pico de produção que ocorreu, na subplacenta, na transição do dia 50 para o 55 (Figura 55B). Além disto, o órgão placentário conteve o dermatam sulfato como o principal açúcar sulfatado (dias 15, 20, 30, 45, 50 e 55 da gestação) (Figura 54A), ao passo que no trigésimo quinto dia, na subplacenta, houve produção de condroitim sulfato (Figura 55A) e 58,853 UAD de GAGs aos 55 dias (Figura 55B).

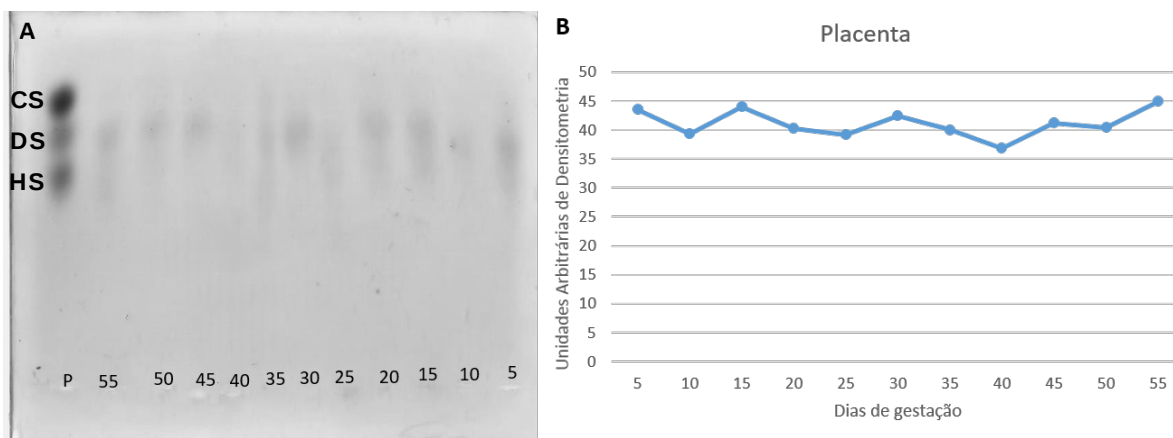


Figura 54– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em placentas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do quinto dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação.

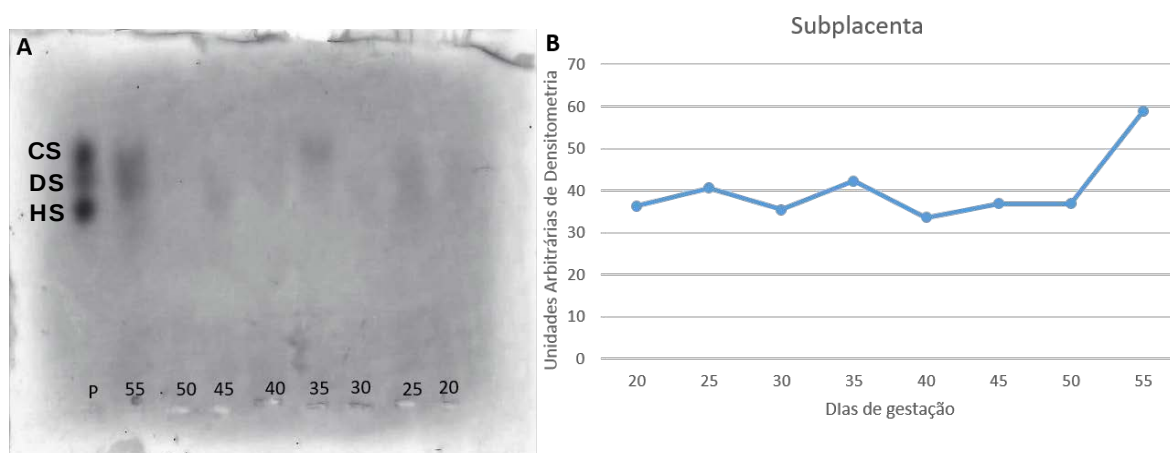


Figura 55– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em subplacentas de preás gestantes. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs, em diferentes dias de gestação – do vigésimo dia até os 55 dias-, sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão: 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação ao longo da gestação. Fonte: Acervo do pesquisador.

Após a exposição dos resultados individuais de cada órgão analisado no transcorrer gestacional, realizou-se o cálculo das médias aritméticas da quantidade de

GAGs, dadas em UAD, com o intuito de se verificar em quais órgãos dar-se-iam as maiores produções dos compostos polissacarídicos em questão. Assim, os componentes integrantes do útero (cornos, corpo e cérvix) se sobressaíram frente as tubas uterinas e estas, por sua vez, contiveram maior quantidade de GAGs do que os ovários. Neste sentido, seguiu-se, em ordem decrescente de concentração: vagina, vulva, placenta e subplacenta (Figura 56).

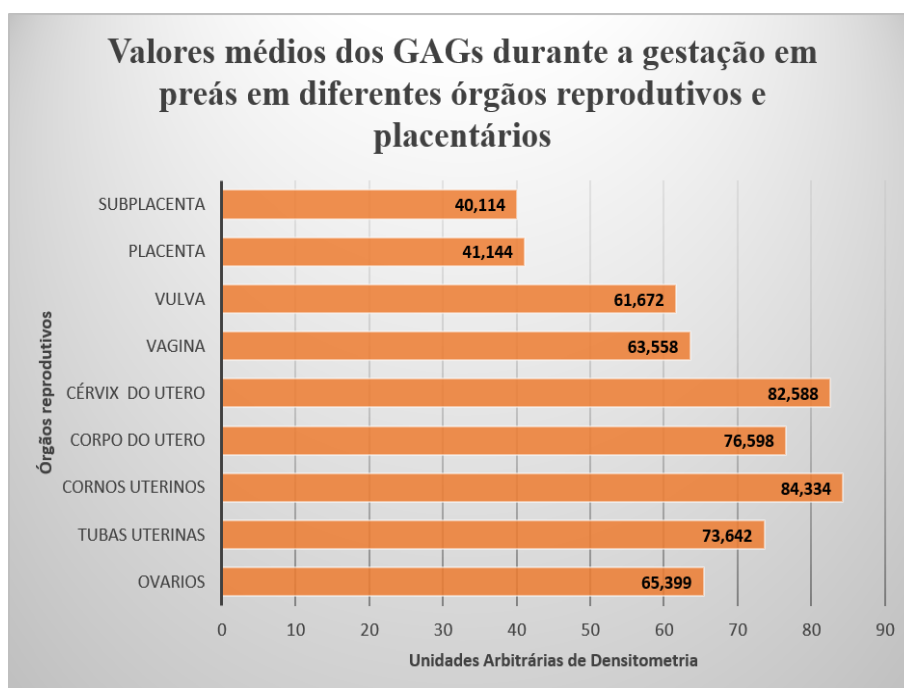


Figura 56– Gráfico representativo das médias aritméticas de GAGs, em termos de Unidades Arbitrárias de Densitometria, obtidas ao longo da gestação, em diferentes órgãos reprodutivos e placentários.

No caso da fase estrogênica, evidenciou-se que os órgãos reprodutivos com maior concentração de GAGs foram ovários, vaginas e vulvas (Figuras 57A e B), cujas medições densitométricas revelaram 69,353; 98,285 e 66,024 UAD (Figura 57B). As tubas, cornos, corpos e cérvices apresentaram expressões de polissacarídeos com valores próximos entre si como se verifica no gráfico da figura 57B.

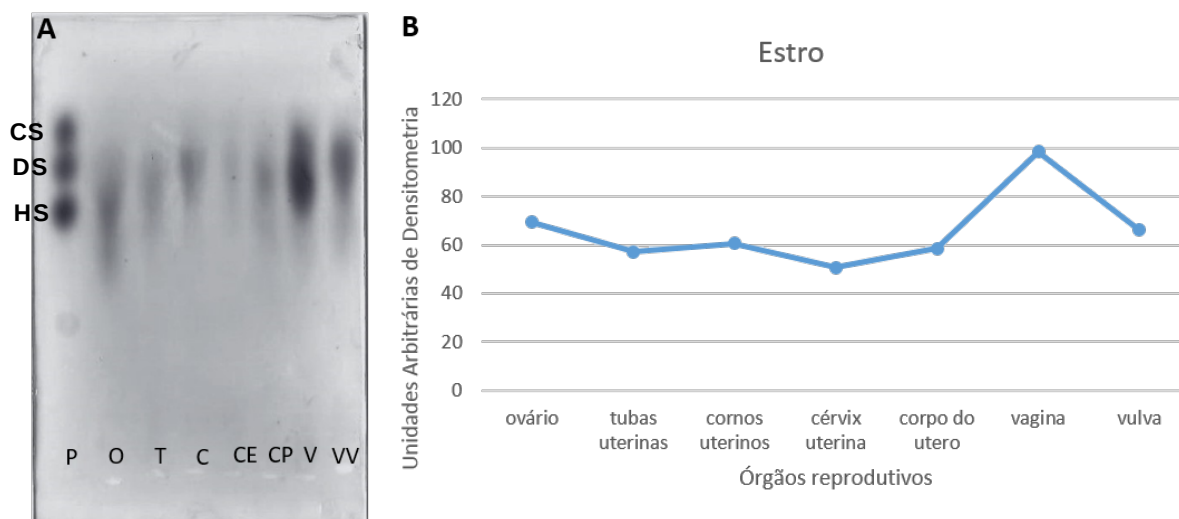


Figura 57– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em órgãos reprodutivos durante específica fase do ciclo estral (estro) em fêmeas de preás. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs em ovário (O), tuba uterina (T), corno uterino (C), cérvis (CE), corpo do útero (CP), vagina (V) e vulva (VV), sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação nos órgãos analisados. Fonte: Acervo do pesquisador.

Já o diestro revelou quantidades de GAGs muito baixas, nos órgãos do sistema reprodutor feminino, com bandas quase não visíveis em lâmina corada pós-corrída eletroforética (Figura 58A). Esta característica também foi refletida no gráfico plotado, cuja amplitude só foi verificada quando se achatou o eixo das ordenadas em valores mínimos e máximos compreendidos entre 33 e 39 UAD (Figura 58B).

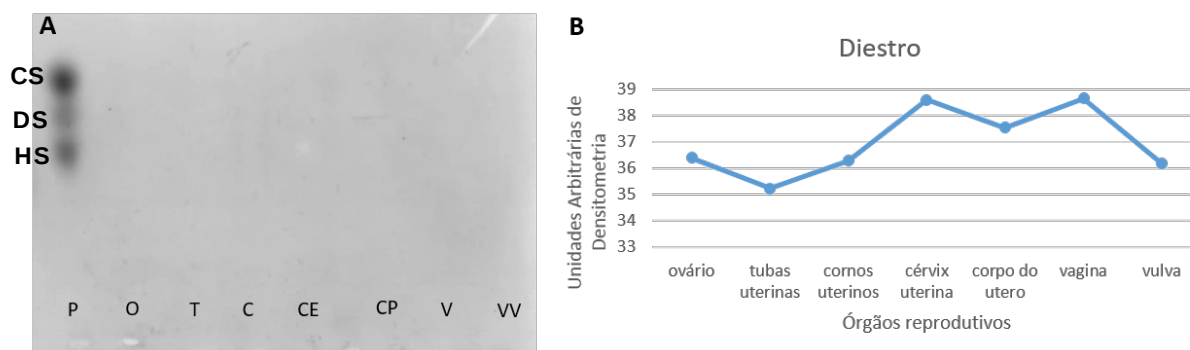


Figura 58– Eletroforese de glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de agarose e quantificação em órgãos reprodutivos durante específica fase do ciclo estral (diestro) em fêmeas de preás. Em A: observa-se as bandas separadas de GAGs em ovário (O), tuba uterina (T), corno uterino (C), cérvis (CE), corpo do útero (CP), vagina (V) e vulva (VV), sendo as respectivas amostras comparadas frente a uma solução padrão (P): 1mg/dL constituída por mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, os quais formaram bandas distinguíveis de cima para baixo, respectivamente. Em B: verifica-se a quantificação dos referidos polissacarídeos em Unidades Arbitrárias de Densitometria e a consequente variação nos órgãos analisados. Fonte: Acervo do pesquisador.

Para efeito comparativo, ficou evidente, no gráfico da figura 59, a maior produção de GAGs no estro quando comparado ao diestro.

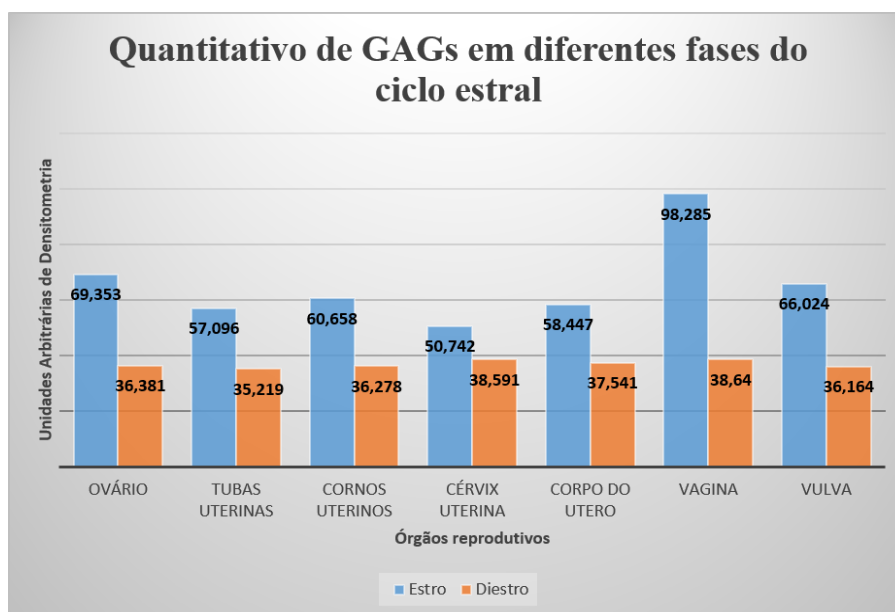


Figura 59– Gráfico representativo das quantidades de GAGs, em termos de Unidades Arbitrárias de Densitometria, em diferentes órgãos reprodutivos, nas fases de estro (barras azuis) e diestro (barras laranjas).

5.8 CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DAS REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS PARA GLICOSAMINOGLICANOS DIRECIONADAS AOS OVÁRIOS, TUBAS, VAGINAS, TECIDOS UTERINOS, PLACENTÁRIOS E SUBPLACENTÁRIOS

As reações imunohistoquímicas para glicosaminoglicanos e direcionadas aos órgãos do sistema reprodutor feminino, placenta e subplacenta revelaram perfis de distribuição variáveis em suas constituições teciduais bem como de acordo com o tipo de macromolécula polissacarídica analisada ao longo da gestação.

Com relação aos ovários, verificou-se que na gestação intermediária e, em especial, no final dela ocorreram as maiores expressões de glicosaminoglicanos como o heparan, dermatan e condroitim sulfatos. Desta forma, moléculas de heparan sulfato estiveram mais concentradas no corpo lúteo, região das tecas foliculares e estroma

medular ovariano (Figura 60A). Esta característica não se repetiu quando se tratou da análise do dermatam sulfato. Aparentemente, este glicosaminoglicano apresentou-se em quantidades significativamente elevadas, porém distribuídas de forma difusa por toda a estrutura dos ovários (Figura 60B). Já no caso do condroitim, verificou-se sua imunolocalização nas células da teca e tecido conjuntivo interfolicular (Figura 60C).

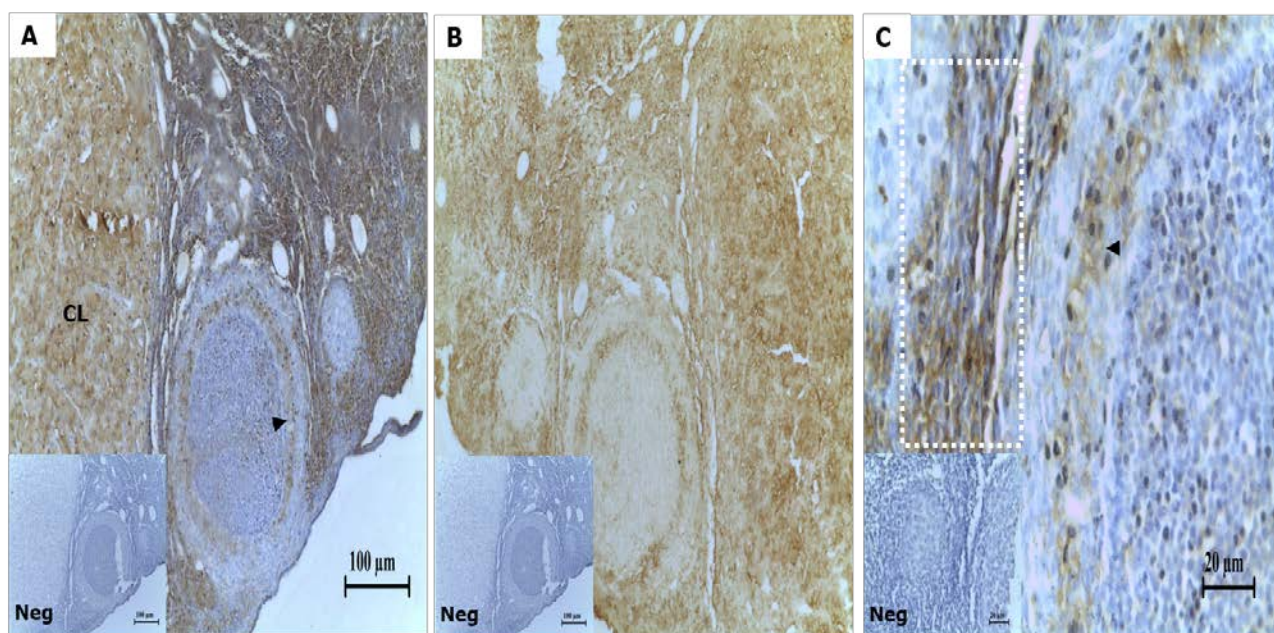


Figura 60– Ovários de preás obtidos no final da gestação e submetidos a reação imunohistoquímica para heparan (figura A), dermatam (figura B) e condroitim sulfatos (figura C). A: as marcações foram predominantes no corpo lúteo (CL), células da teca dos folículos (cabeça de seta) e células estromais da medula ovariana. B: as reações para dermatam sulfato foram intensas e difusas por toda a estrutura dos ovários. C: o condroitim sulfato encontrou-se preferencialmente nas células da teca (cabeça de seta) e no conjuntivo entre os folículos. Fonte: Acervo do pesquisador.

Os testes imunohistoquímicos para os três glicosaminoglicanos analisados anteriormente foram realizados também para as tubas uterinas, em início da gestação, nas regiões do istmo, cuja marcação para o dermatam sulfato foi intensa e predominante no tecido conjuntivo frouxo (Figura 61A); do infundíbulo, onde o heparan sulfato distribuiu-se em elevadas concentrações por toda a extensão do referido segmento tubárico (Figura 61B). No conjuntivo frouxo e porção serosa da ampola, evidenciou-se a presença do condroitim sulfato (Figura 61C).

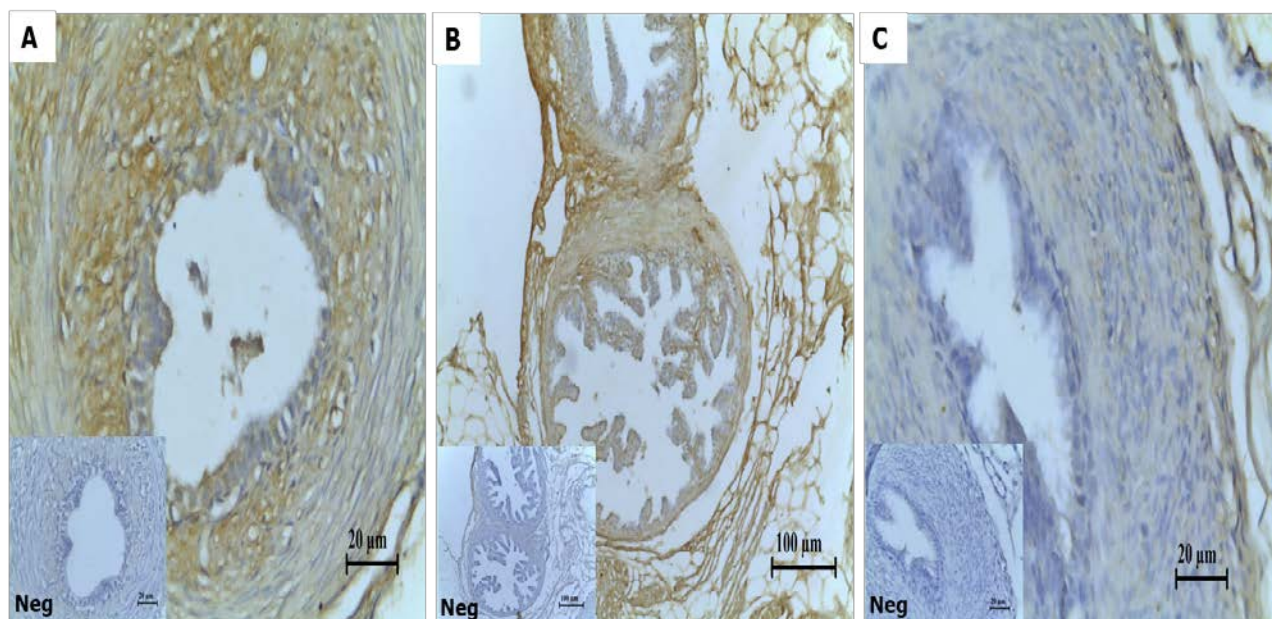


Figura 61– Tubas uterinas de preás obtidas no início da gestação e submetidas a reação imunohistoquímica para dermatam (figura A), heparam (figura B) e condroitim sulfatos (figura C). A: as marcações foram predominantes no tecido conjuntivo frouxo na região do istmo. B: as reações para o heparam sulfato foram intensas e difusas na porção do infundíbulo da tuba. C: o condroitim sulfato apresentou-se distribuído no conjuntivo frouxo e camada serosa da ampola tubárica. Fonte: Acervo do pesquisador.

Os cornos uterinos, na gestação inicial, apresentaram expressões de ácido hialurônico (Figura 62A), heparam (Figura 62B), condroitim (Figura 62C) e dermatam sulfatos (Figura 62D), os quais estiveram em maior proporção no tecido conjuntivo frouxo e ainda na bordadura estriada, situada na porção apical das células epiteliais cilíndricas que revestiam a luz deste segmento uterino.

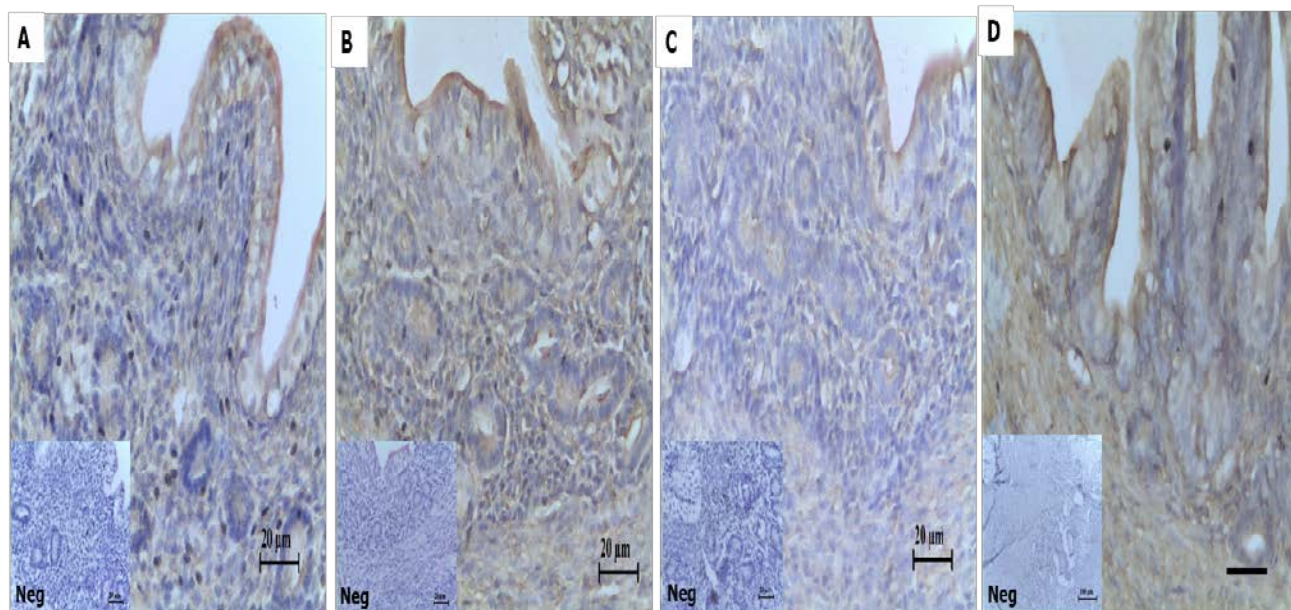


Figura 62– Cornos uterinos de preás obtidos no início da gestação e submetidos a reação imunohistoquímica para ácido hialurônico (figura A), heparam (figura B), condroitim (figura C) e dermatam sulfatos (figura D). Figuras A e B: as marcações dos respectivos GAGs foram predominantes no tecido conjuntivo frouxo. C: as reações para condroitim sulfato foram difusas, pouco evidentes e localizadas no conjuntivo frouxo. D: o dermatam sulfato encontrou-se ricamente concentrado por todo o corno uterino. Barra da figura: 20µm. Fonte: Acervo do pesquisador.

Com relação ao corpo do útero verificou-se, no início da gestação, que o heparam sulfato, ácido hialurônico e dermatam sulfato distribuíram-se no conjuntivo frouxo bem como na bordadura estriada das células epiteliais (Figura 63A, B, C).

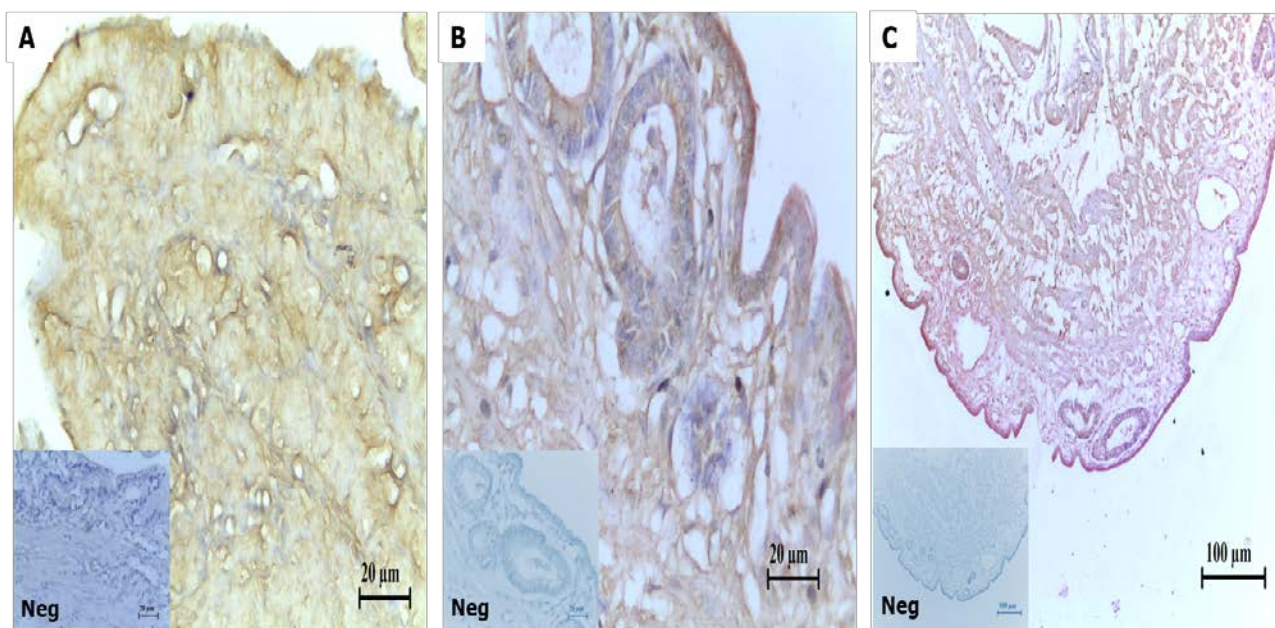


Figura 63– Corpo do útero de preás obtidos no início da gestação e submetidos a reação imunohistoquímica para heparam sulfato (figura A), ácido hialurônico (figura B) e dermatam sulfato (figura C). A: a reação para o heparam foi intensa e difusa no corpo do útero. B: o ácido hialurônico encontrou-se distribuído difusamente. C: notar a distribuição do dermatam sulfato. Fonte: Acervo do pesquisador.

Na cérvix uterina, os glicosaminoglicanos estiveram em maiores concentrações, quando testados, no início da gestação, podendo-se destacar o heparam (Figura 64A), dermatam (Figura 64B), condroitim sulfato (Figura 64C) e ácido hialurônico (Figura 64D). A presença destes foram difusas no tecido conjuntivo frouxo e até mesmo no epitélio de revestimento. Além disto, os limites celulares das células epiteliais glandulares apresentaram marcação específica para o condroitim sulfato (Figura 64C).

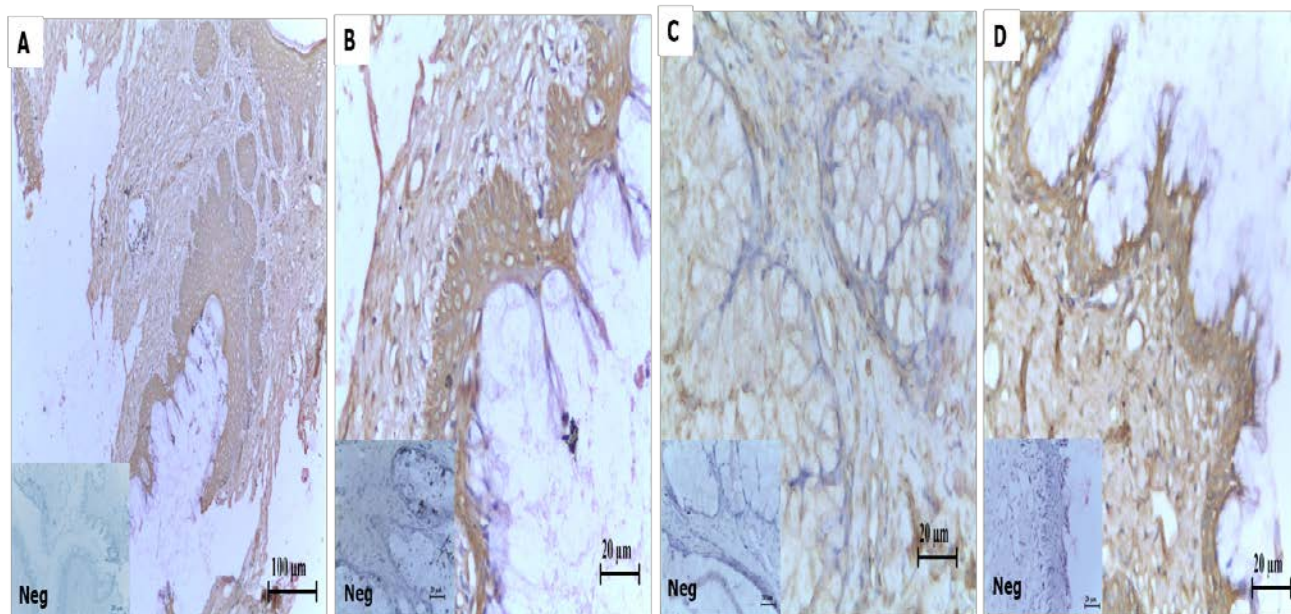


Figura 64– Cérvices uterinas de preás obtidas no início da gestação e submetidas a reação imunohistoquímica para heparam sulfato (figura A), dermatam sulfato (figura B), condroitim sulfato (figura C) e ácido hialurônico (figura D). As figuras A, B, C e D apresentaram intensa marcação difusa no conjuntivo frouxo e epitélio de revestimento. Fonte: Acervo do pesquisador.

As amostras de vaginas, avaliadas no início da gestação, foram marcadas pelos anticorpos anti-DS (dermatam sulfato), anti-HS (heparam sulfato) e anti-CS (condroitim sulfato) preferencialmente no conjuntivo deste órgão, conforme se observa nas figuras 65A, B e C.

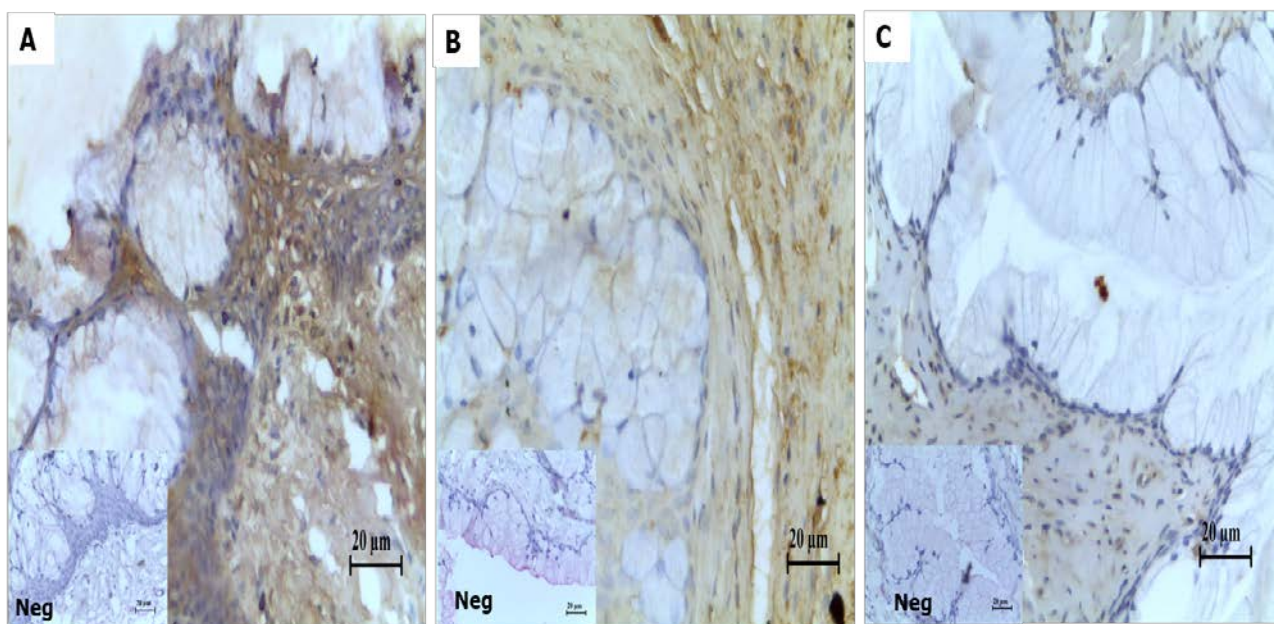


Figura 65– Vaginas de preás obtidas no início da gestação e submetidas a reação imunohistoquímica para dermatam (figura A), heparam (figura B) e condroitim sulfatos (figura C). As três figuras demonstram marcação específica no tecido conjuntivo deste órgão. Fonte: Acervo do pesquisador.

As análises imunohistoquímicas do tecido placentário, obtidos na gestação intermediária de preás, apresentaram como principais glicosaminoglicanos o dermatam, heparam, condroitim e ácido hialurônico, cujas distribuições estiveram concentradas no endoderma parietal e espongiotrofoblasto para o heparam sulfato (Figura 66D) e labirinto placentário para os demais (Figuras 66A, B e C).

No referido endoderma a marcação com anticorpos anti-HS estiveram localizadas na membrana de Reichert e na placenta, concentrados no mesênquima que sustentava as células espongiotrofoblásticas. Na região labiríntica, anticorpos anti-DS, CS e contra o ácido hialurônico promoveram marcações difusas no tecido conjuntivo desta localidade.

No caso da subplacenta a distribuição do condroitim, dermatam e heparam sulfatos estiveram presentes de forma similar ao labirinto, ou seja, difundidos por todo o mesênquima subplacentário (Figuras 67A, B e C).

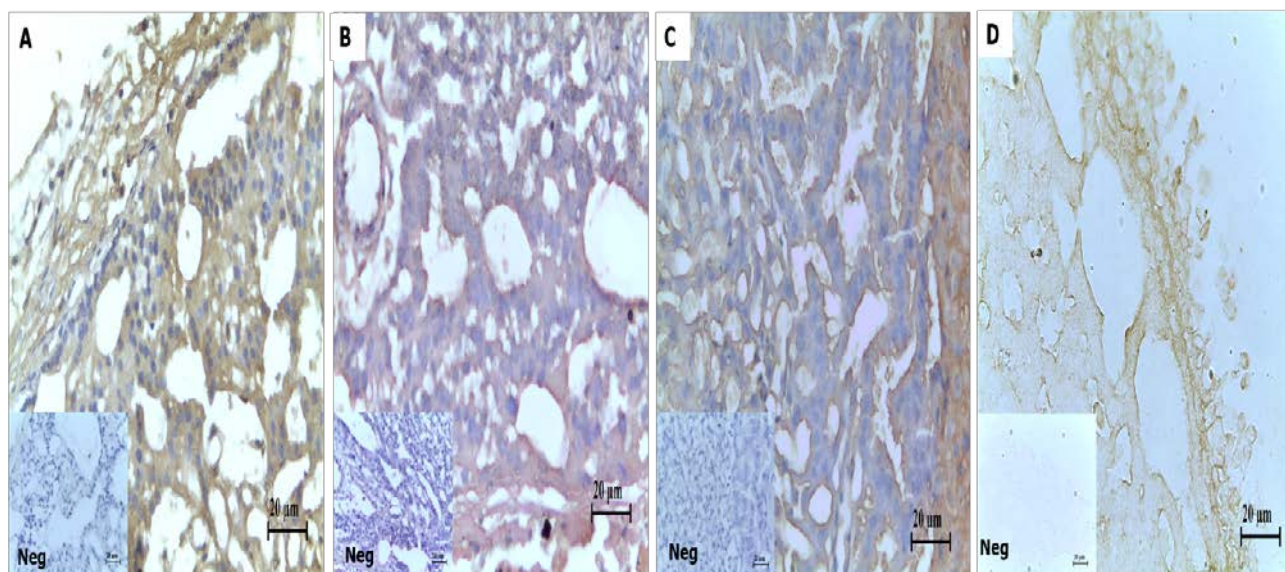


Figura 66— Placentas corioalantoides de preás obtidas no meio da gestação e submetidas a reação imunohistoquímica para dermatam (figura A), ácido hialurônico (figura B), condroitim (figura C) e heparam sulfatos (figura D). As três primeiras figuras demonstram marcação específica no tecido conjuntivo do labirinto placentário, ao passo que em D, destacou-se reação positiva no endoderma visceral do saco vitelino e espongiotrofoblasto. Fonte: Acervo do pesquisador.

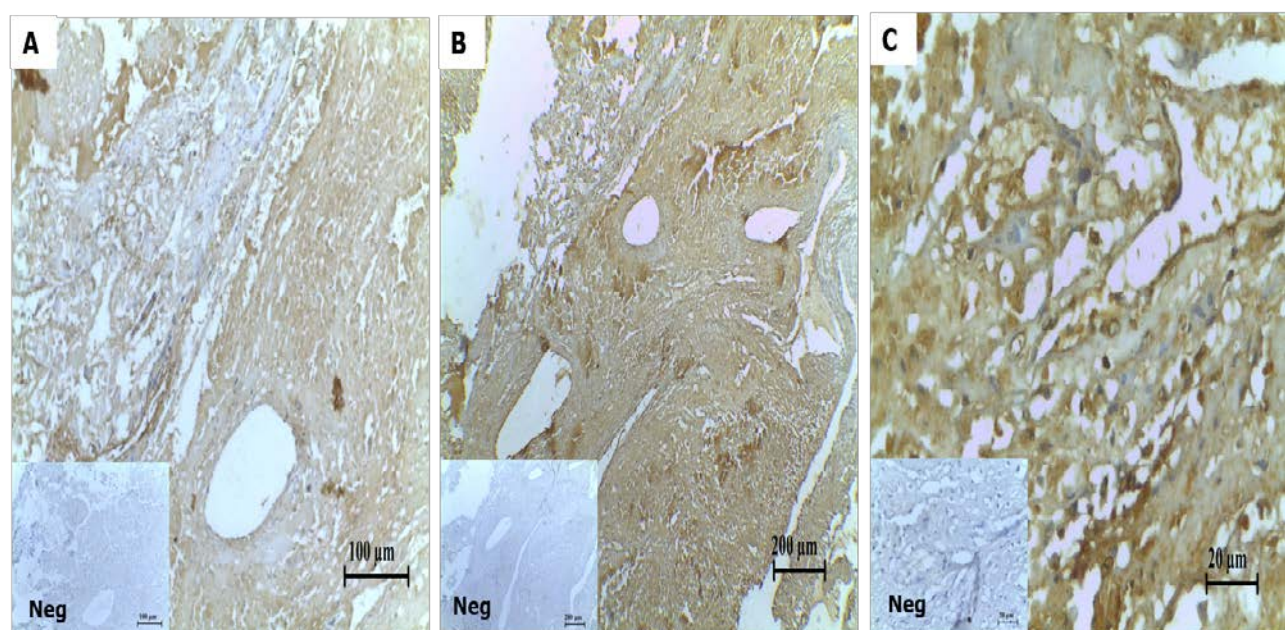


Figura 67— Subplacentas de preás obtidas no final da gestação e submetidas a reação imunohistoquímica para heparam (figura A), dermatam (figura B) e condroitim sulfatos (figura C). As três figuras denotam marcação difusa, porém concentradas no mesênquima subplacentário. Fonte: Acervo do pesquisador.

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de modelos experimentais animais torna-se importante na medida em que estes contribuem para a compreensão de fenômenos biológicos naturais, os quais podem ser transpostos para outras espécies, que possuem relações filogenéticas próximas. Por conseguinte, os conhecimentos a cerca dos eventos reprodutivos, da etiopatogenia das doenças, dos efeitos de medicamentos em sistemas biológicos e/ou intervenções cirúrgicas podem ser aprofundados, extrapolados para outras espécies, inclusive a humana e transmitidos para toda a comunidade acadêmica (FERREIRA et al., 2005).

Nesse sentido, o estabelecimento das informações filogenéticas das espécies veio a agregar e aperfeiçoar as classificações taxonômicas tradicionais mediante novas tecnologias empregadas, podendo-se citar, por exemplo, detecções de regiões gênicas de éxons e íntrons, caracterizações do gene codificador do receptor do hormônio do crescimento, genes relacionados a produção de hormônios tireoidianos e material genético mitocondrial em indivíduos pertencentes a uma mesma superfamília (ROWE; HONEYCUTT, 2002).

Para tanto, ressalta-se a importância dos roedores, os quais constituem excelentes modelos experimentais, que servem de base para que os achados moleculares, oriundos destes estudos, favoreçam as respectivas influências no fenótipo e características evolutivas, as quais são permeadas pelos comportamentos sociais, reprodutivos e morfofisiológicos (BURDA et al., 2000). Associado a isto, torna-se importante a coleta de dados referentes as características reprodutivas, habitat peculiar, o peso do animal adulto e em estágios anteriores do desenvolvimento, tempo de gestação de uma determinada espécie bem como os aspectos relativos ao seu metabolismo (ROWE; HONEYCUTT, 2002).

No entanto, a ordem Rodentia carece de maiores detalhes, no que se refere a natureza anteriormente citada, principalmente diante da grande diversidade de exemplares existentes na fauna brasileira, sendo, em muitos casos, pouco conhecido, sobre quantas e quais espécies ocorrem dentro dos limites locais, regionais e nacionais (DALMACRO; VIEIRA, 2005; CADEMARTORI et al., 2008). Ainda com relação a este

aspecto, os padrões demográficos exibidos por esses animais podem refletir mudanças sazonais, modificações em termos de abundância e taxas de sobrevivência, sendo tais padrões dependentes das estratégias reprodutivas apresentadas pelas muitas espécies em resposta aos diferentes desafios impostos pelo ambiente (CADEMARTORI et al., 2005).

Por esse motivo, torna-se necessário os conhecimentos prévios da reprodução de determinada espécie de roedor, cujas informações incluam as características anatômicas do aparelho reprodutor feminino, o tempo gestacional, dados morfométricos embrionários e fetais – estes indicando parâmetros importantes que se correlacionam com determinado período da gestação, favorecendo, pois, estimativas adequadas de cada fase específica -, aspectos morfofisiológicos das membranas fetais e placentação. Desta forma, com a sedimentação destas informações, podem ser agregados estudos, em âmbito molecular, da presença e frequência com que algumas macromoléculas se encontram distribuídas nos órgãos anteriormente citados e quais inferências são passíveis de serem extraídas neste processo.

Consequentemente, tem-se aumentado o interesse clínico de pesquisas que avaliem os glicosaminoglicanos, justamente pelo fato de tais compostos bioquímicos estarem relacionados aos processos de reconhecimento, migração, proliferação e diferenciação celulares (CUBAS et al., 2010). Além disto, podem se encontrar direta ou indiretamente relacionados as respostas imunes, angiogênese, formações neoplásicas, metástases, implantação embrionária, capacitação espermática e até mesmo infertilidade (DUTT et al., 2006; LOPES et al., 2006; NASCIUTTI et al., 2006; GRIFFITHS et al., 2008).

Como um dos objetivos do presente trabalho consistiu na extração, detecção e análise da presença de glicosaminoglicanos em órgãos do sistema reprodutivo e placentário durante a gestação e ainda duas fases do ciclo estral, o modelo experimental escolhida, o preá, se configurou satisfatória, mediante a facilidade com que tal espécie pôde ser criada em cativeiro, o pequeno porte, o manejo, onde após período adaptativo os animais em questão demonstraram pouco estresse e período moderado de gestação.

Ademais e por se tratar de um animal silvestre, que ainda não foi plenamente estudado, buscou-se trazer à tona também todo o processo reprodutivo, incluindo dados do ciclo estral e análise macroscópica das principais estruturas contribuidoras para o

sucesso reprodutivo bem como aquelas, referentes ao desenvolvimento embrionário e fetal.

6.1 DESCRIÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

No tocante aos órgãos do sistema reprodutor feminino, Almeida et al. (2002) avaliaram as características anatômicas dos ovários de cutias, particularmente as relações de sintopia e esqueletopia, os elementos de sustentação, os aspectos histológicos bem como a sua morfometria. Para tanto, estudaram 24 ovários oriundos de 13 cutias adultas, sendo sete fêmeas gestantes e seis não gestantes. As descrições iniciais verificadas nos resultados caracterizaram os ovários destes animais com formato elipsoide ou ovalado, achatados dorsoventralmente, situados caudalmente aos rins e apresentando superfície externa com pequenas áreas transparentes, fato este que corrobora com os nossos resultados obtidos em preás.

Histologicamente, nas cutias gestantes, evidenciaram-se ovários contendo de dois a três corpos lúteos centrais e muitos outros menores periféricos. Tais órgãos encontravam-se revestidos pela túnica albugínea que envolvia o epitélio germinativo, córtex periférico - contendo células de natureza conjuntiva e folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento – e região medular, dotada de tecido conjuntivo frouxo entremeado por vasos sanguíneos. Em fêmeas de preás do nosso estudo, verificou-se a presença de um grande e único corpo lúteo localizado em posição central, alguns menores distribuídos perifericamente. O revestimento epitelial, regiões corticais, medulares e seus mesênquimas associados mostraram-se semelhantes aos verificados em capivaras (SILVA; PERDOMO, 1983) e pacas (PASHOV; MATAMOROS 1985; SOUZA et al., 2000).

Nesse contexto, Santos et al. (2014) caracterizaram a morfologia do sistema reprodutor femino em dez fêmeas primíparas de preás não gestantes. Demonstraram os ovários como órgão pares, fixados pelo ligamento do mesovario, na cavidade abdominal com forma achatada e envolvido, em parte, por tecido adiposo. Microscopicamente, a superfície deste órgão foi dividida em medular, a qual era bastante vascularizada e

cortical, contendo numerosos folículos. Esta última, apresentou-se constituída por grande quantidade de folículos primordiais que continham um ovócito com núcleo central e citoplasma transparente. Seguiu-se ainda verificações da presença de outros estádios maturativos como os secundários e terciários, sendo que nos mais maduros, observaram-se a presença de oócitos, os quais estavam envolvidos pelas células do *cumulus oophorus* e da *corona radiata*. Estes resultados foram concordantes com os verificados em nosso trabalho tanto para fêmeas não gestantes quanto para aquelas que gestaram. Seguem-se, pois, padrões semelhantes aos determinados por Reis et al. (2011) para *Cuniculus paca* e por Felipe et al. (1999) para o *Myocastor coypus*.

Os dados histológicos oriundos de folículos maduros em preás também nos proporcionaram verificações de corpúsculos polares, imersos no líquido folicular e situados próximos ao oócito, achado este não sendo demonstrado em outros trabalhos que avaliaram a morfologia do sistema reprodutor feminino em roedores.

De acordo com Beck e Boots (1974) e Walter et al. (2001) as tubas uterinas constituem órgãos pares, de natureza tubular, as quais são suspensas e revestidas pela mesosalpinge, que promove conexão da cavidade peritoneal à cavidade uterina. Sua estrutura revela três regiões morfologicamente distintas: infundíbulo, ampola e istmo. A primeira, situada próxima ao ovário, refere-se ao infundíbulo, que se caracteriza pelo lúmen repleto de pregas da mucosa; a ampola, possivelmente o local da fecundação, cujo pregueamento mucoso persiste e o istmo, o qual possui poucas formações digitiformes da mucosa, e se une ao corno uterino na junção útero-tubária. Neste local e particularmente para a capivara, Carvalho (2011) cita que a abertura da tuba no corno uterino diferencia-se para constituir uma projeção evaginante que assume o formato de uma papila, a qual foi denominada papila tubária.

Em experimento conduzido por Fortes et al. (2005) que analisou as porções craniais médias e caudais dos ovidutos, oriundos de três cutias adultas, verificaram a parede da tuba possuidora de três camadas histologicamente distintas, a mucosa, muscular e serosa. O epitélio que revestiu a mucosa mostrou variação do cúbico ao pavimentoso na região do istmo. A muscular foi composta de fibras musculares lisas dispostas em arranjo circular. Já a serosa mostrou-se bastante vascularizada. Além disto, os autores observaram pregueamento da mucosa contendo numerosas projeções direcionadas a luz

do órgão principalmente nas regiões do infundíbulo e ampola, sendo o istmo, responsável pela presença de pregas mucosas baixas e não ramificadas.

Em nossa pesquisa, as tubas uterinas de preás apresentaram uma região do istmo contendo a maior espessura da camada muscular, a mucosa que foi revestida por epitélio cilíndrico simples, o qual apoiou-se em lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo; a ampola que apresentou muscular espessa em arranjo circular, moderadas projeções mucosas que foram revestidas por epitélio colunar simples e o infundíbulo, dotado de numerosas dobras da mucosa, contendo epitélio prismático que se apoiava em lâmina própria (conjuntivo frouxo), seguido de uma camada de fibras musculares lisas pouco espessas, concordando, pois, com os achados de Fortes et al. (2005) para cutias, Santos et al. (2014) em fêmeas de preás não gestantes e divergindo de Walter et al. (2001) no que se refere à túnica muscular da região do istmo, de caprinos sem raça definida, a qual apresentou-se dividida em duas subcamadas, uma circular interna e outra longitudinal externa.

Reis et al. (2011) caracterizaram a morfologia do sistema genital feminino da paca (*Cuniculus paca*) onde indicaram que o útero era formado por dois cornos uterinos retilíneos, cuja parede medial convergia caudalmente, formando um septo interno ou “velum” uterino incompleto, o qual determinou a formação de dois canais cervicais que possuíam dois óstios internos e apenas um externo que se abria na vagina.

Macroscopicamente, Santos et al. (2014) descreveram, em preás, a confluência dos cornos uterinos no corpo do útero, o qual é duplo e se comunica com a cérvix que, por sua vez, termina no fórnix que se abre dentro da vagina. Em nosso trabalho, denominamos o útero de preás como duplo incompleto, contendo cornos uterinos direito e esquerdo, os quais foram separados por um grande septo de tecido conjuntivo frouxo e se comunicavam com uma cérvix única, intensamente pregueada. Por outro lado, Carvalho (2011) caracterizaram a cérvix uterina da capivara como dupla, que compreendia dois canais justapostos, os quais originavam duas aberturas, ambas projetadas para a cavidade vaginal: os ostios uterinos externos. Neste roedor, a cérvix era relativamente curta e continha estriações longitudinais evidentes bem como intensa produção de secreção mucosa. Tal característica anatômica é decorrente da ausência de

fusão dos ductos paramesonéfricos, o que denotou ausência de corpo e desemboque dos cornos uterinos diretamente na cérvix dupla.

Akinloye e Oke (2010) afirmam que o útero de ratas gigantes não gestantes (*Cricetomys gambianus*) possuem dois cornos uterinos, um corpo e duas cérvices, as quais eram separadas por um septo sagital, fato este que o assemelhava ao útero da capivara, diferindo, portanto, da estrutura anatômica revela em preás.

Em fêmeas de preás gestantes, demonstrou-se ainda que a organização estrutural do saco gestacional, retratava as transformações sofridas pelo útero, resultando na formação das decíduas basal e parietal. O espaço descrito pela luz da cavidade uterina apresentou-se revestido pelo endoderma visceral do saco vitelino, o qual envolvia o embrião e inseriu-se na placenta corioalantoide, fato este concordante com as observações estabelecidas por Mossman (1987) para os roedores da ordem Hystricognathi, Jolie (1990) para ratos de laboratório, Kaufman (1998) nos camundongos, Favaron et al. (2011) para os roedores da subfamília Sigmodontinae Oliveira et al. (2008) e Vale et al. (2013) em preás.

O útero, de maneira geral, pode ser dividido ainda sob a ótica de uma camada serosa externa, seguida por uma túnica muscular intermediária ou miométrio e uma mais interna, ou endométrio, o qual é revestido por epitélio colunar, variando do cúbico ao pseudoestratificado, e glândulas uterinas situadas no tecido conjuntivo subjacente (LI; DAVIS, 2007).

Nesse sentido, as características do epitélio nos cornos uterinos em *G. spixii* estiveram representadas por células epiteliais cilíndricas – compondo uma formação pseudoestratificada, que apoiavam-se em tecido conjuntivo frouxo como relatado por Banks (1991) quando este indicou, em suínos e ruminantes, um epitélio variando do colunar simples ao pseudoestratificado, Mayor et al. (2002) na *Hystrix cristata* e Oliveira (2016) na *D. leporina*. Já quando se tratou sobre o corpo do útero em preás, este possuiu epitélio unilaminar e cúbico que repousava sobre tecido conjuntivo frouxo, seguido do conjuntivo denso não modelado, assemelhando-se, pois, as observações promovidas por Monteiro et al. (2009) em cadelas e Santos et al. (2014) no *G. spixii* e divergindo daquelas proporcionadas por Ozdemir e Atalar (2009) no *H. cristata*, os quais mencionam epitélio colunar pseudoestratificado apoiado em conjuntivo. Além disto, o

corpo uterino duplo incompleto de *G. spixii*, continha um septo de tecido conjuntivo frouxo que em suas bordas possuiu revestimento de epitélio cúbico simples.

Esse mesmo tipo epitelial mostrou-se presente, como revela nossos resultados, na superfície da cérvix em região ventral, o qual continha ainda tecido conjuntivo frouxo e numerosas glândulas uterinas associadas. Em localização dorsal, verificou-se grande quantidade de epitélio glandular, cujas células apresentavam citoplasma claro e vacúolos citoplasmáticos evidentes. Tais achados corroboram-se com os demonstrados por Santos et al. (2014) em *G. spixii* e diferiram àqueles descritos por Carvalho (2011) no que se refere as pregas longitudinais da cérvix em *H. hydrochaeris*, as quais estiveram revestidas por epitélio estratificado cilíndrico e, por vezes, estrato de células pavimentosas.

Em *C. paca*, a vagina localiza-se, inicialmente, na cavidade abdominal e projeta-se, em estrutura tubular, à cavidade pélvica, adentrando-a e posicionando-se ventralmente ao reto e dorsalmente à bexiga urinária e uretra. O fórnix vaginal constitui uma projeção em forma de fundo de saco cego na extremidade proximal que circunda a porção vaginal adjacente ao colo uterino. Na parede deste órgão, observa-se grande quantidade de pregas longitudinais (REIS et al., 2011) semelhantes às evidenciadas em *G. spixii*, entretanto, na primeira espécie não se observa convergência da uretra com a vagina, pois este se abre independentemente, junto ao clitóris, o que caracteriza ausência de vestíbulo, fato este não compatível com as observações obtidas em preás.

Nosso modelo experimental, apresentou um longo vestíbulo, igualmente possuindo pregueamento longitudinal, sendo o revestimento interno constituído por monocamada de epitélio cúbico simples, nas fêmeas gestantes, o qual foi sustentado por tecido conjuntivo frouxo e circunscrito por fibras musculares estriadas esqueléticas. Esses achados não estiveram em consonância aos descritos por Mayor et al. (2003) em *A. africanos*, Mayor et al. (2013) na *C. paca* e Santos et al. (2014) no preá, segundo os quais afirmam haver ausência de vestíbulo, estando o clitóris e a uretra, nas espécies em questão, separados da região vaginal.

Além disso, a não verificação da cornificação do epitélio vestibular em *G. spixii*, pode estar relacionada com uma representatividade tecidual obtida justamente em região do órgão que sofreu influência de concentrações elevadas e estáveis de progesterona,

tanto pela liberação deste hormônio pelo corpo lúteo quanto pela placenta, ação esta capaz de reduzir a proliferação e maturação do epitélio deste local, o que assemelha-se com as observações de Lis e Davis (2007) quando estes demonstraram pronunciado decréscimo na estratificação epitelial da vagina de roedores em fase luteínica.

A genitália externa localiza-se entre o ânus e o óstio uretral, podendo-se apresentar edemaciada na fase folicular como descrito por Mayor et al. (2003) no *Atherurus africanus*, Reis et al. (2011) na *D. leporina* e Santos et al. (2014) no preá. Este último cita o clitóris como uma estrutura cônica revestida por pele, sendo que no seu ápice pode ser observado um pequeno orifício ou óstio uretral.

Nossos resultados mostraram também a estrutura da vulva com o seu orifício vaginal, canal uretral contido no clitóris e a região da comissura posterior, resultante da união dos lábios vulvares, posteriormente, no centro do períneo. Microscopicamente, evidenciamos, no clitóris, tecido conjuntivo frouxo e formações cartilaginosas, as quais estiveram delimitadas por melanócitos, característica não descrita para outros autores. Ao longo da gestação foi possível verificar a riqueza de epitélio glandular, o qual sustentava-se em tecido conjuntivo frouxo, seguido do denso e ainda camada muscular, aspectos estes compatíveis com as observações de Santos et al. (2014).

6.2 DETERMINAÇÃO DO PERÍODO GESTACIONAL

Em experimento realizado por Buzzio et al. (2001), o qual verificou curta fase luteínica em roedores murídeos, hipotetizou que a implantação ocorria precocemente (nos cornos uterinos), fato este que motivou os pesquisadores a caracterizarem o período gestacional bem como o desenvolvimento inicial blastocístico em gestações sobrepostas, cujas fêmeas realizavam aleitamento da ninhada anterior. As espécies em questão e os períodos que duravam a gestação foram relatados como inferiores a 10 dias, o que contrastou bastante com as durações das gestações isentas de sobreposição a saber: *Calomys musculinus* (21 dias), *Calomys laucha* (21 dias), *Microtus ochrogaster* (21 dias) e *Akodon molinae* (25 dias) – estas espécies compreendendo roedores sulamericanos sigmodontíneos) e *Peromyscus maniculatus bairdii* (25 dias) - roedor norte-americano sigmodontíneo-.

Adicionalmente, Richmond e Conaway (1969) e Clarke e Hellwing (1983) estabeleceram estimativas de duração da gestação das espécies *Clethrionomys glareolus*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* como sendo 19, 20 e 22 dias respectivamente.

De acordo com Lange e Schmidt (2006) as cutias apresentam duas parições anuais, com intervalo entre partos de 156 dias e duração gestacional situada em torno de 104 a 120 dias.

Em condições naturais não controladas, pesquisadores como Larcher (1981), Mares et al. (1982) e Pinheiro et al. (1989) estabeleceram como 48 dias o tempo decorrido de uma gestação em preás, sendo tal parâmetro utilizado como referência em estudo de placentação promovido por Oliveira et al. (2008). Estes últimos, por sua vez, delimitaram os terços iniciais, médios e finais da gestação com base no período anteriormente citado ao mesmo tempo em que possibilitaram o acompanhamento do aumento quantitativo da morfometria relativa ao diâmetro placentário e comprimento cabeça-nádega (*Crown-rump*) dos embriões e fetos.

Entretanto, de acordo com o nosso trabalho, as 10 fêmeas que gestaram apresentaram um período gestacional que resultou em 59 dias (com desvio padrão de 2,7487), servindo, pois, de elemento norteador para a análise morfométrica embrionária e fetal bem como para o adequado planejamento das coletas de sacos gestacionais e sistema reprodutor feminino, destinados as análises macro e microscópicas.

6.3 CARACTERIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL

No tocante ao ciclo reprodutivo, os perfis citológicos dos tipos descarnativos cervico-vaginais refletem a dinâmica endócrina associada aos ciclos reprodutivos, nas espécies mamíferas, podendo o estudo do ciclo estral, feito por análise quali e quantitativa das referidas células, bem como dos elementos figurados associados, serem utilizados com eficiência para predizer o período fértil da espécie em análise e, por conseguinte, possíveis distúrbios relacionados à reprodução (MOXON et al., 2010).

No presente trabalho, verificamos nas fêmeas de preás, duração do ciclo reprodutivo de $14,8 \pm 0,73$ dias (com variação de 12 a 16 dias) para as cinco fêmeas mantidas na presença de um macho e $14,6 \pm 0,75$ dias (com variação de 13 a 17 dias) nas

outras cinco que estiveram isoladas em box específico, durações estas próximas as estabelecidas por Santos et al. (2015), os quais utilizaram-se de 12 fêmeas de preás não gestantes mantidas isoladas e outras cinco, na presença de um macho. No primeiro grupo, avaliaram dois ciclos completos, obtendo-se, em média, $15,8 \pm 1,4$ dias para a duração do ciclo, com variações de 14 a 19 dias. As fêmeas mantidas na presença do macho não puderam ser avaliadas, pois a maioria foi fecundada por este último. Em nosso estudo, tal problemática não foi evidenciada, pois o macho utilizado estava impossibilitado de fecundar as fêmeas do grupo por estar preso em gaiola.

O monitoramento do ciclo reprodutivo de cutias, criadas em cativeiro no semiárido, foi realizado pela citologia vaginal associada a ultrassonografia transabdominal em tempo real por Campos et al. (2015). Para tanto, os autores caracterizaram oito ciclos completos, empregando a metodologia supracitada, e encontraram em média $28,2 \pm 0,7$ dias com variações de 24 a 31 dias, resultados estes aproximados aos reportados por Guimarães et al. (1997) ao avaliarem 20 fêmeas adultas de cutias (*Dasyprocta prymnlopha*), chegando-se a média de $30,69 \pm 4,65$ dias (com ciclos variando de 19 a 40 dias).

Neste último trabalho, os autores dividiram as fêmeas em grupos experimentais a saber: 1º grupo (seis fêmeas pluríparas isoladas de machos), 2º grupo (seis fêmeas pluríparas associadas com animal macho vasectomizado), 3º grupo (seis fêmeas dos grupos anteriores, mantidas em acasalamentos monogâmicos) e 4º grupo (oito fêmeas nulíparas mantidas com macho vasectomizado). Os resultados sinalizaram não haver diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as médias dos ciclos estrais dos grupos formados, não existindo, portanto, efeito macho significativo, com relação a média geral de duração da ciclicidade avaliada, o que corrobora com os nossos resultados verificados em preás.

No entanto, Touma et al. (2001) ao estudarem as diferentes fases do ciclo estral em duas espécies de roedores sulamericanos (*Cavia aperea* e *Galea musteloides*), definiram como duração para a primeira espécie de 21 dias e períodos variáveis para a segunda, que por sua vez, só ocorria na presença do macho. Foram avaliadas 11 fêmeas adultas não gestantes de cada espécie em questão segundo critérios como abertura da membrana de oclusão vaginal – característica que ocorre no estro ou por ocasião do parto -, dosagens de estrógeno e progesterona e colpocitologia vaginal. Os animais experimentais passavam

por estágios sucessivos que incluíram uma fase em que eram mantidas isoladas e outra, na presença do macho. O ciclo reprodutivo foi calculado pela contagem do número de dias entre duas aberturas sucessivas da membrana de oclusão bem como o padrão da citologia descamativa, a qual foi tratada pela utilização de escala que variou de 0 a 5 no que se refere as quantidades de leucócitos, células superficiais, intermediárias, parabasais e basais. Os resultados demonstraram diferenças marcantes entre as espécies analisadas, sendo que para *C. aparea*, independente da condição, promovia abertura da membrana de oclusão vaginal, possuía elevadas concentrações de estrógeno no estro bem como predomínio de células superficiais e intermediárias nesta fase. Diferentemente, *G. musteloides* só exibia comportamento de estro quando na presença do macho, do contrário, não apresentavam abertura da referida membrana, revelavam baixas concentrações estrogênicas e possuíam esfregaços vaginais dominados por leucócitos e células parabasais.

Guimarães et al. (2011) caracterizaram 20 ciclos estrais de *Dasyprocta prymnolopha*, obtendo-se média de duração de $32,05 \pm 4,17$ dias (variando de 25 a 40 dias), não ocorrendo diferença estatística significativa no tocante ao efeito macho dos grupos experimentais estudados sob a duração do ciclo. No entanto, a maioria dos grupos experimentais formados continham fêmeas adultas e jovens, ambas em contato com machos vasectomizados. Desta forma, ao serem realizadas dosagens hormonais por radioimunoensaio, verificou-se que para o 17-beta estradiol, observaram-se dois picos de concentração, o primeiro na fase de metaestro e o segundo, no proestro, fato este capaz de se sugerir tratem-se de duas fases de desenvolvimento folicular. No caso da progesterona, houve significância estatística ($P < 0,05$) em suas concentrações entre as fases do ciclo. Evidentemente, foi baixa no estro, elevando-se 24h após esta fase e atingindo a maior média, na fase de diestro.

Nesse sentido, comparando-se as durações de cada fase do ciclo reprodutivo de preás, verificamos que a presença do macho influenciou de forma significativa a fase do diestro, a qual foi mais longa ($4,0 \pm 0,63$ dias) quando comparadas com o grupo de cinco fêmeas mantidas na ausência daquele ($2,4 \pm 0,24$ dias) pela análise da citologia vaginal. Os resultados sugerem que a presença do macho pode influenciar a concentração de progesterona, após a ovulação, por subsequente atuação sob a atividade do corpo lúteo.

Em se tratando da citologia, os critérios inclusos para determinação de cada fase do ciclo reprodutivo de preás bem como os aspectos morfológicos celulares foram estabelecidos que a fase de estro deveria conter, somando-se as células superficiais e escamas anucleadas, pelo menos 70% destes tipos descamativos, cujas células demonstravam citoplasma eosinofílico, morfologia poligonal, baixa relação núcleo/citoplasma, cromatina finamente granular ou com núcleo picnótico no caso das superficiais e isentas de núcleo, nas escamas. Além disto, não se observava a presença de leucócitos e as bactérias, em pequeno número ou ausente.

Na fase de metaestro, o tipo celular predominante em valores percentuais era representado pelas células intermediárias, seguidas por quantidades consideráveis de bactérias e leucócitos. Tais células apresentavam-se com forma variando do ovalado ao poligonal, núcleo centrado e com cromatina dispersa e granulosa além de citoplasma basofílico. Para a fase de diestro, consideramos que o somatório de células profundas (parabasais e basais) deveriam perfazer valores relativos acima de 40% e ainda possuir células intermediárias como o segundo tipo predominante. Ademais, numeroso infiltrado leucocitário, de bactérias e muco também foram evidenciados. As células parabasais e basais continham formato redondo, núcleo grande e central, cromatina granular e elevada relação núcleo/citoplasma. Diferiam entre si, pois estas últimas eram menores e possuíam citoplasma intensamente basofílico.

Subsequentemente, a fase de proestro iniciava-se com o predomínio de células intermediárias além da presença de bactérias e muco, sendo a chegada do estro, compatível quando as células superficiais retornavam a valores percentuais iguais ou superiores a 70%. Tais aspectos morfológicos celulares de cada fase foram similares aos apresentados por Guimarães et al. (1997), Bastos et al. (2003), Barbosa et al. (2007), Costa et al. (2009), Guimarães et al. (2011) e Santos et al. (2015).

Touma et al. (2001) consideraram dois tipos de células intermediária: as jovens, cujo formato aproxima-se do oval e as maduras, poligonais, as quais eram quantificadas por meio de escores pré-definidos, quando se estudou o ciclo estral de duas espécies de roedores sulamericanos, por meio do uso de corantes derivados de Romanowsky. Já Paccola et al. (2013) caracterizaram as células do ciclo reprodutivo de ratos Wistar, utilizando a bateria de coloração de Shorr, como sendo pequenas células basofílicas, estas

correspondendo as parabasais e basais; grandes células basófilas (células intermediárias), células pré-acidófilas, células nucleadas acidófilas e enucleadas acidofílicas.

Moxon et al. (2010) produziram um artigo avaliando um grupo de técnicos experientes e outro inexperiente para a caracterização da fase do ciclo estral, contagens e reconhecimento de 100 células do epitélio vaginal e identificação, por meio de escores, os neutrófilos presentes em 16 lâminas citológicas de cadelas, coradas por soluções derivadas de Wright-Giensa. Todas as lâminas foram distribuídas aos participantes de forma randômica. Os resultados demonstraram diferenças significantes no percentual de células intermediárias grandes bem como quanto ao estabelecimento de escores para os leucócitos nos dois grupos de participantes. Ao passo que a variação inter-técnico revelou dificuldades no reconhecimento de pequenas células intermediárias pelos técnicos inexperientes. Por esses motivos elencados, optou-se pela leitura das lâminas citológicas, da caracterização do ciclo estral em preás, serem realizadas apenas pelo responsável da pesquisa bem como em não incluir, nos resultados, as observações semi-quantitativas referentes aos leucócitos, bactérias e filamentos de muco, devido a subjetividade e possibilidade de erro, no que se refere as possíveis inferências posteriores. Limitamo-nos, pois, a afirmar que as bactérias, leucócitos e filamentos mucosos são abundantes entre as fases de metaestro e diestro.

Nossos resultados referentes as médias gerais, dadas em percentual, dos tipos celulares evidenciados no ciclo estral de preás, foram muito semelhantes, na fase de metaestro, e na superioridade quantitativa das escamas anucleadas frente as superficiais nucleadas, em todas as fases do ciclo, o que indica um escalonamento maturativo normal, semelhante aos verificados em cutias por Guimarães et al. (1997) e divergentes quando comparadas as médias gerais nas demais fases, bem como dos resultados apresentados por Zogmo (2002), ao caracterizar as médias celulares por meio da colpocitologia vaginal de mocós (*Kerodon rupestris*) e Santos et al. (2015) ao demonstrarem a distribuição percentual dos tipos celulares em cada fase do ciclo reprodutivo de preás criados em cativeiro.

A análise estatística da nossa pesquisa sinalizou haver efeito significativo ($P<0,05$) da contagem de escamas anucleadas entre as fases do ciclo estral nos dois grupos experimentais, sendo as maiores médias evidenciadas no estro e as menores, no diestro.

Este achado diferiu dos promovidos por Guimarães et al. (1997) que, indicou, em cutias, haver diferença significativa das células superficiais anucleadas apenas na fase de estro, a qual produziu maiores contagens quando comparadas as demais fases e entre estas, não houve diferença. Comparando-se os tratamentos (macho presente e ausente), em preás, verificamos que ocorreu diferença estatística na fase de proestro, sendo evidenciado maior percentual de escamas no grupo de fêmeas mantidas acasaladas ($35,05 \pm 1,97$ %) do que naquele privado da presença do macho ($18,00 \pm 2,28$ %).

A prática corrente da inserção de um macho para a sincronização do ciclo estral é uma atividade indispensável quando se objetiva a criopreservação de embriões, limpeza sanitária de colônias e transgênese murina (MATTARAIA et al., 2009). Em caprinos e ovinos, pela importância econômica, ambiental e sociológica (RANCOURT et al., 2006), a performance reprodutiva relaciona-se, diretamente, com os lucros obtidos na produção de leite e carne. Para tanto, a sincronização do ciclo estral traz grandes benefícios aos produtores pecuários (GONZALEZ-BULNES et al., 2005).

Em nosso trabalho, não houve propriamente uma sincronização do ciclo, porém, a presença do macho relacionou-se direta ou indiretamente com o estímulo das ações estrogênicas, na fase de proestro –reconhecidamente um período fértil para a fêmea em idade reprodutiva –, as quais cursaram com o aumento proliferativo do epitélio vaginal que tende a sofrer estratificação das camadas mais diferenciadas e, conseqüentemente, descamação das células superficiais anucleadas.

No experimento de Zogmo (2002), mantendo-se grupos de fêmeas de mocós em contato com um macho, houve significância estatística para o percentual de escamas anucleadas na fase de estro quando comparada as demais fases, utilizando-se para tal, o teste de Tukey, diferindo, pois dos nossos resultados, que demonstraram diferenças significativas, deste tipo celular, em todas as fases do ciclo, tanto para o grupo contendo o macho quanto para os que contiveram fêmeas isoladas.

No tocante as células intermediárias, em preás, também foram observados efeitos significativos da interação entre os tratamentos na fase de proestro, entretanto, o grupo isento de macho foi o que apresentou maiores porcentagens médias ($48,73 \pm 2,17$ %) na contagem deste tipo de célula quando comparados ao outro grupo em análise ($37,85 \pm 1,88$ %). Desta forma, quando o macho estava ausente, havia menor descamação de células

superficiais anucleadas, provavelmente devido a menor concentração de estrógenos circulantes, fato este que poderia acarretar em maior percentual de células intermediárias, proporcionalmente, por maiores níveis de progesterona, no grupo em questão, e, conseqüentemente, maior desprendimento do tipo celular intermediário.

Ademais, no grupo das fêmeas mantidas isoladas do macho, as fases de proestro e metaestro representaram as maiores produções de células intermediárias, não diferindo entre si, porém sendo significantes quando comparadas com as fases de diestro e estro, fase esta em que se obteve menor média para este tipo celular.

Para o outro grupo, a fase do estro também apresentou os menores valores percentuais, diferindo, de forma significativa, das demais fases e estas últimas não diferiram entre si. No entanto, a fase de metaestro apresentou os maiores percentuais médios de células intermediárias, assemelhando-se aos verificados por Guimarães et al. (1997) verificados em cutias e Zogmo (2002) em pacas, sendo que, de acordo com estes dois autores, os maiores valores de células intermediárias, verificados nas respectivas espécies, ocorreram no metaestro e a produção neste período diferiu significativamente das demais fases, estas últimas não diferindo entre si.

Além disso, em preás, era esperado um maior quantitativo de células superficiais nucleadas nas fases de proestro e estro, as quais sofrem maior estímulo para a diferenciação e proliferação celulares, em decorrências das maiores concentrações de estrógenos nas referidas fases. Como a ovulação ocorre no estro, sob pico do hormônio luteinizante, verificamos que o maior percentual médio deste tipo celular ocorreu nessa fase, porém não diferindo estatisticamente ($P>0,05$) da fase que a antecedia e diferindo, pois, das demais fases. Excetuando-se o proestro, tais informações concordaram com as produzidas por Guimarães et al. (1997) e Zogmo (2002) ao analisarem os ciclos reprodutivos de cutias e pacas, respectivamente.

A diferença entre a média das células parabasais, na fase de diestro, mostrou significância ($P>0,05$) quando comparada às demais, todavia, não houve diferença significativa entre as fases de metaestro e proestro, sendo a fase de estro reponsável pela menor média observada. Característica semelhante ocorreu para as basais que tiveram maiores valores percentuais na fase de diestro, cuja significância ($P>0,05$) as diferiu das demais fases, entretanto, em cada fase do ciclo houve diferença significativa ($P>0,05$) e a

menor quantidade também foi verificada no estro. Esse padrão, verificado na fase de diestro, condiz com elevadas concentrações circulantes de progesterona, as quais induzem a uma menor espessura do epitélio vaginal, acarretando na formação de uma fina camada germinativa de células profundas (WESTWOOD, 2008).

6.4 PLACENTAÇÃO VITELÍNICA E CORIOALANTOIDE

A placentação compreende todos os mecanismos de interação entre os tecidos maternos e membranas fetais envolvidos na formação de um órgão placentário temporário, capaz de produzir o sucesso reprodutivo de uma espécie.

Dentro deste contexto, verifica-se atualmente, estudos de placentação que correlacionam os aspectos morfológicos com informações resultantes de pesquisas utilizando biologia molecular no estabelecimento de correlações filogenéticas entre as diversas ordens dos mamíferos (CARTER, 2001; MESS; CARTER, 2006; MESS; CARTER, 2007). Tais investigações promovem valiosas informações sobre genes relacionados ao desenvolvimento placentário (CROSS et al., 2003) e até mesmo a possibilidade de reconstrução filogenética de uma condição ancestral de modo que se torne possível o entendimento da evolução da placenta nos mamíferos (MESS; CARTER, 2007).

Wislocki et al. (1946) já admitiam que a placenta de roedores constituía uma estrutura de maior complexidade quando comparada a placenta de gatos, porcos e até mesmo no homem. Tal complexidade se relacionava as modificações ocorridas nos tecidos maternos, trofoblasto e saco vitelino, principalmente no início do desenvolvimento embrionário.

No entanto, a busca por modelos experimentais que possibilitem uma melhor compreensão da placentação humana favorece a utilização de roedores devido a estreitas similaridades que ambos apresentam (CARTER et al., 2006; CARTER, 2007).

O órgão placentário forma-se pela íntima associação entre membranas fetais e epitélio uterino de forma a facilitar as trocas fisiológicas (SANSOM, 1922; MOSSMAN, 1987; JOLLIE, 1990; SCHRÖDER, 1995; ENDERS; BLANKENSHIP, 1999; CARTER et al., 2004). A estrutura anatômica varia amplamente durante o seu desenvolvimento

tanto do ponto de vista macroscópico quanto microscópico, podendo haver várias classificações para este órgão (SCHRÖDER, 1995).

É interessante ressaltar que em várias espécies de mamíferos, observa-se o desenvolvimento de uma placenta vitelina precedendo a formação da placenta corioalantoide ou principal. Em roedores os dois tipos coexistem até o final da gestação, sendo a vitelina mais suscetível à síntese proteica e transferência de substâncias necessárias a nutrição histotrófica do que ao intercâmbio de gases respiratórios promovidos pela placenta principal (KING; ENDERS, 1970; ENDERS; CARTER, 2006; ENDERS, 2009).

Até certo tempo havia uma concepção de que a placenta vitelina de roedores era funcional apenas nos estágios iniciais da gestação ao passo que a corioalantoide atuava principalmente nos estágios tardios da mesma. No entanto, mediante novos estudos acerca dessa premissa, torna-se plausível considerar que os dois tipos de placenta se complementam na medida em que desempenham funções essenciais ao desenvolvimento do conceito (WISLOCKI et al., 1946; KING; ENDERS, 1970; MOSSMAN, 1987).

Independente do tipo de placenta, para a obtenção de respostas aos aspectos funcionais de cada uma, torna-se necessário a descrição morfofisiológica de tal órgão de modo a englobar: análises macroscópicas, microscópicas e ultraestrutura dos elementos que a compõe bem como das membranas fetais de forma a tornar esses mecanismos elucidativos.

A compreensão da organização estrutural da placenta vitelina ao longo do período gestacional favorece o estabelecimento de correlações com os aspectos funcionais do saco vitelino. Muitas pesquisas avaliam a estrutura fina das células endodérmicas viscerais e parietais no que diz respeito ao aparato absoritivo bem como das organelas citoplasmáticas presentes neste epitélio. Este fato permite ressaltar a importância de uma placenta vitelina invertida seja para aumentar a contínua demanda anabólica do embrião ou até mesmo como uma característica evolutiva das muitas espécies de roedores.

King e Enders (1970) admitiram a importância de um órgão placentário, no porquinho da Índia e em muitas outras espécies de roedores, para transferência de nutrientes ao feto, sendo os mecanismos de transporte de substâncias desencadeados por

dois tipos de placentas, uma corioalantoide e outra denominada placenta vitelina invertida.

De fato, os aspectos complementares destas placentas foram destacados em estudos que avaliaram a absorção de alguns elementos indispensáveis ao desenvolvimento fetal. Dentre eles verificou-se que o saco vitelino atuava na captação e transporte de íons ferrosos (Fe^{2+}) da mesma forma que os íons cálcio (Ca^{2+}) eram absorvidos e transferidos ao feto pelo labirinto da placenta corioalantoide (WISLOCKI et al., 1946).

Para Calarco e Moyer (1966) a placenta vitelina possui geralmente importância secundária, persistindo como estrutura acessória. No entanto, em muitas espécies de roedores, o saco vitelino apresenta contínuo desenvolvimento durante todo o período gestacional, envolve e protege o embrião além de funções nutritivas e hematopoiéticas.

Beckman et al. (1990) afirmam que o saco vitelino visceral constitui um importante órgão placentário em roedores, pois estabelece os primeiros mecanismos de intercâmbio nutricional antes da placenta corioalantoide se tornar desenvolvida. Mesmo após o estabelecimento desta última, as células do endoderma visceral permanecem funcionais durante toda a gestação, desencadeando diversas funções metabólicas, secretoras e imunológicas.

A formação da placenta vitelina inicia com a produção de uma vesícula cuja porção visceral é vascularizada pelo mesoderma subjacente e o segmento parietal apresenta-se em contato com o trofoblasto da decídua capsular (ENDERS, 2009).

Os termos placenta vitelina parietal e capsular foram introduzidos por Jollie (1990) ao descrever os constituintes do saco vitelino em roedores de laboratório. O primeiro refere-se ao endoderma parietal que reveste a superfície da placenta principal e o segundo, ao epitélio parietal que recobre o trofoblasto mural.

Anderson (1959) ao analisar a placenta vitelina de ratos com o auxílio da microscopia de luz, constatou que a partir do décimo primeiro dia de gestação o saco vitelino era bem desenvolvido, contrastando com a presença de imatura placenta corioalantoide. O autor destacou que a placenta vitelina era constituída inicialmente por duas membranas endodérmicas: uma visceral e outra parietal, delimitando a cavidade do saco vitelino. A camada parietal que revestia a decídua capsular apoiava-se numa

membrana hialina de Reichert e suas células endodérmicas demonstravam formato colunar baixo, além de curtas microvilosidades apicais. Na superfície do epitélio visceral e abaixo da membrana basal que sustentava este epitélio, verificaram-se curtas vilosidades e poucos vasos vitelínicos respectivamente.

Os resultados obtidos em preás, no presente trabalho, demonstraram comportamento similar aos descritos no parágrafo anterior nos períodos estudados antes da inversão do saco vitelino. É importante destacar que a disposição do epitélio visceral apresentou comportamento relativamente constante a partir do décimo quarto dia de gestação, sendo evidenciadas áreas de intensa formação vilosa cujo aspecto convoluto direcionava-se para o endoderma parietal da superfície da placenta principal. Já nos locais distais desta placenta, verificavam-se células prismáticas dotadas de poucas vilosidades, podendo ser caracterizadas como região lisa do endoderma visceral. Tais características estão de acordo com as observações produzidas por Sanson (1922) ao estudar o desenvolvimento placentário inicial na ratazana da água (*Arvicola microtus amphibius*); Wislocki et al. (1946) ao retratarem a placenta vitelina de roedores sobre a ótica imunohistoquímica; Anderson (1959) em trabalho sobre as barreiras placentárias em ratos no tocante a absorção de gamaglobulinas; Jollie (1990) ao ter promovido revisão sobre o desenvolvimento, morfologia e funções do saco vitelino em roedores de laboratório; Oliveira et al. (2008) ao analisarem a placentação corioalantoide em preás e Freyer e Renfree (2009) ao realizarem revisões acerca da ontogenia do saco vitelino nos mamíferos.

É interessante ressaltar que aos 13 dias de gestação, um dos sacos gestacionais de preá apresentou-se destituído do trofoblasto mural e membrana de Reichert subjacente, sendo bem caracterizados os endodermas parietal e visceral da placenta vitelina. Apenas em determinadas regiões, evidenciaram-se as formações vilosas do endoderma visceral. Como argumentado anteriormente, este resultado proporcionou o estabelecimento de condições primordiais para consideração deste período como anterior a inversão do saco vitelino.

A partir do décimo quarto dia de gestação em preás, verificou-se a desestruturação do endoderma parietal que recobre o útero e placenta corioalantoide, sendo, portanto, considerada a data em que o saco vitelino sofre o fenômeno da inversão, já que tal

característica foi evidenciada em mais de um saco gestacional e que a partir do décimo quinto dia não mais se evidenciaram os elementos sinalizadores de uma condição anterior à inversão.

Como a inversão do saco vitelino resulta na degeneração da onfalopleura bilaminar, acarretando na formação de interface entre o endoderma visceral e útero, torna-se intrigante quais os mecanismos moleculares envolvidos no reconhecimento do epitélio visceral pelo sistema imune materno de forma a não ocorrer reações imunogênicas desfavoráveis ao desenvolvimento embrionário. A elucidação dos mecanismos desta situação paradoxal irão solidificar as vantagens promovidas pela inversão do saco vitelino, mediante o aperfeiçoamento do aparato absorptivo, já evidenciado nas relações anatômicas obtidas neste trabalho.

Para Mossman (1987), Mess (2003), roedores e lagomorfos retêm uma placenta vitelina ao longo da gestação, podendo a mesma sofrer inversão parcial ou total. Neste sentido, Beckman et al. (1990) argumentam que em ratos a inversão total do saco vitelino ocorre entre os dias 16 e 17 de gestação com a ruptura da membrana de Reichert e consequente aposição entre endoderma visceral e útero.

De acordo com Jollie (1968) a inversão em ratos acontece no dia 16 de gestação, iniciando com a ruptura da membrana de Reichert seguida de retrações da decídua capsular, produzindo ao final, confluência entre as cavidades vitelina e uterina. Perry (1981) retrata que durante a inversão no porquinho da Índia, ocorre degeneração da decídua capsular permitindo a absorção de substâncias das glândulas uterinas pelo endoderma visceral.

A utilização de histologia convencional associada a técnicas de microscopia eletrônica de transmissão possibilitaram a caracterização da placenta vitelina em coelhos. Os resultados evidenciaram que entre os dias 11 e 12 de gestação ocorria à degeneração do endoderma parietal e ectoderma, resultando na formação de uma placenta vitelina invertida. Consequentemente, verificou-se que a tensão promovida pelo fluido do celoma extraembrionário, fazia com que o endoderma visceral mantivesse estreita relação com a decídua parietal da região antimesometrial do útero (LARSEN, 1963).

Estudos de placentação em morcegos (*Noctilio labialis minor*) permitiram a identificação de três estruturas placentárias diferentes, desenvolvidas ao longo da

gestação: a onfalopleura bilaminar, onfalopleura trilaminar e placenta corioalantoide. A primeira estrutura apresentou contato direto com o trofoblasto e decídua parietal, formando a placenta coriovitelina. A segunda desenvolveu-se em consequência da invasão mesodérmica na primeira. Posteriormente, verificou-se que o segmento parietal persistia até o final da gestação, sendo a inversão referida como incompleta (ANDERSON; WINSATT, 1963).

Dempsey (1953) afirma que antes da inversão do saco vitelino, no porquinho da Índia, o endoderma visceral encontra-se em contato direto com o conteúdo da cavidade do saco vitelino e é suprido pelos vasos vitelínicos localizados abaixo da membrana basal visceral. Durante a inversão, a membrana de Reichert é a última a degenerar resultando ao final, em células endodérmicas diretamente expostas as secreções uterinas, podendo absorvê-las e transferi-las com maior efetividade ao embrião. Já Jollie (1990) afirma que nesta espécie, não é formado o segmento parietal da onfalopleura bilaminar, sendo a inversão constituída pela degeneração do trofoblasto mural logo após a implantação.

É importante destacar que após a inversão em preás houve aumento das relações de aposição entre o endoderma visceral e útero bem como entre os endodermas que se localizam na superfície fetal da placenta principal. Para Cross (1998) tais disposições anatômicas são favorecidas tanto pelo processo da inversão quanto pelo crescimento assimétrico do embrião, o que acarreta em modificações espaciais do epitélio visceral e âmnio.

Nessa área de interface, em especial, a aposição entre endoderma parietal e visceral, as células endodérmicas apresentaram formato poliédrico, núcleos na posição basal e numerosas vilosidades na posição apical, demonstrando o aparato absorptivo nesta região da placenta vitelina.

Essa característica funcional foi confirmada experimentalmente em estudos realizados por Anderson (1959), no qual imunoglobulinas marcadas com iodo radioativo (I^{131}) eram injetadas na veia jugular de ratas gestantes, moviam-se da luz uterina para a cavidade do saco vitelino - na região de interface entre os endodermas visceral e parietal - e confirmavam o intercâmbio absorptivo, que foi visualizado com o auxílio de método autorradiográfico.

Diante disso, fica claro a importância da placenta vitelina ou endoderma visceral, no tocante ao suprimento fetal por substâncias indispensáveis ao seu desenvolvimento, sendo a vascularização vitelínica deste epitélio e a membrana basal visceral - que promove a sustentação da referida estrutura – elementos fundamentais para o desempenho funcional deste tipo de placenta e que, em preás, foram destacados pela marcação específica da reação imunohistoquímica para vimentina.

No presente trabalho, verificamos que a presença de moléculas de glicogênio e/ou substâncias glicoproteicas foram reveladas pela reação do P.A.S principalmente no endoderma parietal e membrana de Reichert subjacente à placenta principal. Este padrão de positividade do P.A.S retratado anteriormente mostra-se compatível com aqueles descritos por Haar e Ackerman (1971) ao estudarem as mudanças ultraestruturais do saco vitelino em camundongos; Favaron et al. (2011) em trabalho de placentação em roedores da Subfamília Sigmodontinae. No entanto, nossos resultados divergem de Wislocki et al. (1946) pelo fato destes autores afirmarem que não seriam encontradas moléculas de glicogênio nas células endodérmicas parietais que revestiam o trofoblasto mural e mesmo com as glicoproteínas presentes neste endoderma, as reações ao P.A.S seriam fracamente positivas.

Devido aos padrões de coloração promovidos pela reação positiva do P.A.S tanto nos elementos presentes na cavidade uterina quanto no saco vitelino, torna-se possível inferir a ocorrência de trocas de substâncias entre estes componentes, cuja mediação pode sofrer influência da membrana de Reichert (WISLOCKI; PADYKULA, 1953).

Na gestação avançada em preás, verificou-se que a membrana de Reichert era desenvolvida e contínua, encontrando-se interposta entre o endoderma parietal e o trofoblasto da placenta corioalantoide. Por meio da microscopia eletrônica de varredura, esta membrana apresentou padrão de eletrodensidade moderada, resultante do aspecto fibrilar agregado que se distribuía de forma contínua ao longo do contorno desta lâmina basal.

Padrões semelhantes no tocante ao desenvolvimento desta membrana foram relatados por Jollie (1968) ao descrever as mudanças da estrutura fina do saco vitelino e membrana de Reichert em ratas com o aumento da idade gestacional. No entanto, o autor relatou que em todos os períodos analisados, as células endodérmicas parietais

apresentaram aspecto cuboidal e eram frequentemente separadas uma das outras. Além disso, as células trofoblásticas em alguns locais apresentaram-se descontínuas, o que resultava na formação de fenestrações tanto do lado endodérmico quanto no lado trofoblástico. Como resultado, coexistiram muitas áreas em que a única barreira que separava substâncias presentes nos canais de sangue materno das células do endoderma parietal foi a membrana de Reichert a qual apresentou propriedades de membrana seletiva.

King (1971) com o propósito de caracterizar o contínuo desenvolvimento do endoderma parietal ao longo da gestação no porquinho da índia, verificou por meio da microscopia eletrônica de transmissão que entre os dias 28 e 30 de gestação as células parietais apresentavam grande quantidade de cisternas do retículo endoplasmático rugoso. Estas organelas celulares apresentaram-se dilatadas e continham em seu interior substâncias com aspecto denso cuja aparência era bastante similar a membrana de Reichert. Consequentemente, inferiu-se como uma das funções do endoderma parietal a síntese desta membrana basal.

Em préas as projeções vilosas do endoderma visceral, na região do disco placentário, tornaram-se mais ramificadas na gestação avançada (aos 35 dias de gestação), conforme evidenciado pela microscopia de luz e eletrônica de varredura, sendo o alicerce das formações vilosas constituídos pela membrana basal visceral e serosa. Segundo Mossman (1987) estas ampliações dos processos digitiformes são decorrentes da inversão do saco vitelino, tornando as bordas apicais do epitélio visceral mais suscetível à captação de substâncias. Consequentemente, as vilosidades aumentam em número e tamanho, acompanhando o desenvolvimento das células viscerais as quais se tornam colunares altas (DEMPSEY, 1953; ANDERSON, 1959; KING; ENDERS, 1970).

Outro fator que chamou a atenção foi a diferença na superfície celular das células endodérmicas viscerais, do ponto de vista ultraestrutural, pela microscopia eletrônica de varredura, quando estas células foram avaliadas nas regiões próximas e distantes da placenta corioalantoide. Em situação proximal, verificaram-se numerosos prolongamentos citoplasmáticos compatíveis com pseudópodes cuja dinâmica motora poderia refletir o desempenho funcional desta célula ao absorver, processar e eliminar resíduos de seu próprio metabolismo. Contrastando com esta característica, as porções

distais revelaram células endodérmicas viscerais apresentando superfície externa altamente lisa, fato este também sugestível em análise macroscópica de amostra obtida a termo e processada por meio da perfusão com látex.

Cockroft (1986) realizou um trabalho que também envolveu análises da superfície celular externa com ênfase nas formações pseudocíticas do endoderma em áreas periplacentárias e distais. No entanto, o enfoque dado nesse experimento direcionou-se para as células endodérmicas parietais na superfície da placenta corioalantoide bem como revestindo o trofoblasto mural, em situação anterior a inversão do saco vitelino. Para atingir tal objetivo foram realizadas análises em microscopia eletrônica de varredura além de gravações dos movimentos celulares em câmera acoplada a microscópio apropriado cuja velocidade de gravação era 64 vezes maior do que a passagem de tempo normal. Os resultados demonstraram o predomínio de pseudópodes e atividade motora nas células endodérmicas às margens do disco placentário ao passo que em regiões distais, as células possuíram superfície extremamente lisa e pouca motilidade.

A placenta corioalantoide de preás, em análise macroscópica, foi classificada como discoidal, sendo a face convexa associada ao feto e a côncava, em contato com os tecidos maternos. Em amostra obtida a fresco, observou-se coloração vermelha da placenta, refletindo elevado número de vasos maternos e fetais.

De forma análoga, Conceição et al. (2008) caracterizou a placenta principal de cutias (*Dasyprocta aguti*) e pacas (*Agouti paca*) como sendo em forma de cálice e apresentando cor vermelha em amostra obtida a fresco. A estrutura placentária nesses animais relacionava-se com a subplacenta centralmente e com a decídua basal lateralmente. Já Oliveira (2004) definiu o padrão macroscópico da placenta corioalantoide de mocós (*Kerondon rupestris*) como discoidal cujo formato placentário apresentou-se ligeiramente alongado no lado materno e levemente achatado no lado fetal.

Os resultados permitiram observar no preá, modificações de forma da placenta principal, que passou do elíptico achatado ao ovalado, entre os dias 10 e 12 da gestação, sendo observada uma organização mais efetiva a partir do décimo quarto dia gestacional. É interessante notar que o dia em que assume forma oval, coincidiu com o estabelecimento da cavidade amniótica e alongamento acentuado do blastocisto. Posteriormente, seguiu-se gradual organização da placenta que começava a apresentar

formato discoide que continha duas extremidades afiladas nas quais partiam o endoderma visceral de modo a envolver o embrião.

Mess (2007) realizou estudo de placentação corioalantoide e vitelina na espécie *Petromus typicus* com o intuito de investigar a evolução histórica da placenta nos roedores histricognatis, utilizando para tal, técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Os resultados demonstraram que na gestação inicial desenvolvia-se uma imatura placenta corioalantoide, situada no lado antimesometrial do útero. Áreas de espongiotrofoblasto desprovidas de vasos sanguíneos começavam a se organizar bem como a região do labirinto que por sua vez, apresentava vasos fetais e canais de sangue materno.

Fischer e Floyd (1972) por meio da microscopia de luz realizaram estudos de placentação no esquilo-da-Mongólia (*Meriones unguiculatus*) como forma de caracterizar a morfologia placentária nesta espécie. Verificaram que entre os dias 13 e 14 de gestação, uma imatura placenta corioalantoide surgia em decorrência da vascularização do cone ectoplacentário por vasos oriundos do mesoderma alantoidiano. Neste período, a organização do labirinto e sincício marginal não era evidente, ao passo que entre os dias 15 e 16 de gestação, observaram-se modificações das membranas fetais e expansões do embrião e placenta principal. Consequentemente, regiões do labirinto placentário e sincício marginal bem como os padrões vasculares das circulações maternas e fetais tornaram-se bem definidos, culminando com elevado grau de maturação placentária a partir do décimo nono dia de gestação.

No preá, por volta do décimo quarto dia de gestação, arranjos cito e sinciciotrofoblásticos indicavam o início da formação do labirinto, ao passo que, aos quinze dias, na região do pedúnculo placentário, ocorreu coexistência das células do citotrofoblasto e sinciciais com tecido conjuntivo transformado (decídua basal), cujo aspecto fusiforme e anisocítico era evidente. Subsequentemente, nos dias 16 e 17 da gestação, a placenta (disposta no lado anti-mesometrial do útero) aumentou bastante de tamanho pela hipertrofia e proliferação celulares, fato este que induziu aproximações do embrião – este inicialmente disposto no lado mesometrial – e endoderma visceral em direção a placenta principal. Tais observações, no que se refere as aposições entre embrião e placenta principal, corroboram com os achados de Oliveira et al. (2008), ao

descreverem a organização da placenta pricipal em preás nos terços iniciais, médios e finais da gestação, Jollie (1990) tratando-se de revisar as principais características das placentas vitelínicas e corioalantoides em roedores de laboratório e Cross (1998) quando tratou sobre a placentação e formação das membranas extra-embrionárias em camundongos.

Na gestação intermediária em preás, aos 20 dias, houve o estabelecimento de regiões bem definidas na placenta, sendo a área de espongiotrofoblasto situada na sua superfície fetal, o labirinto, na região média da placenta, porém não completamente desenvolvido e a subplacenta, localizada entre o labirinto e decídua basal. É importante destacar também que, entre os dias 25 e 30 da gestação, o labirinto placentário passou a constituir grande parte do volume placentário e apresentou intensa rede vascular, a qual foi demonstrada pela marcação do endotélio capilar fetal por meio da reação imunohistoquímica para vimentina.

Estes resultados aproximam-se aos apresentados por Mess (2007) ao demonstrar a placentação do cobaio entre os dias 20 e 23 da gestação. A autora em questão também revelou intensas marcações com a vimentina na região labiríntica, no modelo estudado, retratou ainda a elevada positividade, nas células espongiotrofoblásticas, frente aos anticorpos anti-mib-1 (anticorpo contra o antígeno Ki67 humano), o que indicou grande atividade mitótica (pela revelação dos núcleos celulares em vermelho) da referida região placentária e que aquelas células esponjosas estariam em contínuo processo de migração para a periferia dos lobos placentários.

Similarmente, verificamos, na gestação avançada, reações positivas intensas para o PCNA, no endoderma parietal, espongio e sinciciotrofoblasto – demonstrados pela coloração marrom dos núcleos – o que também indicou capacidade proliferativa dos tipos celulares supracitados.

A maturação plena da placenta principal foi evidenciada aos 38 dias de gestação, sendo verificados os lóbulos placentários, os quais continham uma zona externa de espongiotrofoblasto, uma zona intermediária representada pelo labirinto e outra caracterizando o centro do lóbulo. Evidentemente, o espaço ocupado pelo epitélio esponjoso foi continuamente reduzido, fato este resultante da proliferação e predomínio da maior área destinada as trocas materno-fetais: o labirinto. Neste local, aos 40 dias,

verificaram-se numerosos vasos fetais, muitos deles contendo grande calibre e separados dos canais de sangue materno apenas por uma única camada de sinciciotrofoblasto.

A barreira interhemática hemonocorial assim formada foi compatível com as observações de Flamini et al. (2011) ao descreverem a placentação em *Lagostomus maximus*, Oliveira et al. (2008) em pesquisa de placentação em preás, Enders et al. (1998) e Enders e Blankenship trazendo suas definições sobre a temática em questão nos roedores, Georgiades et al. (2002) quando este último faz menção a condição monocorial humana e diferente quando caracteriza a placenta hemotricorial em camundongos e por King e Mossman (1974) ao afirmarem sobre a existência de interface hemomonocorial do roedor norte africano (*Jaculus jaculus*) e do camundongo saltitante (*Zapus hudsonius*).

Esse arranjo anatômico representa o maior grau de invasão trofoblástica, sendo que em humanos, a região análoga ao labirinto denomina-se placenta fetal e contém como elementos constituintes da interface materno-fetal: uma camada simples de sinciciotrofoblasto viloso que encontra-se em contato direto com o espaço intervilloso (região similar ao canal de sangue materno de roedores) e portanto, com o sangue materno. Esta monocamada sincicial apoia-se numa membrana basal que, por sua vez, sustenta-se num núcleo central viloso – representando uma formação amorfa ricamente constituída por moléculas de colágeno e glicosaminoglicanos – e este último, sustenta-se em outra membrana basal, a qual encontra-se presa ao endotélio dos capilares fetais (ENDERS, 1965; STEVEN, 1975; WOODING; FLINT, 1994; GEORGIADES et al., 2002).

Em ratos, verificam-se uma camada citotrofoblástica que faceia a lacuna materna, seguida de dois estratos de sinciciotrofoblasto, sendo que a terceira camada repousa sobre uma membrana basal e esta, envolve o endotélio dos capilares fetais (ENDERS, 1965; WOODING; FLINT, 1994; TAKATA; HIRANO, 1997).

Bonatelli et al. (2005), Rodrigues et al. (2006) e Mess (2007) citam acerca do surgimento da subplacenta como proliferações de células trofoblásticas situadas na metade inferior da escavação central, nas proximidades da decídua basal, e que contém muitos dobramentos, os quais apoiam-se em sinciciotrofoblasto repleto de vacúolos e cuja capacidade invasiva é reconhecida.

Na gestação intermediária em preás, verificou-se que a subplacenta constituía uma região bem delimitada e facilmente distinguível, cujas formações lamelares partiam de um mesêquima situado na base ou superfície materna da placenta corioalantoide. Estas características concordam com as informações difundidas por Davies et al. (1961), Bonatelli et al. (2005), Rodrigues et al. (2006), Mess (2007) e Oliveira et al. (2008).

No período em questão, observamos células do citotrofoblasto contendo limites celulares precisos, basofilia citoplasmática, elevada relação núcleo/citoplasma, nucléolos únicos e grandes. Por outro lado, o sinciciotrofoblasto revelou amoldamento nuclear, nucléolo evidente, eosinofilia citoplasmática e contornos celulares mal definidos.

De acordo com os resultados promovidos por Flamini et al. (2011), ao caracterizarem a subplacenta do viscacha (*Lagostomos maximus*) no início e meio da gestação, verificaram-se imunorreatividades para a vimentina no endotélio dos vasos fetais, sendo os espaços que contém sangue materno, localizados próximos à decídua materna. Além disto, por meio da reação das células subplacentárias frente ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), os autores puderam inferir que a gestação intermediária coincide com o desenvolvimento máximo da subplacenta. Com relação aos aspectos morfológicos celulares pode-se dizer que foram semelhantes aos observados no estudo subplacentário de preás.

Na espécie em questão, Oliveira et al. (2008) citam que durante a gestação inicial e intermediária precoce, coexistem vasos sanguíneos fetais com as lacunas maternas, na subplacenta, situação esta que se modifica pela presença apenas da vascularização fetal, no transcorrer gestacional, em especial, a partir da gestação intermediária avançada. Este desenvolvimento é ratificado por Flamini et al. (2011) além da constatação de que o órgão subplacentário também serve como ponto de partida para a invasão trofoblástica para toda a estrutura discoidal placentária, fato este concordante ainda pelas exposições estabelecidas por Mess (2003), Mess (2007), Kanashiro et al. (2009) e Kanashiro (2011) para outros roedores caviomorfos.

Finalmente, é importante destacar que a subplacenta, na gestação avançada, demonstra sinais indicativos de degeneração, cuja monocamada citotrofoblástica encontra-se apoiada por sinciciotrofoblastos contendo fragmentações citosólicas, o que acarreta em espaços vazios nestes locais (BONATELLI et al., 2005; RODRIGUES et al.,

2006; KANASHIRO et al., 2009). De fato, Davies et al. (1961) sinalizam haver escassez de figuras mitóticas, presença de núcleos picnóticos e redução no quantitativo de células trofoblásticas gigantes, o que corrobora com a referida degeneração observada ao final da gestação.

Ademais, diante do exposto, deve ser enfatizado que as pesquisas baseadas nos aspectos morfofisiológicos supracitados devem ser correlacionadas com os achados referentes as macromoléculas, que contribuem para as relações anatômicas observadas, no nosso caso, destacamos componentes fundamentais para o desenvolvimento daquelas estruturas: os glicosaminoglicanos, que podem fornecer informações adequadas para a convergência evolutiva, baseada em prévia condição ancestral. Estas relações favorecem o estabelecimento de novos caminhos para os estudos de placentação.

6.5 EMBRIOGÊNESE, DESENVOLVIMENTO E MORFOMETRIA

O desenvolvimento inicial blastocístico com o estabelecimento de cavidade característica (blastocelo), formações do trofoblasto (trofoectoderma), massa celular interna (embrioblasto), hipoblasto, cone ectoplacentário e morfologia esférica mostrou-se compatível com os achados de Levak-Svajger et al. (1991) ao demonstrarem a evolução das camadas germinativas em embriões de roedores, Cross (1998) ao descreverem a formação placentária e destinos das membranas extra-embrionárias de roedores, Schlafer et al. (2000) ao publicarem artigo de revisão sobre a formação dos anexos fetais, placentação e desenvolvimento embrionário em bovinos, Oliveira et al. (2008) que caracterizaram a placentação corioalantoide em preás e Dobrevá et al. (2010) ao representarem esquematicamente um corte transversal de embrião humano aos 12 dias pós-fecundação.

Em contraste, Eakin e Behringer (2004) ao promoverem discussões sobre a diversidade das camadas germinativas e desenvolvimentos embrionários nos mamíferos eutérios, citaram a existência de blastocistos unilaminares em algumas espécies de marsupiais, em insetívoras como o *Hemicentetes spp* e no roedor africano: *Elephantulus spp*, ou seja, tais mamíferos não formam massa celular interna. Neste caso, a própria camada única, por possuir células pluripotentes ou pluriblasticas, sofrem diferenciações e

migrações específicas, cujos rearranjos estruturais assemelham-se ao blastocisto bilaminar, quando essas células se transformam em hipoblasto e migram para região inferior ao pluriblasto, da mesma forma em que delimitam a blastocele. Finalmente num dos pólos gerados, desenvolve-se o epiblasto embrionário e o restante da camada mais externa passa a ser reconhecida como trofoblasto.

Em nossas observações, o blastocisto de preás, aos seis dias de gestação, já se encontrava implantado na região uterina mesometrial concordando, pois, com as observações difundidas por Oliveira et al. (2008) ao estudarem os terços iniciais, médios e finais da gestação em preás bem como para o cobaio (porquinho da Índia), o qual foi exemplificado por Enders (2000), ao passo que, tal característica, diverge da implantação blastocística antimesometrial verificada em camundongos e ratos – acarretando, conseqüentemente, no estabelecimento de um cone ectoplacentário situado em orientação mesometrial -, sendo descrita por Carson et al. (2000), Lee e Demayo (2004) e Herington e Bany (2009).

Nesse contexto, Mossman (1987) indica que a implantação também pode ocorrer em localização central a luz uterina e tal condição dificultaria a invasão do blastocisto e conseqüentemente da ancoragem placentária no estroma endometrial. Dentro desta perspectiva, pequenos mamíferos cilíndricos da ordem *Eulipotyphla* possuem blastocisto em posição central e placenta anti-mesometrial. Os carnívoros também possuem embriões primitivos localizados centralmente, porém com placentas em disposição anti ou mesometrial, fato este capaz de influenciar se a futura placenta será completamente zonaria ou dupla discoidal, respectivamente. Tal característica difere, portanto, do *Rufous elephant shrew* e outros mamíferos da família Macroscelidea, os quais, interessantemente possuem blastocistos e placentas no espaço uterino anti-mesometrial.

Com o desenvolvimento subsequente do blastocisto em preás, foi possível, aos nove, 10 e 12 da gestação, a verificação de modificações na forma, demonstrado pelo alongamento característico e morfologia cilíndrica evidenciada bem como pela delimitação da cavidade amniótica, em decorrência das proliferações de camadas ectodérmicas capazes de gerarem o âmnio. Este envoltório uma vez formado - no décimo dia - proporcionou proteção e favorecimento ao desenvolvimento embrionário.

Essas modificações blastocísticas de forma anteriormente citadas também foram verificadas por Fléchon et al. (2004) ao caracterizarem os eventos de gastrulação, por meio de técnicas ultraestruturais e pela detecção de marcadores moleculares, na gestação inicial de porcos. Assim, quando constituía um disco bilaminar, o primitivo embrião possuía a massa celular interna que apoiava-se, inferiormente, no endoderma embrionário, e faceado na porção superior, por células do trofoectoderma, as quais constituíram a camada de Rauber. Em seguida, esta sofria degeneração e coincidia com a diferenciação da camada superior do embrioblasto em ectoderma embrionário, o qual apresentou imunorreatividade para a citoqueratina. Paralelamente, o mesoderma que tornava-se interposto entre o ectoderma e endoderma embrionários, mostrou intensa reação para a vimentina, sendo formado, pois, uma estrutura embrionária trilaminar achatada.

De acordo com Coucovanis et al. (1995) os embriões de camundongos aos 4.5 dias de desenvolvimento, começam a apresentar uma pequena cavidade – formada por apoptose – no centro do epiblasto, produzindo, então, a cavidade pró-amniótica. Aos sete dias, desenvolve-se uma proliferação do mesoderma extra-embrionário que, por sua vez, induz a formação de três cavidades: a primeira encontrando-se delimitada pelo ectoderma embrionário, onde no teto desta cavidade, tal camada diferencia-se em ectoderma amniótico. Acima desta, verifica-se o mesoderma extra-embrionário que forma a base do celoma extra-embrionário, o qual possuirá como teto o ectoderma extra-embrionário. Este último desenvolve a última cavidade, denominada ectoplacentária, no qual a extremidade mais externa produzirá uma região cônica, responsável pelo desenvolvimento ulterior da placenta principal. Diferentemente, em nossas observações, no tocante a embriogênese de preás, não foram evidenciadas cavidades como a ectoplacentária e pró-amniótica, vislumbrando-se, apenas, uma cavidade amniótica na qual células ectodérmicas amnioblásticas envolviam o blastocisto, apoiavam-se num mesoderma extra-embrionário, sendo este mesênquima, elemento separador do celoma extra-embrionário, o qual apresentou-se formado por trofoblasto associado ao mesoderma anteriormente citado.

Em humanos, logo após a implantação, o epiblasto, por cavitação, origina a cavidade amniótica, sendo o âmnio, produzido por diferenciação de um segmento constituinte do ectoderma embrionário (LUCKET, 1975). De acordo com este autor, a

referida cavidade se estabelece entre os dias sete e oito pós-fertilização e de forma bastante similar, no macaco rhesus ao décimo dia. Antes da gastrulação, células amnióticas humanas já são discerníveis no intervalo compreendido entre os dias 15 e 17 (BIANCHI et al., 1993). No entanto, a origem do mesoderma extraembrionário - que se associa ao âmnio-, ainda é motivo de discussão e intensos debates por pesquisadores que estudam tais aspectos morfofisiológicos da gestação nas diversas espécies animais (DOBREVA et al., 2010). Pode-se citar, por exemplo, o modelo proposto por Enders e King (1988) e Bianchi et al. (1993) que sugeriu o referido mesoderma como sendo derivado de células do hipoblasto, ao passo que, para Robinson et al. (2002) a origem da camada embrionária em questão seria oriunda do mesoderma intra-embrionário.

A estrutura trilaminar linear contendo as camadas germinativas intra e extra-embrionárias passaram a ser identificadas aos 14 dias de gestação em preás. Neste sentido, pela facilidade de discernimento entre os referidos folhetos, estudos de ontogenia destas camadas são recomendados neste período. Cita-se, como exemplo, o trabalho realizado por Levak-Svager et al. (1991) ao promoverem o desenvolvimento das camadas germinativas, de embriões de ratos, transplantados para sítios ectópicos em animais adultos da mesma espécie. Para tanto, elencou-se - a exemplo do décimo quarto dia observado em preás - o nono dia de gestação em ratos, segundo o qual, as três camadas germinativas estiveram visíveis, e possibilitaram a separação destas por procedimento microcirúrgico e tratamento químico mediante utilização de tripsina, acrescida de pancreatina, cálcio e magnésio. Uma vez obtidas de forma isolada, a ectoderma, mesoderma e endoderma primitivas foram transplantadas, individualmente, na região da cápsula renal (compreendida entre a cápsula e o parênquima deste órgão) de três ratos adultos receptivos a cada camada em análise. Os resultados demonstraram que, após o transplante, proliferações e diferenciações no órgão aceptivo produziram formações denominadas teratoma, as quais, apesar do grau desorganizado de evolução, proporcionaram valiosas informações no que se refere ao aspecto ontogênico. Desta forma, os autores puderam concluir que apenas o ectoderma embrionário foi capaz de produzir todas as células constituintes do embrião e promover certo grau de organização ao teratoma. Adicionalmente, em fase mais avançada da gestação, mais especificamente na “dobra da cabeça”, o ectoderma extraído desta região limitou-se a derivar células ecto

e mesodérmicas. Além disto, o endoderma só foi capaz de diferenciar-se quando em contato com mesoderma, cujos resultados foram negativos, mediante inserção individualizada daquela camada.

Na gestação humana, aos 12 dias pós-fertilização, algumas células oriundas do epiblasto migram sobre o retículo extra-embrionário acarretando na diferenciação em mesoderma somático, o qual passa a se localizar adjacente ao citotrofoblasto bem como ao saco amniótico. Similarmente, a camada mesodérmica recém maturada, que parte do mesoderma embrionário e contorna todo o revestimento produzido pelo saco vitelino, é reconhecidamente denominado como esplâncnico (LARSEN, 1997). Estas relações anatômicas também foram evidenciadas em preás aos 16 dias de gestação.

Seguindo-se o desenvolvimento embrionário humano, Cooke (1999) cita os aspectos moleculares e genéticos que influenciam os dobramentos embrionários nos planos longitudinal e transversal, acarretando, em consequência disto, uma morfologia tubular curvada, com o ectoderma revestindo a superfície externa e internamente, o endoderma. O dobramento referente ao primeiro plano citado resulta na projeção do tubo neural de modo a proporcionar que o encéfalo seja a estrutura mais cranial do embrião. Esta cinética compartimentaliza o saco vitelino em porções anterior, média e posterior, os quais constituirão os respectivos intestinos, sendo que uma porção remanescente de endoderma visceral se incorpora ao pedúnculo do embrião para formar o cordão umbilical. Nossos resultados sinalizaram, aos 15 dias de gestação em preás, um organismo embrionário denotando, na região cranial, a formação do sulco neural que logo formaria o tubo neural. Neste período, o embrião em questão encontrou-se envolvido completamente pelo âmnio e estes, pelo endoderma visceral de um saco vitelino invertido, o qual permaneceu íntegro até o final da gestação.

Ainda com relação ao nosso estudo, verificou-se, já no décimo sétimo dia gestacional, a presença do mielencéfalo e vesículas auditivas, não sendo possível a visualização de outras estruturas devido a diferenças de profundidade do corte histológico impetrado ao embrião, o que resultou em algumas imagens com diferentes planos. Como o primeiro, deriva de uma porção do rombencéfalo, infere-se que a porção anterior do tubo neural já havia se expandido para originar as três vesículas encefálicas: rombencéfalo, mesencéfalo e prosencéfalo. De fato, este último já se encontrou dividido em telencéfalo

e diencéfalo, aos 18 dias de gestação em preás, fato este capaz de se sugerir que o único campo óptico, existente no prosencéfalo, dividiu-se em dois, originando as vesículas ópticas e estas permaneceram em comunicação com o diencéfalo após a transformação anteriormente citada.

Por conseguinte, de acordo com os trabalhos de indução embrionária produzidos por Jacobson e Sater (1988), pressupomos que o ectoderma que revestiu tais vesículas sofreu processo de diferenciação, resultando na produção dos placóides do cristalino, os quais, ao se invaginarem e formarem vesículas, originaram, posteriormente, o cristalino do olho. Por outro lado, estes placóides e vesículas do cristalino atuaram sob as vesículas ópticas, as quais adquiriram a forma de cálice (cálice óptico) para a formação da retina.

Segundo Kaufman (1998), em virtude do dobramento do embrião, a membrana bucofaríngea e a cloacal acabam por separar, respectivamente, o estomodeu e o proctodeu do intestino primitivo. Ambos são revestidos por ectoderma, sendo que este último, forma a parte posterior do tubo digestivo, originando, pois, a porção inferior do canal anal. O estomodeu, que dará origem a cavidade bucal, foi caracterizado em preás a partir do décimo oitavo dia gestacional.

Yasui (1992) caracterizou o desenvolvimento embrionário do insetívora *Suncus murinus*, no início da gestação, enquadrando os estágios analisados entre 11C e 12C, segundo o critério de Carnegie, com número de pares de sômitos, variando de 13 a 29. De posse dos resultados, demonstrou-se intensa curvatura embrionária em forma de “C” no dia dez da gestação (estágio compreendido de 13 a 15 pares de sômitos); a vesícula óptica foi reconhecida, externamente, como uma elipse opaca, cujo eixo mostrou-se paralelo a margem dorsal do rombencéfalo. Subsequentemente, no período que equivalia 16-18 (11 dias de gestação) pares de sômitos, observou-se um proeminente estomodeu, tornando-se largamente aberto. Assim, no que tange aos aspectos curvatura, estrutura óptica e primórdios da boca, verificamos similaridades, na embriogênese de preás, os dias 19 e 18, respectivamente.

Seguindo-se essa linha de raciocínio, estudos do desenvolvimento embrionário associados aos dados morfométricos, ao longo da gestação, em camundongos, seguidos de correlações com a gestação humana, foram destacados por Otis e Brent (1954), Snell e Stevens (1966), Theiler (1989) e Rugh (1990) bem como em ratos por Witschi (1956) e

Hebel e Stromberg (1986), os quais sinalizam a sua importância no que se refere a pre-dizer o período da gestação, organogênese envolvida e estágio específico do desenvolvimento embrionário.

Para tanto, muitos sistemas de classificação que estadiam o desenvolvimento do embrião e feto são utilizados. Theiler (1972) para o camundongo, baseou sua classificação pelas informações produzidas por Streeter (1942), o qual caracterizou alguns aspectos da embriologia humana. Posteriormente, Kaufman (2008) citam os sistemas de Theiler (1989) que promove abrangência de dados relativos a cada estágio correlacionando-os com a idade gestacional, comprimento e pares de sômitos, os quais são confrontados com características do blastocisto e sua diferenciação, formação do mesoderma, da cavidade proamniótica, âmnio, placa neural e sulco neurais, cone ectoplacentário, em embriões de camundongos e ratos, totalizando 27 estágios para este último.

Similarmente, o sistema Carnegie estabelece 23 estágios em humanos (Kaufman, 2008), ao passo que Melo (1989) divide o período pré-natal em pré-embrionário – da fecundação até a terceira semana -, embrionário, que varia da quarta a oitava semana de desenvolvimento e o fetal que transcorre do terceiro mês até o final da gestação.

No estudo do desenvolvimento embrionário e fetal de preás, optamos por seguir o conjunto de informações que levassem em consideração a idade, modificações graduais nas transformações corpóreas, peso, características microscópicas desde a formação blastocística, passando pelo desenvolvimento dos folhetos germinativos, estruturas placentárias, vitelínicas, relacionadas ao sistema nervoso e órgãos dos sentidos, até as principais características macroscópicas do período embrionário avançado. Para a análise fetal, demonstramos as características macroscópicas e dados morfométricos. A nomenclatura utilizada baseou-se naquelas estabelecidas pelas Nominas embriológicas (2006) e histológicas veterinárias (1994).

Os dias 19 e 20 gestacionais em preás apresentaram características morfológicas muito próximas aquelas evidenciadas por Fortes et al. (2013) no tocante a curvatura cervical e crânio-caudal em forma de “C”, transparência cutânea, pele delgada bem como estruturas primitivas da região cefálica: prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo, placóides ópticos, saliência cardíaca, primitivos brotos dos membros e cauda. Tais

aspectos mostraram-se equivalentes aos vistos nos embriões humanos aos 28 dias gestacionais (estágio Carnegie 13) (MOORE; PERSAUD, 2004), em ratos no estágio 16-17 de Theiler (THEILER, 1989; KAUFMAN, 2008) e por Francioli et al. (2011) em embriões de *Dasyprocta leporina* com 11 milímetro de *Crown-rump* (CR).

Fortes et al. (2013) reportam que embriões de 30 dias pós-cobertura possuíam desenvolvimento mais pronunciado da região cefálica, espessamento da pele, porém mantida sua transparência, o que facilitou a visualização dos vasos sanguíneos, principalmente na região da cabeça, fato este que corroborou com os achados obtidos em embriões de preás, no vigésimo segundo dia de gestação. De forma análoga, tais achados assemelham-se aos embriões humanos aos 32 dias (estágio Carnegie 14) (KAUFMAN, 2008), em ratos, no estágio Theiler 17-18 (THEILER, 1989) e em cutias, aos 30 dias de gestação (FORTES et al., 2013).

Desta forma, seguindo-se o desenvolvimento embrionário, em nosso estudo, verificamos, no vigésimo quinto dia gestacional, maior proporção da cabeça em relação ao resto do corpo, redução da curvatura dorsal, membros em forma de nadadeiras e presença de saliência auricular, cuja semelhança ao embrião da espécie *Oligoryzomys sp*, destacado por Favaron et al. (2012), pela morfologia de Gross, a qual norteia o estadiamento, principalmente de acordo com os dados relativos ao CR e peso, é evidente.

O dia 45 da gestação, descrito por Fortes et al. (2013), em cutias, o estágio Carnegie 21, ou 52 dias gestacionais em humanos bem como em felinos entre os dias 25 a 28 pós-implantação (KNOSPE, 2002) agregam um fator comum: presença de dígitos separados, principalmente dos membros inferiores, os quais foram compatíveis com o trigésimo dia da gestação em preás.

Nessa última espécie supracitada, considerou-se, como fase fetal, aquela em que todas as estruturas corporais estiveram diferenciadas, destacando-se, pois, o espessamento e pigmentação cutâneos, desenvolvimento dos pelos e formação das unhas, características aferidas aos 40 dias pós-fecundação. As orelhas estavam formadas bem como os olhos, os quais encontravam-se fechados. A pelagem, apesar de curta já sinalizava colorações específicas para a espécie, ao passo que a cauda apresentou-se afilada e curta, mantendo-se desta forma até o final da gestação. Excetuando-se o desenvolvimento verificado para os pelos, nossos resultados concordam com os

reportados por Oliveira (2016) ao retratar o desenvolvimento pós-implantacional de fetos de cutias aos 75 dias de gestação.

Finalmente, observamos entre os dias 48 e 50 da gestação em preás, o início da abertura dos olhos, desenvolvimento da pelagem contendo características específicas da espécie, seguidos da maturação plena fetal, incluindo abertura completa dos olhos, manchas periorcárias e pós-auriculares brancas e região dorsal com coloração escura, do dia 55 ao 60, data limite para o fim do período gestacional da espécie em questão.

Em relação aos dados biométricos, estes se mostraram importantes para o acompanhamento das modificações morfológicas e crescimentos dos parâmetros analisados, os quais possibilitarão estimativas adequadas da idade embrionária e fetal em preás.

Pelo exposto, verificamos que a variável peso apresentou crescimento progressivo, o qual intensificou-se a partir do quadragésimo quinto dia gestacional, sendo que após este período, houve um ritmo de crescimento mais lento para o “*Crown-rump*” (CR) devido à tendência verificada na estabilização dos valores aferidos. Tais constatações, nos dois parâmetros, em se tratando da curva gráfica, assemelharam-se, aquelas descritas por Fortes et al. (2013), em análise morfométrica de fetos de cutias, onde relatam acentuado aumento do peso a partir dos 63 dias e desaceleração do crescimento do CR por volta dos 70 dias pós-cobertura.

Segundo Evans e Sack (1973), o estabelecimento dos parâmetros morfométricos que retratam o crescimento embrionário e fetal para determinada espécie, servem como referência para o entendimento do desenvolvimento intra-uterino, estimativa da idade gestacional ao mesmo tempo em que fornecem subsídios necessários para a compreensão dos efeitos prejudiciais resultantes de substâncias mutagênicas, radioativas, partículas virais, distúrbios metabólicos e alimentares ou modificações dos parâmetros fisiológicos que destoem da normalidade. Neste sentido, os autores citam como principais variáveis a serem levadas em consideração o “*Crown-rump*”, peso e medidas traçadas em linhas retas e/ou curvas entre as partes do corpo, as quais podem ser correlacionadas com as características externas verificadas nos embriões e fetos, em cada idade gestacional. Verificando-se seus resultados, no tocante ao comportamento gráfico das curvas de crescimento do CR demonstrados para o cobaio, porcos, coelhos, vacas e cachorros,

houve similaridade ao evidenciado em preás e diferença, no caso de ratos, camundongos, ovelhas e cavalos.

Favaron et al. (2013) caracterizaram o desenvolvimento embrionário e fetal do *Oligoryzomys sp*, segundo os quais revelaram medidas biométricas de três animais na fase fetal, cujas idades gestacionais foram estimadas de acordo com os critérios de Evans e Sack (1973). Para o primeiro animal, no décimo sétimo dia de gestação, obtiveram-se medidas de CR iguais a 18mm e peso de 0,665g; o segundo, também verificado aos 17 dias, CR igual a 18mm e peso de 1,327g, sendo o terceiro feto dotado de valores de CR e peso, respectivamente, 22mm e 2,327g. Já os resultados obtidos em embriões de preás, aos 20 dias de gestação, possuíam valores médios de CR de $13,74 \pm 1,358$ mm e $0,314 \pm 0,015$ g de peso corporal, o que refletiu uma proporcionalidade CR/peso distinta à estabelecida por aquele autor até mesmo pelo curto período gestacional de seu modelo experimental estudado, que de acordo com Brasil (2002) situa-se em torno de 25 a 26 dias.

Em búfalos (*Bubalus bubali*), Morini et al. (2016) indicaram que a idade fetal iniciava-se entre os dias 41 a 45 de gestação, cujos animais possuíam CR variando de 31 a 35mm e pesos situados de 0,107 a 0,278g. No caso de preás, verificamos que a vida fetal começou a partir do quadragésimo dia de gestação, sendo os valores médios de CR e peso, respectivamente, $59,13 \pm 0,806$ mm e $12,13 \pm 0,125$ g. Além disto, comparando-se as curvas de crescimento de CR para as duas espécies anteriormente citadas, verificou-se tendências de crescimento bastante diferentes.

As variáveis do nosso trabalho, relativas ao comprimento do membro torácico e perímetro abdominal, apresentaram curvas de crescimento linear, as quais acentuaram-se após o vigésimo quinto dia de gestação, sendo para a primeira, verificada elevações uniformes nos demais dias gestacionais e para a segunda, excetuando-se uma redução brusca na variação do crescimento do dia 50 ao 55 e elevação acentuada do dia 55 ao 60, os demais dias revelaram crescimento uniforme. Em parte, tais resultados concordam com os demonstrados por Oliveira (2016), obtidos em fetos de cutias, sendo o crescimento linear ocorrido de forma acentuada a partir dos 45 dias de gestação para as duas variáveis em questão, porém ambas apresentaram reduções de crescimento nos dois últimos dias gestacionais analisados.

O comprimento total, céfalo-caudal e diâmetro biparietal obtidos em préas apresentaram aumentos contínuos, cuja maior variação do crescimento situou-se no intervalo entre os dias 25 e 30 da gestação. Já o comprimento cefálico possuiu crescimento moderado quando comparado as medidas de circunferência cefálica, este último apresentando aumento contínuo e acentuado até o quadragésimo quinto dia de gestação, seguido da redução do ritmo de crescimento após este período. Tais resultados possuíram semelhanças, em termos do comportamento gráfico, quando comparados aos parâmetros comprimento cefálico, circunferência cefálica e diâmetro biparietal de fetos de cutias, demonstrados por Oliveira (2016) e divergiram do comprimento total e céfalo-caudal destas, os quais apresentaram crescimentos lineares, sobretudo a partir dos 45 dias de gestação.

Dados biométricos do comprimento da cauda, em fetos de cutias, sinalizam haver valores constantes nos dias 40, 45 e 50 da gestação, o qual intensifica o crescimento a partir deste último, aumentando ainda mais após os 75 dias (FORTES, 2011). Por outro lado, no préa, verificamos dois momentos de baixo crescimento da cauda com estabilizações no ritmo do crescimento: o início (entre os dias 20 e 30) e fim da gestação (o intervalo entre os dias 50 e 60), cujo aumento acentuado, no crescimento, processou-se do dia 35 até o quadragésimo quinto dia pós-fecundação.

Em relação ao comprimento e diâmetro do olho, em nosso estudo, apresentaram perfis de crescimento que se acentuavam até os 35 dias de gestação, onde, subsequentemente, detectou-se decréscimo na variação do crescimento com valores relativamente estáveis. O dia gestacional referendado coincide com o final da fase embrionária, na qual se pressupõe que a vesícula óptica estruturou-se por completo e cujo aumento de tamanho deveria apresentar desaceleração do crescimento.

Seguindo-se um comparativo entre os comprimentos dos membros torácico e pélvico é evidente que os valores medidos sejam maiores para os pélvicos, apesar de para o primeiro parâmetro haver crescimento linear enquanto que no segundo, observou-se pequenas variações no ritmo do crescimento coincidindo com o início e fim da gestação.

Além disto, para os membros pélvicos, constatou-se maiores dimensões no comprimento e largura das unhas quando comparadas aquelas dos membros torácicos, sendo as medidas de comprimento superiores as da largura. Nas duas variáveis estudadas

houve aumento do crescimento em cada idade gestacional, diferindo, pois, das observações em fetos de cutias, que apresentou diminuição do crescimento para a largura das unhas nos membros pélvicos entre os dias 75 e 85 bem como entre os dias 100 e 110 da gestação e redução do comprimento das unhas dos membros pélvicos também entre os dias 100 e 110 (OLIVEIRA, 2016).

Nossas observações revelaram ainda crescimentos contínuos e progressivos dos perímetros torácicos e abdominais, sendo verificadas reduções para a primeira variável e aumento acentuado para a segunda nos dois últimos dias de gestação. Ademais, os crescimentos da tíbia e do rádio/ulna possuíram equivalência do trigésimo dia gestacional ao 45, sendo após este intervalo, verificado redução no crescimento do rádio/ulna e aumentos contínuos nos valores aferidos para a tíbia. Este padrão seguiu características próprias da espécie e consequentemente indicou dados importantes relativos ao seu crescimento.

Para o crescimento das orelhas, observou-se que houve grande aumento do desenvolvimento entre os dias 40 e 45 da gestação, o que equivaleria em fetos de cutias e guardadas as devidas proporções, ao intervalo verificado do dia 53 ao 78 bem como entre os dias 78 e 103, períodos estes de maiores variações no crescimento, cuja variável apresentou curva de crescimento linear, de acordo com os resultados demonstrados por Fortes (2011).

Por fim, os comprimentos dos dentes incisivos inferiores apresentaram maiores determinações biométricas àquelas verificadas para os superiores, fato este que vem a corroborar com as características gerais estabelecidas para a ordem rodentia, as quais indicam que, o grande desenvolvimento do par de dentes incisivos inferiores é necessário e favorece, portanto, a alimentação, escavação de túneis bem como para a própria defesa (WOLFF; SHERMAN, 2007).

6.6 DETERMINAÇÕES DOS PRINCIPAIS GLICOSAMINOGLICANOS PELA IMUNOHISTOQUÍMICA E ELETROFORESE DE POLISSACARÍDEOS

Em relação as expressões de glicosaminoglicanos sulfatados, ao longo do período gestacional, verificou-se que, para os ovários, houve maior produção de GAGs no meio e fim da gestação com picos de concentração observados nos dias 30, 45 e 50. Neste sentido, macromoléculas de heparam sulfato dispuseram-se, preferencialmente, no corpo lúteo, nas células tecaais foliculares e estroma medular ovariano, contrastando, pois, com uma distribuição difusa do dermatam sulfato por todo o ovário. Já o condroitim, apesar de aparentemente encontrar-se em menor concentração no órgão em questão, localizou-se predominantemente nas tecas foliculares e conjuntivo entre os folículos.

Zhuo et al. (2001) ratificam a importância dos referidos polissacarídeos nos tecidos ovarianos e acrescentam um fator primordial ao ácido hialurônico (AH) como substância fundamental à ovulação. Neste órgão, o AH encontra-se presente ligado covalentemente a cadeia pesada de uma família de proteínas denominadas inibidores inter-alfa-tripsina ou SHAPs (soro derivado de proteínas associadas ao ácido hialurônico) na matriz extracelular que alberga as células do *cumulus oophorus* e, portanto, tal complexo se constitui fundamental para a ovulação e manutenção do oócito. Neste sentido e sabendo-se previamente que o gene bikunin codifica as proteínas que compõem as SHAPs, os autores inativaram, em fêmeas de camundongos, o gene em questão, por deleção, resultante da mutagênese do códon para o resíduo de serina na posição 7, no bikunin. Os resultados demonstraram defeitos na estruturação das células do cúmulos e posterior infertilidade nas fêmeas.

Em relação as tubas uterinas em *G. spixii*, verificou-se perfil de distribuição extremamente variável para os GAGs, cuja maior produção ocorreu no início gestação, no décimo quinto dia, sendo possível inferir - mediante análise da separação eletroforética - que o GAG predominante foi o dermatam sulfato, seguido do heparam e finalmente, pequenas concentrações de condroitim, nos dias 35 e 40 gestacionais. A análise imunohistoquímica demonstrou que o dermatam encontrava-se em quantidade elevada no conjuntivo frouxo da região do istmo; o heparam sulfato, por sua vez, foi verificado em grandes quantidades por toda a extensão do infundíbulo e o condroitim

sulfato em pequenas concentrações na ampola, quando comparados aos outros GAGs, nos respectivos segmentos tubáricos.

A contribuição dos GAGs presentes nos ovidutos conferem grande importância ao processo de fecundação, visto que participam da regulação do transporte espermático e interação deste com o oócito. Por este motivo, estudos bioquímicos destes compostos são necessários para elucidar as funções de cada polissacarídeo, nos diversos segmentos do trato genital feminino (CALOIANU et al., 1997). Estes autores comprovaram em tubas uterinas suínas - oriundas de fêmeas colhidas antes da fase de estro -, mediante auxílio por técnicas citoquímicas e de imunolocalização, que o principal glicosaminoglicano foi o condroitim sulfato, o qual esteve marcado fortemente no istmo e ampola, em especial, no conjuntivo frouxo. O dermatam e ácido hialurônico encontraram-se presentes em menores concentrações, fato este que reflete um perfil diferente ao verificado em fêmeas de preás gestantes.

A capacitação espermática, nos ovidutos, foi inferida a dois tipos de GAGs (ácido hialurônico e heparam sulfato), em análises de tubas uterinas pré e pós ovulatórias em fêmeas de porcas, nas quais foram inseminadas com ácido hialurônico ligado à proteína biotinalada e heparam sulfato constitutivo em proteoglicanos marcados. Os resultados revelaram que o ácido hialurônico esteve marcado em toda a lâmina própria do oviduto, entretanto, no epitélio, principalmente dos ovidutos pré-ovulatórios, o único local de marcação para o referido ácido foi na junção útero-tubárica, adjacente ao istmo, justamente um local em que os gametas masculinos sofrem processo de capacitação. Já as moléculas de heparam sulfato estiveram presentes em todos os epitélios de revestimento do órgão em questão (TIENTHAI et al., 2000).

Os cornos uterinos em *G. spixii* apresentaram os maiores valores médios de GAGs em UAD (Unidades Arbitrárias em Densitometria) quando comparados as demais proções uterinas bem como no tocante aos órgãos reprodutivos femininos e placentários. Ao longo da gestação, os cornos revelaram elevadas concentrações de GAGs demonstrando pequena variação entre si. As marcações imunohistoquímicas específicas para ácido hialurônico, heparam, condroitim e dermatam sulfatos indicaram que estas macromoléculas estiveram presentes no conjuntivo frouxo e na bordadura estriada apical

das células epiteliais que se localizavam na luz do corno. Além disto, pode-se inferir que o GAG de maior expressividade foi o dermatam sulfato.

De acordo com San Martin et al. (2003), GAGs e proteoglicanos encontram-se envolvidos nos processos de implantação embrionária e decidualização. Estudos indicam que em fêmeas de ratos, imediatamente após a cópula, ocorre aumento na produção de versicam – um proteoglicano composto de condroitim e dermatam sulfatos – e ácido hialurônico (AH), no estroma endometrial. Desta forma e por ocasião da implantação no corno uterino, o AH concentra-se na região peridecidual e o versicam, na decídua propriamente dita.

A composição de GAGs e os tipos de macromoléculas envolvidas, ao longo da gestação, são muito importantes nas transformações sofridas pelo útero e desenvolvimento placentário consequente. O crescimento uterino e rigidez da cérvix, verificados na gestação inicial, precisa ser modificado para que se torne uma estrutura uterina flexível, que possibilite a passagem do recém-nascido, fato este necessariamente relacionado com a matriz extracelular do útero, cuja maleabilidade passa pelas ações dos GAGs, em especial, o ácido hialurônico (GOLOCHOWSKI et al., 1980; EL MARADNY et al., 1997; OLIVERIA et al., 2015). Desta forma, pelos motivos elencados, pode-se justificar os maiores valores médios de GAGs totais obtidos no útero de *G. spixii*, os quais constituíram 84,334, 82,588 e 76,598 UAD, respectivamente, para cornos, cérvices e corpos do útero.

Com relação ao corpo do útero verificamos um aumento brusco na produção de GAGs totais, na transição do dia cinco para o décimo gestacional, o que pode estar relacionado com a remodelação da matriz extracelular de uma decídua materna em formação, possivelmente pela hipertrofia e aumento da elasticidade do órgão. Seguindo-se a gestação, observamos valores elevados, dos referidos compostos polissacarídicos até o final da gestação. Nossos resultados demonstraram ainda elevadas produções de heparam e dermatam sulfatos além do ácido hialurônico, os quais distribuíram-se difusamente pelo conjuntivo, gândulas e epitélio de revestimento.

Nesse sentido, já foram reportados grandes aumentos na produção de ácido hialurônico, nos tecidos uterinos de ratas gestantes, os quais estiveram correlacionados a aumentos na transcrição do gene HAS2, que por sua vez, afeta positivamente os efeitos

estrogênicos bem como aqueles associados as modificações da matriz extracelular, principalmente pela redução na atividade da hialuronidase, direcionando, pois, ao aumento do referido ácido e consequente perda da resistência a tração pelo útero, por ocasião do parto (AKGUL et al., 2012).

A cérvix uterina de preás no início da gestação possuiu ácido hialurônico, dermatam e heparan sulfatos e em menor proporção, condroitim sulfato, os quais estiveram distribuídos difusamente no conjuntivo frouxo e epitélio de revestimento. Para o condroitim, verificou-se ainda uma marcação específica nos limites celulares das células epiteliais glandulares. Neste segmento uterino, verificaram-se concentrações altas de GAGs, em especial no início da gestação, seguida por uma pequena redução e estabilização dos valores até o final da gestação. Ademais, em termos de proporcionalidade, verificadas entre as macromoléculas citadas, nossos resultados assemelharam-se aos obtidos por Oliveira (2016) em cutias.

Segundo Souza et al. (2014), o papel do ácido hialurônico é fundamental para que haja aumento na produção de fibras colágenas, vasos sanguíneos dilatados e epitélios constituintes da cérvix uterina. Estes autores, utilizando-se de dois grupos experimentais, infundiram hialuronidase e água destilada nos grupos teste e controle, respectivamente, seguindo-se de imunolocalização e quantificação por ensaio imunoenzimático. No grupo teste, verificaram-se reduções na concentração deste ácido bem como menor marcação na lâmina própria e área que envolvia os vasos sanguíneos, acarretando numa cérvix uterina menos estruturada quando comparada ao grupo controle.

Em experimento conduzido por Shimizu (1980), foram analisadas cérvixes uterinas humanas separadas em dois grupos: o primeiro continha amostras em fase proliferativa e secretória, sendo o segundo, constituído por amostras oriundas do pós-parto, cujo objetivo foi promover uma determinação química do conteúdo de GAGs entre os grupos e compará-los. Os resultados revelaram elevadas concentrações de ácido hialurônico, condroitim e heparan sulfatos além de reduzidas quantificações de dermatam sulfato nas cérvixes analisadas em pós-parto quando comparadas ao outro grupo, o que vem ratificar a importância destas substâncias no desenvolvimento gestacional.

A espécie *G. spixii* apresentou perfil de GAGs, em amostras de vaginas, um predomínio de dermatam sulfato em detrimento das moléculas de heparam e condroitim sulfatos, fato este que vem a corroborar com os achados de Bezerra et al. (2004) quando estes autores compararam os quantitativos de GAGs na vagina e períneo de mulheres na menacme e na pós-menopausa, sendo as maiores concentrações obtidas, significativamente, no estudo promovido ao grupo menacme.

Como descrito no nosso experimento, o dermatam sulfato sobressaiu-se como polissacarídeo sulfatado predominante, em amostras de vaginas ao longo da gestação, bem como na vulva, nos dias 25 e 55 da gestação, fato este que diverge do verificado em vaginas de ratas, proporcionados por Ruano et al. (2011), os quais identificaram diminuições nos GAGs totais, em especial do dermatam sulfato, quando comparados aos tecidos vaginais de fêmeas não gestantes.

O órgão placentário indicou concentração baixa de GAGs se comparada a expressão uterina, por exemplo, apesar desta característica encontrar-se amparada na considerável diferença de tamanho, arranjo morfológico e peso líquido entre ambos. Além disto, mediante transformações diversas sofridas pela placenta corioalantoide, incluindo inversão do saco vitelino, estabelecimento de uma subplacenta e posterior involução, labirinto e região espongiotrofoblástica, torna-se plausível sugerir amplitude variável da matriz extracelular de cada porção supracitada, o que se traduz em mudanças no tocante aos açúcares sulfatados bem como no que se refere a sua detecção ao longo da gestação, o que se traduziu no comportamento irregular de GAGs verificados ao longo da gestação, apesar dos valores estarem mantidos em faixa estreita de concentração.

Conforme descrito, verificamos presença do ácido hialurônico, dermatam e condroitim sulfatos constitutivos do estroma no labirinto placentário, em especial na matriz extracelular e envolvendo vasos fetais e canais de sangue materno. O heparam sulfato distribuiu-se na região espongiotrofoblástica e endoderma parietal que revestia a superfície fetal da placenta, principalmente na membrana de Reichert deste endoderma. Interessantemente, na subplacenta, houve um pico de produção entre os dias 50 e 55 da gestação, provavelmente refletindo a degeneração deste órgão que se processa no final da gestação, sendo verificados condroitim, dermatam e heparam sulfatos, distribuídos difusamente no mesênquima subplacentário.

Segundo Bezerra (2014), aos 45 dias de gestação em preás, a subplacenta começa a apresentar sinais de degeneração como se verifica pela intensa vacuolização e picnose nuclear nas células sinciotrofoblásticas bem como diminuição das lamelas trofoblásticas que são características do órgão subplacentário. Vale ressaltar ainda que entre os dias 53 e 55 da gestação verificou-se redução do volume ocupado pela subplacenta dentro do órgão corioalantoide e elevado grau de desorganização, o qual foi indicativo de destruição do parênquima subplacentário e aumento considerável do conjuntivo que permeia a subplacenta, demonstrado pela microscopia de luz e coloração tricrômica de Gomori. Desta forma, relacionando-se tal aumento com a riqueza de GAGs na matriz extracelular, justificamos, portanto, o aumento na produção de polissacarídeos entre os dias 50 e 55 de gestação obtidos no nosso experimento.

Wasserman et al. (1980) indicaram que o condroitim sulfato e ácido hialurônico são, provavelmente, os principais GAGs constituintes do estroma placentário de mulheres, ao passo que heparam e dermatam sulfatos situam-se preferencialmente nos vasos fetais e superfície sincicial de placentas maduras.

Nesse sentido, pode-se citar um trabalho que verificou, por meio da localização histoquímica, a presença de GAGs em dois grupos de placentas de mulheres, sendo o primeiro, representado por cinco placentas obtidas por aborto terapêutico e as outras cinco, obtidas a termo. Os materiais foram corados em alcian blue e hematoxilina de Mayer, seguidos do tratamento enzimático com hialuronidase e condroitinase. Os resultados revelaram que as placentas oriundas do primeiro trimestre possuíam colorações mais intensas quando comparadas ao grupo em final da gestação, fato este indicativo que a maior produção de GAGs dar-se-ia no início da gestação até mesmo porque, em placentas a termo, o revestimento sincicial e a sua espessura reduziam-se consideravelmente. O tratamento com hialuronidase e condroitinase, nos dois grupos, promoveu diminuição da afinidade pelo alcian blue, principalmente no estroma viloso e vasos sanguíneos, corroborando, indiretamente, que o ácido hialurônico e condroitim sulfato representaram os açúcares mais proeminentes nas respectivas regiões dos órgãos placentários investigados (WASSERMAN et al., 1983).

Greiss e Wagner (1983) verificaram que o condroitim e ácido hialurônico constituíram os principais GAGs em placentomas ovinos, já o condroitim e dermatam

sulfatos se sobressaíram e aumentaram suas expressões, ao longo da gestação, em placentas de ratas, demonstradas por reações imunohistoquímicas (BATBAYAL et al., 2006).

Assim, uma vez considerado a localização dos GAGs placentários e correlacionando com suas funções, moléculas de condroitim e ácido hialurônico estariam desempenhando aumento e manutenção da integridade estrutural da placenta, sendo o dermatam e heparam, envolvidos na homeostase sanguínea da região labiríntica bem como contribuindo para a formação da interface materno-fetal (CALATRONI; DI FERRANTE, 1969; WASSERMAN et al., 1983; SAID, 2011).

O ciclo estral estrogênico de *G. spixii* revelou quantidades elevadas de GAGs nos órgãos do aparelho reprodutor feminino, com destaque para a vagina, cuja concentração em UAD foi 98,285 e ainda no útero, com valores relativamente próximos de polissacarídeos, o que contrastou bastante com o período de diestro, o qual indicou quantidades de GAGs muito baixas. Assim, nossos resultados encontram-se em consonância com as afirmações de Lee e Ax (1984) que indicam, de maneira geral, que o estrógeno estimula a produção de GAGs enquanto que a progesterona exerce efeito inibitório.

Similarmente, Cubas et al. (2010) ao caracterizarem o perfil de GAGs sulfatados, no útero de camundongas, durante as fases do ciclo estral, por meio da microscopia de luz e análises bioquímicas, descreveram que moléculas de dermatam (DS), condroitim (CS) e heparam sulfatos (HS) estiveram presentes em todas as fases do ciclo. Além disto, apesar de não haver separação nítida entre o DS e CS, estes foram considerados em conjunto e considerados em concentrações elevadas na fase estrogênica, ao passo que o HS foi o GAG predominante, porém em concentração reduzida na fase de diestro, quando comparada as outras fases, o que corrobora com as características macroscópicas observadas no útero estrogênico, pois tais moléculas além das inúmeras funções, participam da hidratação tecidual, aumentando o volume bruto do órgão.

7 CONCLUSÕES

Os principais resultados obtidos no presente trabalho forneceram os elementos necessários à conclusão, descritos a seguir:

- 1- O sistema reprodutor feminino de preás apresentou-se composto por um par de ovários, tubas uterinas; dois cornos uterinos, um corpo do útero septado, cérvix, vagina e vulva.
- 2- Não houve diferença aparente, na estrutura dos ovários gestantes quando comparados aos não gestantes. Ambos contiveram túnica albugínea, epitélio germinativo, corpo lúteo proeminente e folículos em diferentes estágios maturativos, sendo, nos maduros, verificados a presença de oócito e corpúsculos polares.
- 3- As tubas uterinas gestantes são caracterizadas como pequenos ductos convolutos - divididos nos segmentos: istmo, ampola e infundíbulo que promoviam a conexão entre os ovários e cornos uterinos. Histologicamente, o istmo apresentou poucas projeções mucosas, epitélio cilíndrico simples repousando sobre lâmina de tecido conjuntivo frouxo e camada muscular lisa. A ampola revelou disposição similar, porém com espessa camada muscular. Já o infundíbulo demonstrou numerosas dobras longitudinais de mucosa seguidos de estruturas semelhantes aos outros segmentos.
- 4- Os cornos uterinos são estruturas retilíneas que convergem para uma câmara única, porém septada, a qual divide os segmentos cornuais em direito e esquerdo. Esta disposição retratou dois óstios, oriundo dos cornos que se comunicavam com uma cérvix única. Histologicamente, os cornos gestantes são revestidos, possivelmente, por epitélio cilíndrico pseudoestratificado apoiado em tecido conjuntivo frouxo. A cérvix apresentou intenso número de glândulas mucosas, o qual revelou tendência de aumento com o transcorrer gestacional.

- 5- A vagina apresentou uma região vestibular extensa e muito pregueada, a qual foi revestida por epitélio cúbico simples e apresentou numerosas glândulas, seguidas de conjuntivo frouxo e camada muscular esquelética circular. No caso da vulva, pôde-se demonstrar a abertura vaginal que estava circunscrita pelos lábios vulvares com revestimento epitelial pavimentoso estratificado. Na região do clitóris, detectaram-se agrupamentos de condrócitos, os quais estiveram delimitados por melanócitos.
- 6- O período gestacional de preás dura em média $59 \pm 2,7487$ dias, cujo número de parições situou-se de um (20%) a dois filhotes (80%).
- 7- *G. spixii* apresentou ciclo sexual poliétrico contínuo com médias de duração de $14,8 \pm 0,73$ dias (12-16) (n=5) para as fêmeas mantidas em contato com o macho e $14,6 \pm 0,75$ dias (13-17) (n=5) para o grupo isento de efeito macho, não sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) entre os grupos.
- 8- A presença do macho influenciou significativamente ($P < 0,05$) a fase de diestro, tornando-a mais longa ($4,0 \pm 0,63$ dias).
- 9- O padrão de caracterização do ciclo no preá apresentou-se semelhante ao descrito em outros cavídeos, sendo observado no proestro um predomínio de células parabasais e intermediárias, com presença de bactérias e leucócitos; no estro, numerosas células superficiais, com predomínio das escamas anucleadas e pequena quantidade ou ausência de bactérias; no metaestro, grande quantidade de células intermediárias, neutrófilos e bactérias e uma quantidade regular de células parabasais; e no diestro, tinha-se o predomínio de células basais, parabasais e intermediárias e grande quantidade de muco vaginal, neutrófilos e bactérias.

- 10- Em gestação a termo, o saco vitelino apresentou-se como uma membrana ricamente vascularizada e de aspecto viloso que envolvia o feto em toda sua extensão.
- 11- Aos 13 dias de gestação, observou-se o estabelecimento dos endodermas parietal e visceral, delimitando a cavidade do saco vitelino e constituindo uma placenta vitelina. O epitélio parietal apresentou-se revestindo tanto a superfície externa da placenta principal como o trofoblasto mural da decídua capsular. Já o endoderma visceral demonstrou poucas vilosidades.
- 12- A inversão do saco vitelino em preás ocorreu no décimo quarto dia de gestação, ratificado pela análise de dois sacos gestacionais diferentes, sendo esta condição favorável ao aumento do aparato absorptivo e consequentemente ao desenvolvimento embrionário.
- 13- As relações de aposição entre os endodermas localizados próximos à placenta corioalantoide, resultou em importante área de troca entre placenta principal, endodermas e embrião.
- 14- As reações imunohistoquímicas para vimentina demonstraram o contínuo desenvolvimento da vascularização endodérmica visceral e no labirinto placentário, ao longo da gestação.
- 15- O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi detectado em quantidades expressivas no endoderma parietal, espongio e sinciciotrofoblasto bem como no embrião, indicando-se tratar de organismo e compartimentos constituídos por células em intensa atividade mitótica.
- 16- Aos 10 dias de gestação, a placenta constituiu um órgão desorganizado estruturalmente, porém modificando a forma que passou de elíptica a ovalada,

contrastando com o décimo quarto dia, onde o formato discoidal e o início da formação do labirinto foram evidentes. Subsequentemente, aos 30 dias, o labirinto passou a ocupar grande parte do volume placentário, ao passo que o espongio limitou-se a preencher um pequeno espaço na região fetal da placenta principal. No trigésimo quinto dia, verificou-se uma subplacenta lobular, situada na base da placenta corioalantoide, coincidindo com a escavação central.

- 17- O processo de implantação blastocístico foi caracterizado como intersticial, situando-se na região mesometrial do útero, fato este que configurou uma placentação no lado anti-mesometrial. No décimo quarto dia gestacional, o embrião passou a diferenciar suas três camadas germinativas. Aos 19 dias, o embrião encontrou-se extremamente curvado e continha as três vesículas encefálicas. A fase fetal iniciou-se aos 40 dias, cuja demonstração das características próprias da espécie foi evidente.
- 18- A morfogênese do conceito em *G. spixii* permitiu estabelecer o desenvolvimento embrionário e fetal que, por sua vez, assemelha-se as espécies mamíferas na fase embrionária e se particulariza na fase fetal. As curvas de crescimento intra-uterina foram bem caracterizadas pela biometria, o que possibilitou que se possa estimar a idade gestacional.
- 19- O perfil de glicosaminoglicanos nos órgãos do aparelho reprodutor feminino gestante e placentário bem como no sistema reprodutivo não gestante em duas fases do ciclo estral revelaram diferenças quanto à composição e concentração, fato este que pode estar relacionado com a função de cada GAG. Desta forma, o dermatam sulfato predominou em amostras de tubas uterinas, vaginas e placentas, ao passo que o heparam expressou-se mais no corpo do útero, no início da gestação. Houve ainda elevadas concentrações de GAGs no útero gestante bem como no aparelho reprodutor feminino na fase estrogênica quando comparada ao diestro.

20- A distribuição do ácido hialurônico, heparam, condroitim e dermatam sulfatos apresentou-se difusa por toda a estrutura do corno uterino e cérvix. Ovidutos, vaginas e subplacenta possuíram imunolocalizações para o heparam, dermatam e condroitim sulfatos no conjuntivo destes órgãos. Nos ovários, verificaram-se distribuições para o heparam sulfato no corpo lúteo, região das tecas foliculares e medula; o dermatam, por sua vez, localizou-se de forma difusa, ao passo que o condroitim situou-se nas tecas foliculares e conjuntivo entre os folículos ovarianos. Finalmente, o labirinto placentário apresentou dermatam, condroitim e ácido hialurônico distribuídos de forma difusa, ao passo que o heparam sulfato foi encontrado principalmente no endoderma parietal e espongiotrofoblasto.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSOHN, P. A. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. **Anatomy and Embriology**. v. 166, p. 263-274, 1983.
- ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. Implantation and decidualization in rodents. **The Journal of Experimental Zoology**. v. 266, p. 603-628, 1993.
- AGRE, P.; BONHIVERS, M.; BORNIA, M. J. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 659-662, 1998.
- AKGUL, Y.; HOLT, R.; MUMMERT, M.; WORD, A.; MAHENDROO, M. Dynamic changes in cervical glycosaminoglycan composition during normal pregnancy and preterm birth. **Endocrinology**. v. 153, p. 3493-3503, 2012.
- AKINLOYE, A. K.; OKE, B. O. Characterization of the uterus and mammary glands of the female African giant rats (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse) in Nigeria. **International Journal of Morphology**. v. 28, n. 1, p. 93-96, 2010.
- AKINS, M. L.; LUBY-PHELPS, K.; BANK, R. A.; MAHENDROO. Cervical softening during pregnancy: regulated changes in collagen cross-linking and composition of extracellular proteins in the mouse. **Biology of reproduction**. v. 84, p. 1053-1062, 2011.
- ALBELDA, S. M.; BUCK, C. A. Integrins and other cell adhesion molecules. **The FASEB Journal**. v. 4, n. 11, p. 2868-2880, 1991.
- ALBERTO-RINCON, M. C.; ZORN, T. M. T.; ABRAHAMSOHN, P. A. Diameter increase of collagen fibrils of the mouse endometrium during decidualization. **American Journal of Anatomy**. v. 186, p. 417-429, 1989.
- ALLEGRETA, M.; FILMUS, J. Therapeutic potential of targeting gliptin-3 in hepatocellular carcinoma. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 11, p. 543-548, 2011.
- ALMEIDA, C. C. D.; PINHEIRO, P. F. F.; SEGATELLI, T. M.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C. R.; MARTINEZ, F. E. Estrous cycle, anatomy and histology of the uterine tube of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Revista Chilena de Anatomia**. v. 19, n. 2, p. 31-38, 2001.
- ALMEIDA, M. M.; CARVALHO, M. A. M.; CAVALCANTE FILHO, M.M; MIGLINO, M. A.; MENEZES, D. J. A. Morphological and morphometric study of the ovary in agoutis (*Dasyprocta aguti*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 40, p. 55-62, 2003.

AMOROSO, E. C.; PERRY, J. S. The foetal membranes and placenta of the African elephant (*Loxodonta africana*). **Biological Sciences**. v. 248, p. 1-62, 1963.

ANDERSON, J. W. The Placental Barrier to Gamma-globulins in the Rat. **The American Journal of Anatomy**. v. 104, p. 403-429, 1959.

ANDERSON, J. W.; WINSATT, W. A. Placentation and Fetal Membranes of the Central American Noctilionid Bat, *Noctilio labialis minor*. **The American Journal of Anatomy**. v. 112, n. 2, p.181-201, 1963.

ANGULO, M. T. S.; LOPEZ, M. S.; CASTRO, E. D.; VILLAVICENCIO, L. L. F.; EMILIANO, J. R.; ORTIZ, M.S. S. Ciclo estral del ratón hembra intacto y ovariectomizado. **Acta Universitaria**. v. 22, n. 2, p. 5-8, 2012.

ASPERBERG, A. The different roles of aggrecan interaction domains. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 60, p.987-996, 2012.

BAKER, D. E. J.; LINDSEY, J. R.; WEISBROTH, S. H. Reproduction and breeding. **The Laboratory Rat**. v. 1, p. 153-168, 1979.

BANAS, R. A.; TRUMPOWER, C.; BENTLEJEWSKI, C.; MARSHALL, V.; SING, G.; ZEEVI, A. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. **Human Immunology**. v. 69, p. 321-328, 2008.

BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2 ed. Ed: Manole, São Paulo, Brazil, 1991. p. 629.

BARAK, Y.; SADOVSKY, Y.; SHALOM-BARAK. PPAR signaling in placental development and function. **PPAR Research**. v. 2008, p. 1-11, 2007.

BARBOSA, L. P.; RODRIGUES, M. V.; NEVES, M. M.; MORAIS, D. B.; MELO, B. E. D.; BALARINI, M. K.; COELHO, C. D. P.; CÍNTIA, M. Caracterização da colpocitologia em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 8, n. 4, p. 258-266, 2007.

BASTOS, L. V.; GUIMARÃES, D. A.; LUZ-RAMOS, R. S.; FERREIRA, A. C. S.; OHASHI, O. M. Aspectos da citologia vaginal durante o ciclo estral de *Agouti paca* criada em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 27, n. 2, p. 294-295, 2003.

BATBAYAL, B.; ISHII, Y.; NOMURA, Y.; WATANABE, M.; YASUKO, T.; NAKAMURA, S. Change in decorin during aging of rat placenta. **Connective Tissue Research**. v. 47, n. 4, p. 235-241, 2006.

BECK, F.; LLOYD, J. B.; GRIFFITHS, A. Lysosomal enzyme inhibition by trypan blue: a theory of teratogenesis. **Science**. v. 157, p. 1180-1182, 1967.

BECK, L. R.; BOOTS, L. R. The comparative anatomy, histology, and morphology of the mammalian oviduct. In: JONH, A. D.; FOLEY, C. W.; A. N. Y. Ed. **The oviduct and its function**. 1974.

BECKMAN, D. A.; KOSZALKA, T. R.; JENSEN, M.; BRENT, R. L. Experimental Manipulation of the Rodent Visceral Yolk Sac. **Teratology**. v. 41, p. 395-404, 1990.

BECKMAN, D. A.; BRENT, R. L.; LLOYD, J. B. Sources of amino acids for protein synthesis during early organogenesis in the rat. 4. Mechanisms before envelopment of the embryo by the yolk sac. **Placenta**. v. 17, p. 635-641, 1996.

BEDDINGTON, R. S.; ROBERTSON, E. J. Anterior patterning in mouse. **Trends Genetics**. v. 14, p. 277-284, 1998.

BEDDINGTON, R. S.; ROBERTSON, E. J. Axis development and early asymmetry in mammals. **Cell**. v. 96, p. 195-209, 1999.

BERARDO, P. T.; ABRAO, M. S.; SOUZA, M. L. S.; MACHADO, D. E.; SILVA, L. C. F.; NASCIUTTI, L. E. Composition of sulfated glycosaminoglycans and immunodistribution of chondroitin sulfate in deeply infiltrating endometriosis affecting the rectosigmoid. **Micron**. v. 40, p. 639-645, 2009.

BERNFELD, M.; BANERJEE, S. D.; KODA, J. E.; RAPRAEGER, A. C. Remodeling of the basement membrane as a mechanism of morphogenetic tissue interaction. In the role of extracellular matrix in development. **Cell**. v. 108, p. 1-5, 1984.

BERNFELD, M.; GOTTE, M.; PARK, P. W.; REIZES, O.; FITZGERALD, M. L.; LINCECUM, J.; ZAKO, M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. **Annual Review of Biochemistry**. v. 68, p. 729-777, 1999.

BERNFELD, M.; KOKENYESI, R.; KATO, M.; HINKES, M. T.; SPRING, J.; GALLO, R. L.; LOSE, E. J. Biology of the syndecans: a Family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. **Annual Review of Cell and Biology**. v. 8, p. 365-393, 1992.

BETANCOURT-ALONSO, M. Á.; FLORES-PÉREZ, F. I.; ROSAS-VELASCO, C.; PÉREZ-MARTÍNEZ. Papel de las citocinas em la implantación embrionária em mamíferos domésticos. **Veterinaria México**. v. 37, n. 3, p. 335-350, 2006.

BEZERRA, L. R.; FELDNER, P. C.; KATI, L. M.; GIRÃO, M. J.; SARTORI, M. G.; BARACAT, E. C.; DE LIMA, G. R.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Sulfated glycosaminoglycans of the vagina and perineal skin in pre- and postmenopausal women,

according to genital prolapse stage. **International Urogynecology Journal**. v. 15, n. 4, p. 266-271, 2004.

BEZERRA, L. R.; FELDNER, P. C. J.; KATI, L. M.; GIRÃO, M. J.; SARTORI, M. G.; BARACAT, E. C.; DE LIMA, G. R.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Sulfated glycosaminoglycans of the vagina and perineal skin in pre- and postmenopausal women, according to genital prolapse stage. **International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction**. v. 15, n. 4, p. 266-271, 2004.

BEZERRA, F. V. F. **A subplacenta do preá (*Galea spixii* Wagler, 1831)**. 2014. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2014.

BIANCHI, D. W.; WILKINS-HAUG, L. E.; ENDERS, A. C.; HAY, E. D. Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans. **American Journal of Medical Genetics**. v. 46, p. 542-550, 1993.

BONATELLI, M.; CARTER, A. M.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, M. F.; LIMA, M. C.; MIGLINO, M. A. Placentation in the paca (*Agouti paca* L). **Reproduction Biology and Endocrinology**. v. 9, n. 3, p. 133-137, 2005.

BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; D'ANDREA, P. S. **Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008. 120p.

BOURDON, M. A.; OLDBERG, A.; PIERSCHBACHER, M.; RUOSLAHTI, E. Molecular cloning and sequence analysis of a chondroitin sulfate proteoglycan cDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 82, p. 1321-1325, 1985.

BOURIN, M-C., AKERLUND, E. L.; LINDAHL, U. Isolation and characterization of the glycosaminoglycan component of rabbit thrombomodulin proteoglycan. **The Journal of Biology and Chemistry**. v. 265, p. 15424-15431, 1990.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle de roedores**. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2002. 132p.

BROSENS, I.; ROBERTSON, W. B.; DIXON, H. G. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. **Journal Pathology and Bacteriology**. v. 93, n. 2, p. 569-579, 1967.

BULLOCK, S. L.; FLETCHER, J. M.; BEDDINGTON, R. S.; WILSON, V. A. Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparin sulfate 2-sulfotransferase. **Genes Development**. v. 12, p. 1894-1906.

BULMER, J. N.; SMITH, J.; MORRISON, L.; WELLS, M. Maternal and fetal cellular relationships in the human placental basal plate. **Placenta**. v. 9, p. 237-246, 1988.

BURDA, H. R. L.; HONEYCUTT, S.; BEGALL, O.; LOCKER-GRUTJEN, O.; SCHARFF. Are naked and common mole-rats eusocial and if so, why? **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v. 47, p. 293-303, 2000.

BURDSAL, C. A.; DAMSKY, C. H.; PEDERSEN, R. A. The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. **Development**. v. 118, p. 829-844, 1993.

BURT, D.; JOHNSTON, T.; WIT, T. R.; ELSEEN, P. VAN DEN.; STERN, P. L. Cellular and Molecular Biology of the Maternofetal Relationship. **International Journal of Gynecological Cancer**. v. 117, n. 6, p. 21-29, 1991.

BURTON, G. J.; HEMPSTOCK, J.; JAUNIAUX, E. Nutrition of the human fetus during the first trimester – a review. **Placenta**. v. 22, p. 70-76, 2001.

BUZZIO, O. L.; KONINCKX, A.; CARRENO, N. B.; CASTRO-VAZQUEZ, A. Embryo implantation during the short luteal phase of the corn mouse, *Calomys musculinus*, and the apparent lack of a lational diapause in South American murid rodents. **Reproduction**. v. 121, p. 815-823, 2001.

CADEMARTORI, C. V.; FABIÁN, M. E.; MENEGUETI, J. O. Variações na abundância de roedores (Rodentia, Sigmodoninae) em duas áreas de floresta ombrófila mista, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**. v. 6, n. 2, p. 147-167, 2005.

CADEMARTORI, C. V.; MARQUES, R. V.; PACHECO, S. M. Estratificação vertical no uso do espaço por pequenos mamíferos (Rodentia, Sigmodontinae) em área ombrófila mista, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**. v. 10, n. 3, p. 187-194, 2008.

CALARCO, P. G.; MOYER, F. H. Structural changes in the murine yolk sac during gestation: Cytochemical and electron microscope observations. **Journal of Morphology**. v. 119, p. 341-357, 1966.

CALATRONI A.; DI FERRANTE, N. The Glycosaminoglycans of human term placenta. **Carbohydrate Research**. v. 10, n. 4, p. 535-548, 1969.

CALOIANU, M.; OANCEA, A.; ZARNESCU, O. Histochemistry and immunocytochemistry of glycosaminoglycans in sow oviduct. **Review Roumain de Biologie Animals**. v. 42, n.1, p. 63-71, 1997.

CALVIN, S. E.; OYEN, M. L. Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with an emphasis on fracture properties. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1101, p. 166-185, 2007.

CAMEJO, G.; HURT-CAMEJO, E.; WIKLUND, O.; BONDJERS, G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. **Atherosclerosis**. v. 139, p. 205-222, 1998.

CAMPOS, L. B. C.; PEIXOTO, G. C. X.; LIMA, G. L.; CASTELO, A. L. P.; SOUZA, A. L. P. S.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Monitoramento do ciclo estral de cutias (*Dasypus leporine* Lichtenstein, 1823) através de citologia esfoliativa vaginal e ultrassonografia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35, n. 2, p. 188-192, 2015.

CAMPOS-XAVIER, A. B.; MARTINET, D.; BATEMAN, J.; BELLUOCIO, D.; ROWLEY, L.; TAN, T. Y.; BAXOVÁ, A.; GUSTAVSON, K. H.; BOROCHOWITZ, Z. U.; INNES, A. M. Mutations in the heparin-sulfate proteoglycan glypican-6 (GPC6) impair endochondral ossification and cause recessive omodysplasia. **The American Journal of Human Genetics**. v. 84, p. 760-770, 2009.

CARBREY, J. M.; AGRE, P. Discovery of the aquaporins and development of the field. **Handbook of Experimental Pharmacology**. v. 190, p. 3-28, 2009.

CARPENTER, C. C.; FERM, V. M. Uptake and storage of trophoblast by the rodent yolk-sac placenta: An electron microscopic study. **The American Journal of Anatomy**. v. 125, p. 429-256, 1969.

CARSON, D. C.; DUTT, A.; TANG, J. P. Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. **Developmental Biology**. v. 120, p. 228-235, 1987.

CARSON, D. D.; BAGCHI, I.; DEY, S. K.; ENDERS, A. C.; FAZLEABAS, A. T.; LESSEY, B. A.; YOSHINAGA, K. Embryo Implantation. **Developmental Biology**. v. 223, p. 217-237, 2000.

CARTER, A. M. Evolution of the Placenta and Fetal Membranes Seen in the Light of Molecular Phylogenetics. **Placenta**. v. 22, p. 800-807, 2001.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C.; KÜNZLE, H.; OKELLO-ODUOR, D.; VOGEL, P. Placentation in species of phylogenetic importance: The Afrotheria. **Animal Reproduction Science**. v. 82, p. 35-48, 2004.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C.; JONES, C. J. P.; MESS, A.; PFARRER, C.; PIJNENBORG, R.; SOMA, H. Comparative Placentation and Animal Models: Patterns of Trophoblast Invasion – A Workshop Report. **Placenta**. v. 27, p. s31-s33, 2006.

CARTER, A. M. Animal models of human placentation – A review. **Placenta**. v. 21, p. 41-47, 2007.

CARVALHO, R. G. **Morfologia e biometria do aparelho reprodutor feminino da capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**. 2011. 85f. Tese (Doutorado em Ciência

Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2011.

CASTRO, T. F.; DUMMER, R. J.; RICKES, E. M.; PEREIRA, M. A. M. Aspectos morfológicos, morfométricos e topográficos do aparelho digestório de Chinchila lanigera. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 47, n. 1, p. 86-94, 2010.

CHANG, S. T; WONG, P. Y. **The Journal of Physiology**. v. 279, p. 385-394, 1978.

CHEN, C. -P.; CHANG, S. -C.; YANG, V. High glucose alters proteoglycan expression and the glycosaminoglycan composition in placentas of women with gestacional diabetes mellitus and in cultured trophoblasts. **Placenta**. v. 28, p. 97-106, 2007.

CHIAPPETTA, C.; KIRKLAND, J. L.; LOOSE-MITCHELL, D. S.; MURTHY, L.; STANCEL, G. M. Estrogen regulates expression of the jun famile of protooncogene in the uterus. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 41, p. 113-123, 1992.

CLARKE, J. R.; HELLWING, S. Fertility of the post-partum bank vole (*Clethrionomys glareolus*). **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 68, p. 241-246, 1983.

CLARK, C. C.; TOMICHEK, E. A.; KOSZALKA, T. R.; MINOR, R. R.; KEFALIDES, N. A. The role of the parietal endoderm in the biosynthesis of basement membrane collagen and glycoprotein *in vitro*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 250, n. 13, p. 5259-5267, 1975.

COCKROFT, D. L. Regional and temporal differences in the parietal endoderm of the midgestation mouse embryo. **Journal of Anatomy**. v. 145, p. 35-47, 1986.

CONCEIÇÃO, R. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; CARVALHO, A. F.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Aspectos morfológicos do saco vitelino em roedores da subordem Hystricomorpha: paca (*Agouti paca*) e cutia (*Dasyprocta aguti*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 5, n. 28, p. 253-259, 2008.

CONNEELY, O. M.; MULAC-JERICEVIC, B.; LYDON, J. P. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. **Steroids**. v. 68, p. 771-778, 2003.

COOKE, J. The early embryo and the formation of body pattern. **American Scientist**. v. 76, p. 35-41, 1988.

COOK, J. Vertebrate left and right: finally, a cascade, but first a flow? **Bioessays**. v. 21, p. 537-542, 1999.

COPP, A. J. Death before birth: clues from genes knockouts and mutations. **Trends Genetics**. v. 11, p. 87-93, 1995.

COPP, A. J. Interaction between inner mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. II. The fate of the polar trophectoderm. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**. v. 51, p. 109-120, 1979.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D. Reprodução de capivaras. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**. v. 5, n. 1, p. 111-118, 2002.

COSTA, R. H. Hepatocyte nuclear factor 3/forkhead protein family: mammalian transcription factors that possess divergent cellular expression patterns and binding specificities. **Gene Expression**. v. 19, p. 183-205, 1994.

COSTA, E. C. F.; ELZYLENE, L.; LETÍCIA, N. Estimativa da fase do ciclo estral por citologia vaginal em cadelas (canis familiares, LINNAEUS, 1758) da região de Ituverava-SP. **Nucleus Animalium**. v. 1, n. 2, p. 75-85, 2009.

COUCOUVANIS, E. C.; MARTIN, G. R. Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. **Cell**. v. 83, p. 279-287, 1995.

COUCOUVANIS, E. C.; MARTIN, G. R.; NADEAU, J. H. Genetic approaches for studying programmed cell death during development of the laboratory mouse. **Methods in Cell Biology**. v. 46, p. 387-440, 1995.

COUCHMAN, J. R.; CHEN, L.; WOODS, A. Syndecans and cell adhesion. **International Review of Cytology**. v. 207, p. 113-150, 2001.

COUCHMAN, J. R.; PATAKI, C. A. An introduction to proteoglycans and their localization. **Journal of Histochemical and Cytochemical**. v. 60, n. 12, p. 885- 897, 2012.

CRESPI; SEMENIUK, C. Parent-offspring conflict in the evolution of vertebrate reproductive mode. **The American Naturalist**. v. 163, n. 5, 2004.

CROSS, J. C.; WERB, Z.; FISHER, S. J. Implantation and Placenta: Key Pieces of the Development Puzzle. **Science**. v. 266, p. 1508-1518, 1994.

CROSS, J. C. Formation of the Placenta and Extraembryonic Membranes. **Annals New York Academy of Sciences**. v. 857, p. 23-32, 1998.

CROSS, J. C. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. v. 11, p. 105-113, 2000.

CROSS, J. C.; BACZYK, D.; DOBRIC, N.; HEMBERGER, M.; HUGHES, M.; SIMMONS, D. G.; YAMAMOTO, H.; KINGDOM, J. C. P. Genes, Development and Evolution of the Placenta. **Placenta**. v. 24, p. 123-130, 2003.

CUBAS, J. J. M.; SIMÕES, R. S.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; SIMÕES, M. J.; BARACAT, E. C.; SOARES-JR, J. M. Glycosaminoglycan distribution in the rat uterine cervix during the estrous cycle. **Clinics (São Paulo)**. v. 65, n. 7, p. 703-708, 2010.

DA SILVA, R. Gomes. **Manual de procedimentos em análise por quadrados mínimos**. Funep, Jaboticabal. 169p, 1993.

DALE, J. K.; MAROTO, M.; DEQUEANT, M. L.; MALAPERT, P.; MCGREW, M.; POURQUIE, O. Periodic notch inhibition by lunatic fringe underlies the chick segmentation clock. **Nature**. v. 421, p. 275-278, 2003.

DALMACRO, A. D.; VIEIRA, E. M. Patterns of habitat utilization of small rodents in an area of Araucaria forest in Southern Brasil. **Austral Ecology**. v. 30, p. 353-362, 2005.

DAVIES, J.; DEMPSEY, E. W.; AMOROSO, E. C. The subplacenta of The Guinea Pig: An Electron Microscopic Study. **The American Journal of Anatomy**. v. 95, p. 311-324, 1961.

DECHERING, K.; BOERSMA, C.; MOSSELMAN, S. Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? **Current Medicinal Chemistry**. v. 7, n. 5, p. 561-576, 2000.

DEMPSEY, E. W. Electron Microscopy of the Visceral Yolk-Sac Epithelium of the Guinea Pig. **American Journal of Anatomy**. v. 93, n. 3, p. 331-363, 1953.

DENKER, H. W. Implantation: A Cell Biological Paradox. **The Journal of Experimental Zoology**. v. 266, p. 541-588, 1993.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. Eletrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**. v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DIETRICH, C. P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 17, n. 1, p. 5-15, 1984.

DOEGE, K.; SASAKI, M.; HORIGAN, E.; HASSEL, J. R.; YAMADA, Y. Complete primary structure of the rat cartilage proteoglycan core protein deduced from cDNA clones. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 262, p. 17757-17767, 1987.

DOBREVA, M. P.; PEREIRA, P. N. G.; DEPREST, J.; ZWIJSEN. On the prigin of amniotic stem cells: of mice and men. **The International of Developmental Biology**. V. 54, p. 761-777, 2010.

DUBRULLE, J.; MCGREW, M. J.; POURQUIE, O. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. **Cell**. v. 106, p. 219-232, 2001.

DUTT, S.; MATASCI, M.; SOMMER, L.; ZIMMERMANN, D. R. Guidance of neural crest cell migration: the inhibitory function of the chondroitin sulfate proteoglycan, versican. **Scientific World Journal**. v. 6, p. 1114-1117, 2006.

EAKIN, G. S.; BEHRINGER, R. R. Diversity of germ layer and axis formation among mammals. **Seminars in Cell & Developmantal Biology**. v. 15, p. 619-629, 2004.

ECHELARD, Y.; EPSTEIN, D. J.; ST-JACQUES, B.; SHEN, L.; MOHLER, J.; MCMAHON, J. A.; MACMAHON, A. P. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. **Cell**. v. 75, p. 1417-1430, 1993.

ECHTERMEYER, F.; STREIT, M.; WILCOX-ADELMAN, S.; SAONCELLA, S.; DENHEZ, F.; DETMAR, M.; GOETINCK, P. Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 107, p. R9-R14, 2001.

EDWARDS, D.; JONES, C. J.; SIBLEY, C. P.; NELSON, D. M. Paracellular permeability pathways in the human placenta: a quantitative and morphological study of maternal fetal transfer of horseradish peroxidase. **Placenta**. v. 14, p. 63-73, 1993.

EGUND, N.; CARTER, A. M. Uterine and Placental Circulation in the Guinea-pig: an Angiographic Study. **Fecundation Reproduction Fertility**. v. 40, n. 2, p. 401-410, 1974.
ENDERS, A. C. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. **American Journal of Anatomy**. v. 116, p. 29-68, 1965.

EL MARADNY, E.; KANAYAMA, N.; KOBAYASHI, H.; HOSSAIN, B.; KHATUN, S.; LIPING, S. The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. **Human Reproduction**. v. 12, n. 5, p. 1080-1088, 1997.

ENDERS, A. C.; SCHLAFKE, S. A Morphological Analysis of the Early Implantation Stages in the Rat. **American Journal of Anatomy**. v. 120, n. 2, p. 185-225, 1967.

ENDERS, A. C. Current Topic: Structural Responses of the Primate Endometrium to Implantation. **Placenta**. v. 12, p. 309-325, 1991.

ENDERS, A. C.; BLANKENSHIP, T. N.; LANTZ, K. C.; ENDERS, S. S. Morphological Variation in the Interhemal Areas of Chorioallantoic Placentae. **Trophoblast Research**. v. 12, p.1-19, 1998.

ENDERS, A. C.; BLANKENSHIP, T. N. Comparative placental structure. **Advanced drug delivery reviews**. v. 38, p. 3-15, 1999.

ENDERS, A. C. Trophoblast-uterine interactions in the first days of implantation: models for the study of implantation events in the human. **Seninars in Reproductive Medicine**. v. 18, p. 225-263, 2000.

ENDERS, A. C.; CARTER, A. M. Comparative Placentation: Some interesting Modifications for Histotrophic Nutrition – A Review. **Placenta**. v. 27, p. 11-16, 2006.

ENDERS, A. C. Reasons for Diversity of Placental Structure. **Placenta**. v. 23, p. s15-s18, 2009.

ENDERS, A. C.; KING, B. F. Formation and differentiation of extraembryonic mesoderm in the rhesus monkey. **American Journal of Anatomy**. v. 181, p. 327-340, 1988.

ESMON, C. T. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. **The Journal of Biology and Chemistry**. v. 264, p. 4743-4746, 1989.

EVANGELISTA, M.; SONCINI, M.; PAROLINI, O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? **Cytotechnology**. v. 58, p. 33-42, 2008.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Curves, External Features and Selected References. **Anatomia, Histologia, Embryologia**. v. 2, p. 11-45, 1973.

EVERED, D.; WHELAN, J. Functions of the proteoglycans. **Ciba Foundation Symposium**. v. 124, p. -, 1986.

FARACH, M. C.; TANG, J. P.; DECKER, G. L.; CARSON, D. D. Heparin/heparin sulfate is involved in attachment and spreading of mouse embryo in vitro. **Developmental Biology**. v. 123, p. 401-410, 1987.

FARRINGTON, S. M. **Winged-Helix transcription factors and yolk sac function in the developing mouse embryo**. Harvard University, Cambridge, MA 1996.

FAUZA, D. Amniotic fluid and placental stem cells. **Best Practice Research in Clinical Obstetrics and Gynaecology**. v. 18, p. 877-891, 2004.

FAVARON, P. O.; CARTER, A. M.; AMBRÓSIO, C. E.; MORINI, A. C.; MESS, A. M.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Placentation in Sigmodontinae: a rodent taxon native to South America. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 9, p. 1-14, 2011.

FAVARON, P. O.; RODRIGUES, M. N.; OLIVEIRA, M. F.; BIASII, C. M.; MIGLINO, M. A. Embryonic and Fetal Development in – Pigmy RiceRat – *Oligoryzomys* sp. (Rodentia, Sigmodontinae) and its Significance for Being a new Experimental Model. **Anatomy, Histology and Embriology**. v. 41, p. 286-299, 2012.

FELIPE, A. E.; CABODEVILA, J.; CALLEJAS, S. Anatomicohistological Characteristics of the Ovary of the Coypu (*Myocastor coypus*). **Anatomia, Histologia, Embryologia**. v. 17, n. 1, p. 89-95, 1999.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 20, p. 28-34, 2005.

FRANSSON, L-A.; CARLSTED, I.; COSTER, L.; MALMSTROM, A. Proteoheparan sulfate from human skin fibroblasts. Evidence for self-interaction via the heparin sulfate side chains. **The Journal of Biology and Chemistry**. v. 258, p. 14342-14345, 1983.

FREEMAN, S. J.; LLOYD, J. B. Evidence that protein ingested by the rat visceral yolk sac yields amino acids for synthesis of embryonic protein. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**. v. 73, p. 307-315, 1983.

FLAMINI, M. A.; PORTIANSKY, E. L.; FAVARON, P. O.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, A. M.; MESS, A. M.; MIGLINO, M. A.; BARBEITO, C. G. Chorioallantoic and yolk sac placentation in the plains viscacha (*Lagostomus maximus*) – A caviomorph rodent with natural polyovulation. **Placenta**. V. 32, p. 963-968, 2011.

FLÉCHON, J.; DEGROUARD, J.; FLÉCHON, B. Gastrulation events in the prestreak pig embryo: ultrastructure and cell markers. **Genesis**. v. 38, p. 13-25, 2004.

FISCHER, V. T.; FLOYD, A. D. Placental Development in the Mongolian Gerbil (*Meriones unguilatus*). **The American Journal of Anatomy**. v. 134, p. 321-336, 1972.

FLINT, M. H.; CRAIG, A. S.; REILLY, H. C.; GILLARD, G. C.; PARRY, A. D. Collagen fibril diameters and glycosaminoglycans content of skins: indices of tissue maturity and functions. **Connective Tissue Research**. v. 13, p. 69-81, 1984.

FORSBERG, E.; PEJLER, G.; RINGVALL, M.; LUNDERIUS, C.; TOMASINI-JOHANSSON, B.; KUSCH-GULBERG, M.; ERIKSSON, I.; LEDIN, J.; HELLMAN, L.; KJELLÉN. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. **Nature**. v. 400, p. 773-776, 1999.

FORTES, E. A. M.; CARVALHO, M. A. M.; ALMEIDA, M. M.; CONDE-JÚNIOR, A. M. CRUZ, N. E. A.; ASSIS-NETO, A. C. Aspectos morfológicos da tuba uterina de

cutias (*Dasyprocta aguti*, Mammalia: Rodentia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 42, n.2, p. 130-134, 2005.

FORTES, E. A. M. **Biologia do desenvolvimento: aspectos morfológicos e morfométricos de embriões, fetos e neonatos de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*)**. 2011. 88f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, 2011.

FORTES, E. A. M.; FERRAZ, M. S.; BEZERRA, D. O.; JÚNIOR, A. M. C.; CABRAL, R. S.; SOUSA, F. C. A.; ALMEIDA, H. M.; PESSOA, G. T.; MENEZES, D. J. A.; GUERRA, S. P. L.; SAMPAIO, I. B. M.; ASSIS, A. C. A. Prenatal development of the agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831): External features and growth curves. **Animal Reproduction Science**. v. 140, p. 195-205, 2013.

FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **Journal of Internal Medicine**. v. 242, n. 1 p. 27-33, 1997.

FRANCIOLLI, A. L. R.; AMBRÓSIO, C. E.; OLIVEIRA, M. F.; MORINI, A. C.; FAVARON, P. O.; MACHADO, M. R. F.; MIGLINO, M. A. South-American Hystricomorphs: A comparative analysis of embryological development. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n. 5, p. 441-446, 2001.

FREYER, C.; RENFREE, M. B. The Mammalian Yolk Sac Placenta. **Journal of Experimental Zoology (MOL DEV EVOL)**. v. 312B, p. 545-554, 2009.

FU, G.; BRKIĆ, J.; HAYDER, H.; PENG, C. MicroRNAs in human placental developmental and pregnancy complications. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p. 5519-5544, 2013.

GARDNER, R. L. The relationship between cell lineage and differentiation in the early mouse embryo. **Results and Problems in Cell Differentiation**. v. 9, p. 205-241, 1978.

GEORGIADES, A. C.; SMITH, F.; BURTON, G. J. Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. **Placenta**. v. 23, p. 3-19, 2002.

GEISE, L.; PARESQUE, R.; SEBASTIÃO, H.; SHIRAI, L. T.; ASTÚA, D.; MARROIG, G. Non-volant mammals, Parque Nacional do Catimbau, Vale do Catimbau, Buíque, State of Pernambuco, Brazil, with karyologic data. **Journal of species lists and distribution**. v. 6, p. 179-186, 2010.

GILBERT, S. F. **Biologia do desenvolvimento**. 5. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003. 956p.

GOETINCK, P. F.; STIRPE, N. S.; TAONIS, P. A.; CARLONE, D. The tandemly repeated sequences of link protein contain the sites for interaction with hyaluronic acid. **The Journal of Cell Biology**. v. 105, p. 2403-2408, 1987.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research (part B)**. v 80, p. 84-97, 2007.

GOLICHOWSKI, A. M.; KING, S. R.; MASCARO, K. Pregnancy-related changes in rat cervical glycosaminoglycans. **Biochemical Journal**. v. 192, n. 1, p. 1-8, 1980.

GONZALEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A.; GARCIA, P.; GARCIA-GARCIA, R. M.; ARIZNAVARRETA, C.; SANCHEZ, M. A.; TRESGUERRES, J. A. F.; COCERO, M. J.; FLORES, J. M. Effects of progestogens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. **Theriogenology**. v. 63, n. 9, p. 2523-2534, 2005.

GREISS, F. C.; WAGNER, W. D. Glycosaminoglycans: their distribution and potential vasoactive action in the nonpregnant and pregnant ovine uterus. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 145, n.8, p. 1041-1048, 1983.

GRIFFITHS, G. S.; MILLER, K. A.; GALILEO, D. S.; MARTIN-DELEON, P. A. Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency. **Reproduction**. v. 135, p. 293-301, 2008.

GUIMARÃES, D. A.; MATOS, E.; VALE, W. G. Estudo morfológico do sistema genital feminino de cutia (*Dasyprocta prymnolopha*, Rodentia: Caviidae). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**. v. 11, n. 2, p. 167-171, 1994.

GUIMARÃES, D. A.; MOREIRA, D.; VALE, W. G. Determinação do ciclo reprodutivo da cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) através do diagnóstico colpocitológico. **Acta Amazônica**. v. 27, n. 1, p. 55-64, 1997.

GUIMARÃES, D. A.; RAMOS, R. L.; OHASHI, O. M.; GARCIA, G. W.; VALE, W. G. Plasma concentration of progesterone and 17 β -estradiol of black-rumped agouti (*Dasyprocta prymnolopha*) during the estrous cycle. **Revista de Biologia Tropical**. v. 59, n.1, p. 29-35, 2011.

HAAR, J. L.; ACKERMAN, G. A. A Phase and Electron Microscopic Study of Vasculogenesis and Erythropoiesis in the Yolk Sac of the Mouse. **Anatomy Research**. v. 170, p. 199-224, 1970.

HAAR, J. L.; ACKERMAN, G. A. Ultrastructural Changes in Mouse Yolk Sac Associated with Initiation of Vitelline Circulation. **The Anatomical Record**. v. 170, n. 4. p. 437-455, 1971.

HAAR, J. L. An *in vitro* Morphological Study of the Mouse Visceral Yolk Sac and Possible Yolk Sac Immunocyte Precursors. **Cell and Tissue Research**. v. 184, p. 113-119, 1977.

HALBERG, D. F.; PROULX, G.; DOEGE, K.; YAMADA, Y.; DRICKAMER, K. A segment of the cartilage proteoglycan core protein has lectin-like activity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 263, p. 9486-9490, 1988.

HAN, V. K. M.; HUNTER III, S.; PRATT, R. M.; ZENDENGUI, J. G.; LEE, D. E. Expression of rat transforming growth factor alpha mRNA during development occurs predominantly in the maternal decidua. **Molecular and Cellular Biology**. v. 7, p. 2335-2343, 1987.

HANIND, H. Y.; ZAKARIA M. Z. A. B. Reproductive characteristics of the female laboratory rat. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, n. 19, p. 2510-2514, 2013.

HARDINGHAM, T. E.; BAYLISS, M. T. Proteoglycans of articular cartilage changes in aging in joint disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. v. 1, p. 12-33, 1990.

HARDINGHAM, T. E.; FOSANG, A. J. Proteoglycans: many forms and many functions. **The FASEB Journal**. v. 6, p. 861-870, 1992.

HEDLUND, K.; NILSSON, O. Hormonal requirements for uterine attachment reaction and blastocyst implantation in the mouse, hamster and guinea pig. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 47, p. 59-62, 1971.

HERINGTON, J. L.; BANY, B. M. Do molecular signals from the conceptus influence endometrium decidualization in rodents? **Journal of Experimental Biology Development and Evolution**. v. 312, n. 8, p. 797-816, 2009.

HILLEMANN, H. H.; GAYNOR, A. L. The definitive architecture of the placenta of nutria, *Myocastor coypus* (Molina). **American Journal of Anatomy**. v. 109, p. 299-317, 1961.

HOSSAIN, M. I.; O'SHEA, J. D. The vascular anatomy of the ovary and the relative contribution of the ovarian and uterine arteries to the blood supply of the ovary in the guinea-pig. **Journal of Anatomy**. v. 137, n. 3, p. 457-466, 1983.

HOUSSAY, B. A.; CARDEZA, A. F.; HOUSSAAY, A. B.; PINTO, R. M. Estrogen phenomena and adrenal tumors in ovariectomized rats. **Revista de la Sociedad Entomologica Argentina**. v. 2, p. 315-323, 1951.

HUANG, W. W.; YIN, Y.; BI, Q.; CHIANG, T. C.; GARNER, N.; VUORISTO, J.; MCLACHLAN, J. A.; MA, L. Developmental diethylstilbestrol exposure alters genetic pathways of uterine cytodifferentiation. **Molecular Endocrinology**. v. 19, p. 669-682, 2005.

IIANCHERAN, S.; MOODLEY, Y.; MANUELPIILLAI, U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? **Placenta**. v. 30, p. 2-10, 2009.

IOZZO, R. V. Proteoglycans and neoplasia. **Cancer and Metastasis Reviews**. v. 0, p. 39-50, 1988.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY EMBRYOLOGICAL NOMENCLATURE: **Nomina anatômica veterinária**. 2. ed. Knoxville: World Association on Veterinary Anatomist, 2006. 36p.

INTERNATIONAL COMMOTTEE ON VETERINARY HISTOLOGICAL NOMENCLATURE: **Nomina histológica veterinária**. 2. ed. Review Zurich: International Committee on Veterinary Histological Nomenclature (Together with Nomina Anatomica Veterinaria, 4. ed. and Nomina Embriologica Veterinaria). 1994.

ISHIBASHI, K.; KUWAHARA, M.; GU, Y. TANAKA, Y.; MARUMO, F.; SASAKI, S. Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not glycerol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 244, p. 268-274.

ITANO, N.; KIMATA, K. Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. **The Journal of Biology and Chemistry**. v. 271, p. 9875-9883, 1996.

JACOBSON, A. G.; SATER, A. K. Features of embryonic induction. **Development**. v. 104, p. 341-359, 1988.

JAQUES, L. B. A microelectrophoresis method for heparin. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. n. 3, p. 351-360, 1968.

JENSH, R. P.; KOSZALKA, T. R.; JENSEN, M.; BIDDLE, L.; BRENT, R. L. Morphological alterations in the parietal yolk-sac of the rat from the 12th to the 19th day of gestation. **Journal of Embryology and Morphology**. v. 39, p. 9-21, 1977.

JOLLIE, W. P. Changes in the fine structure of the parietal yolk sac of the rat placenta with increasing gestacional age. **The American Journal of Anatomy**. v. 122, p. 513-532, 1968.

JOLLIE, W. P. Changes in the Fine Structure of Rat Visceral Yolk-Sac Placenta During Prolonged Pregnancy. **The American Journal of Anatomy**. v. 171, n. 1, p.1-14, 1984.

JOLLIE, W. P. Review Article: Ultrastructural Studies of Protein Transfer across Rodent Yolk Sac. **Placenta**. v. 7, p. 263-281, 1986.

JOLLIE, W. P. Development, Morphology, and Function of the Yolk-Sac Placenta of Laboratory Rodents. **Teratology**. v. 41, p. 361-381, 1990.

KANASHIRO, C. **Análise da dinâmica da origem e destino das células trofoblásticas na interface materno-fetal do útero gestante do cobaio na elucidação da organização da placenta vitelina invertida.** 2011. 85f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

KANASHIRO, C.; SANTOS, T. C.; MIGLINO, M. A.; MESS, A. M.; CARTER, A. M. Growth and development of the placenta in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 57, n. 8, p. 1-13, 2009.

KAR, M.; GHOSH, D.; SENGUPTA, J. Histochemical and morphological examination of proliferation and apoptosis in human first trimester villous trophoblast. **Human Reproduction**. v. 22, p. 2814-2823, 2007.

KAUFMANN, P. The Guinea Pig Placenta and its Development. **Zentralblatt Anatomie**. v. 120, p. 83-101, 1969.

KAUFMAN, M. **The atlas of Mouse Development.** Elsevier. Academic press, San Diego, CA, 1998. 512p.

KIMURA, C.; YOSHINAGA, K.; TIAN, E.; SUZUKI, M.; AIZAWA, S.; MATSUO, I. Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals. **Development Biology**. v. 225, p. 304-321, 2000.

KNOSPE, C. Periods and stages of the prenatal development of the domestic cat. **Anatomy, Histology and Embriology**. v. 31, p. 37-51, 2002.

KING, B. F.; ENDERS, A. C. The Fine Structure of the Guinea Pig Visceral Yolk Sac Placenta. **American Journal of Anatomy**. v. 127, n. 4, p. 397-413, 1970.

KING, B. F. Differentiation of Parietal Endoderm Cells of the Guinea Pig Yolk Sac, with Particular Reference to the Development of Endoplasmic Reticulum. **Developmental Biology**. v. 26, p. 547-559, 1971.

KING, B. F.; HASTINGS, R. A. The comparative fine structure of the interhemal membrane of chorioallantoic placentas from six genera of myomorph rodents. **American Journal of Anatomy**. v. 149, p. 165-180, 1977.

KING, B. F.; MOSSMAN, H. W. The fetal membranes and unusual giant cell placenta of the Jerboa (*jaculus*) and jumping mouse (*zapus*). **American Journal of Anatomy**. v. 140, p. 405-432, 1974.

KING, B. F. A Freeze-Fracture Study of the Guinea Pig Yolk Sac Epithelium. **The Anatomical Record**. v. 202, p. 221-230, 1982.

KING, B. F. Comparative studies of structures and function in mammalian placentas with special reference to maternal-fetal transfer of iron. **American Zoology**. v. 32, p. 331-342, 1992.

KLINGE, C. M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. **Nucleic Acids Research**. v. 29, p. 2905-2919, 2001.

KREBS, C.; MACARA, L. M.; LEISER, R.; BROWMAN, A. W.; GREER, I. A.; KINGDOM, J. C. P. Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 175, p. 1534-1542, 1996.

KRESSE, H.; SCHÖNHERR, E. Proteoglycans of the Extracellular matrix and growth control. **Journal of Cellular Physiology**. v. 189, p. 266-274, 2001.

LAI, E.; PREZIOSO, V. R.; SMITH, E.; LITVIN, O.; COSTA, R. H.; DARNELL, J. E. HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. **Genes Development**. v. 4, p. 1427-1436, 1990.

LACERDA, P. M. O.; MOURA, C. E. B.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F.; ALBUQUERQUE, J. F. G. Origem do plexo lombossacral de mocós (*Kerodon rupestris*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. V. 43, p. 620-628, 2006.

LAMBSON, R. O. An Electron Microscopic Visualization of Transport Across Rat Visceral Yolk Sac. **The American Journal of Anatomy**. v. 118, p. 21-52, 1966.

LANGE, R. R.; SCHMIDT, E. M. S. Rodentia: roedores silvestres, p. 475-491. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds), *Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária*. Editora Roca, São Paulo. 2006.

LAWSON, K. A.; MENESES, J. J.; PEDERSEN, R. A. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. **Development**. v. 113, p. 891-911, 1991.

LARCHER, T. E. The comparative social behavior of *Kerodon rupestris* and *Galea spixii* and the evolution of behavior in the Caviidae. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 17, p. 1-7, 1981.

LARSEN, J. F. Histology and Fine Structure of the Avascular and Vascular Yolk-sac Placentae and the Obplacental Giant Cells in the Rabbit. **The American Journal of Anatomy**. v. 112, n. 2, p. 269-283, 1963.

LARSEN, W. J. **Human Embryology**. 2. Ed. New York: Churchill Livingstone. 488p, 1997.

LAURENT, T. C.; FRASER, J. R. E. Hyaluronan. **The FASEB Journal**. v. 6, p. 2397-2404, 1992.

LEE, K. Y.; DEMAYO, F. J. Animal models of implantation. **Reproduction**. v. 128, p. 679-695, 2004.

LEE, T. Y.; JAMIESON, A. M.; SCHAFER, I. A. Changes in the composition and structure of glycosaminoglycans in the human placenta during development. **Pediatric Research**. v. 7, n. 12, p. 965-977, 1973.

LEE, C. N.; AX, R. L. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. **Journal of Dairy Science**. v. 67, p. 2006-2009, 1984.

LEPPERT, P. C. Anatomy and physiology of cervical ripening. **Clinical obstetrics and gynecology**. v. 38, n. 2, p. 267-279, 1995.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental Clinical Endocrinology**. v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

LEVAK-SVAJGER, B.; KNEZEVIC, V.; SVAJGER, A. Development of separated germ layers of rodent embryos on ectopic sites: a reappraisal. **The International Journal of Developmental Biology**. v. 35, p. 177-189, 1991.

LI, J. P.; GONG, F.; HAGNER-Mc WHIRTER, A.; ABRINK, M.; KISILEVSKY, R.; ZHANG, X.; LINDAHL, U. Targeted disruption of a murine glucuronyl C5-epimerase gene results in heparin sulfate lacking L-iduronic and in neonatal lethality. **The Journal of Biology and Chemistry**. v. 278, p. 28363-28366, 2003.

LI, J. P.; SPILLMANN, D. Heparan sulfate proteoglycans as multifunctional cell regulators: cell surface receptors. **Methods of Molecular Biology**. v. 836, p. 6009-6021, 2012.

LI, S.; DAVIS, B. Evaluating rodent vaginal and uterine histology in toxicity studies. **Birth Defects Research (Part B)**. v. 80, p. 246-252, 2007.

LLOYD, J. B. Cell physiology of the rat visceral yolk sac: a study of pinocytosis and cell function. **Teratology**. v. 41, p. 383-393, 1990.

LOHMILLER, J.; SWING, S. P.; SUCKOW, M. A.; WEISBROTH, S. H.; FRANKLIN, C. L. Reproduction and Breeding. **The Laboratory Rat**. v. 11, n. 2, p. 147-164, 2006.

LOMBARDI, L. A.; SIMÕES, R. S.; MAGNHN, C. C.; SILVA, C. F.; MACIEL, G. A. R.; BARACAT, E. C.; JÚNIOR, J. M. S. Morphology of the interstitial cells of rat polycystic ovaries: an experimental study. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 34, n. 7, p. 323-328, 2012.

LOPES, C. C.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Specific structural features of syndecans and heparin sulfate chains are needed for cell signaling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 39, p. 157-167, 2006.

LOPEZ, M. C.; SATANLEY, M. A. Cytokine profile of mouse vaginal and uterus lymphocytes at estrus and diestrus. **Clinical & Developmental Immunology**. v. 12, n. 2, p. 159-164, 2005.

LU, C. C.; BRENNAN, J.; ROBERTSON, E. J. From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. **Current Opinion in Genetics & Development**. v. 11, p. 384-392, 2001.

LUCKETT, W. P. The development of primordial and definitive amniotic cavities in early Rhesus monkey and human embryos. **American Journal of Anatomy**. v. 144, p. 149-167, 1975.

MA, W.; TAN, J.; MATSUMOTO, H.; ROBERT, B.; ABRAHAMSON, D. R.; DAS, S. K.; DEY, S. K. Adult tissue angiogenesis: evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. **Molecular Endocrinology**. v. 15, p. 1983-1992, 2001.

MALAVAKI, C.; MIZUMOTO, S.; KARAMANOS, N.; SUGAHARA, K. Recent advances in the structural study of functional chondroitin sulfate and dermatan sulfate in health and disease. **Connective tissue Research**. v. 49, p. 133-139, 2008.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**. v. 62, p. 609-614, 2002.

MARES, M. A.; STREILEN, K. E.; DE LA ROSA, M. P. Nonsynchronous molting in three genera of tropical rodents from the Brazilian Caatinga (*Thrichomys*, *Galea*, and *Kerodon*). **Journal of Mammalian evolution**. v. 63, p. 484-488, 1982.

MARQUEZ, D. R.; LEE, J.; LIN, T.; PIETRAS, R. J. Epidermal growth factor receptor and tyrosine phosphorylation of estrogen receptor. **Endocrine**. v. 16, p. 73-81, 2001.

MATTARAIA, V. G. M.; DA SILVA, A. P. R.; SARTORI, D. R. S.; TÁVORA, M. F. C. L. F.; RODRIGUES, U. P.; MOREIRA, V. B.; MOURA, A. S. A. M. T. Efeito macho na indução do estro em ratas Wistar (*Rattus norvegicus*). **Veterinária e Zootecnia**. v. 16, n. 4, p. 669-677, 2009.

MAYOR, P.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; JORI, F.; RUTLLANT, J.; LÓPEZ-PLANA, C.; LÓPEZ-GATIUS, F. Anatomicohistological characteristics of the genital tubular organs of the female brush-tailed porcupine (*Atherurus africanus*, Gray 1842) from Gabon. **Anatomia, Histologia, Embryologia**. v. 31, n. 6, p. 355-361, 2002.

MEDEIROS, G. F.; MENDES, A.; CASTRO, R. A.; BAÚ, E. C.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in vertebrates. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1475, n. 2, p. 287-294, 2000.

MEEKINS, J. W.; PIJENBORG, R.; HANSSENS, M.; MCFADYEN, I. R.; VANASSHE, A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v. 101, p. 669-674, 1994.

MELO, R. A. **Embriologia comparada e Humana**. Atheneu editor, São Paulo. 1989. 290p.

MERLE, B.; DURUSSEL, L.; DELMAS, P. D.; CLÉZARDIN, P. Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycans side chain. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 75, n. 3, p. 538-546, 1999.

MESS, A. Evolutionary Transformations of Chorioallantoic Placental Characters in Rodentia with Special Reference to Hystriognath Species. **Journal of Experimental Zoology**. v. 299, p. 78-98, 2003.

MESS, A.; CARTER, A. M. Evolutionary Transformations of Fetal Membrane Characters in Eutheria with Special Reference to Afrotheria. **Journal of Experimental Zoology**. v. 306, p. 1-24, 2006.

MESS, A.; CARTER, A. M. Evolution of the placenta during the early radiation of placental mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. Molecular & Integrative Physiology**. v. 148, n. 4, p. 769-779, 2007.

MESS, A. Chorioallantoic and Yolk Sac Placentation in the Dassie Rat *Petromus typicus* and its Significance for the Evolution of Hystriognath Rodents. **Placenta**. v. 28, p. 1229-1233, 2007.

MIGLINO, M. A.; FRANCIOLLI, A. L. R.; OLIVEIRA, M. F.; AMBRÓSIO, C. E.; BONATELLI, M.; MACHADO, M. R. F.; MESS, A. Development of the Inverted Visceral Yolk Sac in Three Species of Caviids (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Placenta**. v. 29, n. 8, p. 748-752, 2008.

MONTEIRO, C. M. R.; PERRI, S. H. V.; CARVALHO, R. G.; KOIVISTO, M. B. Histologia e morfometria em cornos uterinos de cadelas nulíparas, múltíparas e tratadas com contraceptivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n. 10, p. 847-851, 2009.

MOOJEN, J. **Os Roedores do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério de Educação e Saúde. Instituto Nacional do Livro; Biblioteca Científica Brasileira, (Série A, v.2), 1952. 214p.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**, 7. ed. Ed. Elsevier Ltda, 2004.

MORINI, A. C.; PIERI, N.; ROBALLO, K.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; MORINI JUNIOR, J. C.; FAVARON, P. O.; MINERVINO, A. H. H.; PEREIRA, F. T. V.; MIGLINO, M. A. Buffalo (*Bubalus bubali*) late embryo and foetus development. A morphological analysis. **Reproduction in Domestic Animals** (1990). v. 51, p. 509-514, 2016.

MOSSMAN, H. W. Comparative morphogenesis of fetal membranes and accessory uterine structures. **Contribution to Embryology of Carnegie Institute Washington**. v. 26, p. 126-146, 1937.

MOSSMAN, H. W.; WEISFELDT, L. A. The fetal membranes of a primitive rodent, the thirteen-striped ground squirrel. **American Journal of Anatomy**. v. 64, p. 59-109, 1939.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes**: Comparative ontogeny and morphology; evolution; phylogenetic significance: basic functions; research opportunities. London: The Macmillan Press, 1987. 383p.

MOXON, R.; COPLER, D.; ENGLAND, G. C. W. Quality assurance of canine vaginal cytology: a preliminary study. **Theriogenology**. v. 74, n. 3, p. 479-485, 2010.

MURTHI, P.; FAISAL, F. A.; RAJARAMAN, G.; STEVENSON, J.; IGNJATOVIC, V.; MONAGLE, P. T. Placenta biglycan expression is decreased in human idiopathic fetal growth restriction. **Placenta**. v. 31, n. 8, p. 712-717, 2010.

MUNTENER, M.; HSU, Y. C. Developmental of trophoblast and placenta of the mouse. **Acta Anatomy**. v. 98, p. 241-252, 1977.

NAHON, J. L.; VENETIANER, A.; SALA-TREPAT, J. M. Specific sets of DNase I-hypertensive sites are associated with the potential and overt expression of the rat albumin and alpha-fetoprotein genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 84, p. 2135-2139, 1987.

NAIRN, A. V.; KINOSHITA-TOYODA, A.; TOYODA, H.; XIE, J.; HARRIS, K.; DALTON, S.; KULIK, M.; PIERCE, J. M.; TOIDA, T.; MOREMEN, K. W. Glycomics of proteoglycan biosynthesis in murine embryonic stem cell differentiation. **Journal of Proteome Research**. v. 6, p. 4374-4387, 2007.

NAKAMURA, O. Children's immunology, what can we learn from animal studies (1): Decidual cells induce specific immune system of feto-maternal interface. **The Journal of Toxicological Sciences**. v. 34, p. 331-339, 2009.

NAKAO, M.; SHICHIJO, S.; IMAIZUMI, T.; INOUE, Y.; MATSUNAGA, K.; YAMADA, A.; KIKUCHI, M.; TSUDA, N.; OHTA, K.; TAKAMORI, S. Identification

of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the CTL. **Journal of Immunology**. v. 164, p. 2565-2574, 2000.

NARDULLI, A. M.; SHAPIRO, D. J. DNA bending by nuclear receptors. **Receptor**. v. 3, p. 247-255, 1993.

NASCIUTTI, L. E.; FERRARI, R.; BERARDO, P. T.; SOUZA, M. L. S.; TAKIYA, C. M.; BOROJEVIC, R.; ABRÃO, M. S.; SILVA, L. C. Distribution of chondroitin sulfate in human endometrium. **Micron**. v. 37, p. 544-550, 2006.

NODEN, D. N.; de LAHUNTA, A. **The embryology of domestic animals. Developmental mechanisms and malformations**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1985. 367p.

NIWA, Y.; MASAMIZU, Y.; LIU, T.; NAKAYAMA, R.; DENG, C. X., KAGEYAMA, R. The initiation and propagation of Hes 7 oscillation are cooperatively regulated by Fgf and notch signaling in the somite segmentation clock. **Development Cell**. v. 13, p. 298-304, 2007.

OLIVEIRA, M. F. **Placentação em mocós, *Kerodon rupestris*. Wied, 1820**. 2004. 208f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.

OLIVEIRA, M. F.; CARTER, A. M.; BONATELLI, M.; AMBROSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Placentation in the Rock Cavy, *Kerondon rupestres* (Wied). **Placenta**. v. 27, p. 87-97, 2006.

OLIVEIRA, M. F.; MESS, A.; AMBROSIO, C. E.; DANTAS, C. A. G.; FAVARON, P. O.; MIGLINO, M. A. Chorioallantoic Placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 6, p. 1-8, 2008.

OLIVEIRA, G. B. O.; VALE, A. M.; SANTOS, A. C. S.; MOURA, C. E. B. M.; ROCHA, H. A. O.; OLIVEIRA, M. F. Composition and significance of glycosaminoglycans in the uterus placenta of mammals. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 103, p. 1-9, 2015.

OLIVEIRA, G. B. **Perfil dos glicosaminoglicanos, morfologia do sistema reprodutor feminino e desenvolvimento pós-implantacional em cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758)**. 2016. 137f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2016.

ORNITZ, D. M. FGFs, heparin sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. **Bioessays**. v. 22, p. 108-112, 2000.

ORNOY, A.; SALAMON-ARNON, J.; BEN-ZUR, Z.; KOHN, G. Placental findings in spontaneous abortions and stillbirths. **Teratology**. v. 24, p. 243-252, 1981.

ORSINI, M. M.; DONOVAN, B. T. Implantation and induced decidualization of the uterus in the Guinea Pig, as indicated by pontamine blue. **Biology of Reproduction**. v. 5, p. 270-281, 1971.

OZDEMIR, D.; ATALAR, O. Observations on the morphology of the uterus of the porcupine (*Hystrix cristata*). **Veterinarski Arhiv**. v. 79, n. 4, p. 379-384, 2009.

PACCOLA, C. C.; RESENDE, C. G.; STUMPP, T.; MIRAGLIA, S. M.; CIPRIANO, I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. **Animal Reproduction**. v. 10, n. 4, p. 677-683, 2013.

PAMPFER, S.; TABIBZADEH, S.; CHUAN, F.-C.; POLLARD, J. W. Molecular cloning of a novel transcript for colony stimulating factor-1 from human endometrial glands. Production of a transmembrane form of the protein. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 5, p. 1931-1938, 1991.

PARRY, E. L.; TUNG, H. N.; PARR, M. B. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. **Biology of Reproduction**. v. 36, p. 211-225, 1987.

PASHOV, B.; MATAMOROS, Y. Histologia e histoquímica do ovário da paca (*Cuniculus paca*, Brisson 1762) prenhe. **Ciências Veterinárias**. v. 2, n. 1, p. 9-13, 1985.

PELLEGRINI, L.; BURKE, D. F.; von DELFT, F.; MULLOY, B.; BLUNDELL, T. L. Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. **Nature**. v. 407, p. 1029-1034, 2000.

PENTŠUK, N.; VANDER LAAN, J. W. An Interspecies Comparison of Placental Antibody Transfer: New Insights into Developmental Toxicity Testing of Monoclonal Antibodies. **Birth Defects Research (Part B)**. v. 86, p. 328-344, 2009.

PERANTONI, A. O.; TIMOFEEVA, O.; NAILLAT, F.; RICHMAN, C.; PAJNI-UNDERWOOD, S.; WILSON, C.; VAINIO, S.; DOVE, L. F.; LEWANDOSKI, M. Inactivation of FGF8 in early mesoderm reveals an essential role in kidney development. **Development**. v. 132, p. 3859-3871, 2005.

PERCEQUILO, A. R.; SANTOS, K. R. P.; CAMPOS, B. A. T. P.; SANTOS, R. G.; TOLEDO, G. A. C.; LANGGUTH, A. Mamíferos dos remanescentes florestais de João Pessoa, Paraíba. **Biologia Geral e Experimental**. v. 7, n. 2, p. 17-31, 2007.

PEREA-GOMEZ, A.; RHINN, M.; ANG, S. L. Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo. **The International Journal of Developmental Biology**. v. 45, p. 311-320, 2001.

- PEREA-GOMEZ, A.; CAMUS, A.; MOREAU, A.; GRIEVE, K.; MONERON, G.; DUBOIS, A.; CIBERT, C.; COLLIGNON, J. Initiation of gastrulation in the mouse embryo is preceded by an apparent shift in the orientation of the anterior-posterior axis. **Current Biology**. v. 14, p. 197-207, 2004.
- PEREIRA, P. N. G.; DOBREVA, M. P.; GRAHAM, L.; HUYLEBROECK, D.; LAWSON, K. A.; ZWIJSEN, A. N. Amnion formation in the mouse embryo: the single amniochorionic fold model. **Developmental Biology**. v. 11, n. 48, p. 1-13, 2011.
- PERKINS, S. J.; NEALIS, A.; DUDHIA, J.; HARDINGHAM, T. E. Immunoglobulin fold and tandem repeat structures in proteoglycan N-terminal domains and link protein. **Journal of Molecular Biology**. v. 206, p. 737-753, 1989.
- PERRY, J. S. The mammalian fetal membranes. **Journals of Reproduction & Fertility Ltd.** v. 62, n. 2, p. 321-335, 1981.
- PLONNÉ, D.; STACKE, A.; WEBER, K. U.; ENDISCH, U.; DARGEL, R. The pattern of apolipoprotein B100 containing lipoprotein subclasses produced by the isolated visceral rat yolk sac depends on developmental stage and fatty acid availability. **Biochimica Biophysica Acta**. v. 1299, n. 54, 1996.
- PINHEIRO, J. J. P.; ANDRADE, S. A.; CUNHA, J. N. Preservação e exploração de animais silvestres nativos: preá, cutia e moco. **Caatinga**. v. 6, p. 28-49, 1989.
- PULKKINEN, L.; KAINULAINEN, K.; KRUSIUS, T.; MÄKINEN, P.; SCHOLLIN, J.; GUSTAVSSON, K-H.; PELTONEN, L. Deficient expression of the gene coding for decorin in a lethal form of marfan syndrome. **The Journal of Biology and Chemistry**. v. 265, p. 17780-17785, 1990.
- RANCOURT, M.; FOIS, N.; LAVIN, M. P.; TCHAKERIAN, E.; VALLEGRAND, F. Mediterranean sheep and goat production: An uncertain future. **Small Ruminant Research**. v. 62, p. 167-179, 2006.
- RAPRAEGER, A.; JALKANEN, M.; ENDO, E.; KODA, J.; BERNFIELD, M. The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparin sulfate glycosaminoglycans. **The Journal of Biology and Chemistry**. v. 260, n. 20, p. 11046-11052, 1985.
- REGNAULT, T. R.; GALAN, H. L.; PARKER, T. A.; ANTONY, R. V. Placental development in normal and compromised pregnancies – a review. **Placenta**. v. 23, p. 119-129, 2002.
- REIS, A. N. G.; GERBASI, S. H. B.; MARTINS, C.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, C. A. Morphology of the female genital system of the paca (*Cuniculus paca*,

Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 48, n. 3, p. 183-191, 2011.

REED, R. K.; LILJA, K.; LAURENT, T. C. Hyaluronan in the rat with special reference to the skin. **Acta Physiologica Scandinavica Journal**. v. 134, p. 405-411, 1988.

RICHARDS, J. S.; RUSSEL, D. L.; OCHSNER, S.; HSIEH, M.; DOYLE, K. H.; FALENDER, A. E.; LO, Y. K.; SHARMA, S. C. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **The Endocrine Society**. v. 11, p. 195-220, 2002.

RICHMOND, M.; CONAWAY, C. H. Induced ovulation and oestrus in *Microtus ochrogaster*. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v. 6, p. 357-376, 1969.

RIDDLE, R. D.; JOHNSON, R. L.; LAUFER, E.; TABIN, C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. **Cell**. v. 75, p. 1401-1416, 1993.

ROBB, L.; TAM, P. P. L. Gastrula organizer and embryonic patterning in the mouse. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 15, p. 543-554, 2004.

ROBERTS, M. E.; MALINIAK, E.; DEAL, M. The reproductive biology of the rock cavy, *Kerodon rupestris* in captivity: a study of reproductive adaptation in a tropic specialist. **Mammalia**. v. 48, n. 2, p. 252-266.

RODGERS, R. J.; LAVRANOS, T. C.; WEZEL, I. L.; RODGERS-IRVING, H. F. Development of the ovarian follicular epithelium. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 151, p. 171-179, 1999.

RÖNNBERG, E.; MELO, F. R.; PEJLER G. Mast cell proteoglycans. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 60, p. 950-962, 2012.

ROSSANT, J.; CROSS, J. C. Placental development: lessons from mouse mutants. **Reviews**. v. 2, p. 538-548, 2001.

ROOD, J. P. Ecological and behavioural comparirions of three genera of argentine cavies. **Animal Behavior Monographs**. v. 5, p. 1-83, 1972.

ROWE, D. L.; RODNEY, L. H. Phylogenetic Relationships, Ecological Correlates, and Molecular Evolution Within the Caviioidea (Mammalia, Rodentia). **Molecular biology and Evolution**. v. 19, n. 3, p. 263-277, 2002.

RUANO, J. M.; FELDNER, P. C. J.; TAKANO, C. C.; CASTRO, R. A.; NADER, H. B.; SARTORI, M. G.; GIRÃO, M. J. Impact of birth in the presence and absence of

simulated birth injury on vaginal glycosaminoglycan content. **International Urogynecology Journal**. v. 22, n. 12, p. 1513-1519, 2011.

RUGH, R. **The mouse. It's reproduction and development**. Oxford University Press, Incorporated, 1990. 438p.

RUOSLAHTI, E. Structure and biology of proteoglycans. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v. 4, p. 229-255, 1988.

RUOSLAHTI E.; YAMAGUCHI, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. **Cell**. v. 64, p. 867-869, 1991.

RUTANEN, E. M.; PEKONEN, F.; NYMAN, T.; WAHLSTROM, T. Insulin-like growth factor and their binding proteins in benign and malignant uterine diseases. **Growth Regulation**. v. 3, p. 74-77, 1993.

SAGA, Y. The mechanism of somite formation in mice. **Genetics & Development**. v. 22, p. 331-338, 2012.

SAID, J. M. The role of proteoglycans in contributing to placental thrombosis and fetal growth restriction. **Journal of Pregnancy**. v. 2011, n. 928381, 2011.

SAN MARTIN, S.; SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. M. T. Distribution of versican and hyaluronan in the mouse uterus during decidualization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 36, n. 8, p. 1067-1071, 2003.

SANDERSON, R. D.; LALOR, P.; BERNFIELD, M. B lymphocytes express and lose syndecans at specific stages of differentiation. **Cell Regulated**. v. 1, n. 1, p. 27-35, 1989.

SANSOM, G. S. Early Development and Placentation in *Arvicola (Microtus) Amphibius*, with Special Reference to the Origin of Placental Giant Cells. **Journal of Anatomy**. v. 56, p. 333-365, 1922.

SANTOS, A. C.; BERTASSOLI, B. M.; VIANA, D. C.; VASCONCELOS, B. G.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A.; ASSIS NETO, A. C. The morphology of female genitalia in *Galea spixii* (Caviidae, Caviine). **Bioscience Journal**. v. 30, n. 6, p. 1793-1802, 2014.

SANTOS, A. C.; VIANNA, D. C.; BERTASSOLI, B. M.; OLIVEIRA, G. B.; OLIVEIRA, D. M.; BEZERRA, F. V. F.; OLIVEIRA, M. F.; ASSIS-NETO, A. C. Characterization of the estrous cycle in *Galea spixii* (Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35, n. 1, p. 89-94, 2015.

SAS User's guide, version 8. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA. 863p, 1999.

- SASAI, Y.; DE ROBERTIS, E. M. Ectodermal patterning in vertebrate embryos. **Developmental Biology**. v. 182, p. 5-20, 1997.
- SAUNDERS, P. T. Oestrogen receptor beta (ER beta). **Reviews of Reproduction**. v. 3, p. 164-171, 1998.
- SAWADA, A.; SHINYA, M.; JIANG, Y. J.; KAWAKAMI, A.; KUROIWA, A.; TAKEDA, H. FGF/MAPK signaling is a crucial positional cue in somite boundary formation. **Development**. v. 128, p. 4873-4880, 2001.
- SCANDROGLIO, R.; SPITALI, R. Histochemical aspects of the vaginal epithelium of the mouse during the estral cycle. **Minerva Ginecologica**. v. 30, n. 20, p. 1766-1767, 1968.
- SCHLAFFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal Reproduction Science**. v. 60, p. 145-160, 2000.
- SCHLAFKE, S.; ENDERS, A. C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. **Biology of Reproduction**. v. 12, p. 41-65, 1975.
- SCHLESSINGER, J.; PLOTNIKOV, A. N.; IBRAHMI, O. A.; ELISEENKOVA, A. V.; YEY, B. K.; YAYON, A.; LINHARDT, R. J.; MOHAMMADI, M. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. **Molecular Cell**. v. 6, p. 743-750, 2000.
- SCHLÜTER, G. Ultrastructural Changes of the Early Visceral Yolk Sac Layer of Mouse Embryos after Maternal Injection of Trypan Blue. **Anatomy and Embryology**. v. 153, p. 287-293, 1978.
- SCHMIDT, C.; BLADT, F.; GOEDECKE, S. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. **Nature**. v. 373, n. 6516, p. 699-702, 1995.
- SCHMIDT, W. The amniotic fluid compartment: the fetal habitat. **Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology**. v. 127, p. 1-100, 1992.
- SCHNEIDER, H. Ontogenic changes in the nutritive function of the placenta. **Placenta**. v.17, n.1, p.15-26, 1996.
- SCHORPP-KISTNER, M.; WANG, Z. Q.; ANGEL, P.; WAGNER, E. F. JunB is essential for mammalian placentation. **EMBO Journal**. v. 18, n. 4, p. 934-948, 1999.
- SCHREIBER, M.; WANG, Z. Q.; JOCHUM, W.; FETKA, I.; ELLIOTT, C.; WAGNER, E. F. Placental vascularization requires the AP-1 component Fra1. **Development**. v. 127, n. 22, p. 4937-4948, 2000.

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

SCOTT, J. E. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. **The FASEB Journal**. v. 6, n. 26, p. 39-45, 1992.

SHELBY, M. D.; NEWBOLD, R. R.; TULLY, D. B.; CHAE, K.; DAVIS, V. L. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. **Environmental Health Perspectives**. v. 104, p. 1296-1300, 1996.

SHIMIZU, T. Correlation of human cervical ripening and glycoconjugates (glycosaminoglycans and glycoproteins). **Acta of Obstetrics and Gynaecology Japanese**, Tóquio. v. 32, n. 12, p. 1967-1976, 1980.

SHIMIZU, A.; MARUYAMA, T.; TAMAKI, K.; UCHIDA, H.; ASADA, H.; YASUMORI, Y. Impairment of decidualization in SRC-deficient mice. **Biology of Reproduction**. v. 73, p. 1219-1227, 2005.

SHINTANI, Y.; TAKASHIMA, S.; ASANO, H.; LISO, Y.; YAMAZAKI, S.; TSUKAMOTO, O.; SEGUCHI, O.; YAMAMOTO, H.; FUKUSHIMA, T. Glycosaminoglycan modification of neuropilin-1 modulates VEGFR2 signaling. **The EMBO Journal**. v. 25, p. 3045-3055, 2006.

SIBILIA, M.; WAGNER, E. F. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. **Science**. v. 269, n. 5221, p. 234-238, 1995.

SIEGELMAN, M. H.; CHENG, I. C.; WEISSMAN, I. L.; WALKELAND, E. K. The mouse lymph node homing receptor is identical with the lymphocyte cell surface marker Ly-22: role of the EGF domain in endothelial binding. **Cell**. v. 61, p. 611-622, 1990.

SILVA, C. L.; PERDOMO, F. Alguns aspectos anatomicos e histológicos del Sistema genital femenino del chiguire (*Hidrochoerus hidrochaeris*). **Revista da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Central da Venezuela**. v. 30, n. 1/8, p. 89-97, 1983.

SOARES, M. J.; CHAPMAN, B. M.; RASMUSSEN, C. A.; DAI, G.; KAMEI, T.; ORWIG, K. E. Differentiation of trophoblast endocrine cells. **Placenta**. v. 17, p. 277-289, 1996.

SOARES, M. J. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 51, n. 2, p. 1-15, 2004.

SOH, Y. M.; TIWARI, A.; MAHENDROO, M.; CONRAD, K. P.; PARRY, L. J. Relaxin regulates hyaluronan synthesis and aquaporin in the cervix of late pregnant mice. **Endocrinology**. v. 153, n. 12, p. 6054-6064, 2012.

SOUDAIS, C.; BIELINSKA, M.; HEIKINHEIMO, M.; MACARTHUR, C. A.; NARITA, N.; SAFFTZ, J. E.; SIMON, M. C.; LEIDEN, J. M.; WILSON, D. B. Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. **Development**. v. 121, 3877-3888, 1995.

SOUZA, S. V.; MACHADO, M. R. F.; CRUZ, C.; MIGLINO, M. A. Aspectos histológicos dos ovários de paca (*Agouti paca* Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**. v. 17, p. 200-211, 2000. Supplement.

SOUZA, G. N.; CAMANO, L.; ARAUJO JÚNIOR, E.; NADER, H. B.; MEDEIROS, V.; MARTINS, J. R. The expression of glycosaminoglycans and proteoglycans in the uterine cervix of albino rats after local hyaluronidase infusion. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**. v. 27, n. 9, p. 879-886, 2014.

SPYROPOULOS, D. D.; CAPECCHI, M. R. Targeted disruption of the even-skipped gene, *evx-1*, causes early postimplantation lethality of the mouse conceptus. **Genes Development**. v. 8, p. 1949-1961, 1994.

STAMATOGLOU, S. C.; KELLER, J. M. Interactions of cellular glycosaminoglycans with plasma fibronectin and collagen. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 719, p. 90-97, 1982.

STAMENKOVIC, I.; ARUFFO, A.; AMIOT, M.; SEED, B. The hemopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. **The EMBO Journal**. v. 10, p. 343-348, 1991

STARCK, D. Ontogenie und Entwicklungsphysiologie der Säugetiere. **Handbuch der Zoologie**. v. 8, p. 11-27, 1959.

STEWART, I. J. Granulated metrial gland cells in 'minor' species. **Journal of Reproductive Immunology**. v. 40, p. 129-146, 1998.

STEVEN, D. Anatomy of the placental barrier. In comparative placentation. **Placenta**. v. 21, p. 25-57, 1975.

STRAACH, K. J.; SHELTON, J. M.; RICHARDSON, J. A.; HASCALL, V. C.; MAHENDROO, M. S. Regulation of hyaluronan expression during cervical ripening. **Glycobiology**. v. 15, n. 1, p. 55-65, 2005.

STULC, J. Placental transfer of inorganic ions and water. **Physiological Reviews**. v. 77, p. 805-836, 1997.

SURVEYOR, G. A.; WILSON, A. K.; BRIGSTOCK, D. R. CTGF in the mouse uterus and early embryo. **Biology of Reproduction**. v. 59, p. 1207-1213, 1998.

TAKATA, K.; HIRANO, H. Mechanism of glucose transport across the human and rat placental barrier: a review. **Microscopy Research and Technique**. v. 38, p. 145-152, 1997.

TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science**. v. 251, p. 1451-1455, 1991.

TAMM, C.; KJELLÉN, L.; Li, J. P. Heparan sulfate biosynthesis enzymes in embryonic stem cell biology. **Journal of histochemistry & cytochemistry**. v. 60, p. 943-949, 2012.

TAN, S.; PARIA, B. C.; DEY, S. K.; DAS, S. K. Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. **Endocrinology**. v. 140, p. 5310-5321, 1999.

THEILER, K. **The House Mouse: Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age**. Springer Verlag, New York. 1972. 168p.

THEILER, K. **The House Mouse: atlas of embryonic development**. Springer Verlag, New York. 1989. 178p.

THELIN, M. A.; BARTOLINI, B.; AXELSSON, J.; GUSTAFSSON, R.; TYKESSON, E.; PERA, E. Biological functions of iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate. **The Febs Journal**. v. 280, n. 10, p. 2431-2446, 2013.

THREADGILL, D. W.; DLUGOSZ, A. A.; HANSEN, L. A. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. **Science**. v. 269, n. 5221, p. 230-234, 1995.

TIENTTHAI, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SUZUKI, K.; PERTOFT, H.; KJELLEN, L. Localization and quantification of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne. V. 12, n. 3-4, p. 173-182, 2000.

TINGBØ, M. G.; PEDERSEN, M. E.; GRØNDAHL, F.; KOLSET, S. O.; VEISETH-KENT, E.; ENERSEN, G.; HANNESSON, K. O. Type of carbohydrate in feed affects the expression of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs), glycosaminoglycans (GAGs) and interleukins in skeletal muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Fish & Shellfish Immunology**. v. 33, p. 582-589, 2012.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHEMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. 241p.

TOUMA, C.; PALME, R.; SACHSER, N. Different types of oestrous cycle in two closely related South American rodents (*Cavia aperea* and *Galea musteloides*) with different social and mating systems. **Reproduction**. v. 121, p. 791-801, 2001.

TROWBRIDGE, J. M.; GALLO, R. L. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. **Glycobiology**. v. 12, p. R117-R125, 2002.

TSUKAGUCHI, H.; SHAYAKUL, C.; BERGER, U. V.; MACKENZIE, B.; DEVIDAS, S.; GUGGINO, W. B. Molecular Characterization of a broad selectivity neutral solute channel. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 737-743, 1998.

UPHAM, N. S.; PATTERSON, B. D. Diversification and biogeography of the neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). **Molecular Phylogenetic Evolution**. v. 63, p. 417-429, 2012.

UEHARA, Y.; MINOWA, O.; MORI, C. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. **Nature**. v. 373, n. 6516, p. 702-705, 1995.

UOTINEN, N.; PUUSTINEN, R.; PASANEN, S.; MANNINEN, T.; KIVINEVA, M.; SYVALA, H.; TUOHIMAA, P.; YLIKOMI, T. Distribution of progesterone receptor in female mouse tissues. **General Comparative Endocrinology**. v. 115, p. 429-441, 1999.

WALTER, C. A.; MIGLINO, M. A.; SANTOS, T. C.; BONATELLI, M.; AMBRÓSIO, C. E. Vascularização arterial e estrutura das tubas uterinas em caprinos sem raça definida. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 38, n. 3, p. 106-109, 2001.

WANG, H.; ERIKSSON, H.; SAHLIN, L. Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**. v. 63, p. 1331-1340, 2000.

WARDA, M.; ZHANG, F.; RADWAN, M.; ZHANG, Z.; KIM, N.; KIM, Y. N. Is human placenta proteoglycan remodeling involved in pre-eclampsia? **Glycoconjugate Journal**. v. 25, n. 5, p. 441-450, 2008.

WARE, C. B.; HOROWITZ, M. C.; RENSHAW, B. R. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. **Development**. v. 121, n. 5, p. 1283-1299, 1995.

WASSERMAN, L.; SHLESINGER, H.; ABRAMOVICI, A.; GOLDMAN, J. A.; ALLALOUF, D. Changes in glycosaminoglycan composition of normal human placentas with maturation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 138, p. 763-768, 1980.

WASSERMAN, L.; ABRAMOVICI, A.; SHLESINGER, H.; GOLDMAN, J. A.; ALLALOUF, D. Histochemical localization of acidic glycosaminoglycans in normal human placentae. **Placenta**. v. 4, n. 1, p. 101-108, 1983.

WASSERMAN, P. M.; JOVINE, L.; LITSCHER, E. S. A profile of fertilization in mammals. **Nature Cell Biology**. v. 3, p. 59-64, 2001.

WELSH, A. O.; ENDERS, A. C. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and degeneration. **American Journal of Anatomy**. v. 172, p. 1-29, 1985.

WELSH, A. O.; ENDERS, A. C. Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of rat. **Anatomical Record**. v. 217, p. 203-219, 1987.

WEI, L. L.; NORRIS, B. M.; BAKER, C. J.; An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR (c), forms heterodimers with PR (b) but interferes in PR (b)-DNA binding. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 62, p. 287-297, 1997.

WEISZ, A.; CICATIELLO, L.; PERSICO, E.; SCALONA, M.; BRESCIANI, F. Estrogen stimulates transcription of c-jun protooncogene. **Molecular Endocrinology**. v. 4, p. 1041-1050, 1990.

WESTWOOD, F. R. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. **Toxicologic Pathology**. v. 36, p. 375-384, 2008.

WEWER, U. M.; FABER, M.; LIOTTA, L. A.; ALBRECHTSEN, R. Immunochemical and ultrastructural assessment of the nature of the pericellular basement membrane of human decidual cells. **Laboratory Investigation**. v. 53, p. 624-633, 1985.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference**. 3. ed. Johns Hopkins University Press, 1993. 2142p.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference**. 3. ed. Johns Hopkins University Press, 2005. 2141p.

WIMSATT, W. A.; WISLOCKI, G. B. The placentation of the American Shrews, *Blarina brevicauda* and *Sorex fumeus*. **American Journal of Anatomy**. v. 80 p. 361-435, 1947.

WIMSATT, W. A. Some comparative aspects of implantation. **Biology of Reproduction**. v. 12, p. 1-40, 1975.

WIRA, C. R.; SANDOE, C. P. Sex steroid hormone regulation of IgA and IgG in rat uterine secretions. **Nature**. v. 268, p. 534-536, 1977.

WIRA, C. R.; STERN, J. Endocrine regulation of the mucosal immune system in the female reproductive tract: control of IgA, IgG, and secretory component during the reproductive cycle, at implantation and throughout pregnancy. **Hormones and fetal pathophysiology**. v. 32, p. 343-368, 1992.

WISLOCKI, G. B.; DEANE, W.; DEMPSEY, E. W. The histochemistry of the rodent's placenta. **The American Journal of Anatomy**. v. 78, p. 281-347, 1946.

WISLOCKI, G. B.; PADYKULA, H. A. Reichert's Membrane and Yolk Sac of the rat investigated by Histochemical means. **American Journal of Anatomy**. v. 92, p. 117-151, 1953.

WITSCHI, E. **Development of Vertebrates**. German: Hardcover – Import, 1956. 588p.

WOLBANK, S.; STADLER, G.; PETERBAUER, A.; GILLICH, A.; KARBIENER, M.; STREUBEL, B.; WIESER, M.; KATINGER, H.; VAN GRIENSVEN, M.; REDL, H. Telomerase immortalized human amnion- and adipose-derived mesenchymal stem cells: maintenance of differentiation and immunomodulatory characteristics. **Tissue Engineering Part A**. v. 15, p. 1843-1854, 2009.

WOLFF, J. O.; SHERMAN, P. W. **Rodent Societies: An Ecological Evolutionary Perspective**. 1. ed. Chicago: The University of Chicago Press, 2007. 610p.

WOOLLETT, L. A. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 82, p. 1155-1161, 2005.

WORD, R. A.; LI, X. H.; HNAT, M.; CARRICK, K. Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: mechanisms and current concepts. **Seminars in reproductive medicine**. v. 25, n. 1, p. 69-79, 2007.

WURST, W.; BALLY-CUIF, L. Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. **Nature Reviews**. v. 2, p. 99-108, 2001.

VALE, A. M. **Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831).** 2011. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2011.

VAN AARDE, R. J.; SKINNER, J. D. Functional anatomy of the ovaries of pregnant and lactating Cape porcupines, *Hystrix africaeaustralis*. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 76, p. 553-559, 1986.

VIGER, R. S.; SILVERSIDES, D. W.; TREMBLAY, J. J. New insights into the regulation of mammalian sex determination and male sex differentiation. **Vitamin and Hormone**. v. 70, p. 387-413, 2005.

VILELA, M. G.; JÚNIOR, J. L. S.; SILVA, J. G. C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**. v. 35, n. 10, p. 667-670, 2007.

VOGEL, K. G.; PAULSSON, M.; HEINEGARD, D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan from tendon. **Biochemistry Journal**. v. 223, p. 587-597, 1984.

VON RICHER, W. The utilization and management of wild animals. **Animal Research and Development**. v. 10, p. 93-103, 1979.

YIN, Y.; MA, L. Development of the mammalian female reproductive tract. **Journal of Biochemistry**. v. 137, p. 677-683, 2005.

YAMAMOTO, H.; FLANNERY, M. L.; KUPRIYANOV, S. Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. **Genes and Development**. v. 12, n. 9, p. 1315-1326, 1998.

YASUI, M.; HAZAMA, A.; KWON, T. H.; NIELSEN, S.; GUGGIO, W. B.; AGRE, P. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. **Nature**. v. 402, p. 184-191, 1999.

ZHOU, Y.; DAMSKY, K.; CHIU, K.; ROBERTS, J. M.; FISHER, S. J. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. **Journal of Clinical Investigation**. v. 91, p. 950-960, 1993.

ZHUO, L.; YONEDA, M.; ZHAO, M.; YINGSUNG, W.; YOSHIDA, N.; KITAGAWA, Y.; KAWAMURA, K.; SUZUKI, T.; KIMATA, K. Defects in SHAP-Hyaluronan complex causes severe female infertility. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, n. 11, p. 7693-7696, 2001.

ZOGMO, M. A. **Aspectos reprodutivos da fêmea de mocó (*Kerodron rupestris*): Análise bioquímica dos líquidos fetais e caracterização colpocitológica do ciclo estral.** 2002. 67f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47731-1	Data da Emissão: 27/07/2015 16:36	Data para Revalidação*: 25/08/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: André Menezes do Vale	CPF: 008.354.344-94
Título do Projeto: Glicosaminoglicanos sulfatados nos eventos reprodutivos em preás fêmeas (Galea spixii Wagler, 1831)	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Formação dos grupos de animais	04/2015	04/2015
2	Coleta das amostras	04/2015	06/2015
3	Processamento do material com os dados de morfologia e hormonais	07/2015	12/2015
4	Análise do material para quantificação química e determinação dos glicosaminoglicanos	12/2015	07/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Hugo Alexandre de Oliveira Rocha	Colaborador	761.118.304-49	1163386 SSP-RN	Brasileira
2	GLEIDSON BENEVIDES DE OLIVEIRA	Colaborador	013.586.734-70	2329578 SSP-RN	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MOSSORO	RN	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA)	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
---	-----------	--------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 56213672





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47731-1	Data da Emissão: 27/07/2015 16:36	Data para Revalidação*: 25/08/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: André Menezes do Vale	CPF: 008.354.344-94
Título do Projeto: Glicosaminoglicanos sulfatados nos eventos reprodutivos em preás fêmeas (<i>Galea spixii</i> Wagler, 1831)	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Galea spixii</i>
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Galea spixii</i> (*Qtde: 8)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

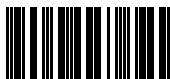
1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Puçá
3	Método de marcação (Outros mamíferos)	Tatuagem (tinta)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 56213672





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47731-1	Data da Emissão: 27/07/2015 16:36	Data para Revalidação*: 25/08/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: André Menezes do Vale	CPF: 008.354.344-94
Título do Projeto: Glicosaminoglicanos sulfatados nos eventos reprodutivos em preás fêmeas (<i>Galea spixii</i> Wagler, 1831)	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Registro de coleta imprevista de material biológico

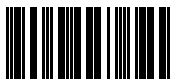
De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 56213672



Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831)¹

André M. Vale^{2*}, Gleidson B. Oliveira², Phelipe O. Favaron³, Maria A. Miglino³,
Valeria V. Paula², Alexandre R. Silva² e Moacir F. Oliveira²

ABSTRACT- Vale A.M., Oliveira G.B., Favaron P.O., Miglino M.A., Paula V.V., Silva A.R. & Oliveira M.F. 2013. [Dynamics of yolk sac inversion in galea (*Galea spixii* Wagler, 1831).] Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, BR 110 Km 47, Rodovia Presidente Costa e Silva s/n, Mossoró, RN 59625-900, Brazil. E-mail: andre_bioquimico@hotmail.com

The aim of this study was to study the time of yolk sac inversion as well as the dynamics resulting from this process in galea throughout pregnancy. For this, conventional histological techniques, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy were used. Parietal and visceral endoderm delimiting the yolk sac cavity was observed at 12 days of pregnancy. The parietal endoderm was coating the fetal surface of the chorioallantoic placenta as well as delimiting the decidua capsularis area. This endoderm had prismatic format and were apart from the trophoblast by an enlarged *Reichert's* membrane. The visceral endoderm had vitelline vessels and there were villi only in certain areas. At 14 days of pregnancy the yolk sac inversion was characterized by the degeneration of parietal endoderm and mural trophoblast, and also the gradual disappearance of the *Reichert's* membrane. So it made the visceral endoderm establish an interface with the uterine epithelium. After the inversion, the parietal endoderm which remained intact was the one that rested on the chorioallantoic placenta surface. It presented cells with high columnar format and pseudostratified epithelium featured. The visceral endoderm presented many apical villi, especially in areas close to the chorioallantoic placenta. The continued development of the embryo and chorioallantoic placenta evidenced the emergence of an important apposition area between visceral and parietal endoderm. The yolk sac inversion represented an anatomical arrangement in favor of the embryo development as well as an evolutionary trait in this rodent species.

INDEX TERMS: Galea, *Galea spixii*, yolk sac, visceral endoderm, parietal endoderm, inversion.

RESUMO.- O objetivo deste trabalho foi estudar o período de inversão do saco vitelino bem como a dinâmica resultante deste processo na gestação inicial em preás, utilizando-se microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. No décimo segundo dia de gestação observou-se o desenvolvimento dos endodermas parietal

e visceral delimitando a cavidade do saco vitelino. O endoderma parietal foi evidenciado revestindo a superfície fetal da placenta corioalantoidea bem como contornando o espaço delimitado pela decidua capsular. Estes endodermas apresentaram formato prismático e encontraram-se separados do trofoblasto por uma desenvolvida membrana de *Reichert*. Já o endoderma visceral continha vasos vitelínicos e possuía vilosidades apenas em determinadas áreas. No décimo quarto dia de gestação verificou-se a inversão do saco vitelino, caracterizada pela degeneração do endoderma parietal e trofoblasto mural, associado ao desaparecimento gradual da membrana de *Reichert*. Como consequência deste fenômeno, o endoderma visceral passou a constituir uma interface com o epitélio uterino. Após a inversão, o endoderma parietal que permaneceu íntegro foi

¹ Recebido em 12 de setembro de 2012.

Aceito para publicação em 2 de maio de 2013.

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN 59625-900, Brasil. *Autor para correspondência: andre_bioquimico@hotmail.com

³ Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brasil.

aquele que se apoiava na superfície da placenta corioalantóidea, apresentando células em formato colunar alto e característica de epitélio pseudoestratificado. O endoderma visceral apresentou numerosas vilosidades apicais principalmente em regiões próximas a placenta corioalantóidea. Com o contínuo desenvolvimento do embrião e placenta corioalantóidea, observou-se o surgimento de importante área de aposição entre os endodermas visceral e parietal. A inversão do saco vitelino representou uma disposição anatômica favorável ao desenvolvimento embrionário, além de ser uma característica evolutiva nesta espécie de roedor.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Préa, *Galea spixii*, saco vitelino, endoderma visceral, endoderma parietal, inversão.

INTRODUÇÃO

A utilização de roedores em pesquisas envolvendo aspectos funcionais da placenta, seja ela corioalantóidea ou vitelina, vem sendo cada vez mais requisitado, mediante as vantagens apresentadas por esses animais. Essas vantagens vão desde características da biologia, principalmente àquelas relacionadas ao pequeno porte, baixo custo de manutenção e curto período de gestação, até a semelhança com a placenta e o processo de placentação em humanos, uma vez que ambos possuem uma placenta discoidal, corioalantóidea e hemocorial, o que torna os roedores um interessante modelo experimental para o entendimento da placentação e mecanismos fisiológicos e moleculares de trocas materno-fetais (Carter 2007). Embora a grande maioria dessas características tenha permanecido estáveis ao longo da evolução dos roedores, trabalhos tem mostrado que pode haver variações relacionadas à presença de estruturas acessórias à placenta corioalantóidea, como é o caso da subplacenta nos roedores da Subordem Histricomorfa (Miglino et al., 2004, Bonatelli et al. 2005, Oliveira et al. 2006, 2008 e 2012a) e das características do saco vitelino, que nas diferentes espécies de roedores de um modo geral, forma uma placenta vitelina invertida ativa para trocas materno-fetais, presente até o final da gestação (Mossman 1987, Miglino et al. 2008, Favaron et al. 2011, 2012, Oliveira et al. 2012a, 2012b).

O saco vitelino é a primeira membrana que se forma com a função de estabelecer trocas entre a mãe e o embrião (Mossman 1987). Embora seja sabido que o mesmo desempenha muitas e importantes funções ao longo de toda a gestação, as características relacionadas ao seu desenvolvimento, especialmente com relação à formação da placenta vitelina invertida nos roedores, ainda são bastante escassos (Conceição et al. 2008, Miglino et al. 2008, Oliveira et al. 2012b).

Na gestação inicial desenvolve-se o saco vitelino cuja conformação espacial dos seus endodermas origina a placenta vitelina. A membrana fetal mais externa refere-se ao endoderma parietal que reveste tanto a superfície da placenta corioalantóidea -ou principal- quanto o trofoblasto mural, delimitando todo o saco gestacional. O endoderma visceral possui localização mais interna apresentando uma região de inserção na placenta principal e ainda acompanha todo o contorno promovido pelo endoderma parietal (Anderson 1959, Jollie 1990).

A inversão do saco vitelino constitui a característica mais marcante que ocorre nas membranas fetais dos roedores, sendo um fenômeno resultante da degeneração do endoderma parietal, membrana de *Reichert* subjacente e trofoblasto mural. Como consequência, o endoderma visceral passa a formar uma interface com o tecido materno, tornando-se exposto as secreções produzidas pelas glândulas uterinas (King 1982, Mossman 1987, Jollie 1990).

O saco vitelino invertido de roedores desempenha várias funções podendo-se destacar aquelas relacionadas ao armazenamento, absorção e transferência de nutrientes (Laliberté et al. 1984, Carter 2001, Holson et al. 2005, Favaron et al. 2012). De fato, distúrbios nestas funções produzidas por agentes teratogênicos, por exemplo, podem explicar possíveis doenças no recém-nascido (Jollie 1990). Esses mecanismos podem ser melhor compreendidos pelo conhecimento da morfofisiologia do saco vitelino e o consequente processo de inversão dessa membrana fetal.

Neste estudo buscou-se descrever o processo de inversão do saco vitelino no preá, um pequeno roedor pertencente à subordem Hystricomorpha e família Caviidae, bem como a morfofisiologia dessa membrana na fase inicial da gestação, utilizando-se de técnicas de microscopia de luz, eletrônica de varredura e de transmissão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 30 fêmeas não gestantes de préas para formação de cinco grupos experimentais contendo seis fêmeas cada. Os animais foram obtidos no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, registrado junto ao IBAMA como criadouro científico sob o número 1478912. As respectivas fêmeas foram alocadas em boxes de 5m² nos quais foi fornecida alimentação apropriada e água *ad libitum*. Para diferenciação destas, foram realizadas marcações com tinta capilar negra, em diferentes regiões anatômicas seguidas da adição de um macho em cada box. A cópula e o consequente início de gestação foram detectados mediante exames de citologia vaginal, onde a presença dos espermatozoides culminaram com a separação do box no qual a fêmea se encontrava para a realização da coleta dos sacos gestacionais. Para tanto, os animais foram pesados e pré-medicados com a associação de cloridrato de xilazina (1mg.kg⁻¹) e cetamina (15mg.kg⁻¹) seguida da overdose anestésica de tiopental sódico (50mg.kg⁻¹) e administração de cloreto de potássio 2,56mEq.kg⁻¹ ambos por via intravenosa. Constatada a morte do animal, realizou-se uma incisão longitudinal mediana, de forma a expor o útero gravídico para retirada dos sacos gestacionais.

A detecção da inversão do saco vitelino e ainda a definição do período da sua ocorrência foram realizados mediante análises de sacos gestacionais com 11, 12, 14, 15, 25 e 30 dias de gestação, até que se fosse evidenciada uma disposição das membranas fetais em situação anterior a inversão. Uma vez que a inversão do saco vitelino foi evidenciada no 14º dia de gestação, atenção especial foi dada a esse período. Para tanto, foram processados e analisados três sacos gestacionais com 14 dias de gestação, oriundos de diferentes fêmeas de modo a ratificar o processo de inversão. Desta forma, todas as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% tamponado e transferidos para uma série de concentrações crescentes de álcoois (70-100%). Posteriormente, os sacos gestacionais foram diafanizados em xilol e embebidos em parafina histológica (Synt®, granulada com ponto de fusão 58°C a 62°C, lote: 138199) para obtenção dos blocos. Estes últimos

foram cortados a 5 µm de espessura em micrótomo (LEICA RM 2125 RT®), sendo os cortes aderidos em lâminas histológicas e corados segundo a técnica de hematoxilina e eosina (HE), azul de toluidina (AT) e ácido periódico de Schiff (PAS). As imagens mais representativas foram fotomicrografadas em microscópio óptico (Olympus CX 31 RBSFA®).

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada mediante o processamento de um saco gestacional de 30 dias, o qual foi fixado em glutaraldeído 2,5% tamponado e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%. Em seguida, foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4 e duas, com água destilada para tratamento posterior com ácido tânico 1% e desidratação em diferentes concentrações de álcoois (50%, 70%, 90% e 100%). Finalizada a desidratação foi feita a secagem em aparelho de ponto crítico utilizando gás carbônico. As seguintes etapas consistiram na montagem do material em suporte de amostra (Stub) e recobrimento metálico com ouro por "sputtering", para observação em microscópio eletrônico de varredura (LEO VP® 435- Carls-Zeis, Oberkochen, Germany).

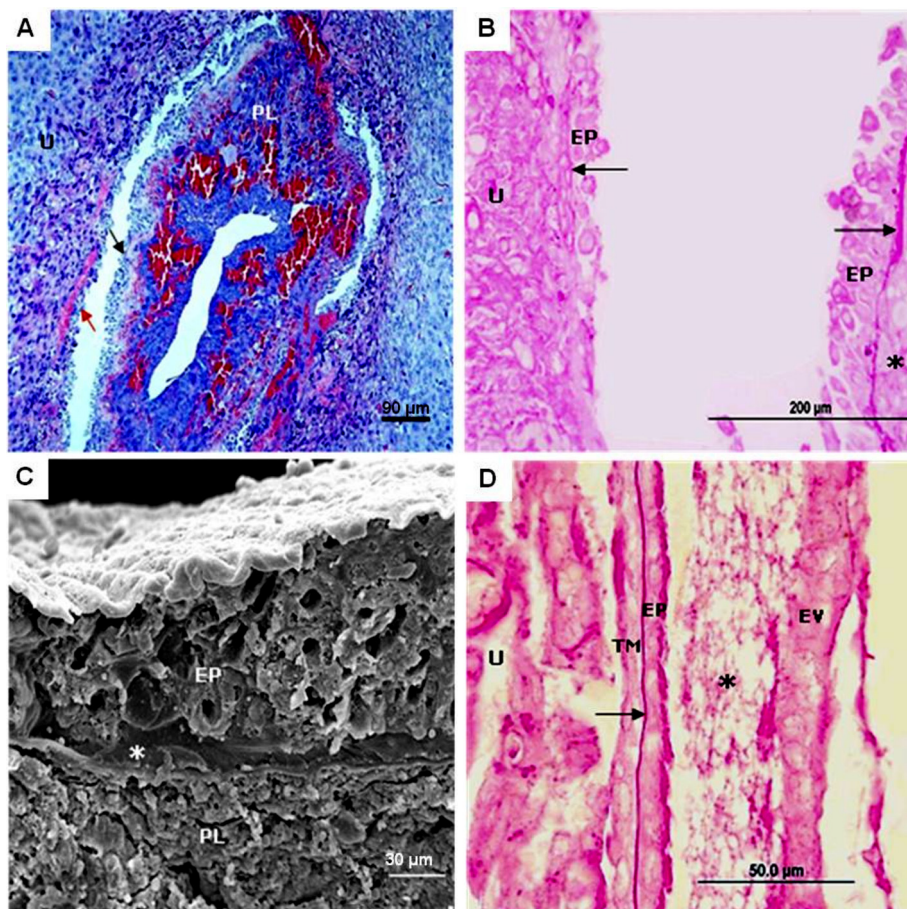
Para análise ultraestrutural, utilizaram-se fragmentos com 0,5cm² da placenta vitelina visceral obtida no décimo quarto dia de gestação. Estes foram fixados em glutaraldeído a 2,5% tamponado e pós-fixados em tetróxido de ósmio. Após este procedimento, os fragmentos foram lavados em solução tampão de fosfato de sódio e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico: 50%, 70%, 80%, 90% e 100%. Os fragmentos foram submetidos a lavagens em óxido de propileno sob rotação e depois, imersos em óxido de propileno e resina Spurr. Finalmente, foram colocados em contato com resina Spurr pura, em moldes específicos, para polimerização. Obtidos os blocos, foram realizados cortes semifinos com 0,4mm de espessura em ultramicrotomo au-

tomático (Ultracut R, Leica Microsystems - Germany), corados com azul de Toluidina a 1% para identificação de regiões específicas de interesse para o trabalho de forma a possibilitarem a realização dos cortes ultrafinos. Posteriormente, cortes de 0,07mm de espessura foram coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila saturado a 2% e citrato de chumbo a 0,5%. O material foi analisado em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268D, FEI Company, The Netherlands; Mega View III câmera, Soft Imaging, Germany).

RESULTADOS

No décimo segundo dia de gestação, verificou-se o desenvolvimento de uma placenta corioalantóidea acompanhado da formação dos endodermas visceral e parietal delimitando a cavidade do saco vitelino e constituindo a placenta vitelínica. O endoderma parietal revestiu a superfície da placenta corioalantóidea, bem como a região da decídua capsular (Fig.1A). Este endoderma apresentou-se separado do trofoblasto e útero por uma desenvolvida membrana basal de Reichert a qual se apresentou positiva para a reação do ácido periódico de Schiff (PAS) como observado na (Fig.1B). Nestes locais, as células endodérmicas apresentaram formato colunar e numerosas vilosidades ao longo do disco placentário. Já a porção de endoderma parietal que se encontrava associado ao trofoblasto mural e desta forma, circunscrevia toda a área da decídua capsular, apresentou grânulos glicoproteicos fortemente positivos para a reação PAS nas superfícies apicais das células endodérmicas. Estas células possuíam morfologia prismática e apoiavam-se

Fig.1. Disposição do endoderma parietal antes da inversão em preás aos 12 dias de gestação. (A) Corte transversal do saco gestacional demonstrando o revestimento das células endodérmicas parietais (seta preta) na superfície da placenta corioalantóidea (PL) e no útero (U) (seta vermelha). Hematoxilina e eosina (HE). (B) Corte transversal do saco gestacional evidenciando o revestimento endodérmico parietal do saco vitelino (EP) no útero (U) e placenta principal (*); observar a proeminente membrana de Reichert (setas) positiva para a reação do ácido periódico de Schiff. Ácido Periódico de Schiff. (C) Observar a membrana de Reichert (*) separando o endoderma parietal (EP) do sincício marginal da placenta corioalantóidea (PL). Microscopia eletrônica de varredura. (D) Região distante da placenta corioalantóidea; observar o útero (U), o trofoblasto mural (TM) e os endodermas parietal (EP) e visceral (EV) delimitando a cavidade do saco vitelino (*). A seta preta refere-se à membrana basal de Reichert. Ácido Periódico de Schiff.



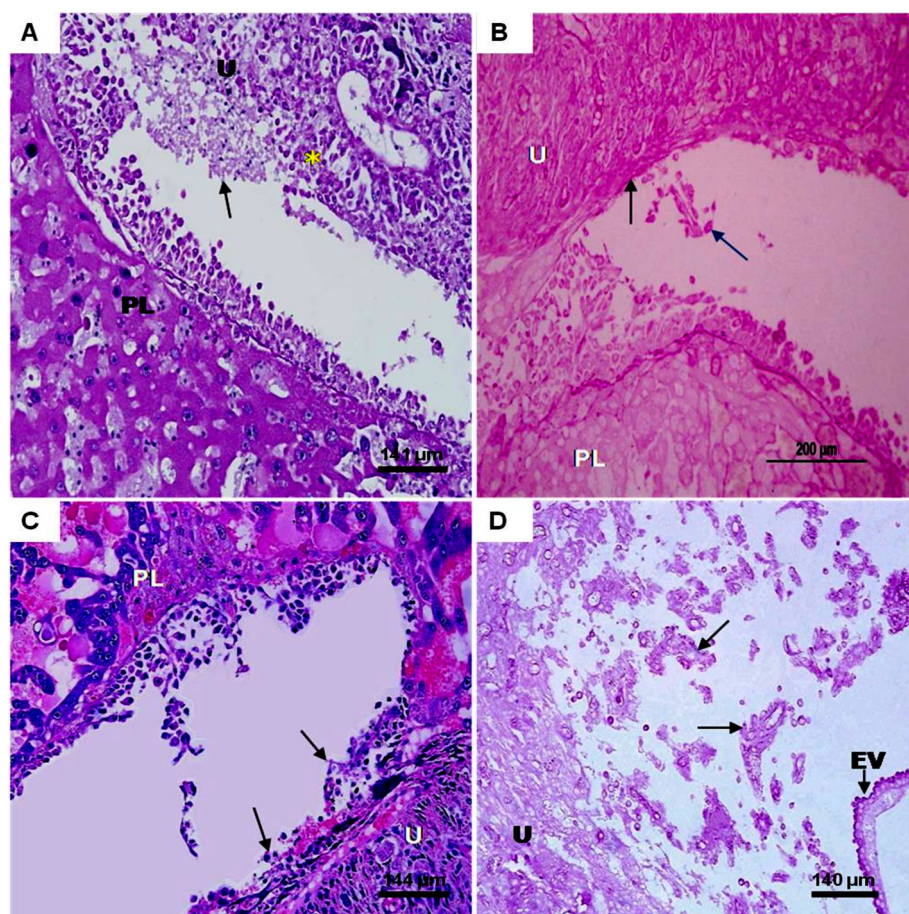


Fig.2. Inversão do saco vitelino no décimo quarto dia de gestação em três sacos gestacionais de preás. (A) Saco gestacional um (SG1); notar o início da degeneração da onfalopleura bilaminar (*) e extravasamento de sangue materno (seta) no interstício entre a placenta corioalantóidea (PL) e o útero (U). HE. (B) Saco gestacional dois (SG2); observar a degeneração de células endodérmicas parietais (seta azul) opostas à placenta corioalantóidea (PL) e escassez da membrana de Reichert (seta preta) distribuída apenas em alguns locais próximo à parede do útero (U). Ácido periódico de Schiff. (C,D) As figuras fazem referência ao saco gestacional três (SG3). (C) Desorganização epitelial do endoderma parietal (setas) revestindo a superfície do útero (U) em região próxima à placenta corioalantóidea (PL). HE. (D) Extrema degeneração de células parietais (setas) próximo à parede uterina (U) e a presença do endoderma visceral (EV). Ácido periódico de Schiff.

na membrana basal de Reichert cujo aspecto contínuo foi bem evidenciado pela microscopia eletrônica de varredura (Fig.1C). Em disposição mais interna, acompanhando o endoderma parietal e envolvendo o embrião, evidenciou-se o endoderma visceral que por sua vez era vascularizado pelo mesoderma subjacente que continha vasos sanguíneos vitelínicos (Fig.1D).

O décimo quarto dia da gestação foi caracterizado pela inversão do saco vitelino. Nos três botões embrionários analisados, observou-se elevada desorganização estrutural das células endodérmicas parietais que revestiam a decídua capsular. Devido ao fato da presença de pequenas diferenças individuais terem sido observadas em cada saco gestacional analisado, procurou-se descrever as respecti-

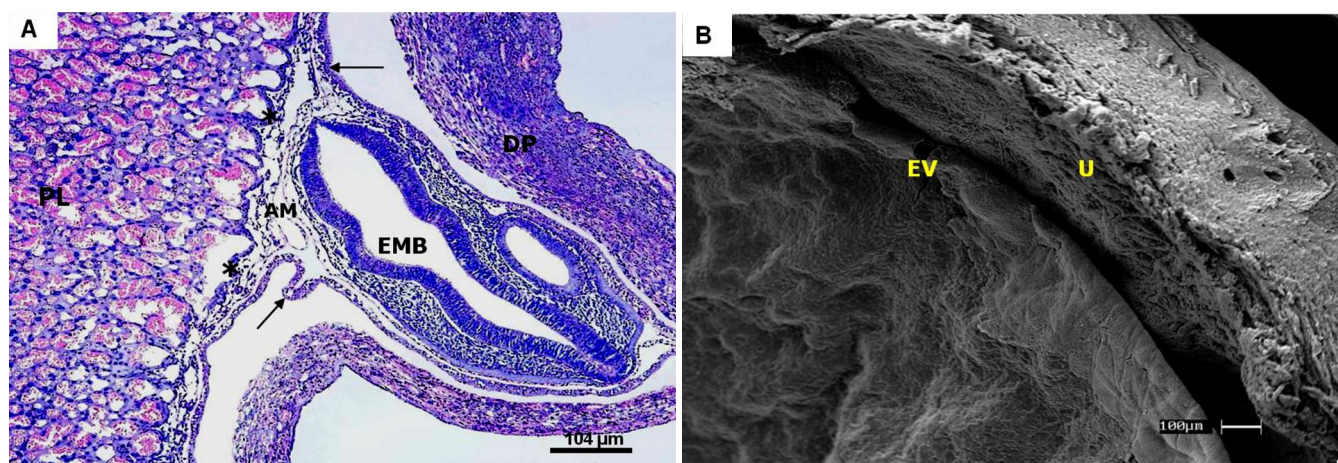


Fig.3. Componentes do saco gestacional de preás aos 15 dias de gestação. (A) Observar o desenvolvimento da placenta corioalantóidea (PL), embrião (EMB) e âmnio (AM) resultando em aproximações dos endodermas visceral (setas) e parietal (*) na região da placenta principal. Notar ainda a decídua parietal (DP) estabelecida após a inversão do saco vitelino. HE. (B) Confluência entre o endoderma visceral (EV) e o útero (U). Microscopia eletrônica de varredura.

vas modificações observadas denominando cada amostra como saco gestacional um (SG1), dois (SG2) e três (SG3). No SG1 verificaram-se degeneração inicial da onfaloopleura bilaminar, localizada próxima à placenta principal e áreas de sangue materno extravasado (Fig.2A). Já no SG2 evidenciaram-se degenerações do endoderma parietal e a presença de resquícios da membrana de *Reichert* em aposição ao tecido uterino (Fig.2B). No SG3 o revestimento epitelial de endoderma parietal apresentou-se descontínuo próximo à placenta principal e completamente desestruturado em locais distantes da mesma (Fig.2C,D).

No décimo quinto dia de gestação destacaram-se as expansões do embrião e placenta corioalantóidea, além do endoderma visceral que circunscrevia todo o contor-

no da decídua parietal. Com o rompimento da onfaloopleura bilaminar criou-se um mecanismo de aposição entre o endoderma visceral e útero de modo a garantir efetivas trocas de substâncias entre os tecidos maternos e fetais. Desta forma, as células endodérmicas viscerais tornavam-se completamente expostas ao conteúdo secretado pelas glândulas uterinas (Fig.3A,B).

As relações de aposição verificadas entre os endodermas localizados próximos à placenta corioalantóidea favoreceram a interpretação de importantes locais para o intercâmbio de substâncias, constituindo vias bidirecionais entre placenta e embrião. Nestes locais, as células viscerais possuíam formato colunar; numerosas vilosidades e núcleos localizados na posição basal da célula. Além disso, tornou-se evidente aos 25 dias de gestação, a caracterização da esplanonopleura como sendo constituída por células endodérmicas viscerais que repousavam sobre uma lâmina basal visceral. Já na superfície externa do epitélio visceral, evidenciou-se uma segunda membrana basal revestindo as células mesoteliais que margeavam o celoma extraembriônico, sendo denominada membrana basal serosa (Fig.4A).

Nas margens da placenta corioalantóidea, verificaram-se processos de aposição entre os endodermas visceral e parietal, sendo suas vilosidades confluentes. De fato, esta relação estrutural pode vir a conferir possíveis rotas de transferências de substâncias ao embrião constituindo uma importante placenta vitelina (Fig.4B).

Conforme descrito, as modificações verificadas no tocante à disposição espacial das membranas fetais do saco gestacional conferem certo dinamismo ao processo de inversão, fato este demonstrado também de forma esquemática (Fig.5A-C) para facilitar o entendimento relativo a este processo.

DISCUSSÃO

A compreensão da organização estrutural da placenta vitelina ao longo do período gestacional favorece o estabelecimento de correlações com os aspectos funcionais do saco vitelino. Muitas pesquisas avaliam a estrutura fina das células endodérmicas viscerais e parietais no que diz respeito ao aparato absorptivo bem como das organelas citoplasmáticas presentes neste epitélio. Este fato permite ressaltar a importância de uma placenta vitelina invertida seja para aumentar a contínua demanda anabólica do embrião ou até mesmo como uma característica evolutiva das muitas espécies de roedores.

King & Enders (1970) admitiram a importância de um órgão placentário, na cobaia (*Cavia porcellus*) e em muitas outras espécies de roedores, para transferência de nutrientes ao feto, sendo os mecanismos de transporte de substâncias desencadeados por dois tipos de placentas, uma corioalantóidea e outra denominada placenta vitelina invertida.

Para Calarco & Moyer (1966) a placenta vitelina possui geralmente importância secundária, persistindo como estrutura acessória. No entanto, em muitas espécies de roedores, o saco vitelino apresenta contínuo desenvolvimento durante todo o período gestacional, envolve e protege o embrião além de funções nutritivas e hematopoiéticas. Como brevemente reportado no preá por Oliveira et al. (2012b),

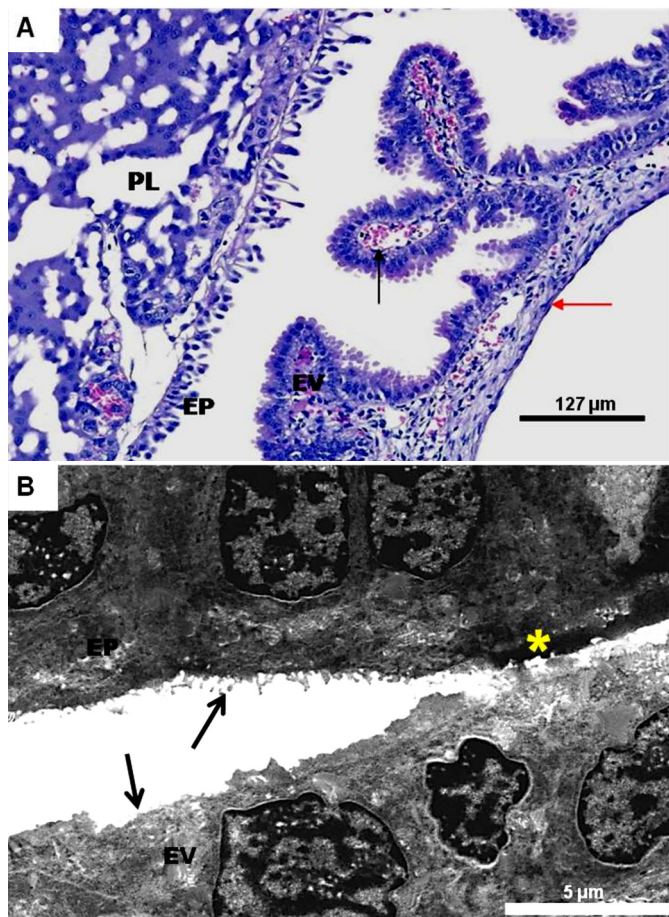


Fig.4. Relações de aposição entre os endodermas visceral (EV) e parietal (EP) as margens da placenta corioalantóidea (PL) em preás aos 25 dias (Fig.A) e no décimo quarto dia de gestação (Fig.B). (A) Formação de tufo ou vilos do endoderma visceral com respectivos núcleos na posição basal da célula; notar a membrana basal visceral (seta preta) e membrana basal serosa (seta vermelha) formando o alicerce do epitélio visceral. Azul de toluidina. (B) Eletromicrografia dos endodermas visceral (EV) e parietal (EP) as margens da placenta corioalantóidea em preás aos 14 dias de gestação. Observar as relações de aposição entre as células e as numerosas microvilosidades apicais (setas) proporcionando possíveis áreas de trocas entre os endodermas. Notar as áreas em que os dois epitélios mantêm íntimo contato (*). Microscopia eletrônica de transmissão.

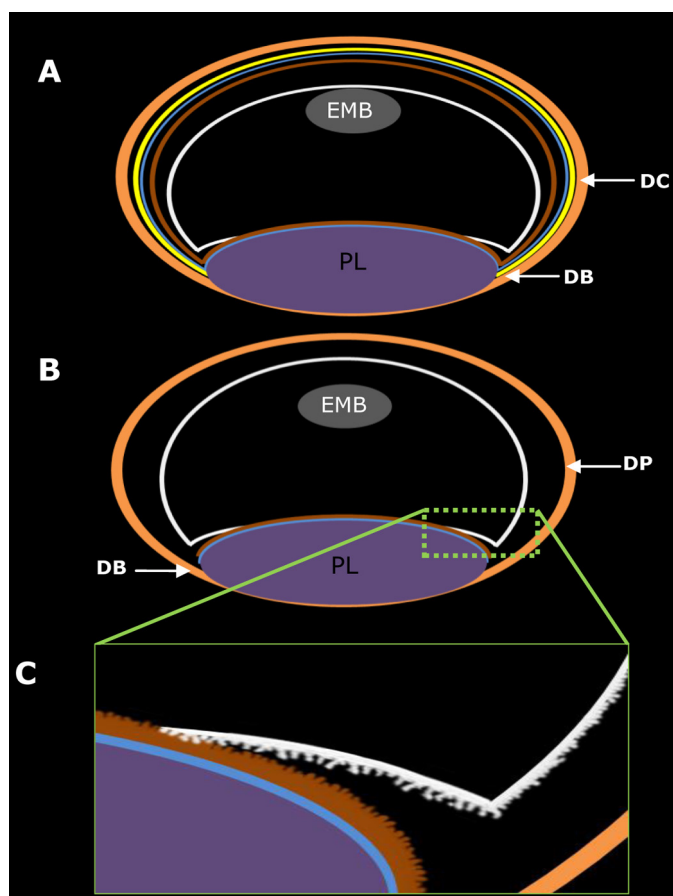


Fig. 5. Representação esquemática dos elementos que compõem o saco gestacional em situação anterior e após a inversão do saco vitelino. (A) Disposição das membranas antes da inversão. Observar o útero, constituído pelas decíduas capsular (DC) e basal (DB). Evidenciar o trofoblasto mural (em amarelo), a membrana de Reichert (em azul) acompanhando todo o contorno do trofoblasto mural e ainda, localizando-se na superfície fetal da placenta corioalantóideia (PL). Em marrom, evidenciar-se o endoderma parietal, contornando a membrana de Reichert e revestindo a superfície fetal da placenta corioalantóideia. Em conjunto, trofoblasto mural, membrana de Reichert e endoderma parietal são denominados onfaloopleura bilaminar. Observar o endoderma visceral (em branco) e as localizações da placenta corioalantóideia e do embrião (EMB). (B) Evidencia-se uma situação posterior à inversão, ocasionada pela degeneração da onfaloopleura bilaminar, resultando em íntima relação entre o endoderma visceral e útero. Este último passa a ser constituído pelas decíduas parietal (DP) e basal (DB). Notar ainda a sintopia com a placenta corioalantóideia (PL) e embrião (EMB). (C) Detalhe das vilosidades dos endodermas parietal (membrana marrom) e visceral (membrana em branco) em região proximal a placenta corioalantóideia, representando importantes locais para o intercâmbio de substâncias.

os autores evidenciaram a presença de células proliferativas nas vilosidades do saco vitelino visceral até o dia 30 de gestação, além de uma intensa vascularização e íntima relação com a parede uterina. Assim como mencionado por Beckman et al. (1990), onde o autor afirma que o saco vite-

lino visceral constitui um importante órgão placentário em roedores, pois estabelece os primeiros mecanismos de intercâmbio nutricional antes da placenta corioalantóideia se tornar desenvolvida. Mesmo após o estabelecimento desta última, as células do endoderma visceral permanecem funcionais durante toda a gestação, desencadeando diversas funções metabólicas, secretoras e imunológicas.

A atividade das células vitelinas, principalmente do endoderma do saco vitelino em fases mais tardias de gestação (meio e final de gestação) também foi descrita para outras espécies de roedores histicomorfos como a paca (*Cuniculus paca*), cutia (*Dasyprocta leporina*), mocó (*Kerodon rupestris*) e porquinho da Índia (*Guinea pig*), mediante utilização de técnicas de imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão (Bonatelli et al. 2005, Oliveira et al. 2006, 2008, 2012a, 2012b, Conceição et al. 2008, Miglino et al. 2008).

Anderson (1959) ao analisar a placenta vitelina de ratos com o auxílio da microscopia de luz, constatou que a partir do décimo primeiro dia de gestação o saco vitelino era bem desenvolvido, contrastando com a presença de uma imatura placenta corioalantóideia. O autor destacou que a placenta vitelina era constituída inicialmente por duas membranas endodérmicas: uma visceral e outra parietal, delimitando a cavidade do saco vitelino. A camada parietal que revestia a decídua capsular apoiava-se numa membrana hialina de Reichert e suas células endodérmicas demonstravam formato colunar baixo, além de curtas microvilosidades apicais. Na superfície do epitélio visceral e abaixo da membrana basal que sustentava este epitélio, verificaram-se curtas vilosidades e poucos vasos vitelínicos respectivamente. Os resultados obtidos em preás demonstraram comportamento similar aos descritos por Anderson (1959) nos períodos estudados antes da inversão do saco vitelino. É importante destacar que a disposição do epitélio visceral apresentou comportamento relativamente constante a partir do décimo quarto dia de gestação, sendo evidenciadas áreas de intensa formação vilosa cujo aspecto convoluto direcionava-se para o endoderma parietal da superfície da placenta principal. Já nos locais distais desta placenta, verificavam-se células prismáticas dotadas de poucas vilosidades, podendo ser caracterizadas como região lisa do endoderma visceral. Tais características estão de acordo com as observações produzidas por Sansom (1922), Wislocki et al. (1946), Anderson (1959), Jollie (1990), Oliveira et al. (2008) e Freyer & Renfree (2009) para outras espécies de roedores.

A presença de moléculas de glicogênio e/ou substâncias glicoproteicas foram reveladas pela reação de PAS, principalmente nos endodermas parietal e visceral, membrana de Reichert e alguns locais na decídua parietal. Não foram observadas reações positivas para o PAS no sincício marginal da placenta corioalantóideia. Este padrão de positividade de PAS retratado anteriormente mostra-se compatível com aqueles descritos por Haar & Ackerman (1971) para o saco vitelino de camundongo e por Favaron et al. (2011, 2012) para espécies de roedores cricetídeos.

A partir do décimo segundo dia de gestação em preás, verificou-se a presença da membrana de Reichert que se

encontrou interposta entre o endoderma parietal e o trofoblasto da placenta corioalantóidea bem como entre o epitélio parietal e trofoblasto mural da decídua capsular. Essa membrana também foi descrita na placenta de roedores cricetídeos por Favaron et al. (2011) em estágios de meio e final de gestação. Como relatado pelos autores, a mesma possuía uma natureza acelular formada por fibras de natureza colágena.

No décimo quarto dia de gestação em preás, verificou-se o crescimento embrionário e da placenta principal, resultando em aproximações entre o endoderma visceral e parietal as margens da placenta corioalantóidea. Para Cross (1998) esta interface entre os endodermas resulta das transformações e crescimento assimétrico do embrião, acarretando em mudanças espaciais do endoderma visceral e âmnio. Nesta área de interface, as células endodérmicas apresentaram formato poliédrico, núcleos na posição basal e numerosas vilosidades na posição apical, demonstrando o aparato absorptivo nesta região da placenta vitelina.

Em preás as projeções vilosas do endoderma visceral, na região do disco placentário, tornaram-se mais ramificadas a partir do vigésimo quinto dia de gestação, conforme evidenciado pela microscopia de luz, sendo o alicerce das formações vilosas constituídos pela membrana basal visceral e serosa. Segundo Mossman (1987) estas ampliações dos processos digitiformes são decorrentes da inversão do saco vitelino, tornando as bordas apicais do epitélio visceral mais suscetível à captação de substâncias. Consequentemente, as vilosidades aumentam em número e tamanho, acompanhando o desenvolvimento das células viscerais as quais se tornam colunares altas (Dempsey 1953, Anderson 1959, King & Enders 1970).

O endoderma parietal em preás apresentou mudanças importantes durante o período em que foi analisado. Inicialmente aos 12 dias de gestação, foi constituído por células prismáticas ou cuboidais, contendo numerosos grânulos apicais positivos para a reação PAS e elevada relação núcleo/citoplasma. Posteriormente, evidenciou-se aos 25 dias de gestação, aspecto pseudoestratificado do epitélio parietal com células de formato predominantemente colunar. Padrões semelhantes de desenvolvimento foram evidenciados por King (1971) ao analisar a diferenciação do endoderma parietal no porquinho da Índia (*Cavia porcellus*), porém foi diferente da caracterização realizada por Jollie (1968). Segundo este autor, o endoderma parietal do rato ou camundongo mantém forma achatada ou esférica ao longo do período gestacional.

Os resultados por microscopia de luz obtidos em preás demonstraram, durante a inversão, desorganização estrutural do endoderma parietal e desaparecimento gradual da membrana de Reichert. É importante ressaltar que existe a possibilidade de variações no período da inversão, pois muitos fatores individuais podem contribuir para a cinética do desenvolvimento embrionário, acarretando, por sua vez, em alterações capazes de influenciar os mecanismos da inversão. No presente estudo, no entanto, verificou-se homogeneidade no tocante ao período de inversão conforme foi evidenciado nos três sacos gestacionais estudados no décimo quarto de dia de gestação.

A grande maioria dos trabalhos disponíveis hoje na literatura sobre a morfologia do saco vitelino trata, principalmente, de amostras oriundas de estágios tardios de gestação, principalmente devido às dificuldades para se obter amostras de placenta e das membranas extra-embrionárias em fases iniciais. Especificamente no caso do saco vitelino, isso leva a uma lacuna no conhecimento, principalmente relacionado à formação da placenta vitelina, tão importante no início da gestação, inclusive na gestação humana, e cujo correto desenvolvimento leva ao progresso da gestação e consequente sucesso do desenvolvimento embrionário e fetal. Os resultados obtidos no presente estudo permitiram afirmar que em preás ocorre um modelo de placentação vitelínica invertida, cuja inversão propriamente dita ocorre a partir do décimo quarto dia da gestação. Para trabalhos futuros, uma análise quantitativa através de técnicas inovadoras, como a estereologia, associada a análises estatísticas, como no trabalho realizado por Favaron et al. (2013) em diferentes regiões da placenta de *Necomys lasiurus* (Cricetidae), poderá trazer dados numéricos sobre a dinâmica do desenvolvimento do saco vitelino, bem como do volume ocupado por essa membrana e suas diferentes porções (parietal e visceral) e dos diferentes tipos celulares constituintes ao longo da gestação, resultando em dados funcionais sobre a participação da placenta vitelina nos diferentes estágios gestacionais do préa.

REFERÊNCIAS

- Anderson J.W. 1959. The placental barrier to gamma-globulins in the rat. *Am. J. Anat.* 104:403-429.
- Beckman D.A., Koszalka T.R., Jensen M., Brent R.L. 1990. Experimental manipulation of the Rodent visceral yolk sac. *Teratology* 41:395-404.
- Bonatelli M., Carter A.C., Machado M.R.F., Oliveira M.F., Lima M.C. & Miglino M.A. 2005. Placentation in the paca (*Agouti paca* L). *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3:9.
- Calarco P.G. & Moyer F.H. 1966. Structural changes in the murine yolk sac during gestation: cytochemical and electron microscope observations. *J. Morphol.* 119:341-357.
- Carter A.M. 2001. Evolution of the placenta and fetal membranes seen in the light of molecular phylogenetics. *Placenta* 22:800-807.
- Carter A.M. 2007. Animal models of human placentation: a review. *Placenta* 21:41-47.
- Conceição R.A., Ambrósio C.E., Martins D.S., Carvalho A.F., Francioli A.L.R., Machado M.R.F., Oliveira M.F. & Miglino M.A. 2008. Aspectos morfológicos do saco vitelino em roedores da subordem Hystricomorpha: paca (*Agouti paca*) e cutia (*Dasyprocta aguti*). *Pesq. Vet. Bras.* 28(5):253-259.
- Cross J.C. 1998. Formation of the Placenta and Extraembryonic Membranes. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 857:23-32.
- Dempsey E.W. 1953. Electron microscopy of the visceral yolk-sac epithelium of the guinea pig. *Am. J. Anat.* 93(3):331-363.
- Favaron P.O., Carter A.M., Ambrósio C.E., Morini A.C., Mess A.M., Oliveira M.F. & Miglino M.A. 2011. Placentation in Sigmodontinae: a rodent taxon native to South America. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9:55.
- Favaron P.O., Carter A.M., Mess A.M., Oliveira M.F. & Miglino M.A. 2012. An unusual feature of yolk sac placentation in *Necomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). *Placenta* 33:578-580.
- Favaron P.O., Mess A.M., Oliveira M.F., Gabory A., Miglino M.A., Chavatte-Palmer P. & Tarrade A. 2013. Morphometric analysis of the placenta in the New World mouse *Necomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae): a comparison of placental development in cricetids and murids. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11:10.

- Freyer C. & Renfree M.B. 2009. The mammalian yolk sac placenta. *J. Exp. Zool.* 312B:545-554.
- Haar J.L. & Ackerman G.A. 1971. Ultrastructural changes in mouse yolk sac associated with initiation of vitelline circulation. *Anat. Rec.* 170(4):437-455.
- Holson J., Stump D., Pearce L., Watson R. & DeSesso J. 2005. Mode of Action: yolk sac poisoning and impeded histiotrophic nutrition-HBOC-related congenital malformations. *Crit. Rev. Toxicol.* 35:739-745.
- Jollie W.P. 1968. Changes in the fine structure of the parietal yolk sac of the rat placenta with increasing gestational age. *Am. J. Anat.* 122:513-532.
- Jollie W.P. 1990. Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. *Teratology* 41:361-381.
- King B.F. & Enders A.C. 1970. The fine structure of the guinea pig yolk sac placenta. *Am. J. Anat.* 127(4):397-413.
- King B.F. 1971. Differentiation of parietal endoderm cells of the guinea pig yolk sac, with particular reference to the development of endoplasmic reticulum. *Dev Biol.* 26:547-559.
- King B.F. 1982. A freeze-fracture study of the guinea pig yolk sac epithelium. *Anat. Rec.* 202:221-230.
- Laliberté F., Muccielli A. & Laliberté M.F. 1984. Dynamics of antibody transfer from mother to fetus through the yolk sac in the rat. *Biol. Cell.* 50:255-261.
- Miglino M.A., Franciolli A.L.R., Oliveira M.F., Ambrósio C.E., Bonatelli M., Machado M.R.F. & Mess, A. 2008. Development of the inverted visceral yolk sac in three species of caviids (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). *Placenta* 29:748-752.
- Miglino M.A., Carter A.M., Ambrósio C.E., Bonatelli M., Oliveira M.F., Santos Ferraz R.H., Rodrigues R.F. & Santos T.C. 2004. Vascular organization of the hystricomorph placenta: a comparative study in the agouti, capybara, guinea pig, paca and rock cavy. *Placenta* 25:438-48.
- Mossman H.W. 1987. *Vertebrate Fetal Membranes: comparative ontogeny and morphology, evolution, phylogenetic significance, basic functions, research opportunities.* MacMillan Press, London.
- Oliveira M.F., Carter A.M., Bonatelli M., Ambrósio C.E. & Miglino M.A. 2006. Placentation in the rock cavy, *Kerodon rupestris* (Wied). *Placenta* 27:87-97.
- Oliveira M.F., Mess A., Ambrosio C.E., Dantas C.A.G., Favaron P.O. & Miglino M.A. 2008. Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6:1-8.
- Oliveira M.F., Favaron P.O., Ambrósio C.E., Miglino M.A. & Mess A.M. 2012a. Chorioallantoic and Yolk Sac Placentation in *Thrichomys laurentinus* (Echimyidae) and the Evolution of Hystricognath Rodents. *J. Exp. Zool. B, Mol. Dev. Evol.* 318B:13-25.
- Oliveira M.F., Vale A.M., Favaron P.O., Vasconcelos B.G., Oliveira G.B., Miglino M.A. & Mess A. 2012b. Development of yolk sac inversion in *Galea spixii* and *Cavia porcellus* (Rodentia, Caviidae). *Placenta* 33:878-881.
- Sansom G.S. 1922. Early development and placentation in *Arvicola (Microtus) amphibius*, with special reference to the origin of placental giant cells. *J. Anat.* 56:333-365.
- Wislocki G.B., Deane W. & Dempsey E.W. 1946. The histochemistry of the rodent's placenta. *Am. J. Anat.* 78:281-347.



Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Pesquisa Veterinária Brasileira

Manuscript ID

PVB-5239

Title

Caracterização do período gestacional e ciclo reprodutivo em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831)

Authors

VALE, ANDRÉ

Oliveira, Gleidson

ARAÚJO JÚNIOR, HÉLIO

Bezerra, Ferdinando

QUEIROZ, JOÃO

OLIVEIRA JÚNIOR, CARLOS

COSTA, HERSON

Oliveira, Moacir

Date Submitted

24-Jan-2017

[Author Dashboard](#)



Caracterização do período gestacional e ciclo reprodutivo em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831)

Journal:	<i>Pesquisa Veterinária Brasileira</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	VALE, ANDRÉ; Universidade Federal Rural do Semi-Arido, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Oliveira, Gleidson; UFERSA, Ciência Animal ARAÚJO JÚNIOR, HÉLIO; Universidade Federal Rural do Semi-Arido, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Bezerra, Ferdinando; Universidade Federal Rural do Semi-Arido, Ciência Animal QUEIROZ, JOÃO; Universidade Federal Rural do Semi-Arido, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde OLIVEIRA JÚNIOR, CARLOS; Universidade Federal Rural do Semi-Arido, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde COSTA, HERSON; Universidade Federal Rural do Semi-Arido, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Oliveira, Moacir; Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Ciências Animais
Keyword:	Estrous cycle, estrus, pregnancy, rodent, <i>Galea spixii</i>

SCHOLARONE™
Manuscripts

Caracterização do período gestacional e ciclo reprodutivo em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831)

André M. Vale^{2*}, Gleidson B. Oliveira², Hélio N. Araújo Júnior³, Ferdinando V.F. Bezerra², João Paulo A.F. Queiroz², Carlos M. Oliveira Júnior², Herson S. Costa⁴ e Moacir F. Oliveira⁵

ABSTRACT. – Vale A.M., Oliveira G.B., Araújo Júnior H.N., Bezerra F.V.F., Queiroz J.P.A.F., Oliveira Júnior C.M., Costa H.S. & Oliveira M.F. 2017. [Characterization of the gestational period and reproductive cycle in galea (*Galea spixii* Wagler, 1831)]. Caracterização do período gestacional e ciclo reprodutivo em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Rua Francisco Mota 572, Alto de São Manoel, Mossoró, RN 59625-900, Brazil. E-mail: andre.vale@ufersa.edu.br

The Spix's yellow-toothed cavy is a rodent belonging to the Caviidae family, with high biological and zootechnical potential to be explored, being their knowledge about the reproductive aspects fundamental for its creation. Thus, this work had as objective to determine the gestation period in galea as well as, to characterize as phases of the reproductive cycle, verifying, if there was influence of the male presence in this process. For gestational follow-up (G1), five females were used and placed in a box with the male. For the analysis of the estrous cycle, 10 females were used, five of which were placed in a box holding a male trapped in a cage (G2) and added in another box without a male (G3). The females were submitted to daily colpocitological examination and when the presence of spermatozoa was identified in the females slide in G1, it was removed from the group and counted as "zero" day of gestation. Females of G2 and G3 were evaluated over two complete cycles regarding the macroscopic characteristics of the vulva and vaginal smear, counting a total of 100 cells and by qualitative analysis, leukocytes, bacteria and filaments of mucus. It was verified that the gestation period in *Galea* was of 59±2,24 days and that the females present continuous polcitic sexual cycle, with average period of 14,8±0,73 days for the females submitted to the male effect and 14,6±0.75 days for those free of the male effect. Proestrus was characterized by: predominance of parabasal and intermediate cells as well as the presence of bacteria and leukocytes; Estrus: presented numerous superficial cells, with predominance of the anucleated scales with little presence or absence of bacteria; Metaestrus: with large numbers of intermediate cells, neutrophils and bacteria and a regular amount of parabasal cells; Diestrus: predominance of basal, parabasal and intermediate cells and large amount of vaginal mucus, neutrophils and bacteria. The male presence significantly influenced the duration of the diestrus, becoming longer, a fact that may be related to the influence on the production of progesterone in the female. The pattern of characterization of the cycle in galea was similar to that described in other caviids such as capybara, agouti and paca.

INDEX TERMS: Estrous cycle, estrus, pregnancy, rodent, *Galea spixii*.

¹ Recebido em
Aceito para publicação em
² Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Rua Francisco Mota 572, Alto de São Manoel, Mossoró, RN 59625-900, Brasil.
*Autor para correspondência: andre.vale@ufersa.edu.br
³ Discente do curso de graduação em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFERSA, Rua Francisco Mota 572, Alto de São Manoel, Mossoró, RN 59625-900, Brasil.
⁴ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFERSA, Rua Francisco Mota 572, Alto de São Manoel, Mossoró, RN 59625-900, Brasil.
⁵ Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFERSA, Rua Francisco Mota 572, Alto de São Manoel, Mossoró, RN 59625-900, Brasil.

RESUMO. - O preá é um roedor pertencente a família Caviidae, com elevado potencial biológico e zootécnico a ser explorado, sendo o conhecimento sobre os aspectos reprodutivos, fundamentais para que sua criação seja satisfatória. Desta forma, este trabalho teve como objetivo determinar a duração da gestação em preás, bem como, caracterizar as fases do ciclo reprodutivo, verificando, se existe influência da presença do macho neste processo. Para acompanhamento gestacional (G1), utilizou-se cinco fêmeas que foram colocadas em um box com o macho. Para análise do ciclo estral, utilizou-se 10 fêmeas, sendo cinco destas colocadas em box contendo um macho preso em gaiola (G2) e as demais acrescidas em outro box sem o macho (G3). As fêmeas foram submetidas ao exame colpocitológico diário e quando identificado a presença de espermatozoide na lâmina de fêmeas em G1, esta era removida do grupo e contava-se como dia "zero" da gestação. As fêmeas do G2 e G3 foram avaliadas ao longo de dois ciclos completos quanto as características macroscópicas da vulva e esfregaço vaginal, contabilizando-se um total de 100 células e por análise qualitativa, os leucócitos, bactérias e filamentos de muco. Verificou-se que o período de gestação em preás foi de 59±2,24 dias e que as fêmeas apresentam ciclo sexual

poliétrico contínuo, com período médio de $14,8 \pm 0,73$ dias para as fêmeas submetidas ao efeito macho e $14,6 \pm 0,75$ dias para aquelas isentas do efeito macho. O proestro caracterizou-se pelo predomínio de células parabasais e intermediárias bem como pela presença de bactérias e leucócitos; o estro, apresentou numerosas células superficiais, com predomínio das escamas anucleadas com pequena presença ou ausência de bactérias; metaestro, com grande quantidade de células intermediárias, neutrófilos e bactérias e uma quantidade regular de células parabasais; diestro, predomínio de células basais, parabasais e intermediárias e grande quantidade de muco vaginal, neutrófilos e bactérias. A presença do macho influenciou significativamente a duração do diestro, tornando-se mais longa, fato que pode estar atrelado a influência sobre a produção de progesterona na fêmea. O padrão de caracterização do ciclo no preá apresentou-se semelhante ao descrito em outros caviões como capivara, cutia e paca.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Ciclo estral, estro, gestação, roedor, *Galea spixii*.

INTRODUÇÃO

Os roedores possuem uma ampla variedade de formas e tamanhos, cujas particularidades são identificáveis no tocante a dentição, crânio e mandíbula, que os capacitam para atividades relacionadas à alimentação, escavação de túneis e dispersão de sementes, fato este que ratifica sua importância em muitos ecossistemas (BRASIL 2002, WOLFF & SHERMAN 2007). Os modos de vida particulares e diversidades reprodutivas constituem um desafio para os cientistas que utilizam esses animais em experimentos (UPHAM & PATTERSON 2012). Vale ressaltar que mediante o caráter de diversidade e a reconhecível facilidade com que várias espécies de roedores são criadas em cativeiro, muitos estudos genéticos, ecológicos, demográficos e fisiológicos passam a ser justificados e viáveis com a utilização de tais modelos experimentais (WOLFF & SHERMAN 2007).

Neste aspecto, destaca-se o preá, roedor silvestre, pertencente a família Caviidae, que possui como características corpo alongado, superfície dorsal cinza-escura e ventre branco e por serem animais de fácil adaptação ao cativeiro, com elevado potencial biológico e zootécnico, que poderá ser explorado em um futuro próximo (OLIVEIRA et al. 2014, 2015). Tem-se verificado que a criação, em cativeiro, desses animais, é realizada com o intuito de proporcionar o conhecimento e a manutenção da referida espécie, sendo os aspectos reprodutivos, em especial os estudos do período reprodutivo e ciclo estral, fundamentais para que esse processo seja satisfatório (ROBERTS et al. 1984, PINHEIRO et al. 1989).

Associado a isto, a citologia vaginal constitui um método prático, pouco invasivo (MARCONDES et al. 2002, BASTOS et al. 2003) e cujos sistemas de coloração dos esfregaços (Giemsa, Azul de Metileno e Shorr) são relativamente rápidos e eficientes (BARBOSA et al. 2007) de modo que o padrão morfológico e quantitativo das células são importantes na avaliação da integridade do sistema reprodutor feminino (LOHMILLER & SWING 2006, GOLDMAN et al. 2007).

Desta forma, objetivou-se verificar a duração da gestação em preás, bem como, caracterizar as fases do ciclo reprodutivo, analisando a influência do macho neste processo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais e suas respectivas amostras biológicas foram obtidos no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), registrado junto ao IBAMA como criadouro científico sob o número 1478912, sendo o experimento aprovado pelo Comitê de Ética institucional (Processo nº 23091.010264/2015-90).

Em box específico de 5,0 m x 4,0 m foram alocadas cinco fêmeas de preás não gestantes (Grupo 1), as quais, para fins de identificação foram diferenciadas mediante pintura com tinta capilar, em diferentes regiões anatômicas. Após período adaptativo de dez dias, adicionou-se um macho neste local, fato este que resultou nas realizações diárias da citologia vaginal com a finalidade de detectar a presença de espermatozoides e o consequente estabelecimento do início do período gestacional após 24 horas do encontro do gameta masculino. Assim, na medida em que as fêmeas gestavam, estas eram separadas do box em que se encontravam e transferidas para outro, o qual era isento de macho e, por conseguinte, as gestações puderam ser acompanhadas.

Para análise do ciclo estral, dez fêmeas foram utilizadas, sendo cinco, transferidas para um box que continha um macho preso em gaiola de dimensões 107 x 68 x 75 cm (Grupo 2), o que impedia a fecundação e as outras colocadas em box sem o macho (Grupo 3). A determinação do ciclo foi feita, diariamente, por meio da colpocitologia vaginal em esfregaços com o auxílio de corante panótico rápido Instant-Prov (New Prov®) de acordo com as recomendações preconizadas pelo fabricante.

Para tanto, considerou-se como o primeiro dia do ciclo aquele período em que determinada fêmea encontrava-se no estro, apresentando vulva edemaciada e predomínio de células superficiais no esfregaço citológico, sendo estes critérios considerados nas fêmeas que estiveram em contato com o macho, enquanto no outro grupo, analisou-se os aspectos macroscópicos verificados nas vulvas e citologia vaginal, contendo características de fase estrogênica. Assim, em cada lâmina citológica corada, foram analisados diversos campos microscópicos, nos quais eram contabilizadas as escamas anucleadas, células superficiais nucleadas,

intermediárias, parabasais, basais de modo a se obter um total de 100 células. Além disto, por meio do estabelecimento de cruzes, observou-se, qualitativamente, os leucócitos, bactérias e filamentos de muco; sendo uma, duas e três cruzes, relacionadas com pequena, moderada e grande quantidade, respectivamente. Ao todo, foram acompanhados dois ciclos completos em cada animal.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para os percentuais dos diferentes tipos celulares pelo método dos quadrados mínimos (DA SILVA 1993) usando os modelos lineares gerais do software estatístico Statistical Analysis System (SAS 1999) para determinar o efeito da presença do macho e da fase do ciclo estral. Os dados foram expressos em porcentagem média $\pm$ erro padrão e o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Posteriormente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk ($p = 0,1528$).

A ANOVA foi baseada no seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + F_j + I_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Onde, Y_{ijk} é a k -ésima análise colpocitológica realizada no i -ésimo grupo experimental durante a j -ésima fase do ciclo estral, μ é a média geral; M_i é o efeito fixo do i -ésimo tratamento (i =macho ausente, macho presente); F_j é o efeito fixo da j -ésima fase do ciclo estral (j =proestro, estro, metaestro, diestro); I_{ij} é o efeito aninhado da j -ésima fase do ciclo estral dentro do i -ésimo tratamento; ε_{ijk} é o efeito residual que inclui todas as demais fontes de variação não consideradas no modelo.

O efeito da presença do macho sobre a duração de cada fase do ciclo estral foi determinando aplicando-se o teste T de Student por meio da utilização do SAS. Inicialmente, os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homocedasticidade das variâncias. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em logaritmo de base decimal.

RESULTADOS

A duração da gestação em preás apresentou média de 59 dias e erro padrão de 2,24 nas cinco fêmeas utilizadas para este fim, parindo de um (20%) a dois filhotes (80%).

Quanto a análise do ciclo estral, no preá, observou-se que as fêmeas apresentam ciclo sexual poliétrico contínuo, com período médio de $14,8 \pm 0,73$ dias (12-16) ($n=5$) para as fêmeas submetidas ao efeito macho (G2) e $14,6 \pm 0,75$ dias (13-17) ($n=5$) para aquelas isentas do efeito macho (G3), não sendo verificadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) entre as fêmeas dos dois grupos analisados (Quadro 1).

Por outro lado, comparando-se cada fase do ciclo com a respectiva duração e ainda os dois grupos experimentais, verificou-se que a presença do macho influenciou, significativamente, a fase de diestro, a qual se apresentou mais longa ($4,0 \pm 0,63$ dias) como se observa na tabela 1.

O ciclo estral foi também caracterizado por meio da análise descritiva de acordo com o padrão da citologia esfoliativa do epitélio vaginal bem como dos elementos figurados associados como leucócitos, filamentos de muco e bactérias como demonstra o parágrafo a seguir.

Nesse sentido, denominaram-se as células descamativas vaginais como sendo, em ordem decrescente de maturação: células superficiais anucleadas (escamas anucleadas), contendo morfologia poligonal, citoplasma eosinofílico, delimitado e ausência de núcleo - muitas vezes podendo ser encontradas granulações basofílicas resultantes da cariorrexe (fragmentação nuclear) - (Fig.1B, 1C e 1D); células superficiais nucleadas, dotadas de formato poligonal, limites citoplasmáticos bem definidos, citoplasma levemente basofílico ou eosinofílico e núcleo pequeno, contendo cromatina finamente granulosa (Fig.1B) ou acentuadamente condensada (picnose nuclear) (Fig.1D); células intermediárias, possuindo forma variando do redondo ao poligonal, citoplasma basofílico, limites celulares pouco definidos, núcleo pequeno, porém maior do que na célula superficial, e cromatina finamente granular (Fig.1A, 1E, 1F, 1G, 1H e 1I); células parabasais, caracterizadas por serem basofílicas, redondas e de moderada relação núcleo/citoplasma (Fig.1A, 1E, 1F, 1G, 1H e 1I); células basais, redondas, acentuadamente basofílicas, diminutas em tamanho e com elevada relação núcleo/citoplasma (Fig.1G, 1H e 1I).

O início do proestro caracterizou-se pelo predomínio de células parabasais e intermediárias bem como pela presença de bactérias e leucócitos (Fig.1A), sendo o final deste período, similar a fase estrogênica.

Durante o estro, observaram-se numerosas células superficiais, cujos percentuais, por diversas ocasiões, ultrapassavam 80%, no tocante a celularidade deste tipo. Nesta fase, houve predomínio das escamas anucleadas em detrimento das superficiais nucleadas (Fig.1B, 1C e 1D). Outro aspecto importante consistiu na ausência de leucócitos e presença de bactérias, estas últimas em pequeno número ou até mesmo não sendo visualizadas em alguns esfregaços citológicos (Fig.1D).

Posteriormente, na fase de metaestro, verificaram-se grande quantidade de células intermediárias, neutrófilos e bactérias, seguidas de regular quantidade de células parabasais (Fig.1E e 1F).

Por fim, no diestro, verificou-se a predominância de células basais, parabasais e intermediárias. Os esfregaços apresentaram-se com o aspecto "sujo" mediante intensa produção de muco vaginal bem como pela grande quantidade de neutrófilos e bactérias (Fig.1G, 1H e 1I).

Além disso, por meio do cálculo percentual das médias gerais dos tipos celulares identificados pela citologia vaginal, foi possível observar, na fase de estro, que os percentuais de escamas anucleadas e superficiais nucleadas ($59,42 \pm 1,48\%$ e $15,84 \pm 0,79\%$, respectivamente) representaram mais de 70% da celularidade total, ao passo que no diestro, as células profundas (parabasais e basais), cujos percentuais médios foram $30,65 \pm 1,06\%$ e $18,67 \pm 0,87\%$, respectivamente, estiveram constituindo quase a metade de todas as células identificadas e contabilizadas nessa fase. Ademais, as fases de proestro e metaestro demonstraram-se semelhantes no que se refere a celularidade encontrada, sendo as médias de células superficiais nucleadas maiores no proestro e as intermediárias, superiores no metaestro (Fig.2).

Avaliação do ciclo estral em preás após análise estatística. A contagem (porcentagem) de escamas anucleadas sofreu efeito significativo ($p < 0,05$) da interação entre tratamento (macho ausente, macho presente) e fase do ciclo estral (Fig.3). A diferença entre os tratamentos foi observada no proestro, com as fêmeas no G2 ($35,05 \pm 1,97\%$) apresentando uma porcentagem média de escamas anucleadas, superior às do G3 ($18,00 \pm 2,28\%$). No estro foram registrados os maiores valores médios em ambos os tratamentos, $59,19 \pm 2,21\%$ para as fêmeas do G2 e $59,65 \pm 1,97\%$ para aquelas G3. As fêmeas do G2 apresentaram menor valor médio de escamas anucleadas na fase diestro ($14,55 \pm 1,97\%$). Por outro lado, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos no proestro ($18,00 \pm 2,28\%$) e diestro ($8,33 \pm 2,55\%$) para o grupo em que o macho esteve ausente.

As células intermediárias também sofreram efeito significativo ($p < 0,05$) da interação entre tratamentos e fase do ciclo estral (Fig.4), sendo que no proestro, as fêmeas do G3 apresentaram uma porcentagem média destas células ($48,73 \pm 2,17\%$) significativamente superior às do G2 ($37,85 \pm 1,88\%$). Vale destacar que no G3, não foi observada diferença significativa no valor médio de células intermediárias entre as fases proestro e metaestro ($46,34 \pm 1,65\%$), sendo a menor média obtida no estro ($18,45 \pm 1,88\%$). Da mesma forma, ocorreu no G2, não ocorrendo diferenças significativas para esse tipo celular entre as fases proestro ($37,85 \pm 1,88\%$), metaestro ($44,05 \pm 1,98\%$) e diestro ($30,75 \pm 1,88\%$), sendo o estro a fase com a menor média ($20,69 \pm 2,10\%$).

As células superficiais nucleadas, parabasais e basais sofreram efeito significativo entre as fases do ciclo estral ($p < 0,05$). A proporção média de células superficiais nucleadas foi significativamente mais elevada durante as fases proestro e estro, quando comparadas as fases de metaestro e diestro (Fig.5). O estro ainda foi marcado pela menor porcentagem média de células parabasais ($4,10 \pm 0,97\%$) e basais ($0,72 \pm 0,79\%$). Por outro lado, o diestro foi caracterizado pela maior porcentagem média de células parabasais ($30,65 \pm 1,06\%$) e basais ($18,66 \pm 0,86\%$). A porcentagem média de células parabasais não diferiu entre o proestro ($13,03 \pm 0,99\%$) e o metaestro ($16,23 \pm 0,89\%$) conforme se observa na figura 5.

DISCUSSÃO

Em experimento realizado por Buzzio et al. (2001), o qual verificou curta fase luteal em roedores murídeos, hipotetizou que a implantação ocorria precocemente (nos cornos uterinos), fato este que motivou os pesquisadores a caracterizarem o período gestacional bem como o desenvolvimento inicial blastocístico em gestações sobrepostas, cujas fêmeas realizavam aleitamento da ninhada anterior. As espécies em questão e os períodos que duravam a gestação foram relatados como inferiores a 10 dias, o que contrastou bastante com as durações das gestações isentas de sobreposição a saber: *Calomys musculinus* (21 dias), *Calomys laucha* (21 dias), *Microtus ochrogaster* (21 dias) e *Akodon molinae* (25 dias) – estas espécies compreendendo roedores sulamericanos sigmodontíneos e *Peromyscus maniculatus bairdii* (25 dias) – roedor norte-americano sigmodontíneo.

Adicionalmente, Richmond & Conaway (1969) e Clarke & Hellwing (1983) convergiram as informações no tocante as estimativas de duração da gestação das espécies *Clethrionomys glareolus*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* como sendo 19, 20 e 22 dias respectivamente.

De acordo com Lange & Schmidt (2006) as cutias apresentam duas parições anuais, com intervalo entre partos de 156 dias e duração gestacional situada em torno de 104 a 120 dias.

Em condições naturais não controladas, pesquisadores como Larcher (1981), Mares et al. (1982) e Pinheiro et al. (1989) estabeleceram como 48 dias o tempo decorrido de uma gestação em preás, sendo tal parâmetro utilizado como referência em estudo de placentação promovido por Oliveira et al. (2008), divergindo, dos nossos resultados, no qual identificamos um período médio de gestação de 59 dias para esta espécie.

No tocante a análise citológica, os perfis evidenciados dos tipos descamativos cervicovaginais refletem a dinâmica endócrina associada aos ciclos reprodutivos, nas espécies mamíferas, podendo o estudo do ciclo estral, feito por análise quali e quantitativa das referidas células, bem como dos elementos figurados associados, serem utilizados com eficiência para predizer o período fértil da espécie em análise e, por conseguinte, possíveis distúrbios relacionados à reprodução (MOXON et al. 2010).

Santos et al. (2015) também caracterizou o ciclo estral em preás, utilizando-se para tal de 12 fêmeas não gestantes mantidas isoladas e outras cinco, na presença de um macho. No primeiro grupo, avaliaram dois ciclos completos, obtendo-se, em média, $15,8 \pm 1,4$ dias para a duração do ciclo, com variações de 14 a 19 dias. As fêmeas mantidas na presença do macho não puderam ser avaliadas, pois a maioria foi fecundada por este último.

Em nosso estudo, tal problemática não foi evidenciada, pois o macho utilizado estava impossibilitado de fecundar as fêmeas do grupo por estar preso em gaiola.

O monitoramento do ciclo reprodutivo de cutias, criadas em cativeiro no semiárido, foi realizado pela citologia vaginal associada a ultrassonografia transabdominal em tempo real por Campos et al. (2015). Para tanto, os autores caracterizaram oito ciclos completos, empregando a metodologia supracitada, e encontraram em média 28,2±0,7 dias com variações de 24 a 31 dias, resultados estes aproximados aos reportados por Guimarães et al. (1997) ao avaliarem 20 fêmeas adultas de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*), chegando-se a média de 30,69±4,65 dias (com ciclos variando de 19 a 40 dias).

Guimarães et al. (2011) caracterizaram 20 ciclos estrais de *Dasyprocta prymnolopha*, obtendo-se média de duração de 32,05±4,17 dias (variando de 25 a 40 dias), não ocorrendo diferença estatística significativa no tocante ao efeito macho dos grupos experimentais estudados sob a duração do ciclo. No entanto, a maioria dos grupos experimentais formados continham fêmeas adultas e jovens, ambas em contato com machos vasectomizados. Ao serem realizadas dosagens hormonais por radioimunoensaio, os autores verificaram que para o 17β-estradiol, ocorria dois picos de concentração, o primeiro na fase de metaestro e o segundo, no proestro, fato este capaz de se sugerir tratar-se de duas fases de desenvolvimento folicular. Para progesterona, houve significância estatística (p<0,05) em suas concentrações entre as fases do ciclo, estando evidentemente baixa no estro, elevando-se 24 horas após esta fase e atingindo a maior média, na fase de diestro.

Nesse sentido, comparando-se as durações de cada fase do ciclo reprodutivo de preás, verificamos que a presença do macho influenciou de forma significativa a fase do diestro, a qual foi mais longa (4,0±0,63 dias) quando comparadas com o grupo de cinco fêmeas mantidas na ausência daquele (2,4±0,24 dias) pela análise da citologia vaginal. Os resultados sugerem que a presença do macho pode influenciar a concentração de progesterona, após a ovulação, por subsequente atuação sob a atividade do corpo lúteo.

Em se tratando da citologia, os critérios inclusos para determinação de cada fase do ciclo reprodutivo de preás bem como os aspectos morfológicos celulares foram estabelecidos que a fase de estro deveria conter, somando-se as células superficiais e escamas anucleadas, pelo menos 70% destes tipos descamativos, cujas células demonstravam citoplasma eosinofílico, morfologia poligonal, baixa relação núcleo/citoplasma, cromatina finamente granular ou com núcleo picnótico no caso das superficiais e isentas de núcleo, nas escamas. Além disto, não se observava a presença de leucócitos e as bactérias, em pequeno número ou ausente.

Na fase de metaestro, o tipo celular predominante em valores percentuais era representado pelas células intermediárias, seguidas por quantidades consideráveis de bactérias e leucócitos. Tais células apresentavam-se com forma variando do ovalado ao poligonal, núcleo centrado e com cromatina dispersa e granulosa além de citoplasma basofílico. Para a fase de diestro, consideramos que o somatório de células profundas (parabasais e basais) deveriam perfazer valores relativos acima de 40% e ainda possuir células intermediárias como o segundo tipo predominante. Ademais, numeroso infiltrado leucocitário, de bactérias e muco também foram evidenciados. As células parabasais e basais continham formato redondo, núcleo grande e central, cromatina granular e elevada relação núcleo/citoplasma. Diferiam entre si, pois estas últimas eram menores e possuíam citoplasma intensamente basofílico.

Subsequentemente, a fase de proestro iniciava-se com o predomínio de células intermediárias além da presença de bactérias e muco, sendo a chegada do estro, compatível quando as células superficiais retornavam a valores percentuais iguais ou superiores a 70%. Tais aspectos morfológicos celulares de cada fase foram similares ao descrito na cutia (GUIMARÃES et al. 1997, 2011, CAMPOS et al. 2015), capivara (BARBOSA et al. 2007), paca (BASTOS et al. 2003), e preá (SANTOS et al. 2015).

No caso dos elementos figurados associados as células da colpocitologia, decidimos não os incluir nos resultados. Limitamo-nos, pois, a afirmar que as bactérias, leucócitos e filamentos mucosos são abundantes entre as fases de metaestro e diestro.

Nossos resultados referentes as médias gerais, dadas em percentual, dos tipos celulares evidenciados no ciclo estral de preás, foram muito semelhantes, na fase de metaestro, e na superioridade quantitativa das escamas anucleadas frente as superficiais nucleadas – em todas as fases do ciclo, o que indica um escalonamento maturativo normal, aos verificados em cutias por Guimarães et al. (1997) e divergentes quando comparadas as médias gerais nas demais fases, bem como dos resultados apresentados por Zogmo (2002), ao caracterizar as médias celulares por meio da colpocitologia vaginal de mocós (*Kerodon rupestris*) e Santos et al. (2015) ao demonstrarem a distribuição percentual dos tipos celulares em cada fase do ciclo reprodutivo de preás criados em cativeiro.

A análise estatística do nosso trabalho sinalizou haver efeito significativo (p<0,05) da contagem de escamas anucleadas entre as fases do ciclo estral nos dois grupos experimentais, sendo as maiores médias evidenciadas no estro e as menores, no diestro. Este achado diferiu dos promovidos por Guimarães et al. (1997) que, indicou, em cutias, haver diferença significativa das células superficiais anucleadas apenas na fase de estro, a qual produziu maiores contagens quando comparadas as demais fases e entre estas, não houve diferença. Comparando-se os tratamentos (macho presente e ausente), em preás, verificamos que ocorreu diferença estatística na fase de proestro, sendo evidenciado maior percentual de escamas no grupo de fêmeas mantidas acasaladas (35,05±1,97%) do que naquele privado da presença do macho (18,00±2,28%).

A prática corrente da inserção de um macho para a sincronização do ciclo estral é uma atividade indispensável quando se objetiva a criopreservação de embriões, limpeza sanitária de colônias e transgênese murina (MATTARAIA et al. 2009). Em caprinos e ovinos, pela importância econômica, ambiental e sociológica (RANCOURT et al. 2006), a performance reprodutiva relaciona-se, diretamente, com os lucros obtidos na produção de leite e carne. Para tanto, a sincronização do ciclo estral traz grandes benefícios aos produtores pecuários (GONZALEZ-BULNES et al. 2005).

Em nosso trabalho, não houve propriamente uma sincronização do ciclo, porém, a presença do macho relacionou-se direta ou indiretamente com o estímulo das ações estrogênicas, na fase de proestro, as quais cursaram com o aumento proliferativo do epitélio vaginal que tende a sofrer estratificação das camadas mais diferenciadas e, conseqüentemente, descamação das células superficiais anucleadas.

No experimento de Zogmo (2002), mantendo-se grupos de fêmeas de mocós em contato com um macho, houve significância estatística para o percentual de escamas anucleadas na fase de estro quando comparada as demais fases, utilizando-se para tal, o teste de Tukey, diferindo, pois dos nossos resultados, que demonstraram diferenças significativas, deste tipo celular, em todas as fases do ciclo, tanto para o grupo contendo o macho quanto para os que contiveram fêmeas isoladas.

Quanto as células intermediárias em preás, observou-se também efeitos significativos da interação entre os tratamentos na fase de proestro. Entretanto, o grupo isento de macho foi o que apresentou maiores porcentagens médias ($48,73 \pm 2,17\%$) na contagem deste tipo de célula quando comparados ao outro grupo em análise ($37,85 \pm 1,88\%$). Desta forma, quando o macho estava ausente (G3), havia menor descamação de células superficiais anucleadas, provavelmente devido a menor concentração de estrógenos circulantes, fato este que poderia acarretar em maior percentual de células intermediárias, proporcionalmente, por maiores níveis de progesterona, no grupo em questão, e, conseqüentemente, maior desprendimento do tipo celular intermediário.

Ademais, no grupo das fêmeas G3, as fases de proestro e metaestro representaram as maiores produções de células intermediárias, não diferindo entre si, porém sendo significantes quando comparadas com as fases de diestro e estro, fase esta que obteve a menor média para este tipo celular.

Nas fêmeas do G2, a fase do estro também apresentou os menores valores percentuais, diferindo, de forma significativa, das demais fases e estas últimas não diferiram entre si. No entanto, a fase de metaestro possuiu os maiores percentuais médios de células intermediárias, assemelhando-se aos descritos por Guimarães et al. (1997) verificados em cutias e Zogmo (2002) em pacas, sendo que, de acordo com estes dois autores, os maiores valores de células intermediárias, verificados nas respectivas espécies, ocorreram no metaestro e a produção neste período diferiu significativamente das demais fases, estas últimas não diferindo entre si.

Além disso, em preás, era esperado um maior quantitativo de células superficiais nucleadas nas fases de proestro e estro, as quais sofrem maior estímulo para a diferenciação e proliferação celulares, em decorrências das maiores concentrações de estrógenos nas referidas fases. Como a ovulação ocorre no estro, sob pico do hormônio luteinizante, verificamos que o maior percentual médio deste tipo celular ocorreu nessa fase, porém não diferindo estatisticamente da fase que a antecedia e diferindo, pois, das demais fases. Excetuando-se o proestro, tais informações concordaram com as produzidas por Guimarães et al. (1997) e Zogmo (2002) ao analisarem os ciclos reprodutivos de cutias e pacas, respectivamente.

A diferença entre a média das células parabasais, na fase de diestro, mostrou significância estatística quando comparada às demais, todavia, não houve diferença entre as fases de metaestro e proestro, sendo a fase de estro responsável pela menor média observada. Característica semelhante ocorreu para as basais que tiveram maiores valores percentuais na fase de diestro, cuja significância ($p > 0,05$) as diferiu das demais fases. Entretanto, em cada fase do ciclo houve diferença significativa e a menor quantidade também foi verificada no estro.

Esse padrão, verificado na fase de diestro, condiz com elevadas concentrações circulantes de progesterona, as quais induzem a uma menor espessura do epitélio vaginal, acarretando na formação de uma fina camada germinativa de células profundas (WESTWOOD 2008).

CONCLUSÃO

A duração da gestação em preás apresentou média de 59 dias, com parição de um a dois filhotes por parto. As fêmeas de preá apresentam ciclo sexual poliétrico contínuo, com período médio de $14,8 \pm 0,73$ dias para as fêmeas submetidas ao efeito macho e $14,6 \pm 0,75$ dias para aquelas isentas do efeito macho, não sendo verificada influência do efeito macho na duração do ciclo. O padrão de caracterização do ciclo no preá apresentou-se semelhante ao descrito em outros caviões, sendo observado no proestro um predomínio de células parabasais e intermediárias, com presença de bactérias e leucócitos; no estro, numerosas células superficiais, com predomínio das escamas anucleadas e pequena quantidade ou ausência de bactérias; no metaestro, grande quantidade de células intermediárias, neutrófilos e bactérias e uma quantidade regular de células parabasais; e no diestro, tinha-se o predomínio de células basais, parabasais e intermediárias e grande quantidade de muco vaginal, neutrófilos e bactérias. A ausência do macho influenciou significativamente a quantidade de células intermediárias e superficiais anucleadas na fase de proestro, enquanto a presença do macho aumentou a duração

da fase diestro, o que pode estar relacionado a níveis elevados de progesterona e níveis baixos de estrógenos circulantes.

REFERÊNCIAS

Barbosa L.P., Rodrigues M.V., Neves M.M., Morais D.B., Melo B.E.D., Balarini M.K., Coelho C.D.P. & Cínthia M. 2007. Caracterização da colpocitologia em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Rev. Bras. Saúde e Prod. Anim., 8(4):258-266.

Bastos L.V., Guimarães D.A., Luz-Ramos R.S., Ferreira A.C.S. & Ohashi O. M. 2003. Aspectos da citologia vaginal durante o ciclo estral de *Agouti paca* criada em cativeiro. Rev. Bras. Reprod. Anim., 27(2):294-295.

Brasil. 2002. Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle de roedores. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde.

Buzzio O.L., Koninckx A., Carreno N.B. & Castro-Vazquez A. 2001. Embryo implantation during the short luteal phase of the corn mouse, *Calomys musculinus*, and the apparent lack of a lactional diapause in South American murid rodents. Reproduction, 121:815-823.

Campos L.B.C., Peixoto G.C.X., Lima G.L., Castelo A.L.P., Souza A.L.P.S., Oliveira M.F. & Silva A.R. 2015. Monitoramento do ciclo estral de cutias (*Dasyprocta leporina* Lichtenstein, 1823) através de citologia esfoliativa vaginal e ultrassonografia. Pesq. Vet. Bras., 35(2):188-192.

Clarke J.R. & Hellwing S. 1983. Fertility of the post-partum bank vole (*Clethrionomys glareolus*). J. Reprod. Fertil., 68(1):241-246.

Da Silva R.G. 1993. Manual de procedimentos em análise por quadrados mínimos. FUNEP, Jaboticabal.

Goldman J.M., Murr A.S. & Cooper R.L. 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth Defects Research (part B), Hoboken, 80(2):84-97.

Gonzalez-Bulnes A., Veiga-Lopez A., Garcia P., Garcia-Garcia R.M., Ariznavarreta C., Sanchez M.A., Tresguerres J.A.F., Cocero M.J. & Flores J.M. 2005. Effects of progestogens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. Theriogenology, 63(9):2523-2534.

Guimarães D.A., Moreira D. & Vale W.G. 1997. Determinação do ciclo reprodutivo da cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) através do diagnóstico colpocitológico. Acta Amazônica, 27(1):55-64.

Guimarães D.A., Ramos R.L., Ohashi O.M., Garcia G.W. & Vale W. G. 2011. Plasma concentration of progesterone and 17 β -estradiol of black-rumped agouti (*Dasyprocta prymnolopha*) during the estrous cycle. Rev. Biol. Trop., 59(1):29-35.

Lange R.R. & Schmidt E.M.S. 2006. Rodentia: roedores silvestres. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds). Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária. São Paulo: Editora Roca.

Larcher T.E. 1981. The comparative social behavior of *Kerodon rupestris* and *Galea spixii* and the evolution of behavior in the Caviidae. Bull. Am. Mus. Nat. Hist., 17:1-7.

Lohmiller J.J. & Swing S.P. 2006. Reproduction and breeding. In: Suckow M.A., Weisbroth S.H. & Franklin C.L. (Ed.). The Laboratory Rat. 2nd ed. Nova Iorque: Academic Press.

Marcondes F.K., Bianchi F.J. & Tanno A.P. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Braz. J. Biol., 62:609-614.

Mares M.A., Streilen K.E. & De La Rosa M.P. 1982. Nonsynchronous molting in three genera of tropical rodents from the Brazilian Caatinga (*Thrichomys*, *Galea*, and *Kerodon*). J. Mammal. Evol., 63(3):484-488.

Mattaraia V.G.M., Da Silva A.P.R., Sartori D.R.S., Távora M.F.C.L.F., Rodrigues U.P., Moreira V.B. & Moura A.S.A.M.T. 2009. Efeito macho na indução do estro em ratas Wistar (*Rattus norvegicus*). Vet. Zootec., 16(4):669-677.

Moxon R., Copler D. & England G.C.W. 2010. Quality assurance of canine vaginal cytology: a preliminary study. Theriogenology, 74(3):479-485.

Oliveira G.B., Rodrigues M.N., Sousa R.S., Moura C.E.B., Miglino M.A. & Oliveira M.F. 2014. Origin of the lumbosacral plexus in *Galea spixii* (Wagler, 1831) (Rodentia, Caviidae). Biotemas, 27(4):107-115.

Oliveira G.B., Santos A.C., Oliveira R.E.M., Câmara F.V.C., Bezerra F.V.F., Araújo Júnior H.N., Silva A.V.N. & Oliveira M.F. 2015. Artérias mesentéricas cranial e caudal do preá (*Galea spixii*). Acta Sci. Vet., 43(1):1297.

Oliveira M.F., Mess A., Ambrosio C.E., Dantas C.A.G., Favaron P.O. & Miglino M. A. 2008. Chorioallantoic Placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). Reprod. Biol. Endocrinol., 6(1):39.

Pinheiro M.J.P., Andrade S.A. & Cunha J.N. 1989. Preservação e exploração de animais silvestres nativos: preá, cutia e mocó. Caatinga, 6(1):28-49.

Rancourt M., Fois N., Lavin M.P., Tchakerian E. & Vallegand F. 2006. Mediterranean sheep and goat production: An uncertain future. Small Rumin. Res., 62(3):167-179.

Richmond M. & Conaway C.H. 1969. Induced ovulation and oestrus in *Microtus ochrogaster*. J. Reprod. Fertil. Suppl., 6:357-376.

Roberts M.E., Maliniak E. & Deal M. 1984. The reproductive biology of the rock cavy, *Kerodon rupestris* in captivity: a study of reproductive adaptation in a tropic specialist. Mammalia, 48(2):252-266.

Santos A.C., Vianna D.C., Oliveira G.B., Silva R.S., Oliveira M.F. & Assis-Neto A.C. 2015. Characterization of the estrous cycle in *Galea spixii* (Wagler, 1831). Pesq. Vet. Bras., 35(1):89-94.

- Statistical Analysis System Institute. 1999. SAS User's guide, version 8. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.
- Upham N.S. & Patterson B.D. 2012. Diversification and biogeography of the neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 63(2):417-429.
- Westwood F.R. 2008. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol. Pathol.*, 36(3):375-384.
- Wolff J.O. & Sherman P.W. 2007. *Rodent Societies: An Ecological Evolutionary Perspective*. 1st ed. Chicago: The University of Chicago Press.
- Zogmo M.A. 2002. Aspectos reprodutivos da fêmea de mocó (*Kerodron rupestris*): Análise bioquímica dos líquidos fetais e caracterização colpocitológica do ciclo estral. Tese de Doutorado. Disponível em <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-04042003-103133/en.php>>. Acesso em 20 jan. 2017.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Quadro. 1. Efeito da presença do macho sobre a duração das fases do ciclo estral (média $\pm$ erro padrão, dias) de preás.

Fig.1. Fases do ciclo estral em fêmeas de preás. Em A: Proestro inicial. Observam-se células parabasais (setas pretas) e intermediárias (setas vermelhas) como predominantes desta fase. Notar ainda a presença de bactérias (cabeça de seta preta) e um neutrófilo (cabeça de seta amarela). Figuras B, C e D: Estro. Em B: evidenciam-se três células superficiais nucleadas contendo cromatina finamente granular (setas) e o restante, constituído por células superficiais anucleadas (escamas anucleadas). Observar ainda a presença de bactérias (cabeça de seta). Em C: no transcorrer do estro, ocorre aumento da descamação de células superficiais, presença de bactérias e ausência de leucócitos. Em D: notar o predomínio das escamas anucleadas e apenas uma célula superficial contendo núcleo picnótico (seta). Tal esfregaço apresentou fundo limpo, ou seja, isento de bactérias e leucócitos. Barra desta figura: 20 μ m. As figuras E e F remetem a fase de metaestro em estágio inicial e avançado, respectivamente. Em E: verificar duas células parabasais justapostas (elipse tracejada), duas células intermediárias (setas) e bactérias (cabeça de seta). Em F: nota-se o predomínio de células intermediárias, de diferentes tamanhos, seguidas das células parabasais. As bactérias e leucócitos também estiveram presentes, sendo dois destes últimos, representados pela elipse tracejada. As figuras G, H e I caracterizaram o diestro. Em G: observar duas células intermediárias (setas) e o aparecimento de células basais (elipse tracejada), as quais predominaram nesta imagem. Seguiu-se, nas figuras H e I, aumento progressivo na quantidade de células profundas (basais) e a presença de bactérias (elipse tracejada na figura H), filamentos de muco (seta na figura I), numerosos neutrófilos e uma célula intermediária binucleada (* na figura I) além de células parabasais. Os esfregaços citológicos vaginais foram corados mediante coloração panótica rápida.

Fig.2. Percentual médio geral dos diferentes tipos celulares identificados pelo método colpocitológico durante as fases do ciclo estral de preás.

Fig.3. Efeito do macho sobre a contagem média de escamas anucleadas pelo método colpocitológico em preás nas diferentes fases do ciclo estral. Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada grupo experimental (macho presente, macho ausente) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais dentro de cada fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro, diestro) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fig.4. Efeito do macho na contagem média de células intermediárias pelo método colpocitológico em preás nas diferentes fases do ciclo estral. Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada grupo experimental (macho presente, macho ausente) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais dentro de cada fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro, diestro) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fig.5. Contagem média de células superficiais nucleadas, parabasais e basais pelo método colpocitológico em preás nas diferentes fases do ciclo estral. Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada tipo celular (superficiais nucleadas, parabasais e basais) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fase do ciclo estral	Grupos experimentais	
	Macho presente (G2)	Macho ausente (G3)
Proestro	4,0±0,55	3,0±0,89
Estro	3,2±0,49	4,0±0,55
Metaestro	3,6±0,68	5,2±0,58
Diestro*	4,0±0,63	2,4±0,24
Ciclo estral	14,8±0,73	14,6±0,75

*p<0,05

Quadro. 1. Efeito da presença do macho sobre a duração das fases do ciclo estral (média ± erro padrão, dias) de preás.

199x151mm (150 x 150 DPI)

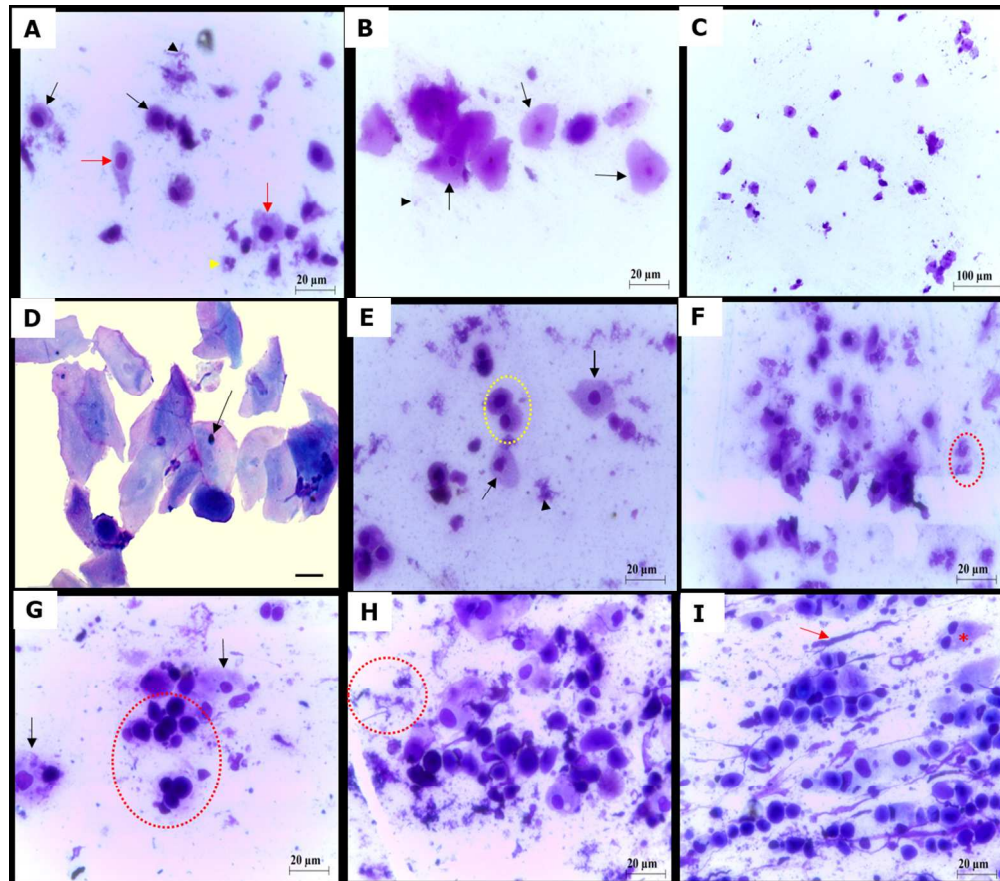


Fig.1. Fases do ciclo estral em fêmeas de preás. Em A: Proestro inicial. Observam-se células parabasais (setas pretas) e intermediárias (setas vermelhas) como predominantes desta fase. Notar ainda a presença de bactérias (cabeça de seta preta) e um neutrófilo (cabeça de seta amarela). Figuras B, C e D: Estro. Em B: evidenciam-se três células superficiais nucleadas contendo cromatina finamente granular (setas) e o restante, constituído por células superficiais anucleadas (escamas anucleadas). Observar ainda a presença de bactérias (cabeça de seta). Em C: no transcorrer do estro, ocorre aumento da descamação de células superficiais, presença de bactérias e ausência de leucócitos. Em D: notar o predomínio das escamas anucleadas e apenas uma célula superficial contendo núcleo picnótico (seta). Tal esfregaço apresentou fundo limpo, ou seja, isento de bactérias e leucócitos. Barra desta figura: 20µm. As figuras E e F remetem a fase de metaestro em estágio inicial e avançado, respectivamente. Em E: verificar duas células parabasais justapostas (elipse tracejada), duas células intermediárias (setas) e bactérias (cabeça de seta). Em F: nota-se o predomínio de células intermediárias, de diferentes tamanhos, seguidas das células parabasais. As bactérias e leucócitos também estiveram presentes, sendo dois destes últimos, representados pela elipse tracejada. As figuras G, H e I caracterizaram o diestro. Em G: observar duas células intermediárias (setas) e o aparecimento de células basais (elipse tracejada), as quais predominaram nesta imagem. Seguiu-se, nas figuras H e I, aumento progressivo na quantidade de células profundas (basais) e a presença de bactérias (elipse tracejada na figura H), filamentos de muco (seta na figura I), numerosos neutrófilos e uma célula intermediária binucleada (* na figura I) além de células parabasais. Os esfregaços citológicos vaginais foram corados mediante coloração panótica rápida.

338x296mm (96 x 96 DPI)

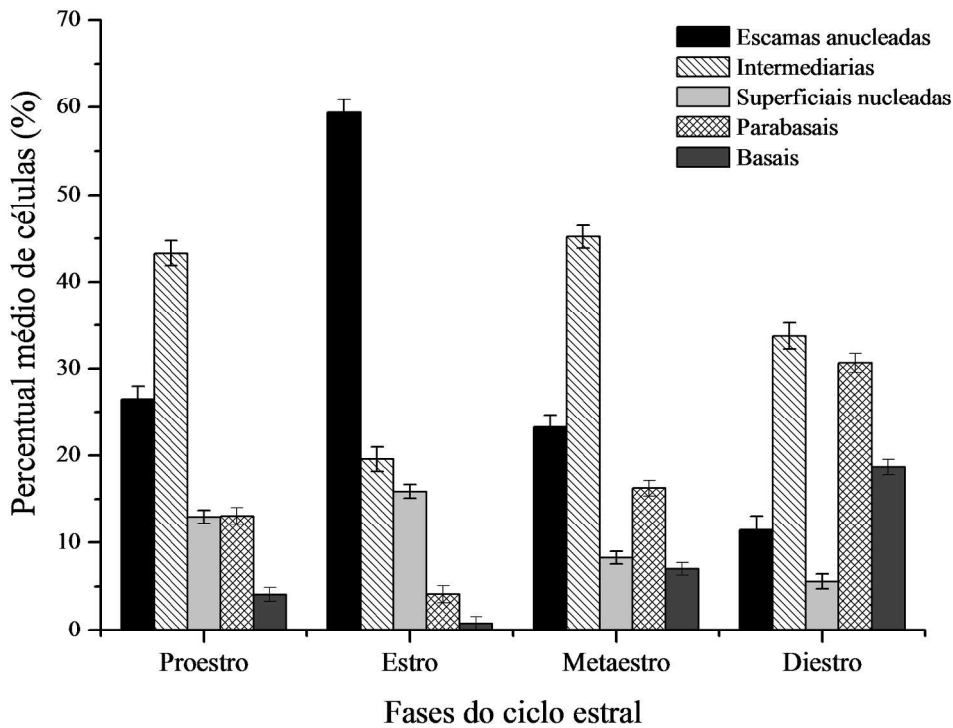


Fig.2. Percentual médio geral dos diferentes tipos celulares identificados pelo método colpocitológico durante as fases do ciclo estral de preás.

379x281mm (150 x 150 DPI)

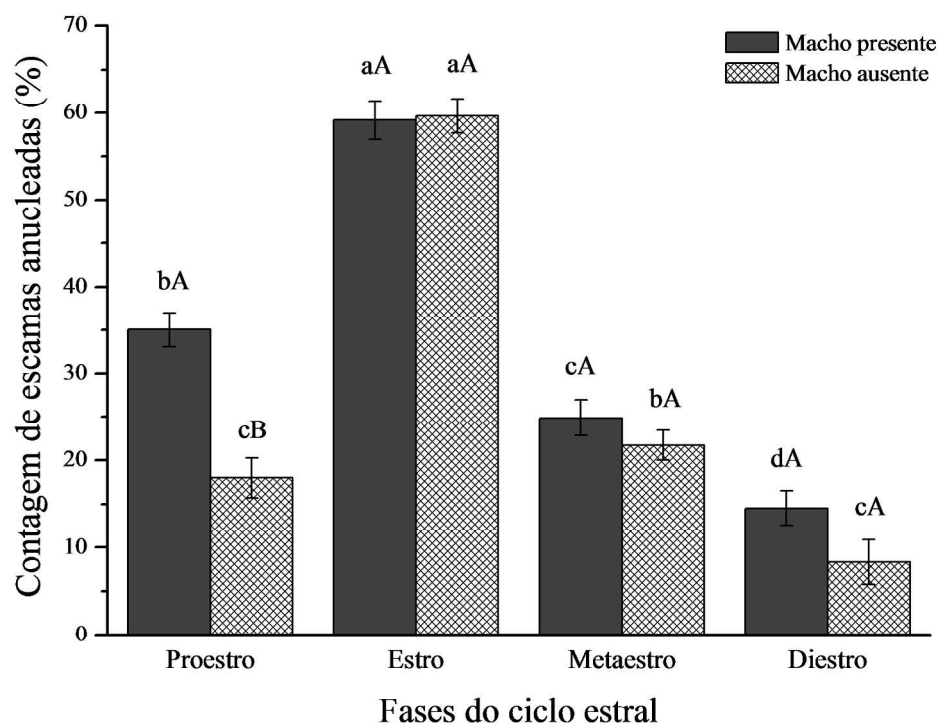


Fig.3. Efeito do macho sobre a contagem média de escamas anucleadas pelo método colpocitológico em preás nas diferentes fases do ciclo estral. Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada grupo experimental (macho presente, macho ausente) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais dentro de cada fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro, diestro) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

380x282mm (150 x 150 DPI)

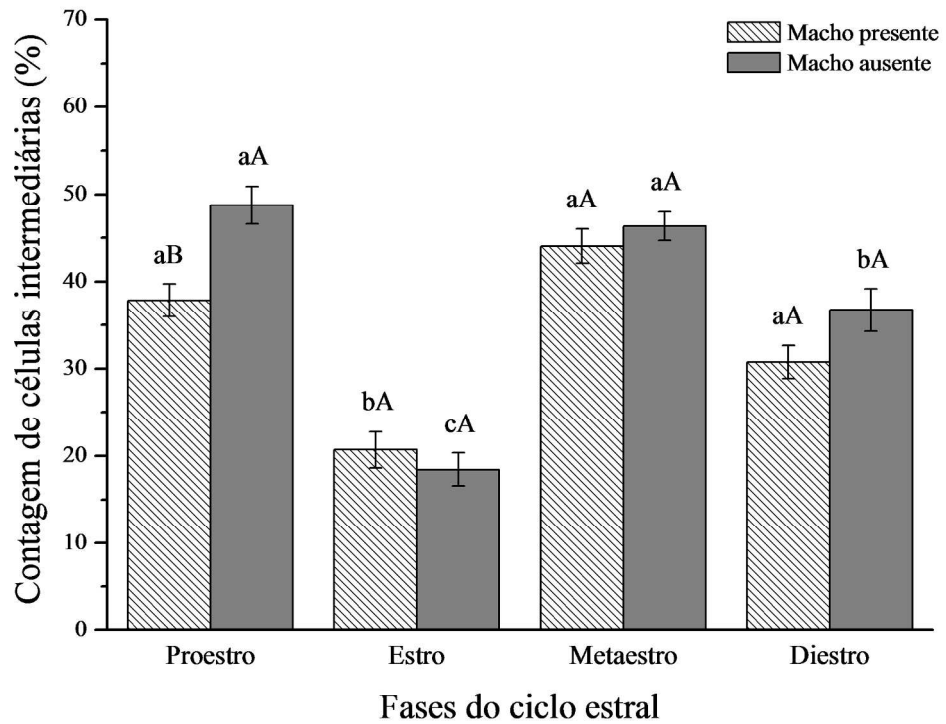


Fig.4. Efeito do macho na contagem média de células intermediárias pelo método colpocitológico em preás nas diferentes fases do ciclo estral. Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada grupo experimental (macho presente, macho ausente) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais dentro de cada fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro, diestro) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

379x282mm (150 x 150 DPI)

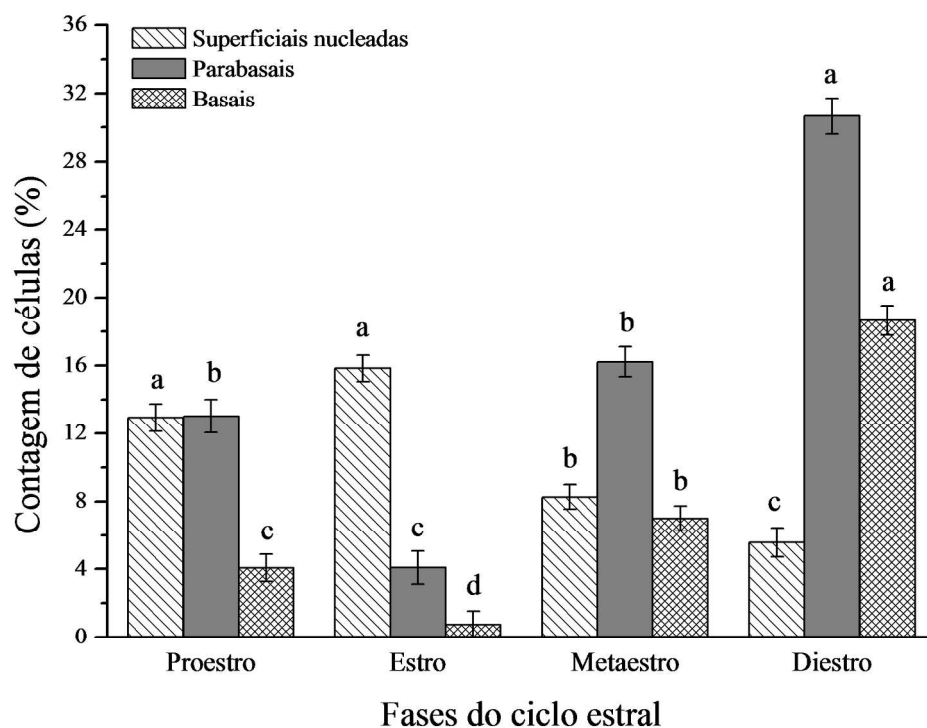


Fig.5. Contagem média de células superficiais nucleadas, parabasais e basais pelo método colpocitológico em preás nas diferentes fases do ciclo estral. Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada tipo celular (superficiais nucleadas, parabasais e basais) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

377x282mm (150 x 150 DPI)