



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

A SUBPLACENTA DO PREÁ *Galea spixii* Wagler, 1831

FERDINANDO VINÍCIUS FERNANDES BEZERRA

Médico Veterinário

Mossoró-RN

Fevereiro - 2014



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

FERDINANDO VINÍCIUS FERNANDES BEZERRA

A SUBPLACENTA DO PREÁ *Galea spixii* Wagler, 1831

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

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

Mossoró-RN

Fevereiro – 2014



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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)

Setor de Informação e Referência

B574s Bezerra, Ferdinando Vinicius Fernandes.

A subplacenta do preá *Galea spixii* Wagler, 1831 / Ferdinando Vinicius Fernandes Bezerra -- Mossoró, 2014.

137f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pós-Graduação.

1. Citotrofoblasto. 2. Desenvolvimento. 3. Sinciciotrofoblasto.
4. Subplacenta. I. Título.

RN/UFERSA/BCOT /413-14

CDD: [636.93234](#)

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza Borba



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

FERDINANDO VINÍCIUS FERNANDES BEZERRA

A SUBPLACENTA DO PREÁ *Galea spixii* Wagler, 1831

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

APROVADO EM: 28 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA:

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

Prof. Dr. Sc. Maria Angélica Miglino (FMVZ/USP)
Primeiro Membro

Dr. Sc. Phelipe de Oliveira Favaron (FMVZ/USP)
Segundo Membro



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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FERDINANDO VINÍCIUS FERNANDES BEZERRA – Mossoró/RN, 22/05/1987. Concluiu o ensino médio no então Centro de Educação Tecnológica Federal do Rio Grande do Norte – CEFET/RN campus Mossoró. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (2011). Foi monitor da disciplina de anatomia I no período de agosto de 2007 a dezembro de 2007. Têm experiência nas áreas de Medicina Veterinária e Morfologia dos animais domésticos. Em março de 2012, ingressou no programa de pós-graduação em Ciência Animal da UFERSA em nível de mestrado na área de Morfofisiologia.



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

A **Deus**, Autor e princípio de tudo que há, aquele que concede a graça para que a cada dia possamos estar de pé para continuarmos na busca por seus caminhos.

Dedico...



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

A minha esposa **Jessiele Rocha** e
ao meu filho **João Vinícius** por todo
amor, sincero e dedicado, com o qual
tanto me apoiaram, deram força e
sustentaram nas horas de dificuldades e
ausência.

Dedico...



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

A minha família, Pai, **Fernando Bezerra**, Mãe, **Maria Aparecida** e Irmão, **Ferdinício Fernandes**, por tudo que fizeram e fazem por mim e pelo apoio em todas as minhas escolhas.

Dedico...



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

Combati o bom combate, terminei a minha carreira, guardei a fé. Resta-me agora receber a coroa da justiça, que o Senhor, justo Juiz, me dará naquele dia, e não somente a mim, mas a todos aqueles que aguardam com amor a sua aparição.

II Timóteo, 6-8



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

Agradecimentos

Agradeço a **Deus**, pela força concedida, pela temperança e por estar sempre presente em todos os momentos, pois “mesmo que eu não veja, mesmo que eu não perceba Deus cuida de mim”.

À **minha esposa e filho** meus maiores refúgios nos momentos difíceis, onde sempre podia renovar minhas forças e que por tantas vezes tiveram que lidar com minha ausência, por compreender que necessário seria desprender de tempo para a realização de todo esse projeto, obrigado.

Meu obrigado também para a minha **mãe**, meu **pai** e meu **irmão** que não mediram esforços para me auxiliar durante todo esse período de construção desta dissertação e de todo o processo de formação. Ao contrário, sempre se dedicaram o quanto puderam para que eu chegasse até aqui.

Agradeço particularmente ao Prof. Dr. **Moacir Franco de oliveira**. Por sua doação profissional e também pessoal para conclusão desse trabalho. Suas orientações e sua determinação em construirmos e concluirmos juntos esse projeto foi de demasiada importância para que pudéssemos ter em mãos esse resultado

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

Ao **CEMAS – UFERSA** pela disponibilização dos animais, sem os quais não teríamos conseguido viabilizar este projeto.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo**, pela oportunidade de realização das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Ao **Dr. Phelipe Oliveira Favaron** por toda ajuda e disponibilidade, especialmente durante o período na FMVZ-USP.



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

À **Rose Eli Grassi Rici**, por sua ajuda e seu empenho em fazer com que este trabalho pudesse ser executado da melhor forma.

Agradeço aos amigos **Renato Otaviano do Rego**, **Rafael de Oliveira Picado**, **Talyta Lins Nunes**, que por tantas vezes estavam presentes, dispostos a ajudar, para que esse trabalho fosse enriquecido.

Ao amigo **Mychel Raony Paiva Teixeira Moraes**, sempre disposto a ajudar e a contribuir, além de sempre se fazer presente nos momentos onde precisávamos fugir da rotina.

Aos colegas de laboratório, **André Menezes**, **Gelidson Benevides**, **Felipe Venceslau**, **Radan Elvis e Igor Renno**, que nos em que requisitei sempre estiveram prontos a ajudar, meu muito obrigado!

Ao funcionário **Antonio Almeida dos Santos**, pela disponibilidade e boa vontade em sempre ajudar e passar seus ensinamentos.



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

A SUBPLACENTA DO PREÁ *Galea spixii* Wagler, 1831

BEZERRA, F. V. F. **A subplacenta do preá *Galea spixii* Wagler, 1831.** 2014. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2014.

RESUMO: A subplacenta é considerada um modelo ideal para o estudo comparativo dos processos trofoblásticos em humanos. Dessa maneira objetivou-se descrever morfológicamente o desenvolvimento da subplacenta no preá. Para isto foram utilizadas 12 fêmeas desta espécie que foram distribuídas em três grupos numa relação de um macho para quatro fêmeas, mantidos em boxes de 5m². Após formação dos grupos, exames de citologia vaginal eram realizados diariamente, para verificação da cópula, separando-se dos grupos as fêmeas que eram cobertas. A partir da ocorrência da cópula programaram-se as coletas das subplacentas nos dias 15, 23, 30, 45, 53, e 55 da gestação e estas foram realizadas mediante sacrifício das fêmeas gestantes com a utilização de protocolo anestésico específico. O material, então, era processado segundo técnicas para histologia convencional, citoquímica, imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão. No 15º dia de gestação observou-se que a subplacenta era constituída por uma monocamada citotrofoblástica envolta por sincício que apresentava vacúolos e lacunas maternas e que ao se afastar da camada de citotrofoblasto apresentava características invasivas. Aos 23 dias de gestação a subplacenta apresentou-se ainda sem uma forma característica definida, porém, mostrava uma conformação em lóbulos compostos predominantemente por citotrofoblasto e seu sincício esteve relacionado com as regiões onde apareciam as lacunas de origem materna. Aos 30 dias de gestação a subplacenta mostrou-se como um órgão compacto de forma definida e com a capilarização do mesênquima bastante evidente, os lóbulos eram constituídos por citotrofoblasto que envolvia o mesênquima e em seu centro possuía sinciciotrofoblasto. A partir dos 45 dias de gestação a degeneração do tecido subplacentário era evidente e a quantidade de sinciciotrofoblasto supera a de citotrofoblasto, além disto o sincício apresenta uma grande quantidade de vacúolos e sinais de morte celular podiam ser visualizados. Aproximando-se ao termo da gestação (53 e 55 dias) a subplacenta encontrava-se em avançada degeneração e os sinais de morte celular assim como a diminuição de seu tecido eram evidentes. A presença da circulação fetal foi característica a partir do 23º dia de gestação podendo ser destacada pela reação positiva a vimentina, e a reação a citoqueratina foi positiva durante toda a gestação especialmente no citotrofoblasto. A atividade proliferativa do tecido subplacentário, avaliada pelas técnicas de PCNA e AgNOR, demonstrou ser maior no início da gestação e decair com o avançar desta. Ultraestruturalmente evidenciou-se as características do trofoblasto celular e sincicial. O desenvolvimento da subplacenta do preá inicia-se por volta do 15º dia de gestação, tem seu auge aos 30 dias e a termo é necrótica. Além disto, é muito semelhante a subplacenta de outros cavídeos, quanto a sua organização e estrutura.

Palavras Chave: Subplacenta, Citotrofoblasto, Sinciciotrofoblasto, Desenvolvimento.



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

THE SUBPLACENTA OF PREÁ *Galea spixii* Wagler, 1831

BEZERRA, F. V. F. **The subplacenta of preá *Galea spixii* Wagler, 1831.** 2014. 137f. Dissertação (Master's degree in animal science) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2014.

ABSTRACT: The subplacenta is considered an ideal model for comparative studies of trophoblastic processes in humans. Thus, the aim of this study was made a morphological description of the development of the Spix's yellow-toothed cavy. To do this, 12 females were distributed in three groups in a proportion of 1 male to 4 females, kept in pickets of 5m². Thereafter, vaginal cytology examinations were made daily, to verify if the females were copulated and to separate them from the other females. Then, the collection of subplacentas was made in the 15, 23, 30, 45, 53 and 55 days of gestation, by slaughtering the pregnant females using a specific anesthetic protocol. The samples were processed to standard histological techniques, cytochemistry and immunohistochemistry, and to transmission electronic microscopy. In the 15th day of gestation, the subplacenta was formed by a single cytotrophoblastic layer surrounded by a vacuolized syncytium with maternal lacunae which presented invasive characteristic in the portions apart of the cytotrophoblastic layer. In the 23th day of gestation, the subplacenta did not presented a well-defined shape, however, it was organized in lobules composed of predominantly of cytotrophoblast e its syncytium was related to the regions where maternal lacunae previously appeared. In the 30th day of gestation, the subplacenta appeared as a compact organ with a well-defined shape and with an evident mesenchymal capilarization; the lobules was composed by syncytiotrophoblast in the centre, and by a mesenchyme surrounded by cytotrophoblast. From the 45th day of gestation, the degeneration of the subplacental tissue was evident and the syncytiotrophoblast was more abundant than the cytotrophoblast; moreover, the syncytium was markedly vacuolized and presented signs of cellular death. Near to gestation term (53-54th day), the subplacenta was in an advanced degeneration stage, with evident signs of cellular death and reduction of subplacental tissue. The presence of fetal circulation was characteristic from the 23th day of gestation, evidenced by the positive reaction to vimentin; positive reaction to cytokeratin was observed during entire gestation. The proliferative activity of the subplacenta was assessed by PCNA and AgNOR procedures, and demonstrated to be higher in the beginning of the gestational period, decreasing progressively during the gestation. Ultrastructurally, the subplacenta presented cellular and syncytial trophoblastic characteristics. The development of the Spix's yellow-toothed cavy subplacenta starts around the 15th day of gestation, reaching maximum development in the 30th day and becomes necrotic in the end of gestation. Moreover, it presented an organization and structure similar to the subplacenta of other caviidae.

Key words: Subplacenta, cytotrophoblast, syncytiotrophoblast, development.



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

LISTAS DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

± - mais ou menos

°C – graus Celsius

µm –micrometro

AgNOR – Argirofilic Nucleolar Organiser Regions (regiões organizadoras de nucléolo argirofílicas)

CEMAS – Centro de Multiplicações de Animais Silvestres

CTGs – Células Trofoblásticas Gigantes

ESAM - Escola Superior de Agricultura de Mossoró

h – horas

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

M – molar

mEq.Kg⁻¹ – miliequivalente por quilo

mg.Kg⁻¹ – miligrama por quilo

MHz – megahertz

min – minutos

mm² – milímetro quadrado

NOR - Nucleolar Organiser Regions (regiões organizadoras de nucléolo)

PAS – Periodic Acid Schiff (ácido periódico de Schiff)

PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen (antígeno de proliferação celular)

pH – potencial hidrogeniônico

UFERSA – Universidade Federal Rural do Semi Árido

UK - United Kingdom

USA - United States of America



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

LISTAS DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Esquema da diferenciação das linhagens de células trofoblásticas. Fonte: Soares et al. (2012).....	31
Figura 2: Vista da entrada do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS/UFERSA. 2013. Fonte Acervo do autor.....	45
Figura 3: Espécie estudada. Preá (<i>Galea spixii</i> Wagler, 1831) CEMAS – UFERSA, 2013. Fonte: Acervo do autor.....	47
Figura 4: Confirmação da cópula pela presença de espermatozoides na citologia vaginal. Após 24 horas, considera-se o primeiro dia de gestação. Objetiva de 100X. Barra, 200 µm. Coloração panótico rápido. Fonte: Acervo do autor.....	49
Figura 5: Caracterização macroscópica do útero gravídico. Em A: Observar adelgaçamento da parede uterina permitindo a visualização dos fetos e a placenta (PL). Em B: Notar embrião no terço médio de gestação envolto pelo saco vitelino (SV) e em destaque a placenta principal (PL). Fonte: Acervo do autor.....	56
Figura 6: Fotomicrografia da placenta do preá aos 30 dias de gestação, ilustrando, em uma vista panorâmica, a parede uterina (U), a cavidade uterina (CU), a placenta principal (P), a subplacenta (SP), decídua basal (DB), o saco vitelino visceral (SVV), e o saco vitelino parietal (SVP). Fonte: Acervo do autor.....	58
Figura 7 – Subplacenta do preá aos 15 dias de gestação. Em A: Visão panorâmica da subplacenta evidenciando sua monocamada de citotrofoblasto (Ct) envolta por tecido sincicial (St) que participa dos processo de invasão do tecido materno e da destruição e substituição do endotélio dos vasos deciduais, pode-se também observar a presença de grandes lacunas maternas (LM) nas margens da estrutura, além da presença do endoderma visceral (EV). Barra, 200 µm. Em B: observar a relação da camada citotrofoblástica (Ct) com o tecido sincicial (St) e a presença de vasos maternos com o endotélio substituído marcados pela cabeça de seta (>). Barra, 50 µm. Em C: notar novamente a presença de vasos de origem materna com revestimento trofoblástico (>)presença de figuras de mitose indicada pela seta (→) e por fim sinalizados pelo asterisco (*) pode-se visualizar os vacúolos característicos do sinciotrofoblasto (St). Barra, 20 µm. Coloração hematoxilina e eosina. Fonte: Acervo do autor.....	60
Figura 8: Característica invasiva do tecido trofoblástico aos 15 dias de gestação. Em A: notar a organização das células trofoblásticas (Tb), que confluem em direção ao tecido materno participando do processo de invasão do mesmo, seus núcleos aglomerados e em fila, presença de células gigantes (→) binucleadas e o endoderma visceral (EV).	



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

Barra, 50 µm. Em B: observar as células trofoblásticas gigantes (→) aproximando-se de vasos decíduais (*). Barra, 50 µm. Coloração hematoxilina e eosina. Fonte: Acervo do autor.....

62

Figura 9 – Organização da subplacenta aos 23 dias de gestação e sua relação com a placenta principal (PP) e decídua basal (DB). Em A: observar em uma visão panorâmica os lóbulos da subplacenta compostos em sua maioria por citotrofoblasto (Ct) e circundado por sinciciotrofoblasto (St). Barra, 200 µm. Em B: notar a relação de justaposição da placenta principal (PP) e a subplacenta (SP). Barra, 50 µm. Em C: a relação entre o tecido subplacentário (SP) e a decídua basal (DB), onde ainda não há uma zona juncional bem definida e esta região assume aspecto desorganizado com tecido subplacentário adentrando profundamente na decídua. Barra, 50 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Fonte: Acervo do autor.....

64

Figura 10 – Organização do citotrofoblasto (Ct) e do sincício (St) aos 23 dias de gestação. Em A: observar a presença de pequenas células (*) com citoplasma bastante eosinofílico e citoplasma basófilo no centro do lóbulo citotrofoblástico. Barra, 50 µm. Em B: notar a relação do sincício (St) com os lóbulos de citotrofoblasto (Ct) e a presença de células gigantes (→) e lacunas materna (LM) permeando o tecido sincicial. Barra, 50 µm. Coloração hematoxilina e eosina. Fonte: Acervo do autor.....

65

Figura 11 – Fotomicrografia detalhando a presença de grande quantidade de células gigantes aos 23 dias de gestação. Em A: notar a presença de uma célula trofoblástica gigante (→) entre a placenta principal (PP) e a subplacenta. Barra, 50 µm. Em B, observa-se estas células, marcadas pelas setas (→), difusas na decídua, especialmente, próximas aos vasos decíduais (VD). Em C: observar a presença de células trofoblásticas gigantes nas margens da placenta principal, ocupando o espaço entre o espongiotrofoblasto (Et) e o saco vitelino parietal (SVP). Barra, 50 µm. Coloração hematoxilina e eosina. Fonte: Acervo do autor.....

67

Figura 12 – Fotomicrografias ilustrando as relações da subplacenta com a placenta principal e a decídua basal. Em A: Observar a presença de um tecido conjuntivo frouxo (TF) entre a subplacenta (SP) e a placenta principal, esta é contituida por tecido conjuntivo frouxo e contem vasos de origem fetal (VF). Barra, 200 µm. Em B: temos um maior detalhamento da zona transicional e vaso fetal (VF) e percebe-se ainda, e percebe-se ainda a relação periférica do citotrofoblasto (Ct) subplacentário com o sincício (St). Barra, 50 µm. Em C: relação da subplacenta (sp) com a zona juncional (ZJ), e em D: um maior aumento desta região demonstrando suacaracterística de tecido amorfo com a presença de células gigantes (→). Fonte: Acervo do autor.....

69

Figura 13 – Fotomicrografia evidenciando característica lobulada da subplacenta. Em A: notar a organização dos lóbulos subplacentário nesta fase da gestação, com sincício (St) no centro e citotrofoblasto (Ct) em sua periferia. Barra, 200 µm. Em B: evidencia-se em um maior aumento os lóbulos subplacentários com o citotrofoblasto (Ct)



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

periférico e o sincício (St) compondo sua porção central. Barra, 50 μ m. Fonte: acervo do autor..... 71

Figura 14 – Ilustração da difusão do tecido oriundo da subplacenta (SP), em especial o citotrofoblasto (Ct), no tecido da placenta principal (PP). Em A: observa-se uma ilhota de citotrofoblasto (Ct), originado na subplacenta, na placenta (PP), e Em B, é possível notar o deslocamento do citotrofoblasto (Ct) no interior do tecido placentário. Barra, 50 μ m. Fonte: Acervo do autor 72

Figura 15 – Relação dos vasos fetais (VF) com o sinciciotrofoblasto (St) aos 30 dias de gestação. Em A: notar a grande proximidade entre o sincício (St) e o vaso fetal (VF), e Em B, observar a relação de proximidade do vaso fetal com os resquícios das lacunas maternas (LM). Barra, 20 μ m. Fonte: Acervo do autor 73

Figura 16 – subplacenta aos 45 dias de gestação. Observar em A, em uma visão panorâmica, a maior quantidade de sinciciotrofoblasto (St) em relação ao citotrofoblasto (Ct). Barra, 200 μ m. Em B: relação das camadas citotrofoblasticas (Ct) com o sincício (St) e manutenção do aspecto lobulado. Barra, 50 μ m. Em C: Notar as características de degeneração do trofoblasto sincicial, como a a grande quantidade de vacúolos (V) e a presença de núcleos picnóticos ($\rightarrow$) evidenciando a presença de morte celular neste tecido. Barra, 50 μ m. Fonte: Acervo do autor..... 75

Figura 17 – subplacenta aos 45 dias de gestação. Observar em A, Proximidade dos vasos fetais (VF) com o sinciciotrofoblasto (St), assim como com as lacunas maternas (LM) residuais. Barra, 20 μ m. Em B: relação das camadas citotrofoblasticas (Ct) com o sincício (St) na periferia da subplacenta (SP), notar que o citotrofoblasto permanece ocupando a periferia do órgão e que o tecido conjuntivo que separava a subplacenta (SP) da placenta (PP) diminui em relação ao período gestacional anterior. Barra, 20 μ m. Fonte: Acervo do autor 76

Figura 18 – subplacenta no final da gestação (53 e 55 dias). Observar em A e B, grande quantidade de tecido conjuntivo evidenciado pela técnica do tricrômio de Gomori. Barra, 50 μ m. Em C: uma ilhota de sinciciotrofoblasto (St) e uma monocamada de citotrofoblasto (Ct) que se torna descontínua, características marcantes desta fase da gestação. Barra, 20 μ m. Em D: região de tecido amorfo (*) contendo grande quantidade de núcleos picnóticos que ressaltam a deterioração deste tecido. Barra, 50 μ m. Em E: Vasos fetais (VF) expostos e presença de tecido conjuntivo denso no tesido subplacentário. Barra, 50 μ m. Em F: região onde situava-se a zona juncional composta em sua maior parte por tecido amorfo eosinofílico e presença de núcleos picnóticos.Barra, 20 μ m. Fonte: Acervo do autor..... 78

Figura 19 – Reação de PAS no tecido subplacentário nas diferentes idades gestacionais. Observar em A, o sinciciotrofoblasto (St) PAS-positivo aos 15 dias de gestação, assim como as lacunas (*) possuem conteúdo que reage positivamente. Barra, 50 μ m. Em B:



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

reação PAS-positiva no sinciciotrofoblasto (St) e nas lacunas maternas (*) aos 23 dias de gestação, perceber ainda reação negativa no citotrofoblasto (Ct) e a íntima relação entre o sincício e as lacunas. Barra, 50 μ m. Em C: notar aos 30 dias de gestação a reação PAS-positiva novamente no sincício (St) e negativa no trofoblasto celular (Ct). Barra, 50 μ m. Em D: novamente a reação PAS-positiva no Sincício (St) aos 45 dias de gestação, perceber a maior quantidade de vacúolos no citoplasma sincicial nesta idade. Barra, 50 μ m. Em E e F: subplacenta no final de gestação aos 53 e 5 dias respectivamente, neste período devido a degeneração do tecido subplacentário, surge uma grande quantidade de tecido amorfo PAS positivo e que possui núcleos picnóticos. Barra 50 μ m e 20 μ m. Fonte: Acervo do autor 80

Figura 20 – Reação imunohistoquímica ao PCNA nas diferentes idades gestacionais. Observar em A, a reação positiva a PCNA 23 dias de gestação, e em B, Controle negativo. Barra, 50 μ m. Em C: notar aos 30 dias de gestação a intensa reação ao PCNA. E em D: controle negativo. Barra, 50 μ m. Em E: perceber a brusca diminuição da reação ao PCNA. Em F: controle negativo. Barra 50 μ m. Em G: reação ao PCNA praticamente ausente. Barra 50 μ m. Fonte: Acervo do autor 82

Figura 21: Gráfico do índice mitótico por idade gestacional durante o desenvolvimento subplacentário. Fonte: Acervo do autor..... 83

Figura 22 – Em A: fotomicrografia ilustrando o resultado da técnica de impregnação por prata das AgNORs. Barra 50 μ m. Em B: gráfico da média por idade gestacional da contagem de AgNORs durante o desenvolvimento subplacentário. Fonte Acervo do autor 84

Figura 23: Reação imunohistoquímica à vimentina nas diferentes idades gestacionais. Em A: reação positiva na subplacenta aos 23 dias de gestação, notar que o endotélio da rede capilar fetal é bem demarcado neste estágio e caracteriza-se pela proximidade com as lacunas maternas que não são marcadas pela reação, e em B, controle negativo para a mesma idade gestacional. Barra 50 μ m. Em C: reação positiva do endotélio fetal aos 30 dias de gestação, notar a grande proximidade entre o vaso fetal e o sinciciotrofoblasto (St) e em D, o controle negativo aos 30 dias de gestação. Barra 20 μ m. Em E: reação positiva aos 45 dias de gestação, observar que nesta fase da gestação a maior parte do tecido nas proximidades do vaso fetal trata-se de sinciciotrofoblasto (St) e em F, o controle negativo para esta fase. Barra, 20 μ m. Em G: observa-se tecido subplacentário aos 55 dias de gestação, a desorganização e deterioração do tecido é evidente, no entanto, vasos com endotélio intacto e preenchidos por material amorfo podem ser visualizados, e em H, temos o controle negativo para esta idade gestacional. Barra, 20 μ m. Fonte Acervo do autor 86

Figura 24 – Reação imunohistoquímica à citoqueratina durante as diferentes idades gestacionais. Em A: observar a reação positiva do citotrofoblasto aos 23 dias de gestação, a presença de células gigantes ($\rightarrow$) e um vaso fetal (VF), e em B controle negativo para esta idade. Barra 20 μ m. Em C: notar aos 30 dias de gestação a reação



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

positiva no citotrofoblasto (Ct) e com menor intensidade no sincício (St), e em D, o controle negativo. Barra, 20 µm. Em E: Reação positiva aos 45 dias de gestação, e em F: controle negativo. Barra, 20 µm. Em G: reação positiva aos 55 dias de gestação, notar a diminuição da população celular em comparação as outras idades. Em H: controle negativo. Barra, 20 µm. Fonte: Acervo do autor 88

Figura 25: Aglomerado células de origem trofoblástica presente nas margens subplacentárias aos 30 dias de gestação, ressalta-se também a presença de células trofoblásticas gigantes (→). Em A, reação positiva e em B, controle negativo. Barra, 20 µm. Reação imunohistoquímica a citoqueratina 89

Figura 26: Eletrofotomicrografia do tecido subplacentário. Notar a presença do sinciciotrofoblasto (St) e do citotrofoblasto (Ct) em uma relação de justaposição, a presença de mitocôndrias (→) no sincício, uma lacuna materna e os núcleos de ambos os tipos celulares. Fonte: Acervo do autor 91

Figura 27 – Eletromicrografia ilustrando a disposição e características do citotrofoblasto (Ct) e sinciciotrofoblasto (St). Em A: Observar o citotrofoblasto (Ct) com citoplasma finamente granular, poucas mitocôndrias (M), núcleos (N) com formato variável, cromatina em grumos e espaços intracelulares (*), e o sinciciotrofoblasto com citoplasma grosseiramente granular, com vacúolos e mais eletrodenso que o citoplasma citotrofoblástico, notar ainda a presença de um vaso fetal com endotélio intacto, confirmado pela visualização do núcleo endotelial (NE). Em B: Observar a justaposição entre citotrofoblasto (Ct) e sincício (St). Fonte: Acervo do autor 92

Figura 28 – Relação entre sinciciotrofoblasto (St) e tecido materno (TM), ressaltando a presença de vilosidades na região de contato entre as estruturas. Em A, uma visão mais ampla e em B, em maior aumento detalhando as vilosidades, pode-se ainda notar a presença de mitocôndrias (M) e vacúolos (V). Fonte: Acervo do autor 94

Figura 29 – Fotomicrografias de lacunas maternas nas diferentes idades gestacionais. Em A: Observar a presença de duas lacunas aos 15 dias de gestação, nas quais pode-se observar a presença de vilosidades consideravelmente alongadas e hemácias em sua luz, a lacuna é envolta por sincício (St) e visualiza-se células trofoblásticas gigantes (Cg). Em B: Aos 23 dias de gestação as lacunas mantem sua conformação, no entanto, as vilosidade aparecem menos alongadas, nota-se em seu interior a presença de material amorfo de diferentes densidades e hemácias (*). Em C: Lacuna materna aos 30 dias de gestação, observar a diminuição das vilosidades em sua luz e a presença de material amorfo de diferente aspecto, quando comparado as idade anteriores, em sua luz. Em D: notar a evidente degeneração das vilosidades aos 45 dias de gestação. Em E e F: exemplares aos 53 e 55 dias de gestação, respectivamente, é possível observar as lacunas preenchidas somente por material amorfo e a ausências das vilosidades. Fonte: Acervo do autor 95



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

- Figura 30 – Fotomicrografia de uma célula trofoblástica gigante (Cg), caracterizada por apresentar multinucleações (N), cromatina dispersa e espessamento da membrana citoplasmática indicado pela seta (→). Fonte: acervo do autor 96
- Figura 31 – Características ultraestruturais da subplacenta aos 15 dias de gestação. Em A: observar a presença de vacúolos (V) no sincício. Em B: é possível visualizar formações circulares de baixa eletrodensidade marcadas com asterisco (*). E em C: nota-se uma célula trofoblástica gigante (Cg) aproximando-se de um vaso com endotélio intacto, evidenciado pela presença do núcleo (NE). Fonte: Acervo do autor.... 98
- Figura 32 – Características notáveis da subplacenta aos 30 dias de gestação. Em A: notar a organização da da cromatina dos núcleos sinciciais (St) em nucléolo (Nc). E em B observar a formação de gotículas de baixa eletrodensidade no sincício que margeia as lacunas maternas. Fonte: acervo do autor 100
- Figura 33 – Ilustração da ultraestrutura da subplacenta do préa aos 45 dias de gestação. Em A: Observar o espaçamento entre as células citotrofoblásticas (Ct), núcleos (N) do sincício (St) bastante aglomerados, inclusões eletrodensas (→) e formações de elevada densidade (*). Em B: perceber que as lacunas maternas (LM) são apenas resquícios e a apresentam gotículas em sua luz. Em C: notar a organização característica do nucléolo (Nc) e a justaposição do citotrofoblasto ao sinciciotrofoblasto. Em D: Verificar que nos espaços (→) onde antes havia projeções do sinciciotrofoblasto há agora apenas resquícios destas. Fonte: Acervo do autor 101
- Figura 34 – Ilustração da ultraestrutura da subplacenta do préa no final da gestação. Em A: observar uma ilhota de sinciciotrofoblasto com seus núcleos (N) aglomerados e rodeada por tecido em degeneração com vacúolos (V). Em B: perceber que os núcleos do sinciciotrofoblasto (St) organizam-se concentricamente, esta configuração foi observada em varias ocasiões onde ainda havia sincício intacto. Em C e D: notar o avançado grau de degeneração do tecido subplacentário evidenciado principalmente pelos sinais de morte celular (→). Fonte: Acervo do autor 102



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

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ROEDORES.....	23
1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O PREÁ.....	24
1.3 JUSTIFICATIVA.....	26
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	28
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O TROFOBLASTO.....	28
3.2 ASPECTOS DA PLACENTA DOS ROEDORES.....	33
3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A SUBPLACENTA.....	37
3.3.1 Aspectos relacionados à histologia da subplacenta.....	38
3.3.2 Aspectos relacionados à ultraestrutura da subplacenta.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 LOCAL DE AMOSTRAGEM.....	45
4.2 ESPÉCIE ESTUDADA.....	46
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	47
4.4 CITOLOGIA VAGINAL.....	48
4.5 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO-CIRÚRGICO.....	49
4.6 COLETA DO MATERIAL.....	50
4.7 MICROSCOPIA DE LUZ.....	50
4.8 REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS.....	51
4.9 AgNOR.....	52
4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	53
5. RESULTADOS.....	55
5.1 DESCRIÇÃO GERAL DO ÚTERO GRAVÍDICO E DOS ANEXOS FETAIS DO PREÁ.....	55
5.2 CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA SUBPLACENTA.....	59
5.2.1 Aos 15 dias de gestação.....	59
5.2.2 Aos 23 dias de gestação.....	63
5.2.3 Aos 30 dias de gestação.....	68
5.2.4 Aos 45 dias de gestação.....	74
5.2.5 Aos 53 e 55 dias de gestação.....	77
5.3 REAÇÕES CITOQUÍMICAS E IMUNOCITOQUÍMICAS.....	79
5.3.1 PAS.....	79
5.3.2 PCNA e AgNOR.....	81
5.3.3 Vimentina e citoqueratina.....	85



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

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	90
6. DISCUSSÃO.....	103
6.1 DESCRIÇÃO GERAL DO ÚTERO GRAVÍDICO E DOS ANEXOS FETAIS DO PREÁ.....	104
6.2 CARACTERIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO SUBPLACENTÁRIO.....	105
6.3 CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO DESENVOLVIMENTO SUBPLACENTÁRIO.....	112
6.4 CARACTERIZAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO SUBPLACENTÁRIO.....	115
6.5 CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO DESENVOLVIMENTO SUBPLACENTÁRIO.....	116
7. CONCLUSÃO.....	119
REFERÊNCIAS.....	121
APÊNDICE.....	132
ANEXO.....	147

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ROEDORES:

O Brasil possui umas das mais diversificadas faunas do mundo, sendo considerada uma nação megadiversa juntamente com a Indonésia e a Colômbia. Sua mastofauna, possui aproximadamente 10% dos mamíferos descritos no mundo. Neste grupo predominam, em número, os animais de pequeno porte, com especial destaque para os roedores, que compreende cerca de 43% das espécies mamíferas, correspondendo a aproximadamente 450 gêneros e 2.015 espécies desta ordem (REIG, 1984; WOLFF e SHERMAN, 2007; CADEMARTORI et al., 2009; PAGLIA, 2008).

Os roedores, taxonomicamente, estão incluídos na ordem Rodentia, uma das mais antigas ordens da classe Mammalia. Esta ordem de acordo com dados paleontológicos tem o primeiro relato fóssil datado de 55 a 60 milhões de anos, na época geológica denominada de Paleoceno, com o fóssil de um exemplar da família Paramyidae e do gênero *Paramys*, que na época seguinte, o Eoceno, tornou-se profuso em toda Eurásia e que provavelmente, pode ter constituído o grupo básico do qual se originou todos os roedores (RIBEIRO, 2006; WOLFF e SHERMAN, 2007).

Embora tenham surgido em épocas geológicas anteriores, o estabelecimento das famílias mais modernas desta ordem se deu somente entre o final do Eoceno e início do Oligoceno na região que correspondia ao continente ainda conhecido como Eurásia, sendo que os Histicognatos ocuparam as áreas onde estão situadas a África e Ásia, enquanto, os Murídeos se estabeleceram na região que corresponde Europa (RIBEIRO, 2006; WOLFF; SHERMAN, 2007). Já na América do Sul, de acordo com Wolff e Sherman (2007), os exemplares atuais da ordem Rodentia, provêm de duas invasões distintas, uma por parte dos Histicognatos, oriundos da África, que provavelmente se estabeleceram nesta região no período em que houve a separação entre os continentes, e outra por parte dos Murídeos, ancestrais da subfamília Sigmodontinae, que vieram da região Neártica estabelecendo-se primeiro na América do Norte e posteriormente na América do Sul.

Ao longo de sua história evolutiva os roedores tornaram-se a ordem mamífera com maior diversidade, não só no Brasil e América do Sul, mas em todo mundo, variando desde animais de 15 gramas, tais como o camundongo (*Mus musculus*) até a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) com peso em torno de 50 quilogramas (NOWAK, 1999; EMMONS e FEER, 1997). O sucesso adaptativo destes, segundo Colbert (1969), se dá por quatro motivos: o tamanho corporal pequeno, grande agilidade, elevados índices reprodutivos e alimentação diversificada, o que favorece sua adaptação aos mais diversos ambientes e um grande sucesso na perpetuação da espécie.

1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O PREÁ:

A princípio a ordem Rodentia foi subdividida por Simpson (1945) em três grandes grupos, baseados na osteologia craniana, nas especializações do músculo masseter e nas relações deste com o conduto infra-orbitário, que denominou estes grupos de Sciuromorpha, Myomorpha e Hystricomorpha. Assim, com base nestes caracteres, o preá é considerado um roedor pertencente à subordem Hystricomorpha.

O preá na América do Sul distribui-se pelo Brasil, Bolívia e oeste dos Andes (WILSON e REEDER, 2005). No Brasil, estão presentes do sudeste do estado do Pará e leste de Mato Grosso ao noroeste de Minas Gerais, oeste da Bahia, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Piauí e Maranhão, além do Distrito Federal (MOOJEN, 1952), mas também são encontrados no Rio Grande do Norte. São pertencentes à família Caviidae e subfamília Caviinae, que compreende um grupo primitivo de roedores histricognatos endêmicos da América do Sul (WOODS, 1982).

A família Caviidae se distingue das outras famílias de roedores histricognatos, por aspectos morfológicos ligados ao crânio e aos dentes. Sendo em relação aos dentes, as principais distinções relacionadas aos molares, no que diz respeito a sua convergência formando um “V”, por possuir raízes curtas, serem hipsodontes e terem sua morfologia baseada em quatro cristais reduzidos a dois prismas (WOOD, 1955).

Dentro da família Caviidae, o gênero *Galea*, onde estão incluídos os preás, se caracteriza por um corpo coberto por pêlos macios, coloração variando do cinza agrisalhado

ao marrom-claro agrisalhado e especificamente o *Galea spixii*, segundo Brandt (1835), possui coloração dorsal acinzentada, com tom brunáceo e ventre branco, presença ou não de anel periorcular de pêlos mais curtos e claros que os do dorso, são desprovidos de cauda, e seus membros pélvicos apresentam apenas três dígitos e habitam principalmente áreas abertas (DOUTT, 1938; VAUGHAN, 1972; DIAZ, 2000).

Estes animais são comumente encontrados em regiões em que o bioma caatinga é predominante, geralmente habitam locais como capinzais e serrotes de pedra e utilizam cercas de pedra e locas como esconderijo (MOOJEN, 1952; BONVICINO et al., 2008). Na caatinga, a reprodução desta espécie pode, de acordo com Eisenerg e Redford (1999), ocorrer em qualquer época do ano mesmo com as adversidades impostas pelo clima desta região, e quando em período gestacional, as fêmeas fazem seus ninhos preferencialmente em locais protegidos seja por pedras ou vegetação, parem em média dois filhotes, por gestação, que nascem totalmente cobertos de pêlos e já apresentam os olhos abertos (BRASIL, 2002; OLIVEIRA et al., 2008).

Outra característica marcante dos roedores Hystricomorfos, e dessa forma, também do preá, é a presença de um órgão associado à placenta e denominado de subplacenta que de acordo com Mossman (1937) era conhecida inicialmente por existir somente em dois animais, o porquinho da índia (*Cavia porcellus*) e o porco espinho (*Erethizon dorsatum*), porém com o avançar dos estudos com os animais desta subordem verificou-se que este órgão está presente em toda ela. Exemplo disso são as pesquisas realizadas por Fisher (1985) que estudou especificamente a subplacenta do castor (*C. canadenses*) como modo de contribuir ao estudo da placentação desta espécie, além disso, mais recentemente Bonatelli (2005) estudou de maneira específica este órgão na paca (*Cuniculus paca*), a partir do terço médio de gestação realizando análises morfológicas de sua ultraestrutura e vascularização e na cutia (*Dasyprocta leporina*) Rodrigues (2005) caracterizou morfolologicamente a subplacenta neste animal baseando-se em estudos macroscópicos, microscopia convencional, eletrônica e imunohistoquímica.

Já no preá esta estrutura ainda não foi alvo central de estudos, nestes, a subplacenta foi citada em pesquisas relacionadas à placentação de uma maneira geral, como é o caso do descrito por Oliveira et al. (2008) estudando a placentação nesta espécie, onde descrevem como sendo inicialmente um órgão confluyente com a placenta principal e em contato com vasos maternos em suas bordas, já em meados da gestação torna-se uma estrutura distinta e

com vascularização materna e fetal e com a proximidade do termo diminui de tamanho e sua atividade é diminuída.

1.3 JUSTIFICATIVA:

A utilização de animais na pesquisa, principalmente como modelo experimental, é uma prática comum no meio científico e a maioria das espécies utilizadas, são de animais domesticados e de médio a grande porte, como a ovelha no estudo da fisiologia fetal. Todavia, as implicações éticas tendem a aumentar com o tamanho dos animais e são ainda mais ríspidas quando envolvem cães, gatos e animais de casco. Dessa maneira, os roedores surgem como uma alternativa viável e que trazem consigo grandes vantagens para o desenvolvimento de pesquisas, como curtos períodos de gestação, grandes ninhadas e pequeno porte, o que os torna animais de fácil manejo e acomodação, além de diminuir os custos para a pesquisa (CARTER, 2007).

Assim, os estudos com modelos de placentação de roedores tem se tornado uma ferramenta interessante para o conhecimento da biologia reprodutiva das espécies, favorecendo, conseqüentemente, a preservação e manutenção em cativeiro com vistas a domesticação. Adicionalmente, podem proporcionar o desenvolvimento de estudos comparativos e mesmo tornar estas espécies modelos para os mais diversos tipos de pesquisas, tais como aqueles voltados à produção de células tronco e mesmo para o entendimento de diversas afecções que acometem fetos na vida pré-natal, como descreve Carter (2007) ou mesmo por considerar que a presença da subplacenta nos roedores histricomorfos, representa um modelo ideal para o estudo comparativo dos processos trofoblásticos em humanos, dado poder de invasão do trofoblasto subplacentário de acordo com Mess et al. (2007).

Do exposto, justifica-se estudar o desenvolvimento da subplacenta do preá, por ser um animal de pequeno porte, com grande capacidade de reprodução e adaptação ao cativeiro, já que tais características são importantes quando se quer definir uma espécie como modelo experimental, para estudos ligados a reprodução, entre outros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Descrever morfológicamente o desenvolvimento da subplacenta do preá nas diferentes idades gestacionais, enfatizando, especialmente, aspectos da microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e imunohistoquímicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Analisar a organização histológica da subplacenta nos terços inicial, médio e final da gestação.
2. Avaliar a ultraestrutura da subplacenta nos terços inicial, médio e final da gestação.
3. Identificar os componentes celulares da subplacenta nos terços inicial, médio e final da gestação segundo os métodos citoquímicos e imunocitoquímicos, ressaltando, especialmente, aspectos relacionados à sua vascularização, proliferação de seu tecido e produtos de secreção.
4. Comparar os resultados obtidos com os discutidos para outras espécies já estudadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O TROFOBLASTO:

No início do desenvolvimento dos mamíferos, o conceito se diferencia numa massa celular interna e em uma monocamada exterior de células uninucleadas, o trofoblasto, que é responsável pela formação de grande parte das membranas extra- embrionárias e da placenta, enquanto que os tecidos do embrião, assim como o cordão umbilical são exclusivamente derivados do eixo de massa celular interna. (BURTON; KAUFFMAN; HUPPERTZ, 2006).

O trofoblasto situa-se em uma posição intermediária entre o tecido materno e o embrião permanecendo assim até o final da gestação. Além disso, as células trofoblásticas são responsáveis por desempenhar funções como adesão, fixação e implantação do blastocisto no endométrio receptivo, nutrição do embrião, regulação hormonal, fagocitose de elementos sanguíneos maternos e formação da porção fetal da placenta (FERRO, 2000).

As células trofoblásticas possuem um importante papel durante o período de implantação do blastocisto nos mamíferos euterianos. Para que esta ocorra é necessário que o trofoblasto chegue a um estado invasivo e que o endométrio esteja em uma situação de receptividade adequada ao processo. Outra condição para que a implantação se processe, está relacionada ao poder de adesão destas células, onde o trofoblasto por meio de sua membrana plasmática apical se prende à membrana plasmática apical do epitélio uterino (DENKER, 1993).

Durante o processo de implantação surgem basicamente duas populações celulares oriundas do blastocisto, o sinciotrofoblasto, mais externo, com núcleos volumosos e citoplasma contínuo e o citotrofoblasto, constituído por uma camada irregular de células ovóides e mononucleadas (GUDE, et al., 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O citotrofoblasto é a camada basal das células trofoblásticas e são comparadas por Kliman (2000), em revisão de literatura acerca dos processos de invasão do trofoblasto, à camada basal de células indiferenciadas da pele que dão origem aos queratinócitos diferenciados e, da mesma forma, o citotrofoblasto é chamado de célula tronco da placenta pelo autor, pois dá origem as formas trofoblásticas diferenciadas que constituirão a placenta.

Kanashiro et al. (2009), estudando a placentação da capivara, e Oliveira et al. (2012), estudando a placentação do punaré, descreveram que na placenta em início de gestação o citotrofoblasto está presente em formações denominadas ninhos de trofoblasto celular, que estão situados do lado fetal da camada esponjosa formada pelo espongiotrofoblasto e nos pontos onde ocorrem projeções de tecido conjuntivo. Este trofoblasto celular atua como revestimento que se expande tanto na região central da escavação central como também lateralmente a ela.

Oliveira et al. (2008), descrevendo as zonas de crescimento da placenta do preá em estágios iniciais da gestação relatam que o citotrofoblasto se apresenta com os limites celulares bastante evidentes e situados no mesênquima fetal, atuando como uma fronteira entre a placenta que está em processo de desenvolvimento e a escavação central. Este tecido apresenta grandes espaços intercelulares e recobre as projeções mesenquimais desde as margens placentárias até a região do labirinto.

Flamini et al. (2011), em estudo com placentação da viscacha, descreveram que o citotrofoblasto envolve os canais tubulares que estão presentes no interior do espongiotrofoblasto e se situa entre a camada sincicial e o mesênquima, organizados em aglomerados de células que separam estas duas estruturas.

Além disso, Oliveira et al. (2008), Kanashiro et al. (2009) e Flamini et al. (2011), concordam que o trofoblasto celular caracteriza-se por possuir um elevado grau de atividade proliferativa que é fortemente evidenciado pela reação ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), e que da origem a um segundo centro de proliferação celular que é irrigado por vasos de origem fetal situado dentro das áreas sinciciais da placenta.

A segunda forma básica assumida pelas células trofoblásticas embrionárias é a do sinciciotrofoblasto, que surge a partir de um processo denominado de sincicialização, onde as células citotrofoblásticas fusionam-se e dão origem a massa sincicial. Todavia os mecanismos envolvidos, assim como o controle deste evento, ainda não são bem compreendidos, mas características como o contato íntimo com as células vizinhas, com o tecido materno e com a matriz extracelular são de fundamental importância para a origem e manutenção do sinciciotrofoblasto de acordo com Burton, Kauffman e Huppertz (2006) e Soares et al., (2012).

Para Johansson et al. (2000) e Rodrigues (2005) o sincicitrofoblasto é caracterizado, de forma mais específica, como sendo uma massa celular multinucleada que apresenta

núcleos de forma e tamanho variados, citoplasma basófilo e com limites celulares indefinidos, e possui como função a regulação da passagem transcelular dos nutrientes, solutos e água agindo de forma direta na manutenção do crescimento e desenvolvimento fetal.

Mess (2007), estudando a placentação do *Petromus typicus* relatou que no terço médio da gestação o sinciotrofoblasto tanto na região do espongiotrofoblasto como no labirinto, esteve presente, principalmente envolvendo os canais de sangue materno, e com a aproximação do termo da gestação o tecido placentário, em sua maioria, é de natureza sincicial, que por sua vez possui uma considerável quantidade de projeções e microvilosidades, além de comportar-se como uma tênue membrana entre os sistemas sanguíneos materno e fetal.

Para Kanashiro (2006), em estudo acerca da placentação da capivara, o sincício ocupava a maior parte da área compreendida pelo labirinto placentário, revestindo as lacunas maternas presentes nesta região e na área correspondente ao interlóbulo possuía uma característica mais eosinofílica, além de amplas lacunas de origem materna com material também eosinofílico.

No preá, segundo Oliveira et al. (2008), o sinciotrofoblasto forma a maior parte do espongiotrofoblasto desde o início do desenvolvimento placentário, enquanto que no labirinto este tecido torna-se mais frequente por volta do terço médio da gestação, situando-se entre os sistemas materno e fetal como uma fina camada.

Para Kliman (2000), além destas duas populações trofoblásticas mais comumente descritas, atualmente, com avanços como o advento de técnicas de cultura celular, a melhoria dos marcadores sintéticos de atividade trofoblásticas e o aumento da compreensão das funções do trofoblasto no complexo uteroplacenta, é possível identificar outros subtipos de trofoblasto.

Soares et al. (2012), estudando a placentação do rato como um modelo experimental para a interação maternofetal classifica os diferentes subtipos de células trofoblásticas de acordo com a região da placenta que estão localizados, e cita que no labirinto o único subtipo originado é o sinciotrofoblasto, enquanto que na região de zona juncional surgem três subtipos: as células trofoblásticas gigantes, as células do espongiotrofoblasto e as células trofoblásticas produtoras de glicogênio (Figura 1).

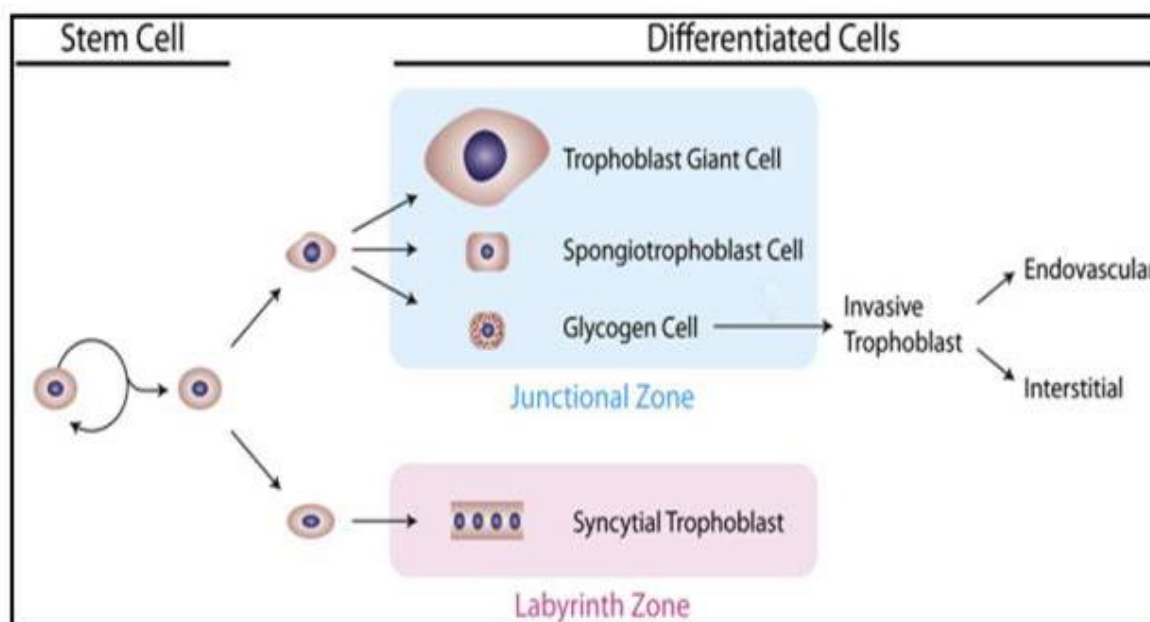


Figura 1 – Esquema da diferenciação das linhagens trofoblásticas. Fonte: Soares et al (2012).

As células trofoblásticas gigantes (CTGs) correspondem à primeira linhagem de células trofoblásticas a se desenvolver, possuem habilidade invasiva e são as que possuem o maior potencial endócrino, surgem inicialmente a partir do trofoectoderma mural como CTGs primárias, e imediatamente após o início do processo de implantação surgem as CTGs secundárias (SIMMONS; CROSS, 2005; SOARES et al., 2012).

Favaron et al. (2011) descrevendo a placentação de cinco gêneros da subfamília Sigmodontinae, citaram que as células trofoblásticas gigantes encontram-se dispersas na zona juncional mantendo uma íntima relação com as lacunas de sangue materno e possuíam grandes núcleos com cromatina proeminente. Particularmente para os gêneros *Oligoryzomys* e *Necomys* os autores citam que as CTGs estavam intimamente associadas com o espongiotrofoblasto, enquanto que os gêneros *Cerradomys*, *Hylaeamys* e *Euryoryzomys* apresentaram poucas células trofoblásticas gigantes na zona juncional, estando estas células, comumente, em forma de aglomerados e dispostas em regiões distintas na periferia do disco placentário. Em acréscimo, os pesquisadores afirmam que todos os gêneros estudados possuíam uma faixa contínua de CTGs situada entre a decídua e a zona de juncional e, em sua maioria bi ou multinucleadas.

Outra linhagem trofoblástica que possui como local de diferenciação a zona juncional é a que origina as células espongiotrofoblásticas, que após diferenciadas ocupam uma camada

média da placenta e posicionam-se entre as CTGs secundárias e o labirinto. A função destas células é pouco entendida, no entanto, atuam como principal constituinte da zona juncional, e poderiam atuar como suporte estrutural para o desenvolvimento das estruturas vilosas do labirinto e ainda contribuírem com a função endócrina da placenta (ROSSANT; CROSS, 2001; SIMMONS; CROSS, 2005; SOARES et al., 2012).

Estudando as diferentes linhagens trofoblásticas Simmons e Cross (2005) relataram que as células espongiotrofoblásticas surgem na região do cone ectoplacentário e podem se originar a partir do mesmo precursor das células trofoblásticas gigantes. No mesmo estudo os autores discutem que mesmo proveniente de um precursor comum, as células espongiotrofoblásticas respondem diferentemente quanto à expressão de alguns genes característicos do trofoblasto como, por exemplo, no que ocorre com o aumento da expressão do *Mash2* onde há uma evidente diminuição das células espongiotrofoblásticas, enquanto que, as CTGs secundárias aumentam. Além disso, mutações nos genes *Cx31* e *Keratin8/19*, também atuam de forma contraditória nestas duas populações celulares, o que para os autores pode ser uma evidência da atuação destes genes na diferenciação das células espongiotrofoblásticas.

Por volta do terço médio da gestação surge uma nova população de células trofoblásticas que se caracterizam por acumular glicogênio em seu citoplasma. Situadas inicialmente na região da zona juncional, as células trofoblásticas produtoras de glicogênio, migram em direção à decídua ultrapassando até os limites alcançados pelas CTGs, e são, provavelmente, progenitoras de uma linhagem de células trofoblásticas invasivas conforme descreve Adamson et al.(2002) e Soares et al. (2012).

Coan et al. (2006) em estudo com células produtoras de glicogênio avaliando sua origem e características, inferem que em um determinado período da gestação uma população celular, denominada pelos autores de células preglicogênicas, começa a acumular glicogênio e concomitantemente expressam a proteína P57^{Kip2}. Esta proteína atua inibindo a proliferação das células pré-glicogênicas ao passo que estimula sua diferenciação em células glicogênicas. Além disto, promove alterações no citoesqueleto das células tanto para a acomodação do glicogênio como para seus processos de migração.

3.2 ASPECTOS DA PLACENTA NOS ROEDORES:

Na formação da placenta, segundo Leiser e Kauffman (1994), estão envolvidas quatro estruturas membranosas: o cório, o âmnio, o saco vitelino e o alantóide. O cório é uma estrutura avascular que necessita do desenvolvimento de uma circulação funcional para que possa atuar nas trocas materno-fetais. Esta circulação pode ser derivada de vasos próximos ao mesoderma extraembrionário que são oriundos do saco vitelino ou do alantóide.

Quando os vasos sanguíneos originam-se do saco vitelino é formada uma estrutura denominada placenta coriovitelina, modelo de placentação bastante comum em marsupiais (ROBERTS e BREEDS, 1994). Todavia, na maioria dos mamíferos, o saco vitelino é uma estrutura transitória com função de aporte nutritivo e respiratório nas fases iniciais da gestação.

Em roedores, como por exemplo, a paca e a cutia, que tiveram os aspectos morfológicos do saco vitelino estudados por Conceição et al. (2008), o saco vitelino persiste durante toda a gestação, embora ele realmente não irrigue o cório. Em algumas espécies, tais como a capivara (FERRAZ, 2001) e os mocós (OLIVEIRA et al, 2006) o saco vitelino passa por um processo de inversão expondo o revestimento endodermal às secreções das glândulas uterinas, que representa uma importante via de absorção de proteínas e transporte de imunoglobulinas maternas, sendo esta estrutura denominada de placenta vitelina, que é funcional até o termo da gestação como um anexo da placenta principal e da subplacenta (BECKMAN; BRENT; LLOYD, 1996; CONCEIÇÃO et al, 2008).

No preá Vale et al. (2013), tratando da inversão do saco vitelino, relataram que nesta espécie ocorre uma placenta vitelínica e que passa por processo de inversão por volta do décimo quarto dia, caracterizando-se por apresentar uma degeneração inicial da onfalopleura bilaminar, por áreas de sangue materno extravasado, degeneração do endoderma parietal, resquícios da membrana de Reichert em aposição ao tecido uterino e descontinuidade do revestimento epitelial do endoderma parietal.

Apesar da importância da placenta vitelina, especialmente nos roedores, a placenta definitiva na maioria dos mamíferos recebe seu aporte vascular a partir de vasos associados ao alantoide caracterizando a assim chamada placenta corioalantóide. Esta placenta é formada por diferentes estruturas que se desenvolveram ao longo do tempo à medida que as espécies

mamíferas evoluíam, e originaram diversas configurações placentárias que se distinguem de acordo com as formas placentárias, os padrões geométricos das interdigitações nas superfícies materna e fetal, a quantidade de camadas que separam o sangue materno do fetal, e o arranjo dos vasos envolvidos nas trocas materno-fetais (LEISER; KAUFFMAN, 1994; BURTON; KAUFFMAN; HUPPERTZ; 2006). Assim, a placenta corioalantóide dos roedores pode ser classificada quanto a forma em discoidal, com interdigitações do tipo labiríntica, com barreira placentária do tipo hemocorial e com fluxo sanguíneo do tipo contra-corrente (MOSSMAN, 1987; LEISER; KAUFFMAN, 1994).

A forma placentária denominada discoidal é o tipo de configuração que possui o mais alto grau de concentração entre as interdigitações, permitindo uma relação de maior intimidade entre os tecidos maternos e fetais e proporcionando apenas um local de estabelecimento desta relação (BENIRSCHKE, KAUFMANN e BAERGEN, 2006), sendo os primatas (GILL, 1871), os roedores (FERRAZ, 2001; KANASHIRO, 2006; OLIVEIRA, et al. 2008; FAVARON, 2009) e os morcegos (ENDERS; WIMSATT, 1968) os principais exemplos de animais que desenvolvem este tipo placentário.

Para Wildman et al. (2006) que estudaram a relevância da placenta para a análise filogenética, a placenta discoidal para chegar a sua conformação atual passou por cerca de sete modificações ao longo dos processos evolutivos e claramente esteve presente nos ancestrais dos Eutérios permanecendo até hoje na maioria dos clados.

A placenta dos roedores possui o mais complexo e comum tipo de interdigitação materno-fetal, que é a placenta denominada labiríntica, este modelo de interdigitação caracteriza-se pela invasão de um bloco de tecido de origem trofoblástica no tecido endometrial originando uma estrutura que contém os vasos do embrião e canais de sangue materno dispostos de forma longitudinal, por onde passam o sangue materno (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961 a e b; ODUOR-OKELO, 1984; MOSSMAN, 1987; BONATELLI et al., 2001; MESS, 2003; RODRIGUEZ et al., 2003; FAVARON et al, 2011).

O labirinto é definido por Kauffman e Davidoff (1977), estudando a placenta do porquinho da índia, como sendo uma área de sincício capilarizado, na porção fetal da placenta principal, que é permeada por regiões sinciciais acapilarizadas denominadas de interlobulos. Este componente placentário que constitui a maior porção da placenta é o local de máxima intimidade entre o sangue materno e fetal e está presente desde o início da gestação, após a

implantação, sendo que o único componente materno presente é o sangue extravasado nas lacunas (FERRAZ, 2001; BONATELLI, 2005; KANASHIRO, 2006; FAVARON, 2009).

Para autores como Fisher (1971), Ferraz (2001), Bonatelli et al. (2005), Kanashiro (2006), Oliveira et al. (2008), Kanashiro, et al. (2009) e Favaron (2009), tratando da placentação de diferentes espécies de roedores concordaram que tanto citotrofoblasto como sinciotrofoblasto estão presentes na região de labirinto, que é marcado por apresentar sincício com inclusões de lipídios, apresentarem espaços intercelulares e ninhos de trofoblasto celular, especialmente nos terços inicial e médio da gestação. Há ainda uma grande atividade proliferativa do citotrofoblasto até metade da gestação, indicando que ocorre no labirinto um segundo centro de proliferação celular.

Favaron et al. (2011) discutindo a placentação de roedores Sigmondontinae comenta que o labirinto é vascularizado tanto pela circulação materna como pela fetal, com o sangue materno fluindo por canais tubulares, chamados de lacunas de sangue materno ou canais de sangue e que os vasos fetais permaneciam com seu endotélio intacto, que eram marcados positivamente pela reação da vimentina, enquanto as paredes das lacunas por serem envoltas por sinciotrofoblasto reagiam negativamente ao marcador de endotélio.

Já tratando da placentação do punaré Oliveira et al. (2012) descreveram que a atividade de proliferação das células trofoblásticas do labirinto estava alta durante os terços inicial e médio da gestação, indicando que o labirinto serviu como um segundo centro de proliferação. No início do período gestacional, no entanto, nem todas as células trofoblásticas apresentaram-se com característica proliferativa e a partir do terço médio até próximo ao termo da gestação o sinciotrofoblasto tornou-se dominante em relação ao citotrofoblasto.

Quanto à barreira placentária dos roedores, ocorre em seu processo de formação uma invasão trofoblástica que ultrapassa todos os tecidos maternos e faz com que o trofoblasto fique em contato direto com o sangue materno, em um processo de destruição do endotélio e substituição deste por um revestimento de origem trofoblástica, mecanismos característico de placenta hemocorial, comum em roedores, lagomorfos e primatas superiores (LEISER e KAUFFMAN, 1994; CARTER e ENDERS, 2004; BENIRSCHKE, KAUFMANN e BAERGEN, 2006; BURTON; KAUFFMAN; HUPPERTZ, 2006).

Segundo Leiser e Kauffman (1994) a placenta hemocorial pode ainda ser classificada de acordo com o número de camadas trofoblásticas presentes na barreira placentária, dando origem a três subtipos: a placenta hemotricorial que ocorre quando estão presentes três

camadas trofoblásticas como nos roedores Myomorfos, entre eles o hamster (CARPENTER, 1972) e o *Calomys callosus* (LIMONGI; FERRO, 2003), a placenta hemodichorial quando persistem duas camadas trofoblásticas, observada em castores (FISCHER, 1971) e em lagomorfos (ENDERS, 1965) e a placenta hemomonochorial quando há somente uma camada trofoblástica presente em histicognatos como a capivara (FERRAZ, 2001; KANASHIRO et al., 2009), preá (OLIVEIRA et al., 2008) e porquinho da índia (MESS, 2007).

Em relação classificação das placentas a dos roedores é comumente definida como do tipo de fluxo contracorrente, pelo fato dos vasos estarem dispostos de forma paralela, com os fluxos sanguíneos materno e fetal deslocando-se em sentidos opostos, modelo considerado o mais eficaz dentre os demais tipos de fluxos placentários (BENIRSCHKE, KAUFMANN e BAERGEN, 2006; BURTON; KAUFFMAN; HUPPERTZ, 2006).

A placenta dos roedores, como já citada é do tipo corioalantóidea e se caracteriza pela presença de duas porções distintas representadas pelo labirinto e pela zona juncional, ambas com funções endócrinas segundo descreve Gibori, (1994) e Soares, et al., (1996). Além disso, estão presentes na placenta dos roedores elementos tanto celulares (células gigantes, subplacenta e placenta vitelínica) como não celulares (membrana de Reichert) estando estas estruturas distribuídas em sua massa mesenquimal (OLIVEIRA, 2004).

Situada na face materna próximo a decídua, a zona juncional é a porção menos conhecida dos dois compartimentos fetais que compõem a placenta, sendo descrita por Coan et al. (2006) como um compartimento formado por dois subtipos de trofoblasto, o espongiotrofoblasto e as células trofoblásticas de deposição de glicogênio.

Em roedores histicognatos a zona juncional, em sua face fetal, faz contato com a subplacenta e em suas margens laterais com a placenta principal (KANASHIRO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012). Quanto aos tipos celulares presentes nesta zona juncional Kanashiro et al. (2009), estudando o crescimento e desenvolvimento da placenta da capivara, relataram que na fase inicial da gestação esta região consiste em grande parte de citotrofoblasto e pequenas quantidades de sincitiotrofoblasto e que nas proximidades da subplacenta iniciava o processo de reconstrução das artérias maternas, já na metade da gestação o trofoblasto adentrava profundamente na decídua e apresentava citotrofoblasto e grupos de células trofoblásticas gigantes, assim como fios de sincitiotrofoblasto.

A presença das células trofoblásticas gigantes na região de zona juncional é descrita, também, por Bonatelli et al. (2005) em estudo sobre a placentação da paca, onde cita-se a

localização destes tipos celulares entre a subplacenta e a decídua, caracterizadas por serem multinucleadas e possuírem um citoplasma finamente granular, basofílico e PAS positivo. Para Favaron et al. (2011), tratando de roedores da família Sigmondontinae, a zona juncional consiste basicamente de espongiotrofoblasto e possuem grande atividade proliferativa, evidenciada pela reação de PCNA positiva, que mostrou-se no início da gestação como ninhos celulares dentro da zona juncional e ao passo que a gestação avançava tornavam-se mais frequentes e distribuídos em toda esta região.

Juntamente com a porção fetal (labirinto e Zona Juncional), há a presença de uma porção materna que faz contato com a placenta dos roedores denominada de decídua, que nos roedores surge durante a fase de implantação, sendo o processo conhecido como reação decidual ou decidualização onde ocorre a diferenciação e proliferação do estroma endometrial em resposta a estímulos do blastocisto ou artificiais (BURTON; KAUFFMAN; HUPPERTZ; 2006). Esta decidualização, nos roedores, é associada à produção de células multinucleadas e gigantes segundo Ansell, Barlow, McLaren, (1974). A decídua inicialmente foi definida como uma porção materna do endométrio, que produz uma zona inicial formada por uma faixa semicontinua entre o trofoectoderma e o miométrio (WOODING; FLINT, 1994).

Na paca Bonatelli (2005) relatou que no endométrio haviam células trofoblásticas gigantes e células degeneradas, além de extravasamento sanguíneo próximo aos vasos comprometidos pela invasão trofoblástica, sendo possível notar células deciduais integras somente próximo aos grandes vasos. Desse modo, e com o auxílio da técnica histológica de picrossirius definiu o limite entre o endométrio comprometido e o íntegro, identificado pela população de células deciduais que formavam uma espessa camada junto ao perimétrio.

3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A SUBPLACENTA:

Dentre os roedores, a subordem histricomorfa é a que apresenta as maiores diversidades morfológicas bem como em sua ecologia, já que os indivíduos que a compõem, distribuem-se em praticamente toda a América do Sul e ocupam os mais diversos habitats, indo desde animais semifossoriais até espécies de comportamento arbóreo (LARA, et al., 1996). Estes animais caracterizam-se, também, por possuírem sob sua estrutura placentária

típica, um órgão exclusivo, denominado subplacenta (MESS, 2003; RODRIGUES et al., 2006).

A primeira descrição precisa sobre este órgão é creditada por Davies, Dempsey e Amoroso (1961) à Duval que em 1892, estudando a placenta do porquinho da Índia e de outros roedores. Atualmente este órgão é caracterizado como uma região coriônica especializada resultante da proliferação e pregueamento do ectoderma fetal na base da escavação central ou no centro da placenta corioalantóidea quando de origem mesodermal. Está é formada por lamelas de citotrofoblasto inserido no mesênquima corioalantoideo, que se diferencia em sinciotrofoblasto, ao longo da gestação, e é separado do citotrofoblasto por uma membrana basal tênue (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961).

Macroscopicamente a subplacenta pode ser visualizada após corte sagital, onde aparece destacada por sua coloração mais esbranquiçada e sua localização no ápice do cone placentário mantendo contato íntimo com o tecido de origem materna (RODRIGUES, 2005; BONATELLI, 2005; KANASHIRO, 2006). Oliveira, et al., (2008) descrevendo morfológicamente a placentação do preá observa macroscopicamente esta estrutura entre o 9º e 12º dia de gestação prolongando-se até o termo, onde encontra-se com seu tamanho reduzido. Na paca a subplacenta mostrou-se maior na gestação a termo quando comparada com seu tamanho no terço médio de gestação (BONATELLI, 2005).

3.3.1 Aspectos relacionados à histologia da subplacenta:

Nos estágios iniciais da gestação a subplacenta caracteriza-se por possuir como população celular predominante o citotrofoblasto. Estas células apresentam núcleos grandes e com heterocromatina dispersa que também são denominadas de figuras de mitose. A subplacenta surge a partir do trofoblasto situado na metade inferior da escavação central, próximo ao tecido materno, e distingui-se por três características marcantes: a espessura e quantidade de dobras da sua camada citotrofoblástica, a vacuolação do seu sincício e o grande número de excrescências invasivas (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961; RODRIGUES ET AL, 2006; BONATELLI, 2005; MESS, 2007).

Davies, Dempsey e Amoroso (1961) em estudos com a subplacenta do porquinho da Índia utilizando técnicas histológicas e histoquímicas relataram que nesta espécie a subplacenta está presente no 16º dia de gestação, situada na escavação central nas proximidades da decídua e é constituída por uma camada de citotrofoblasto que se distingue do citotrofoblasto do disco placentário, principalmente, por suas dobras. Seu sincício, ainda discreto, possuía como principal característica a presença de vacúolos observados logo após a diferenciação do citotrofoblasto em sincício. Outra característica marcante observada pelos autores foi o surgimento de CTGs a partir do sincício marginal. Estas células apresentavam núcleo grande, com massas grosseiras de cromatina, o citoplasma era basófilo em sua região perinuclear e apresentava uma grande quantidade de gotículas PAS positivas.

A subplacenta do Degu descrita por Mess (2007), em estágios iniciais da gestação apresenta o trofoblasto subplacentário como uma camada contínua tanto ao citotrofoblasto como ao sincíotrofoblasto da placenta principal. Em relação aos canais de sangue materno, o processo de substituição destes já se inicia neste período, contudo, nas proximidades da subplacenta alguns vasos maternos mantêm seu endotélio intacto, enquanto que, região basal da subplacenta estes canais encontram-se revestidos por trofoblasto sincicial. No *Petromus typicus* o pesquisador descreve que a subplacenta no início de seu desenvolvimento, por volta dos 35 dias de gestação, era uma região proeminente ao redor da escavação central, constituída por múltiplas camadas de citotrofoblasto que se dispunham em forma de lamelas que repousavam no mesênquima fetal. A circulação fetal passa no interior do órgão, porem alguns vasos fetais podiam ser vistos nas margens da subplacenta, já as lacunas de origem materna estavam relacionadas com o sincíotrofoblasto tanto no interior da subplacenta como fora de seus limites.

No preá Oliveira et al. (2008), descrevendo a placentação desta espécie, observaram que a subplacenta destes exemplares pode ser observada macroscopicamente entre o 9º e o 12º dia de gestação e que em seu estágio inicial este órgão apresenta-se confluyente com a placenta principal, e ainda observaram que a circulação materna, assim como a fetal, já estão presentes.

De acordo com Oliveira et al. (2012) estudando a placentação do punaré (*Thrichomys laurentinus*) a subplacenta é uma estrutura que inicia seu desenvolvimento na face materna da placenta principal em contanto com os canais de sangue maternos. Vasos maternos e fetais estavam presentes na subplacenta desde as fases com menor período de gestação que foram

observadas. Além disto, descreveram que o citotrofoblasto era altamente proliferativo no início da gestação e o sincício produzia uma forte reação positiva ao ácido periódico de Shiff.

Com o avançar da gestação, a subplacenta passa por um processo de aumento progressivo da espessura e da complexidade das camadas citotrofoblásticas, e no terço médio da gestação este órgão encontra-se totalmente desenvolvido, apresenta-se como um órgão distinto com seus limites facilmente identificáveis e é separada da placenta principal por projeções de mesênquima fetal (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961; RODRIGUES et al, 2006; BONATELLI, 2005; MESS, 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

Dessa maneira, Davies, Dempsey e Amoroso (1961), observaram que a partir do 25º dia de gestação a camada citotrofoblástica, que consistia em duas ou três camadas, desenvolveu-se consideravelmente até o 45º dia onde atinge seu máximo desenvolvimento. Neste período as camadas citotrofoblásticas são altamente proliferativas. O sincício torna-se mais compacto nas proximidades do trofoblasto celular, sua proliferação é mais acentuada e sua reatividade ao PAS é mais intensa, enquanto que o citotrofoblasto reage negativamente.

A subplacenta do castor foi descrita por Fisher (1985), onde ele relatou que se trata de uma estrutura composta de extensões típicas das vilosidades da superfície basal da placenta que diferem consideravelmente da estrutura labiríntica, Estas vilosidades penetram a subplacenta desde sua base, estão dispostas numa matriz circular em torno de ambos os canais arteriais e venosos e as vilosidades consistem de um núcleo mesenquimal cercado por um citotrofoblasto incompleto e uma camada externa de sinciciotrofoblasto. O núcleo das vilosidades contém um par central de grandes vasos fetais e uma rede capilar periférica adjacente à cobertura trofoblástica.

Oliveira (2004) observou que a subplacenta do mocó apresenta-se com as mesmas características já descritas em outros roedores. O sincício subplacentário foi caracterizado por possuir núcleos regulares comparados aos do labirinto, encontravam-se localizadas centralmente aos lóbulos, possuíam aspecto irregular e apresentavam áreas de degeneração celular. As células trofoblásticas exibiam um núcleo único que ocupava a maior parte do citoplasma, nucléolo menos organizado que os nucléolos sinciciais e eram ricos em áreas de cromatina condensada dispersas pelo núcleo, além disso, organizavam-se de maneira que delimitavam os septos de mesênquima fetal, que constituíam os lóbulos da subplacenta.

Na paca Bonatelli (2005) caracteriza a subplacenta como sendo uma região isolada, bem delimitada e facilmente distinguível a partir do terço médio da gestação, era composta

por formações lamelares com um eixo mesenquimal contendo vasos fetais. Quando submetida a reações citoquímicas, como o ácido periódico de Shiff, o autor percebeu que o citotrofoblasto marcava-se de maneira fraca ou ausente, no entanto, o sincício apresenta reação positiva, especialmente, na massa amorfa que entremeia os núcleos, porém esta reação é diminuída pela ação da amilase. E demonstrou possuir grande potencial proliferativo avaliado pela reação de PCNA, em especial, nesta fase da gestação.

Rodrigues et al., (2006), descreveram a subplacenta da cutia no terço médio da gestação, relatando que o suprimento sanguíneo é inteiramente oriundo de vasos fetais, as lamelas de tecido conjuntivo são delimitadas por uma camada de citotrofoblasto mononuclear com limites celulares claramente definidos, apresentando duas populações celulares, as sinciciais e as citotroblásticas e, que, provavelmente, possui células com potencial endócrino. Em relação às reações imunohistoquímicas os autores explicam que como esperado as células trofoblásticas são marcadas positivamente para citoqueratina, enquanto que os vasos sanguíneos fetais foram marcados pela reação à vimentina. O sincício assim como seus grânulos são PAS positivo mesmo após a reação da amilase, sendo a reação mais forte na região das lacunas.

Mess et al. (2007), estudando a placentação dos Caviomorfos como um possível modelo para a invasão trofoblástica, verificaram que nas bordas da subplacenta há pontos em que o sincício é interrompido e a camada citotroblástica entra em contato direto com tecido endometrial. Nestes pontos, os autores observaram que a imunoreação ao Ki67 revela uma alta atividade proliferativa por parte das células trofoblásticas.

Na capivara Kanashiro et al. (2009), estudando a placentação desta espécie, descreveram que a subplacenta possuía lóbulos irregulares, que consistiam de camadas de trofoblasto celular e sincicial com mesênquima fetal associado a vasos sanguíneos, o citotrofoblasto possuía núcleos esféricos com cromatina frouxa e era altamente proliferativo, e o sinciciotrofoblasto era bastante vacuolizado com microvilosidades na superfície, e seus núcleos permaneciam próximos uns dos outros.

Descrevendo as características morfológicas da placentação da viscacha, Flamini et al. (2011), relataram que a subplacenta era uma estrutura com dobras, constituída por cito e sinciciotrofoblasto e que iniciava seu desenvolvimento na fase inicial da gestação com suprimento sanguíneo de origem materna e com o decorrer do tempo era substituído por um fornecimento sanguíneo a partir de vasos fetais que estavam em contato com o citotrofoblasto.

É observado ainda, no mesmo estudo, que no sincício estão presentes canais de sangue materno e que a proliferação celular em ambos os tecidos desde o início da gestação, mas decai com a proximidade do termo.

No punaré com o avançar da gestação e aproximando-se do terço médio a subplacenta tornava-se um órgão distinto e bastante proeminente. Seu suprimento sanguíneo, assim como na fase inicial, é oriundo dos sistemas materno e fetal. Para os autores a subplacenta desta espécie era composta por citotrofoblasto e sinciotrofoblasto que envolviam o mesênquima fetal que continha vasos com o endotélio intacto e que relacionavam-se com o citotrofoblasto, enquanto que no sincício havia a presença de lacunas por onde passava a circulação de origem materna (OLIVEIRA, et. Al., 2012).

Após ultrapassar a metade da gestação e com a aproximação do final deste evento, a placenta encontra-se com seu labirinto totalmente desenvolvido e ocupando praticamente toda a região da placenta principal, neste mesmo período o tecido subplacentário, em especial o que corresponde ao citotrofoblasto, inicia um processo de decréscimo em sua atividade metabólica e grande parte de sua estrutura inicia um processo degenerativo gradual (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961; RODRIGUES et al, 2006; BONATELLI, 2005; MESS, 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

No porquinho da Índia, após o 45º dia de gestação, Davies, Dempsey e Amoroso (1961), relataram que já é possível notar o início do declínio da atividade citotrofoblástica na subplacenta. Para os autores o principal indicativo do início deste processo é o evidente declínio na quantidade de figuras de mitose na região, além de uma característica fibrosa das camadas citotrofoblásticas e em alguns pontos a ausência do citotrofoblasto, permitindo que o sincício repouse sobre a lâmina basal. Com a degeneração do sincício ocorre um acúmulo de gotículas de material PAS positivo nas ilhotas de sinciotrofoblasto. No entanto, até mesmo nos últimos dias de gestação pode-se notar sinais da organização histológica inicial da subplacenta, especialmente, pelas monocamadas de citotrofoblasto que são, em sua maioria, descontínuas, com núcleos picnóticos e envolvem material PAS positivo.

No terço final da gestação do degu, Mess (2007), ressaltou a presença de graves sinais de degeneração da subplacenta, notabilizando-se, este processo, pela substituição das células trofoblásticas, tanto sincício como citotrofoblasto, por detritos amorfos. Quando presente, o citotrofoblasto era constituído por monocamadas, em alguns casos interrompidas, os espaços intercelulares aumentaram de tamanho. Neste mesmo estudo o Autor também descreve a

subplacenta do *Petromus typicus* e relata que neste estágio da gestação só é possível observar regiões degeneradas remanescentes da subplacenta, caracterizada como restos celulares que compõem uma massa amorfa avascularizada.

3.3.2 Aspectos relacionados á ultraestrutura da subplacenta:

Corroborando com o descrito em estudos utilizando a microscopia tradicional, observa-se com o auxílio da microscopia eletrônica de transmissão que a subplacenta é composta por duas populações celulares distintas, o citotrofoblasto e o sinciciotrofoblasto dispostos em lamelas. Os eixos destas lamelas são formados por um tecido, cuja matriz extracelular é pouco preservada nessa técnica, característica também evidente no tecido conjuntivo mesenquimal. Neste nota-se a presença de vasos sanguíneos de pequeno calibre, em sua maioria vênulas e capilares (BONATELLI, 2005; RODRIGUES, 2005).

Davies, Dempsey e Amoroso (1961) com o objetivo de esclarecer alguns aspectos abordados em pesquisas anteriores com o porquinho da índia, realizaram uma análise ultraestrutural da subplacenta desta espécie, verificaram que a maior parte das membranas celulares está em aposição com espaços intercelulares irregulares entre duas ou mais células trofoblásticas, ressaltando-se ainda a presença de microvilosidades nestes espaços. Os núcleos das células citotrofoblásticas mostraram-se grandes, quando comparados ao volume do citoplasma, e com várias proeminências semelhantes a nucléolos. O citoplasma foi descrito como finamente granular com presença marcante de mitocôndrias. Quanto ao sincício, este possui citoplasma grosseiramente granular e com poucas mitocôndrias em relação ao citotrofoblasto. As lacunas são revestidas por microvilosidades que são associadas com transporte de água, principalmente, em estágios iniciais da gestação onde as microvilosidades apresentaram-se intumescidas.

Segundo Oduor-Okelo (1984) analisando a placenta e a subplacenta do rato dos capins (*Thryonomys swinderianus*), por meio de microscopia eletrônica de transmissão, descreve que o órgão é constituído por camadas dobradas de citotrofoblasto separadas entre si por porções de mesênquima fetal e por sinciciotrofoblasto. Neste estudo as células citotrofoblásticas apresentaram uma aparência indiferenciada com ribossomos livres, aparelhos Golgi discretos,

mitocôndrias pequenas e arredondadas e conectadas por desmosomos, além da presença de grandes vacúolos citoplasmáticos. No sincício as lacunas mostraram-se frequentes e caracterizadas pela presença de um precipitado eletrodenso e microvilosidades, e em seu citoplasma foram relatados numerosos grânulos esféricos característicos do sincício subplacentário. Por fim a região de citoplasma imediatamente abaixo da borda preenchida pelas microvilosidades estava livre de organelas, mas era ocupada por um pó finamente granulado e eletrodenso semelhante ao das lacunas.

Rodrigues et al. (2006), descrevendo a subplacenta da quanto a sua ultraestrutura, ressaltaram que os núcleos do citotrofoblasto eram grandes e seu nucléolo era evidente, enquanto o citoplasma continha mitocôndrias arredondadas, retículo endoplasmático rugoso e pequenas inclusões eletrodensas. A membrana basal do citotrofoblasto repousava no tecido conjuntivo aproximando-se vasos fetais. O sinciciotrofoblasto possui núcleos irregulares com nucléolos evidentes e seu citoplasma contém poucas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi ocasional. As células gigantes têm núcleos irregulares e seu citoplasma é vacuolado.

Quanto a ultraestrutura a subplacenta do punaré de acordo com Oliveira et al. (2012), continha camadas de trofoblasto celular e sincicial localizadas no mesênquima fetal. Parte destas células estavam intimamente interligadas. Vasos fetais percorriam o mesênquima perto da camada citotrofoblásticas, enquanto no sinciciotrofoblasto haviam lacunas. Em meados da gestação, o trofoblasto sincicial mostrou sinais de degeneração, enquanto que no final da gestação todo trofoblasto estava no estado de degeneração.

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DE AMOSTRAGEM

O material destinado ao estudo da subplacenta do preá, *Galea spixii*, foi obtido do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), criado pela portaria ESAM Nº 154/89 em 29 de setembro de 1989 e registrado junto ao IBAMA como criadouro científico sob número 1478912 e situado na cidade de Mossoró-RN entre as coordenadas geográficas 5° 11'S e 37° 20'W Gr, com altitude ao redor de 16 m acima do nível do mar e ocupando uma área de 20 ha. Este possui como objetivo fomentar pesquisas voltadas a preservação e manutenção de espécies silvestres em cativeiro, especialmente daquelas que tenham algum interesse sócio-econômico (Figura 2).



Figura 2: Vista da entrada do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS/UFERSA. 2013. Fonte: Bessa (2010).

4.2 ESPÉCIE ESTUDADA

O preá, conhecido como preá do campo nas regiões do seridó e oeste do estado do Rio Grande do Norte, é um roedor de pequeno porte, com orelhas pequenas, desprovido de cauda e com peso médio de 500g e que possuem coloração dorsal acinzentada, com tom brunáceo e ventre branco e membros pélvicos com três dígitos. Habitam as capoeiras, entre pedras, barreiras de rios e canaviais, alimentando-se de capins e raízes (MATA, 2013).

Quanto a sua taxonomia o preá foi classificado por Meyen (1833), em seu artigo de contribuição a zoologia com dados coletados em sua viagem ao redor da terra, da seguinte forma:

Filo: Chordata

Classe: Mammalia

Ordem: Rodentia

Subordem: Hystricomorpha

Família: Caviidae

Subfamília: Cavinae

Gênero: *Galea*

Espécie: *Galea spixii*, Wagler, 1831.



Figura 3: Espécie estudada. Preá (*Galea spixii* Wagler, 1831) CEMAS /UFERSA, 2013. Fonte: Acervo do autor

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

Após liberação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFERSA – 68/2012) e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO – 35231-1) foram selecionados 12 preás do sexo feminino, não gestantes, com as quais se formou três grupos com quatro fêmeas em cada. Estes animais foram alocados em recintos com dimensão de 5 m² e alimentados com ração para roedores, frutos, grãos de soja, milho e água *ad libitum*, de modo que cada grupo tivesse o mesmo manejo alimentar.

Para identificação dos animais em seus respectivos recintos, optou-se por marcar as fêmeas com tintura capilar de cor preta (Wella Koleston - Espuma Color Intense - Preto Azulado 28) tingindo diferentes regiões anatômicas. Desse modo, as quatro fêmeas de cada grupo foram marcadas nas regiões torácicas e pélvicas, recebendo uma identificação única de modo a não haver repetições.

Após identificação das fêmeas em cada grupo foi adicionado um macho de forma a possibilitar a fecundação. Dessa forma, para que se tivesse o controle da cópula dos animais acompanhou-se diariamente, por meio de citologia vaginal, a presença de espermatozoides em esfregaço vaginal. Considerava-se o dia zero da gestação aquela em que encontrava-se espermatozoide ao exame das amostras colpocitológicas. Confirmada a presença de sêmen nas lâminas as fêmeas eram separadas do grupo, a fim de evitar erros na estimativa das idades de gestações caso as fêmeas viessem a repetir cio.

As coletas dos fragmentos de subplacenta foram realizadas considerando-se os dias 15, 23, 30, 45, 53 e 55 de gestação

4.4 CITOLOGIA VAGINAL:

Durante o processo de acompanhamento da cópula dos animais foi realizado diariamente o exame colpocitológico das fêmeas de cada grupo por meio de esfregaços em lâmina de vidro confeccionados a partir do fluido vaginal coletado com a utilização de swab estéril. Para isto os animais eram contidos manualmente e era feita a limpeza da região vulvar com auxílio de algodão embebido em solução salina 0,9% e logo após a limpeza os swabs lubrificados na mesma solução eram introduzidos na vagina do animal em um ângulo de 45° e com movimentos circulares percorria-se toda a vagina coletando assim o seu fluido.

Após a coleta o material era distendido em lâmina de vidro e seco à temperatura ambiente. Depois de secos os esfregaços eram submetidos a procedimento de coloração com a utilização do corante panótico rápido Instant-Prov (New Prov) de acordo com as especificações do produto indicadas pelo fabricante. Já coradas e secas as lâminas eram analisadas, quanto à presença de espermatozoides (Figura 4), com o auxílio de microscópio de luz (Olympus CX 31 RBSFA).

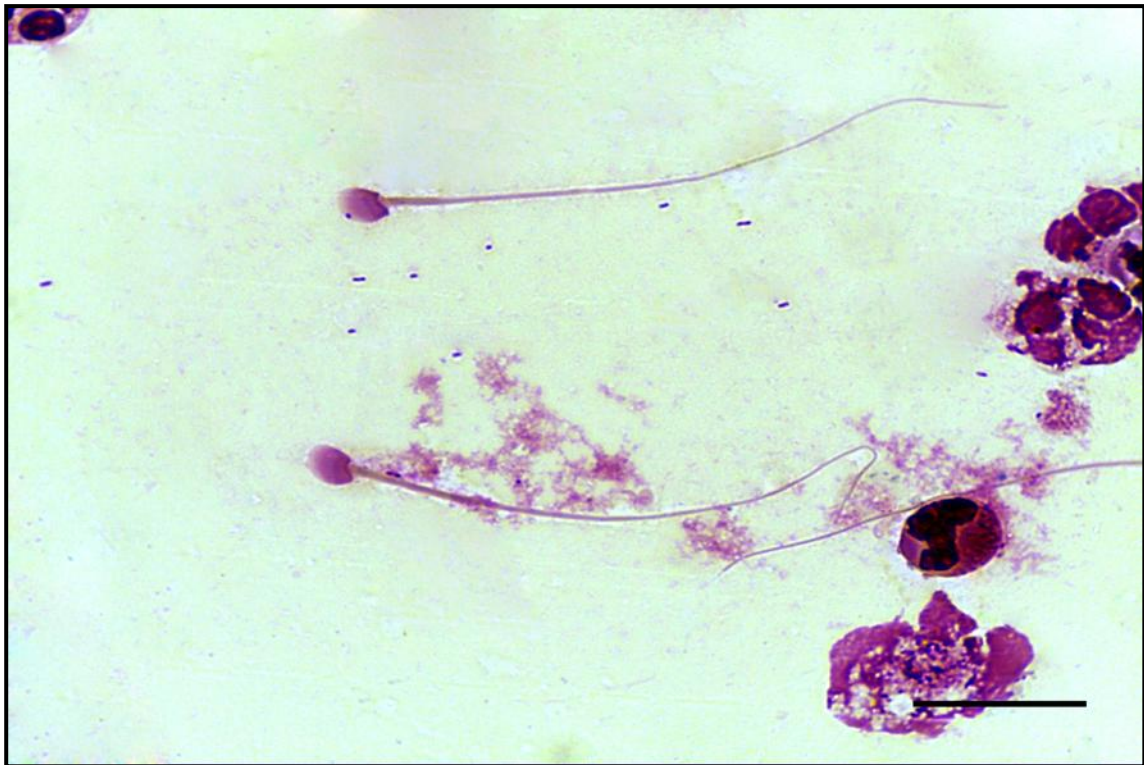


Figura 4: Confirmação da cópula pela presença de espermatozoides na citologia vaginal. Após 24 horas, considerava-se o primeiro dia de gestação. Objetiva de 100X. Barra = 200 μ m. Coloração panótico rânido. Fonte: Acervo do autor.

4.5 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO:

Identificada a prenhez, os animais eram separados e no dia anterior a coleta eram submetidos a jejum sólido de doze horas e líquido de seis horas. No momento da coleta os animais eram pesados e submetidos a procedimento anestésico, para isso administrava-se como medicação pré-anestésica a associação de cloridrato de xilazina (Xilazin[®] 2% na dose de 1mg.Kg⁻¹, fabricante Syntec) e cloridrato de cetamina (Quetamina[®] 10% na dose de 15mg.Kg⁻¹, fabricante Vetnil) ambos por via intramuscular, após espera de tempo hábil (10min.) administrava-se o anestésico tiopental 1g (Tiopental sódico[®] 1g na dose de 25mg.Kg⁻¹, fabricante Richmond, División Veterinaria S.A.) por via endovenosa como fármaco indutor da anestesia. Atingido o plano anestésico seguia-se com a administração de Cloreto de Potássio (Cloreto de potássio[®] 19,1% na dose de 2,56 mEq.Kg⁻¹, fabricante Halexistar) também por via endovenosa, confirmando o óbito do animal após a parada cardiorrespiratória do mesmo.

4.6 COLETA DO MATERIAL:

Confirmado o óbito do animal realizava-se uma incisão longitudinal mediana pós-umbilical com aproximadamente 4-5 cm, para expor o útero gravídico, que era seccionado para identificação dos sacos gestacionais e posterior coleta do material subplacentário para análise.

Foram coletadas subplacentas nos terços inicial, médio e final da gestação sendo que as coletas foram distribuídas da seguinte maneira, para cada idade gestacional (15, 23, 30, 45, 53 e 55 dias) foram coletadas duas subplacentas, sendo uma destinada a processamento para microscopia de luz e imunohistoquímica e outra para microscopia eletrônica de transmissão.

Em seguida eram realizadas secções na placenta coletada com o intuito de diminuir a área a ser processada e concentrar ao máximo na região da subplacenta, esses fragmentos eram fixados em solução de paraformaldeído 4% tamponado com tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4, quando destinados a processamento de microscopia de luz e reações imunohistoquímicas, e em solução de glutaraldeído 2,5% tamponado com tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4, quando as amostras eram direcionadas a microscopia eletrônica de transmissão.

4.7 MICROSCOPIA DE LUZ:

Após coletadas e fixadas às amostras passaram por processamento histológico no Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA. Para isso optou-se por seguir a metodologia descrita por Tolosa et al. (2003), adaptando-a quando necessário devido a natureza do material.

Os fragmentos de subplacenta fixados por 48h em solução de paraformaldeído 4% tamponado com solução de fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4 eram lavados em água corrente para retirada do excesso do fixador e submetidos a processo de desidratação onde as amostras eram submetidas a banhos de imersão em álcoois em concentrações crescentes, onde iniciava-se com o álcool 60% “over night” seguindo com uma bateria de álcoois nas concentrações

70%, 80%, 90%, 95% e 100%, por um período de uma hora imersos em cada álcool. Passada a desidratação prosseguiu-se com a diafanização que era realizada com dois banhos em solução de xilol por uma hora cada, para total retirada do álcool das amostras, em sequencia era feita a parafinização das amostras por meio de banhos de imersão em parafina histológica (Synt[®], granulada com ponto de fusão 58°C a 62°C, lote: 138199) em estufa a temperatura de 60°C, sendo que o primeiro banho, na parafina 1, era “over night” e o segundo banho, parafina 2, era feito por uma hora. Após esta etapa as amostras eram incluídas em uma nova parafina para confecção dos blocos e assim finalizar o processo de parafinização. Obtidos os blocos estes eram submetidos a cortes de cinco e sete micrometros de espessura, com o auxílio de micrótomo (LEICA RM 2125 RT), que eram aderidos à lâminas de vidro e levados a estufa a 60°C “over night”. Posteriormente eram desparafinizados em dois banhos de xilol por dez minutos, reidratados em álcool 100%, 95%, 70% e em água corrente, durante três minutos em cada álcool até garantir total hidratação. Dando continuidade foram realizadas as colorações pelas técnicas de Heatoxilina e Eosina (HE), Tricrômio de Gomori e PAS, e finalizando a montagem com Permount[®] (FISH-SP15-500). O material foi então analisado em microscópio óptico (Olympus CX 31 RBSFA) sendo as imagens analisadas e fotomicrografadas (Leica ICC50 HD).

4.8 REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS:

As reações imunohistoquímicas foram realizadas em material processado, até a obtenção dos cortes, da mesma maneira utilizada para a microscopia de luz. Estas reações objetivaram a imunolocalização de proteínas que evidenciassem particularidades importantes para o estudo, entre elas a vimentina (filamento intermediário característico de tecidos mesenquimais e estroma decidual) e a citoqueratina (filamento intermediário característico de tecidos epiteliais, entre eles o endotélio vascular). Além disso, avaliou-se a capacidade proliferativa das células com a utilização do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA).

Para isso os cortes foram aderidos em lâminas sinalizadas e submetidos a uma bateria de banhos em etanol em concentrações decrescentes para em seguida realizar o bloqueio da

peroxidase endógena com a utilização de peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos. Após isso se procedia com a recuperação antigênica onde à temperatura ambiente, foram tratados em tampão citrato 0,1M, Ph 7,4 e irradiados por três vezes em microondas de uso caseiro (700MHz). Em sequência eram feitas lavagens em Tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4, Adicionando em seguida a proteína Dako para bloquear as reações inespecíficas. Dando prosseguimento para que as reações fossem evidenciadas as amostras foram incubadas com anticorpo primário, sendo eles, anticorpo Anti-Vimentina policlonal de cabra (cód. SC-1226, Santa Cruz Biotchnology, USA), Anti-citoqueratina policlonal de coelho (cód. PU071-UP, Biogenex) e Anti-PCNA monoclonal de camudongos (cód. 107904, Novocastra, UK) em câmara úmida (12h) entre 0 e 4°C. Passada esta etapa as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase e revelados com diaminobenzidina/peróxido de hidrogênio em tampão TRis-HCl Ph 8,2 e por fim Contracorados com Hematoxilina de Harris e montados resina sintética – Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Com o resultado obtido com a imunorreação ao PCNA foi também calculado o índice mitótico de cada idade gestacional avaliada. Para isso as lâminas foram fotomicrografadas (microscópio Leica ICC50 HD), em objetiva de 100x e nas imagens obtidas foram contadas 1000 células diferenciando-as em positivas e negativas a reação, sendo que o índice mitótico era obtido pela razão entre o número de células positivas e o total de células contadas (1000), com este resultado multiplicado por cem e era expresso em percentual (ZHENG et al, 2002; GUPTA et al, 2014).

44.8 REACÃO DE AgNOR:

Além da imunorreação ao PCNA, a atividade proliferativa na subplacenta foi também avaliada por meio da contagem de Regiões Organizadoras de Nucléolo Argirofílicas (AgNOR), uma ferramenta útil para avaliar a cinética de proliferação celular. Para isso, fragmentos da subplacenta, em cada idade gestacional, com cerca de 5,0 mM de espessura, foram previamente fixados em paraformaldeído 4% com tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4, foram desparafinados em xilol e etanol (100 %) , pós - fixadas em solução de etanol

absoluto e ácido acético na proporção de 3 para 1 durante 30 min a temperatura ambiente e foram re-hidratadas. Para realização da coloração da NOR, duas soluções foram preparadas separadamente: a solução A composta por 2% de gelatina sem sabor em solução aquosa de ácido fórmico a 1 % e a solução B à base de nitrato de prata na concentração de 50% em água. A solução de coloração foi preparada imediatamente antes do procedimento, misturando uma solução com B a A na proporção de uma parte da solução A para duas da solução B em um tubo de ensaio ao abrigo da luz. As secções foram coradas em um local escuro, à temperatura ambiente durante 30 min, em seguida, enxaguava-se com água destilada e realizava-se o bloqueio com solução aquosa de tiosulfato de sódio a 5% durante 5 min. As secções foram desidratadas numa série gradual de etanol ao xilol, e montadas.

AgNORs foram visualizados como pontos escuros intranucleares e aglomerados e contados no sincício e citotrofoblasto (200 núcleos). A contagem foi feita às cegas pelo mesmo observador utilizando as imagens obtidas com o auxílio de microscópio (Leica ICC50 HD), em campos aleatórios de cada secção, capturados em objetiva de 100x. O número total de AgNOR (pontos e aglomerados) por núcleo foi expressa pelo erro médio $\pm$ padrão da média (ZHENG et al, 2002; GUPTA et al, 2014).

4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO:

Para que fosse realizada a caracterização ultra estrutural da subplacenta do preá foram utilizados fragmentos com cerca de 0,5 mm² que foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% tamponado com fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4, durante 24h.

Após fixados os fragmentos eram lavados em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4 por meio de banhos de imersão com duração de 10min, sendo este processo repetido por três vezes e então pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 2% tamponado (fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4) durante duas horas. Em sequência a lavagem era repetida seguindo os mesmos procedimentos da primeira lavagem. Já lavados os fragmentos eram imersos em acetato de uranila a 3% “over night” e lavados novamente com solução tampão e seguia-se com desidratação em uma bateria de álcool etílico iniciando na concentração de 50%, em seguida

70% e 90% por dez minutos cada e finalizando com quatro imersões em álcool etílico 100% por vinte minutos cada.

Concluída a desidratação eram realizadas lavagens em óxido de propileno por dez minutos com o material em rotação, e logo após era feita a imersão dos fragmentos em uma mistura de óxido de propileno e resina Spurr na proporção de 1:1 por um período de seis horas e então mergulhados em resina Spurr durante 12 horas em rotação. Passadas as 12 horas acondicionava-se o material em moldes contendo resina que por sua vez eram colocados, por 72 horas, em estufa a 60°C.

Finalizado este procedimento e obtidos os blocos, estes eram cortados a uma espessura de 0,4µm com o auxílio de ultramicrotomo automático (Ultracut R, Leica Microsystems, Germany). Os cortes eram corados com azul de toluidina 1% para que as regiões de interesse pudessem ser selecionadas e então serem feitos os cortes ultrafinos com 0,07µm de espessura que eram coletados por meio de telas de cobre e contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,5% para que fossem analisados em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268D, FEI Company, The Netherlands; Mega View III câmera, Soft Imaging, Germany). Após processamento e análises as imagens mais relevantes foram eletromicrografadas e utilizadas neste trabalho.

5 RESULTADOS:

Inicialmente e para que haja uma maior compreensão do assunto exposto nesta seção, optou-se por caracterizar de forma geral e sucinta, o arranjo do útero gravídico, assim como dos anexos fetais do preá, de modo a fornecer dados acerca da distribuição espacial e dos componentes que envolvem a formação dos órgãos relacionados ao processo de gestação da espécie estudada.

5.1 DESCRIÇÃO GERAL DO ÚTERO GRAVÍDICO E DOS ANEXOS FETAIS DO PREÁ

Macroscopicamente a organização do útero gravídico e dos anexos fetais do preá apresentou-se como observado na Figura 5. O útero do preá possuía um formato de “Y” e era constituído por dois longos cornos que confluíam em direção a um curto corpo e uma cérvix espessa, os cornos eram levemente arqueados e possuíam um formato afunilado. Com o evoluir da gestação o útero é uma estrutura que se molda ao feto e sua parede torna-se cada vez mais tênue, ao ponto de permitir a visualização do feto e da placenta, preenchendo toda sua luz (Figura 5A). Quanto aos anexos fetais, estes se mostraram, tanto o âmnio como o saco vitelínico, como estruturas delgadas que permitiam a visualização do embrião e o envolviam com maior ou menor intensidade de acordo com o avançar da gestação (Figura 5B). Quando removidas as suas paredes percebia-se que a placenta em sua porção voltada para o lado fetal sustentava uma estrutura circular transparente e vascularizada correspondente ao saco vitelino visceral e em um plano mais profundo observava-se o feto revestido pela membrana amniótica. Esta região o saco vitelino apresenta a impressão da área de contato com a placenta e mostra-se aparentemente viloso (Figura 5B).

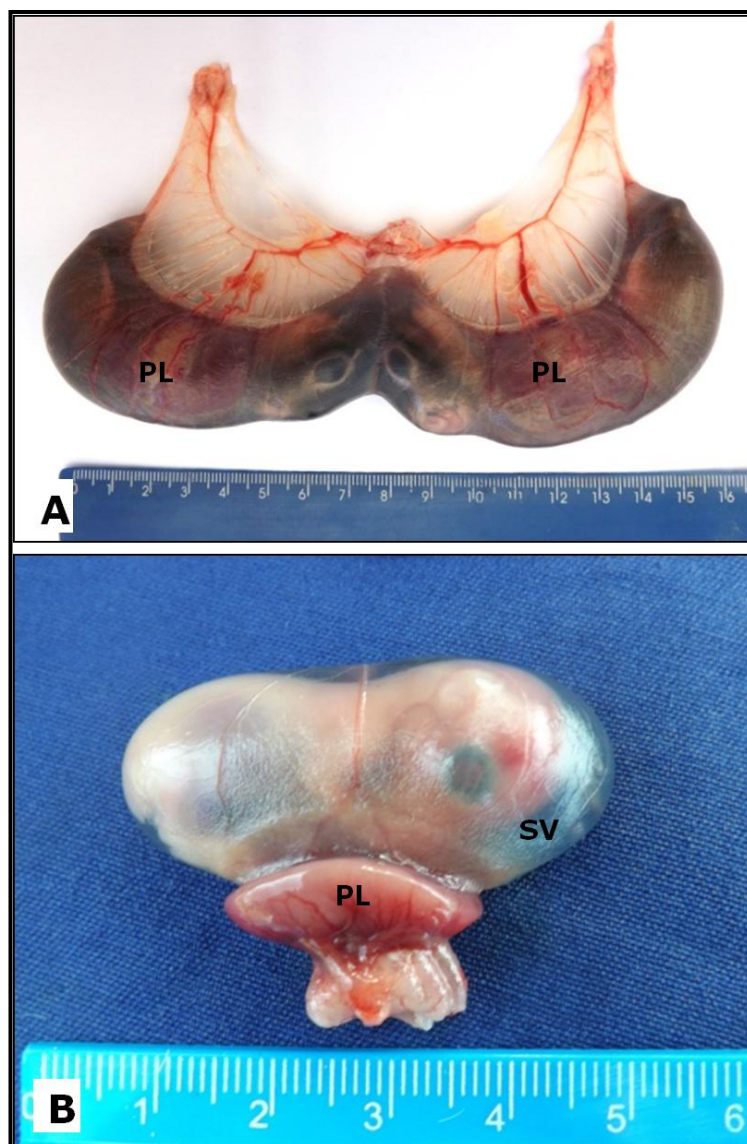


Figura 5: Caracterização macroscópica do útero gravídico. Em A: Observar adelgaçamento da parede uterina permitindo a visualização dos fetos e da placenta (PL). Em B: Notar embrião no terço médio de gestação envolto pelo saco vitelino (SV) e em destaque a placenta principal (PL). Fonte Acervo do autor.

Destaca-se que a placenta a partir do momento em que se tornava uma estrutura distinta da decídua dado seu processo de desenvolvimento com consequente aumento de volume, em função da proliferação do trofoblasto, torna-se uma estrutura em forma de disco com sua face fetal levemente côncava, enquanto sua face materna apresentava um aspecto mais ovalado (Figura 5B). Além disto, era densamente vascularizada em suas bordas. Outra característica marcante deste órgão era que após seccionada transversalmente em sua região média notava-se claramente a divisão da placenta em lóbulos e observa-se na região de transição entre a placenta e a decídua, uma estrutura de coloração mais clara que seguia a forma da placenta correspondente a subplacenta.

O arranjo dos anexos fetais do preá no terço médio de gestação (30 dias) esta ilustrado na Figura 6. A placenta corioalantóide era situada na porção antimesometrial do útero, apresentando regiões lobulares, interlóbulos, que constituíam um labirinto. O saco vitelínico, neste estágio, já se encontrava invertido.

A subplacenta, objeto deste estudo, pode ser observada macroscopicamente a partir dos 23 dias de gestação, após secção transversal da placenta. A mesma nesta fase era bem desenvolvida mais ainda não se encontrava completamente envolta pela placenta. Nesta fase a subplacenta é vista como uma estrutura justaposta a placenta principal e profundamente inserida na decídua, o que pôde ser confirmado durante as análises microscópicas. No entanto somente aos 30 dias a subplacenta apresentou-se bem desenvolvida atingindo o seu tamanho máximo, estendendo-se por, aproximadamente, metade da área ocupada pela placenta principal e, encravada entre a decídua basal e o disco placentário como uma região intermediária entre estas duas estruturas, sendo separada de ambas por uma zona de transição. Nesta fase tanto a placenta principal como a subplacenta apresentavam-se lobuladas.

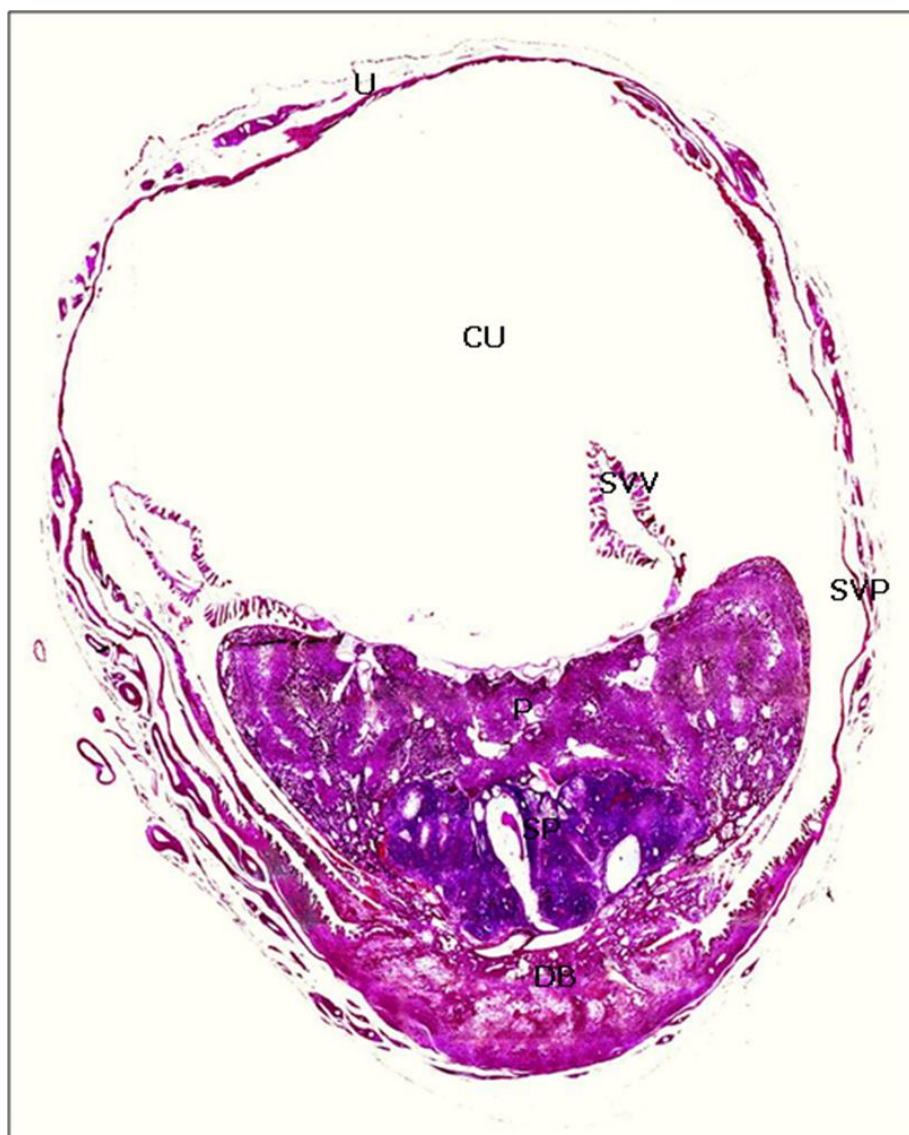


Figura 6: Fotomicrografia da placenta do preá aos 30 dias de gestação, ilustrando, em uma vista panorâmica, a parede uterina (U), a cavidade uterina (CU), a placenta principal (P), a subplacenta (SP), decídua basal (DB), o saco vitelino visceral (SVV), e o saco vitelino parietal (SVP). Fonte Acervo do autor.

5.2 CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA SUBPLACENTA

5.2.1 Aos 15 dias de gestação

Neste estágio da gestação a subplacenta, assim como a placenta, não eram visualizadas macroscopicamente, dado o seu grau de desenvolvimento. Nesta fase a subplacenta mostrou-se como uma camada única de citotrofoblasto que se dobrava sobre si dando origem a uma estrutura ininterrupta preenchida por um tecido conjuntivo frouxo e estava situada na região abaixo de onde se formaria a estrutura correspondente à placenta principal, como pode ser verificado na Figura 7A. A camada citotrofoblástica era constituída por células cúbicas pseudoestratificadas em toda sua extensão. O citoplasma destas células era levemente basofílico e seus núcleos predominantemente basais, arredondados, basófilos e com cromatina dispersa.

Ao redor da camada citotrofoblástica havia um tecido sincicial de origem trofoblástica que se caracterizava por apresentar um citoplasma eosinofílico e permeado por vasos de origem decidual que tiveram o endotélio destruído e substituído por tecido de origem fetal (Figura 7B). Este era vacuolado e possuía projeções que adentravam profundamente na decídua. Os núcleos eram arredondados, com nucléolos evidentes, apresentavam várias figuras de mitose (Figura 7C) e muitas vezes aglomerados formando ilhotas com grandes porções de citoplasma livre.

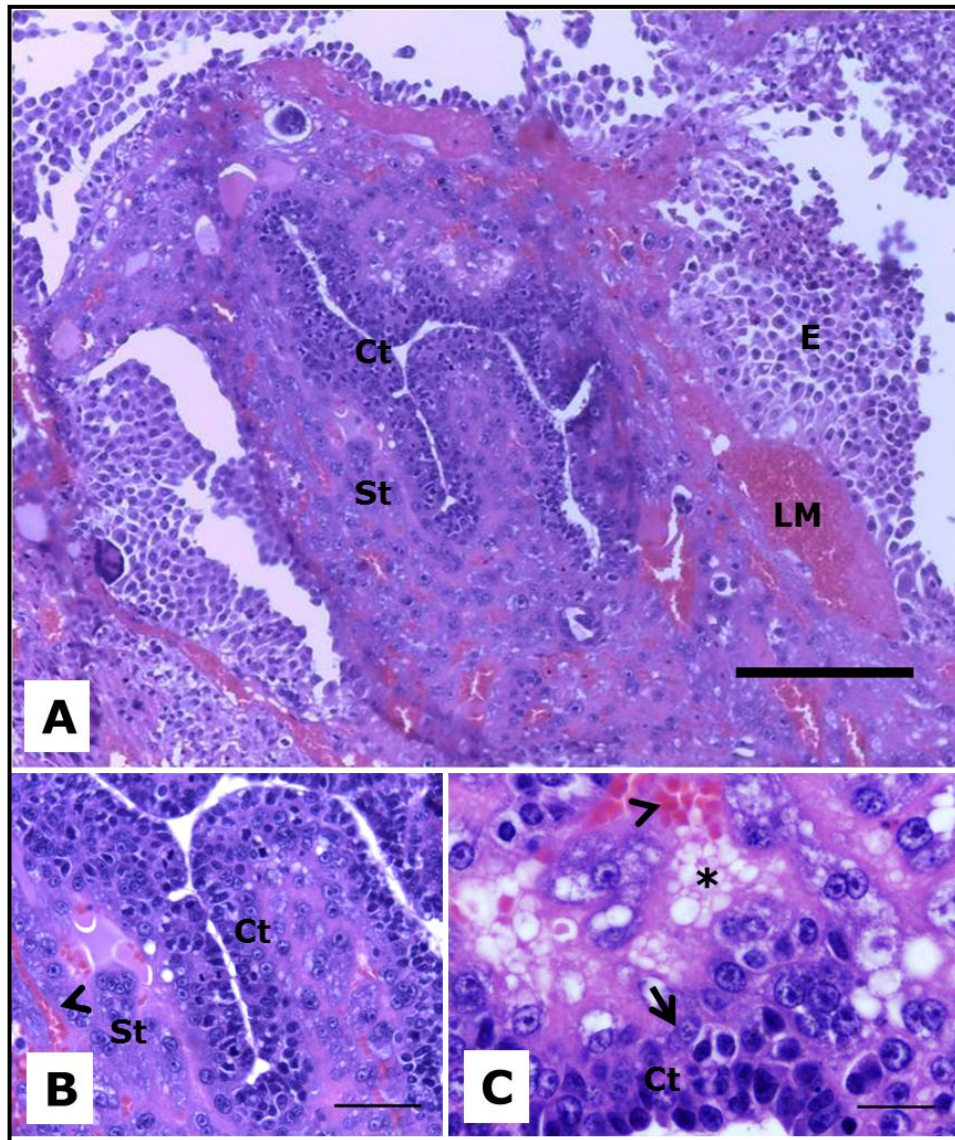


Figura 7 – Subplacenta do preá aos 15 dias de gestação. Em A: Visão panorâmica da subplacenta evidenciando sua monocamada de citotrofoblasto (Ct) envolta por tecido sincicial (St) que participa dos processo de invasão do tecido materno e da destruição e substituição do endotélio dos vasos decíduais, pode-se também observar a presença de grandes lacunas maternas (LM) nas margens da estrutura, além da presença do endoderma visceral (EV). Barra, 200 μ m. Em B: observar a relação da camada citotrofoblástica (Ct) com o tecido sincicial (St) e a presença de vasos maternos com o endotélio substituído marcados pela cabeça de seta (>). Barra, 50 μ m. Em C: notar novamente a presença de vasos de origem materna com revestimento trofoblástico (>) presença de figuras de mitose indicada pela seta (→) e por fim sinalizados pelo asterisco (*) pode-se visualizar os vacúolos característicos do sinciciotrofoblasto (St). Barra, 20 μ m. Coloração hematoxilina e eosina. Fonte: Acervo do autor.

À medida que o sinciotrofoblasto se expandia e afastava-se da camada citotrofoblástica em direção à decídua (Figura 8A), foram observadas algumas alterações no que diz respeito a sua organização. Quando os núcleos do sincício estavam mais próximos ao citotrofoblasto, estes se organizavam de forma mais individualizada e observava-se uma maior quantidade de figuras de mitose tanto no trofoblasto sincicial indicando que o sincício origina-se do citotrofoblasto. À medida que as células sinciciais se distanciavam do citotrofoblasto, verificava-se o aumento no número de aglomerados de núcleos e em seguida, principalmente, nas regiões próximas aos vasos sanguíneos, observava-se a presença de células trofoblásticas gigantes em alguns casos multinucleadas (Figura 8B).

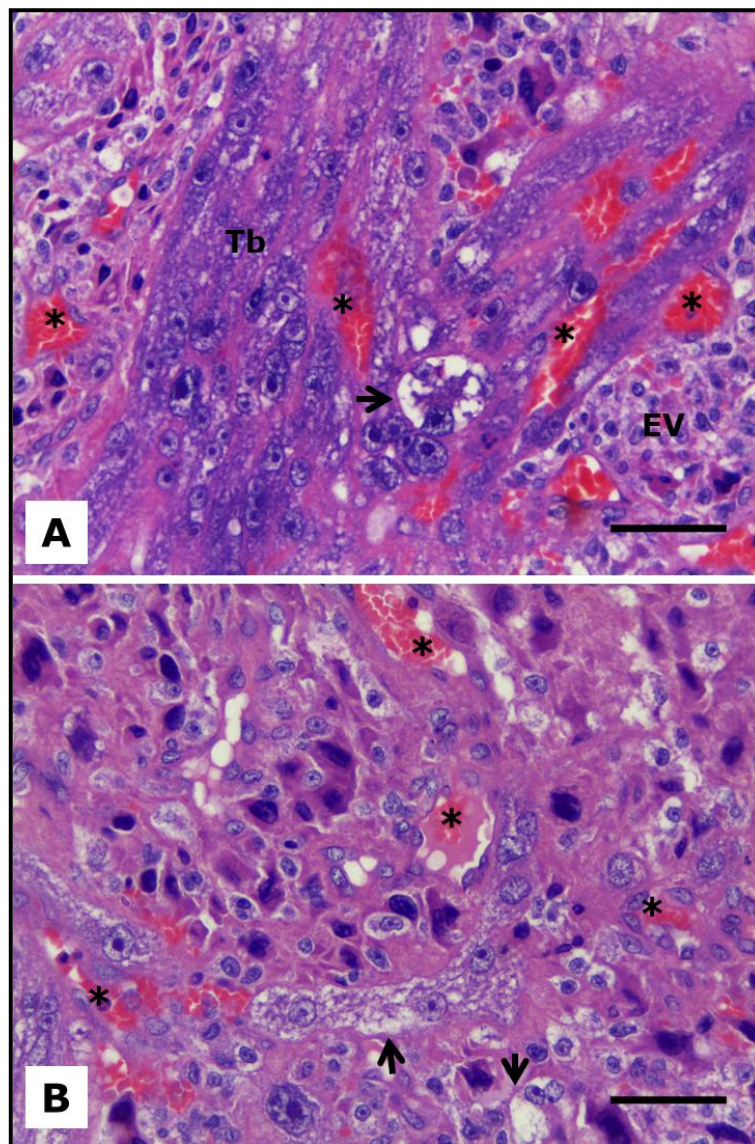


Figura 8 – Característica invasiva do trofoblasto aos 15 dias de gestação. Em A: notar a organização das células trofoblásticas (Tb), que confluem em direção ao tecido materno participando do processo de invasão do mesmo, seus núcleos aglomerados e em fila, presença de células gigantes (→) binucleadas e o endoderma visceral (EV). Barra, 50 µm. Em B: observar as células trofoblásticas gigantes (→) aproximando-se de vasos deciduais (*). Barra, 50 µm. Coloração hematoxilina e eosina. Fonte: Acervo do autor.

5.2.2 Aos 23 dias de gestação:

Neste período da gestação a placenta principal está em seu processo de formação e desenvolvimento. O aspecto labiríntico da mesma é facilmente distinguível, no entanto, sua organização típica em lóbulos não está completa e a maior parte de seu tecido é ocupada por interlóbulo e observam-se poucas camadas de citotrofoblasto envolvendo um grande vaso. Neste período a placenta possui também em seu ápice, assim como em suas margens, uma grande quantidade de células trofoblásticas gigantes que ocupam a região entre o espongiotrofoblasto em sua margem e a porção parietal do saco vitelino.

A subplacenta nesta idade ainda não possui uma forma definida, no entanto, já se mostra como uma estrutura com característica lobulada e com sua área bem delimitada em relação ao disco placentário (Figura 9A), onde possui em alguns pontos uma faixa tênue de tecido conjuntivo separando os dois órgãos, e em sua maior parte o que ocorre é uma justaposição dos tecidos destas duas estruturas (Figura 9B). Em sua borda que faz contato com a decídua basal, a subplacenta ainda não possui limites bem definidos e seu tecido se expande por boa parte da região decidual não havendo uma distinção clara entre subplacenta e decídua basal (Figura 9C).

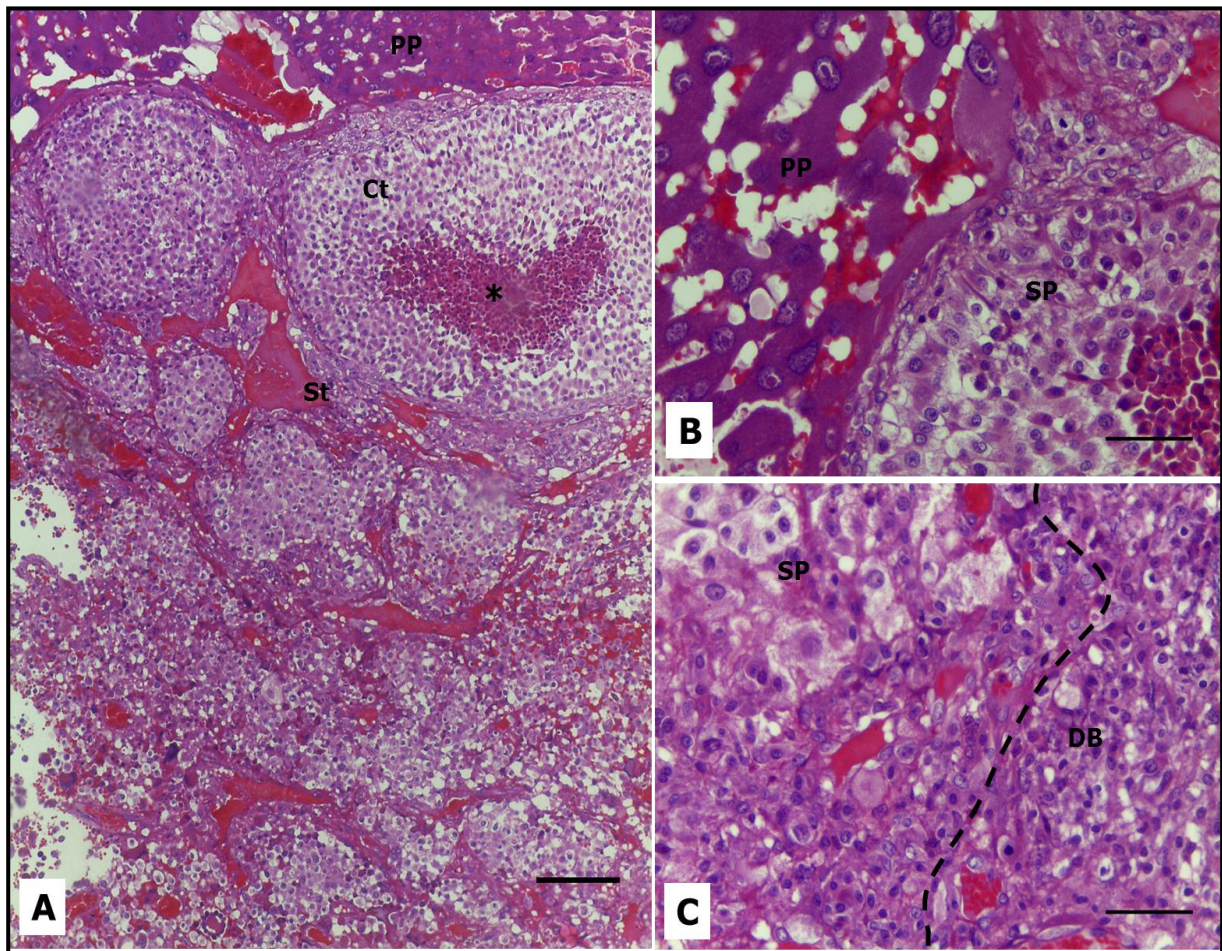


Figura 9 – Organização da subplacenta aos 23 dias de gestação e sua relação com a placenta principal (PP) e decídua basal (DB). Em A: observar em uma visão panorâmica os lóbulos da subplacenta compostos em sua maioria por citotrofoblasto (Ct) e sinciotrofoblasto (St) próximo as lacunas. Barra, 200 μ m. Em B: notar a relação de justaposição da placenta principal (PP) e a subplacenta (SP). Barra, 50 μ m. Em C: a relação entre o tecido subplacentário (SP) e a decídua basal (DB), onde ainda não há uma zona juncional bem definida e esta região assume aspecto desorganizado com tecido subplacentário adentrando profundamente na decídua. Barra, 50 μ m. Coloração Hematoxilina e eosina. Fonte: Acervo do autor.

A organização do citotrofoblasto e do sinciotrofoblasto nos lóbulos se dá de forma que as camadas de trofoblasto celular são predominantes e as células estão dispostas de forma concêntrica (Figura 9A), enquanto que o sincício aparece nos pontos onde há a presença de vaso de origem materna (Figura 10B). No centro desta formação ocorrem aglomerados de pequenas células de citoplasma bastante eosinofílico e de núcleo basófilo (Figura 10A). Na relação entre os tipos de trofoblasto, o celular aparece em maior quantidade nesta idade da gestação. Este tecido em sua maior parte é composto por células arredondadas, com

citoplasma eosinofílico e finamente granular e seus núcleos comumente são basais e arredondados. Todavia em alguns pontos estas células parecem perder suas características conformacionais e começam a se apresentar de forma mais alongada, ou com projeções citoplasmáticas que em alguns pontos parece se tratar de locais onde está ocorrendo a transição de cito para sinciciotrofoblasto.

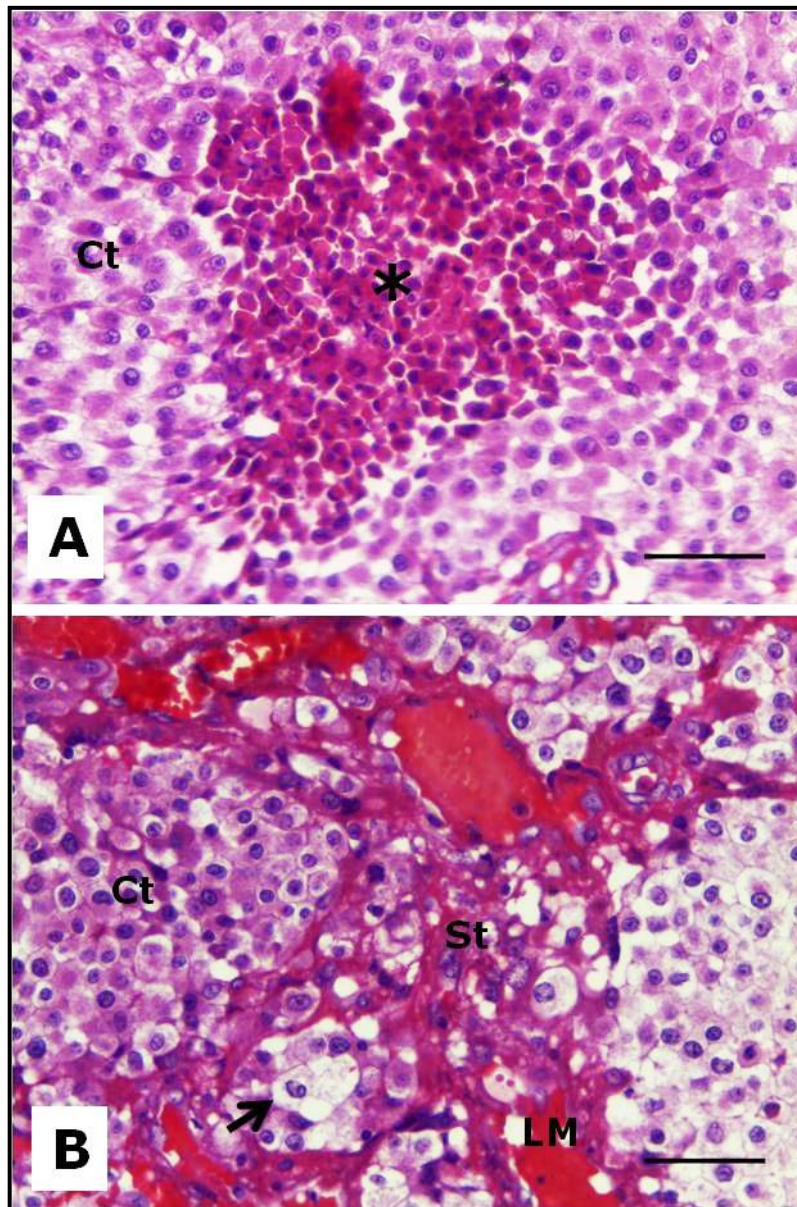


Figura 10 – Organização do citotrofoblasto (Ct) e do sincício (St) aos 23 dias de gestação. Em A: observar a presença de pequenas células (*) com citoplasma bastante eosinofílico e citoplasma basófilo no centro do lóbulo citotrofoblástico. Barra, 50 μ m. Em B: notar a relação do sincício (St) com os lóbulos de citotrofoblasto (Ct) e a presença de células gigantes (→) e lacunas materna (LM) permeando o tecido sincicial. Barra, 50 μ m. Coloração hematoxilina e eosina. Fonte: Acervo do autor.

O sinciciotrofoblasto aos 23 dias de gestação possui como característica a presença de poucos vacúolos e envolve várias lacunas com sangue de origem materna. Seu citoplasma é granular com núcleos em grande parte arredondados, podendo-se observar alguns com forma alongada e observar-se ainda figuras de mitose. Os núcleos sinciciais podem apresentar-se dispersos ou muito próximos formando aglomerados (Figura 10B).

Um fato marcante no tecido subplacentário foi a presença de células trofoblásticas gigantes dispersas em meio ao sinciciotrofoblasto, visualizadas, também, na região entre a subplacenta e placenta principal (Figura 11A) na periferia da placenta principal (Figura 11C) e ainda na região que faz relação com a decídua basal (Figura 10B). Neste último local aumentam consideravelmente de quantidade e as binucleações tornam-se mais frequentes.

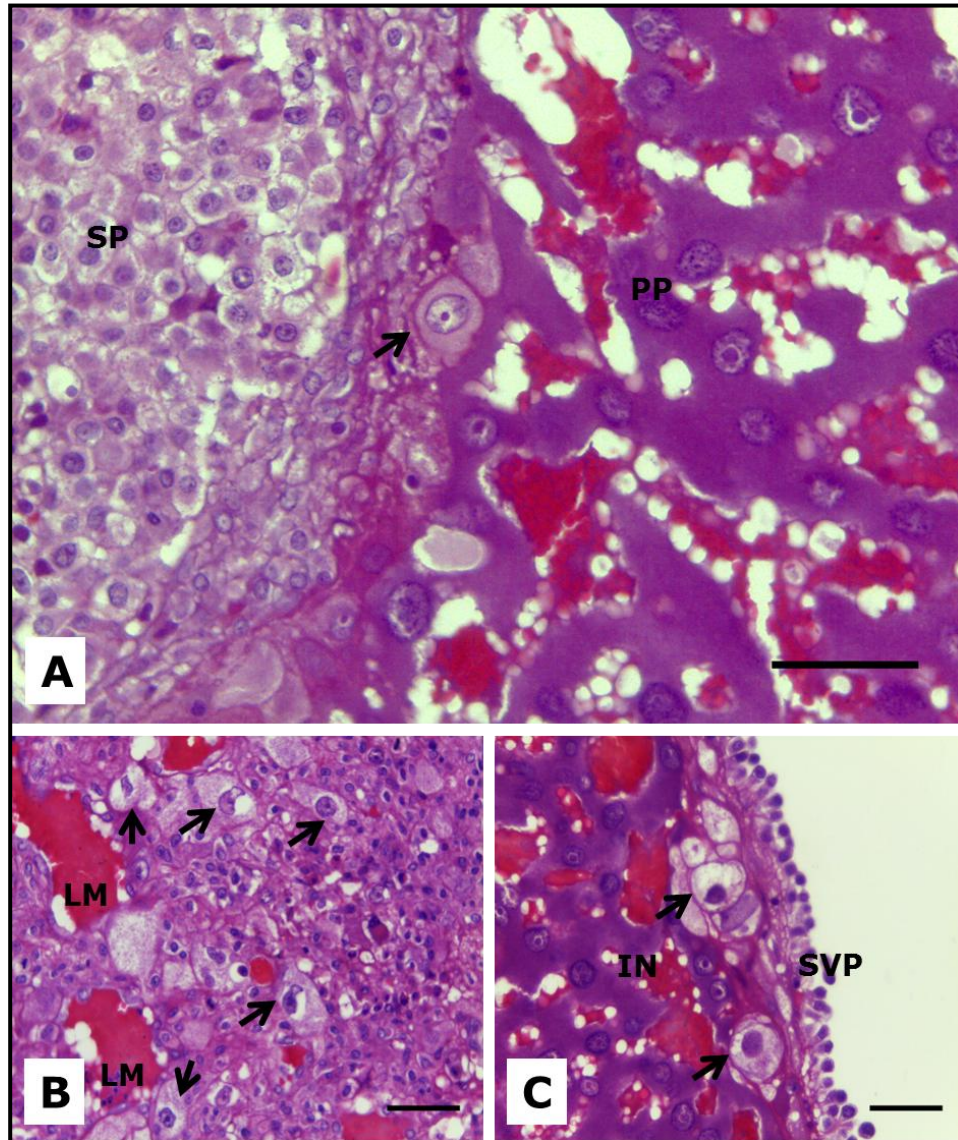


Figura 11 – Fotomicrografia detalhando a presença de grande quantidade de células gigantes aos 23 dias de gestação. Em A: notar a presença de uma célula trofoblástica gigante (→) entre a placenta principal (PP) e a subplacenta. Barra, 50 µm. Em B, observam-se estas células, marcadas pelas setas (→), difusas na decidua, especialmente, próximas aos vasos deciduais (VD). Em C: observar a presença de células trofoblásticas gigantes nas margens da placenta principal, ocupando o espaço entre o espongiotrofoblasto (Et) e o saco vitelino parietal (SVP). Barra, 50 µm. Coloração hematoxilina e eosina. Fonte: Acervo do autor.

5.2.3 Aos 30 dias de gestação:

Neste estágio da gestação, tanto a placenta como a subplacenta encontravam-se bem desenvolvidas e maduras. A subplacenta era bem delimitada mostrando-se como um órgão isolado que era separado da placenta principal por um tecido mesenquimal de origem fetal que percorria toda a região entre os dois órgãos (Figura 12A e B). Nesta região estavam inseridos vasos de origem fetal e o conjuntivo em alguns pontos penetrava na subplacenta. Nas margens da subplacenta, assim como em toda a sua face voltada ao tecido materno, a subplacenta relacionava-se com a zona juncional (Figura 12C e D), constituída por um tecido amorfo preenchido por detritos celulares e que apresenta uma considerável quantidade de células trofoblásticas gigantes.

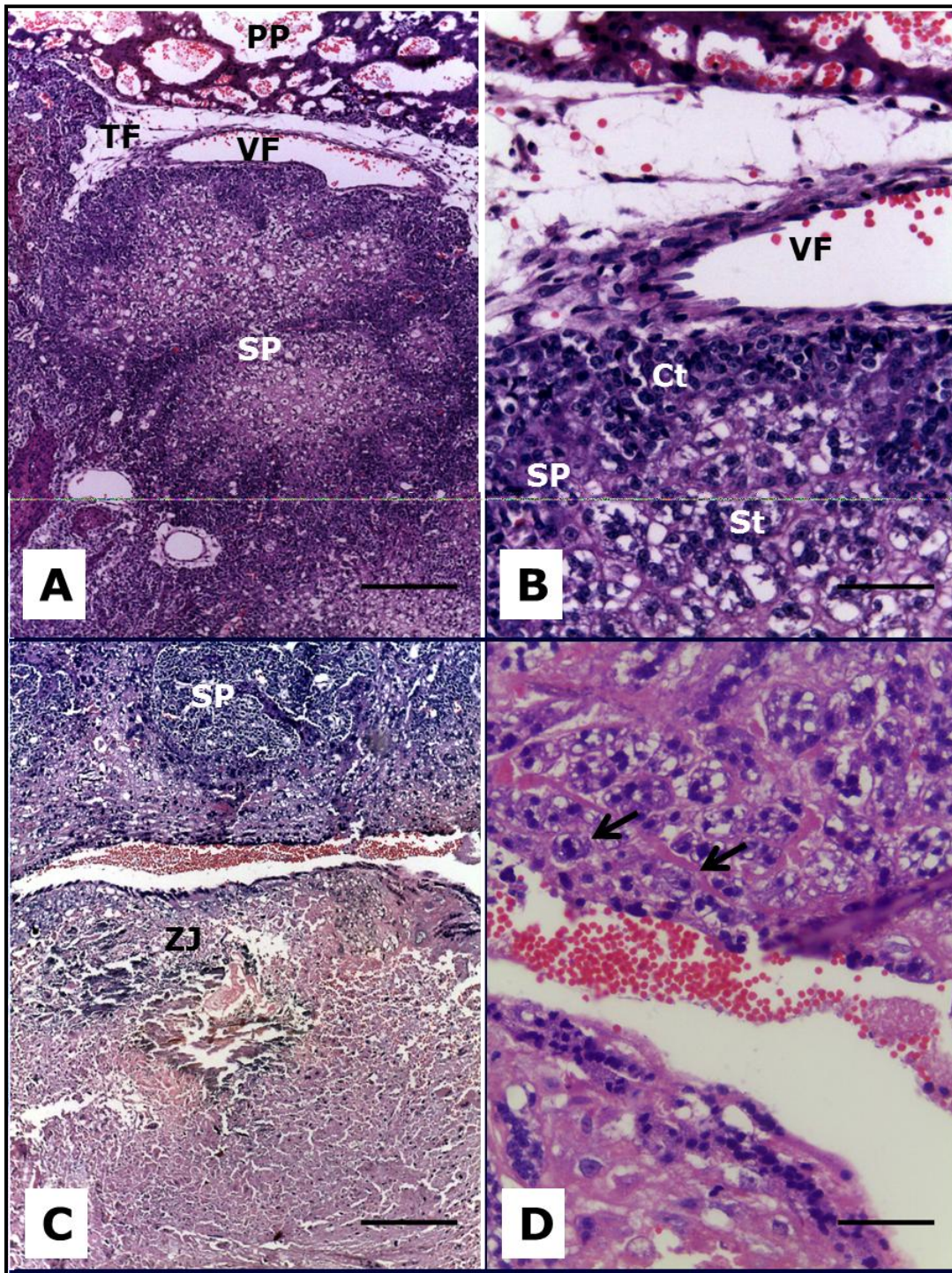


Figura 12 – Fotomicrografias ilustrando as relações da subplacenta com a placenta principal e a decidua basal aos 30 dias de gestação. Em A: Observar a presença de um tecido conjuntivo frouxo (TF) entre a subplacenta (SP) e a placenta principal, que contem vasos de origem fetal (VF). Barra, 200 μ m. Em B: temos um maior detalhamento desta região evidenciando o vaso fetal (VF) e percebe-se ainda, a relação periférica do citotrofoblasto (Ct) subplacentário com o sincício (St). Barra, 50 μ m. Em C: relação da subplacenta (sp) com a zona juncional (ZJ), barra 200 μ m, e em D: fotomicrografia em maior aumento desta região demonstrando sua característica de tecido amorfo com a presença de células gigantes ($\rightarrow$). Barra, 50 μ m. Fonte: Acervo do autor.

Aos 30 dias de gestação a organização da subplacenta em forma de lamelas citotrofoblásticas que envolvem projeções de tecido mesenquimal torna-se evidente. A forma como o sincício e o citotrofoblasto organizam-se continua seguindo a mesma conformação da idade anterior, onde o trofoblasto celular reveste o tecido mesenquimal e acima dele surge o sincíciotrofoblasto, o que faz com que a subplacenta apresente-se como uma estrutura lobulada com o citotrofoblasto ocupando a periferia dos lóbulos e o sincício as regiões centrais (Figura 13A e B) e, de maneira oposta ao que ocorre aos 23 dias de gestação, a predominância na composição dos lóbulos é do sincício. Esta disposição do citotrofoblasto está tanto para os lóbulos, como para subplacenta como um todo, já que o mesmo ocupa toda extensão das bordas subplacentária (Figura 12B).

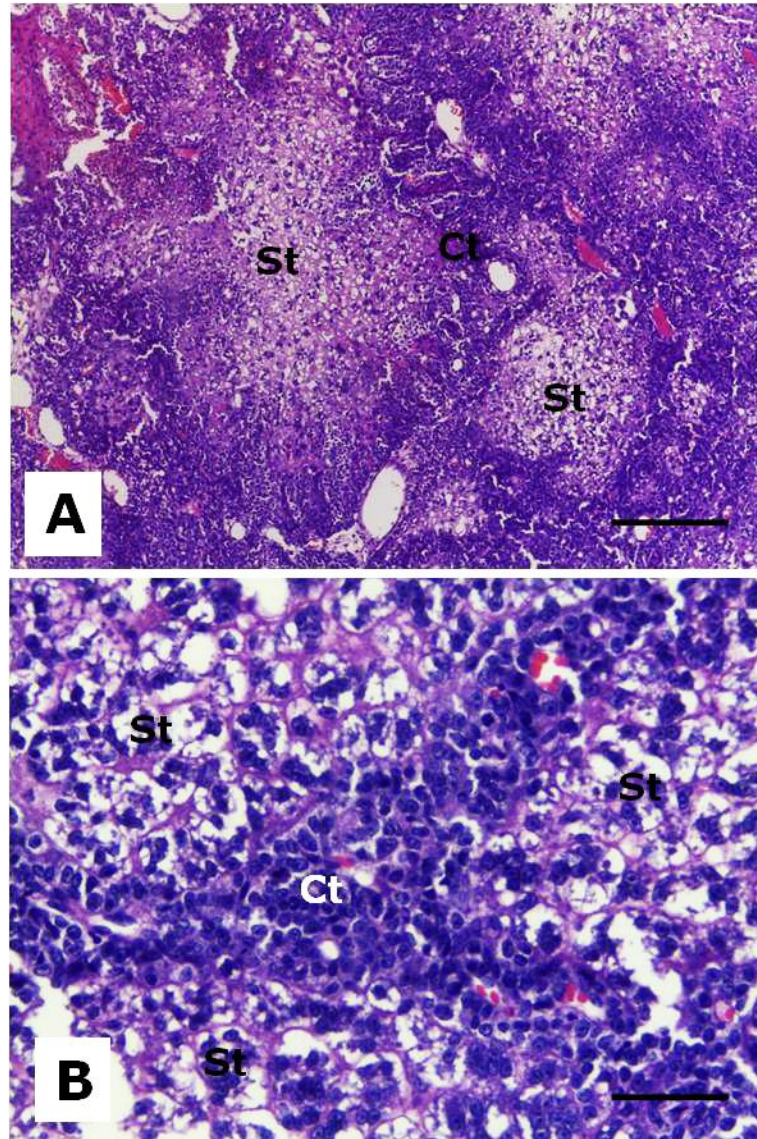


Figura 13 – Fotomicrografia da subplacenta aos 30 dias evidenciando característica lobulada da subplacenta. Em A: notar a organização dos lóbulos subplacentário nesta fase da gestação, com sincício (St) no centro e citotrofoblasto (Ct) em sua periferia. Barra, 200 μ m. Em B: evidencia-se em um maior aumento os lóbulos subplacentários com o citotrofoblasto (Ct) periférico e o sincício (St) compondo sua porção central. Barra, 50 μ m. Fonte: acervo do autor.

Nesta idade da gestação verificou-se, ainda que, o citotrofoblasto apresentou maior complexidade na organização de suas lamelas e em alguns pontos, especialmente, nos pontos em que subplacenta está separada da placenta por apenas uma tênue camada de tecido conjuntivo observava-se ilhotas de citotrofoblasto subplacentário na placenta (Figura 14A), Estas células penetravam o tecido placentário por meio de projeções citotrofoblásticas em alguns pontos da subplacenta (Figura 14B). O citoplasma destas células eram levemente

basófilos, com uma pequena quantidade de grânulos. Já os núcleos eram basais, arredondados, com característica basófila e, na maioria das vezes, com o nucléolo evidente e podiam apresentar figuras de mitose.

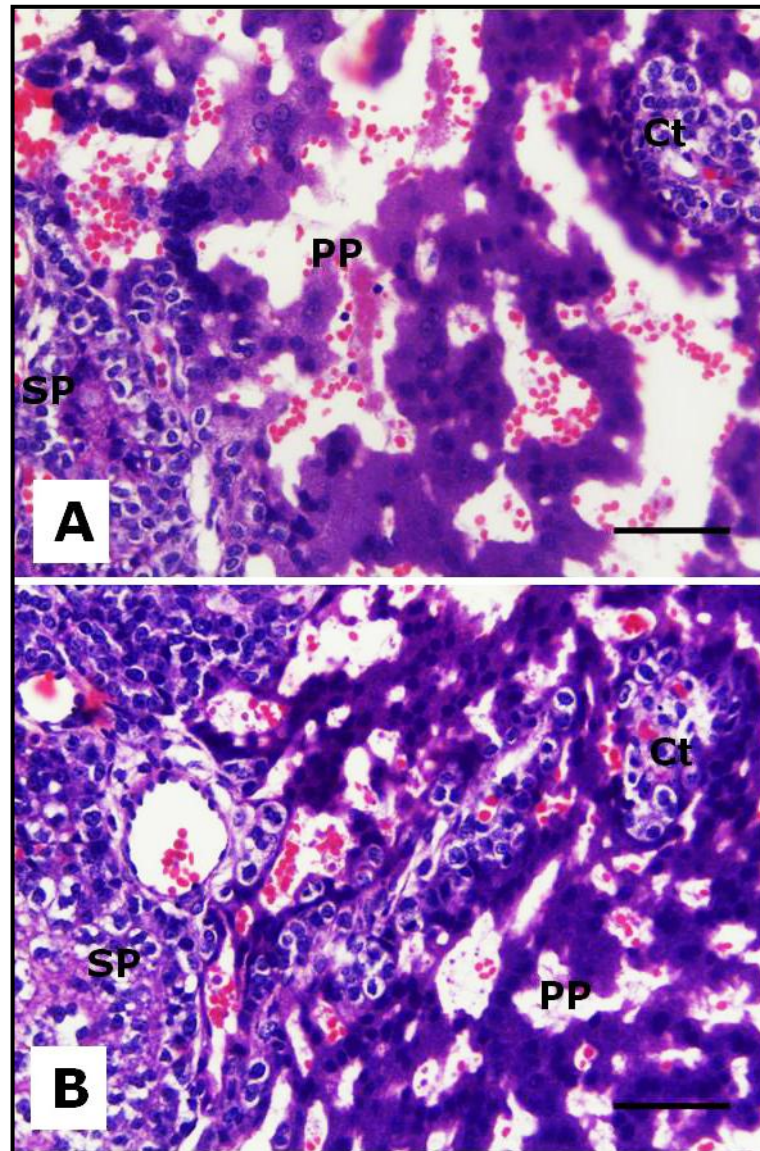


Figura 14 – Ilustração da difusão do tecido oriundo da subplacenta (SP) aos 30 dias, em especial o citotrofoblasto (Ct), no tecido da placenta principal (PP). Em A: observa-se uma ilhota de citotrofoblasto (Ct), originado na subplacenta, na placenta (PP), e Em B, é possível notar o deslocamento do citotrofoblasto (Ct) no interior do tecido placentário. Barra, 50 μ m. Fonte: Acervo do autor.

Quanto às características do sincício observou-se que o citoplasma eosinofílico, apresentavam núcleos arredondados e apresentavam-se aglomerados e podiam apresentar ainda grandes regiões livres e áreas bastante vacuoladas. Uma característica deste tecido que chamou a atenção neste período gestacional foi seu contato com os vasos de origem fetal revestidos por endotélio (Figura 15A), que são comumente envoltos por citotrofoblasto. Percebeu-se, também, uma grande proximidade entre os vasos de origem fetal e os resquícios das lacunas maternas que ocorriam aos trinta dias de gestação (Figura 15B).

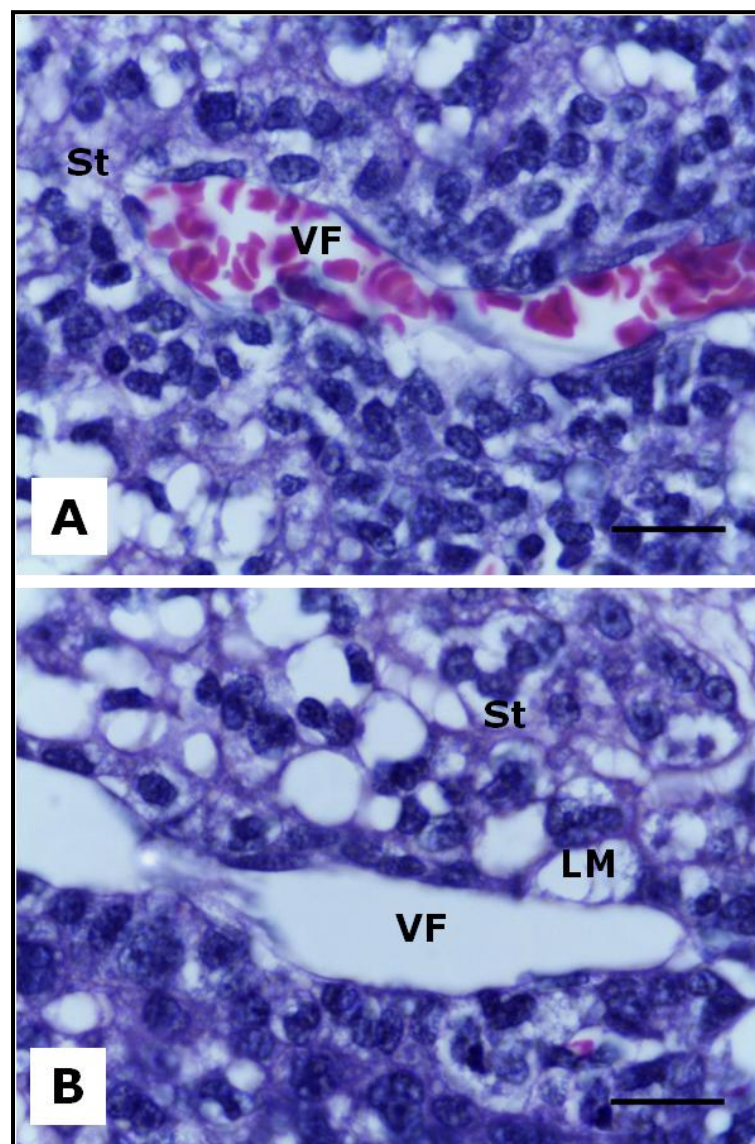


Figura 15 – Relação dos vasos fetais (VF) com o sinciotrofoblasto (St) aos 30 dias de gestação. Em A: notar a grande proximidade entre o sincício (St) e o vaso fetal (VF), e Em B, observar a relação de proximidade do vaso fetal com os resquícios das lacunas maternas (LM). Barra, 20 μ m. Fonte: Acervo do autor.

5.2.4 Aos 45 dias de gestação:

A partir deste período da gestação, a subplacenta do preá começa a apresentar sinais de degeneração e de diminuição da sua atividade celular, notadas especialmente pela redução na quantidade e ausência, em alguns pontos, de figuras de mitose, também foram observados indícios de morte celular, principalmente, pela presença de núcleos picnóticos no sinciciotrofoblasto (Figura 16C).

Sinciciotrofoblasto abrange uma maior área e é notável sua maior quantidade quando comparado ao citotrofoblasto (Figura 16A e B). A disposição dos núcleos em aglomerados já não se apresenta de forma tão característica quanto em fases anteriores da gestação, principalmente, pela grande quantidade de núcleos neste tecido e pela marcante diminuição na relação entre núcleos e espaço citoplasmático livre. Os vacúolos característicos do sincício apresentaram-se maiores e em maior número (Figura 16C). As lacunas maternas resumiam-se a resquícios que ainda apresentavam em alguns pontos uma grande proximidade com os vasos fetais que também se relacionavam em alguns casos com o trofoblasto sincicial (Figura 17A).

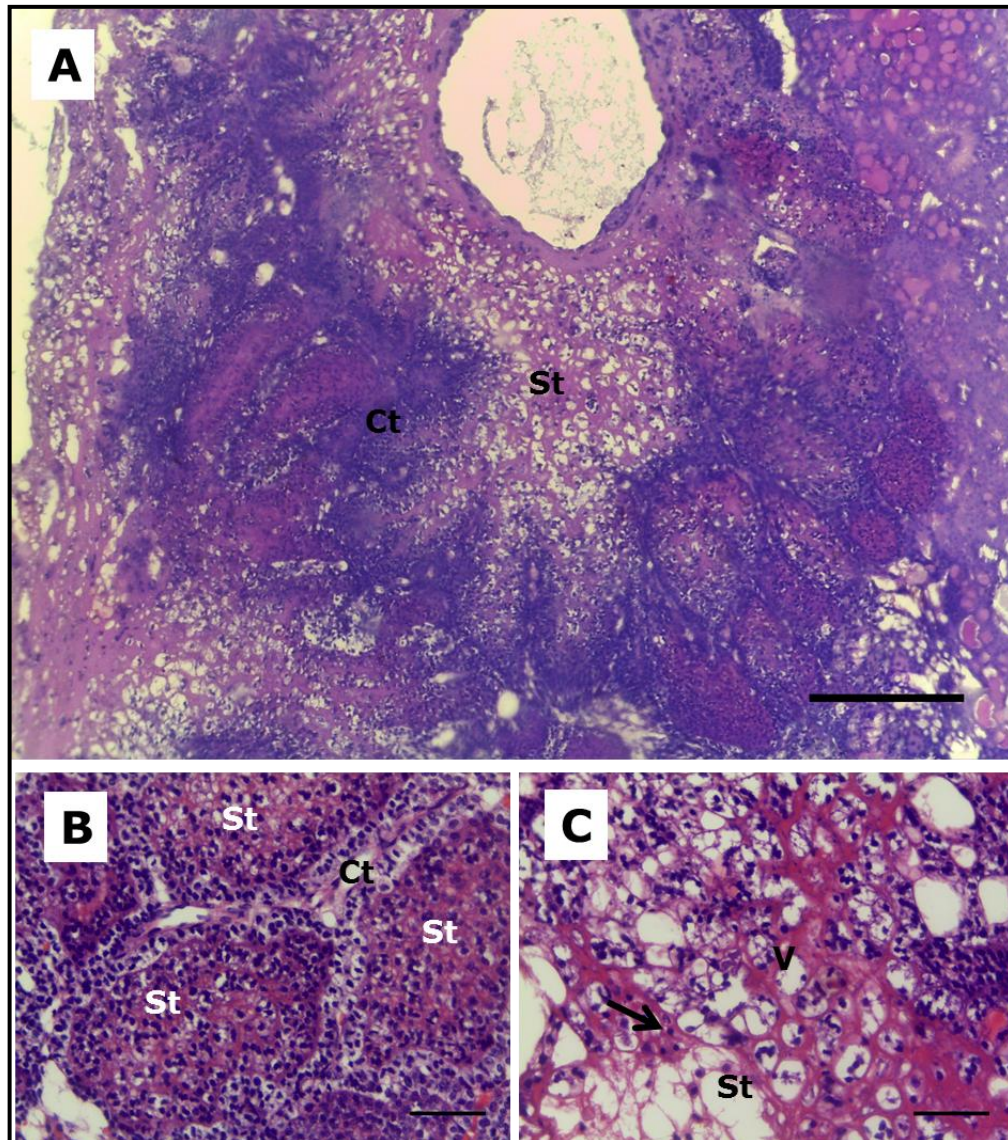


Figura 16 – subplacenta aos 45 dias de gestação. Observar em A, em uma visão panorâmica, a maior quantidade de sinciotrofoblasto (St) em relação ao citotrofoblasto (Ct). Barra, 200 μ m. Em B: relação das camadas citotrofoblasticas (Ct) com o sincício (St) e manutenção do aspecto lobulado. Barra, 50 μ m. Em C: Notar as características de degeneração do trofoblasto sincicial, como a grande quantidade de vacúolos (V) e a presença de núcleos picnóticos (→) evidenciando a presença de morte celular neste tecido. Barra, 50 μ m. Fonte: Acervo do autor.

Quanto ao trofoblasto celular, este apresentou uma considerável diminuição em suas lamelas, chegando a apresentar-se em monocamadas em algumas regiões da subplacenta, apresentava certo grau de desorganização com sua conformação de distribuição periférica em relação ao sincício perdida em alguns locais. Seu comportamento periférico, nas proximidades da placenta principal ainda se mantinha, no entanto, não eram visualizados sinais de invasão

do disco principal por parte do trofoblasto subplacentário. Entretanto as conformações que lembram lóbulos continuavam presentes até este período da gestação (Figura 17B).

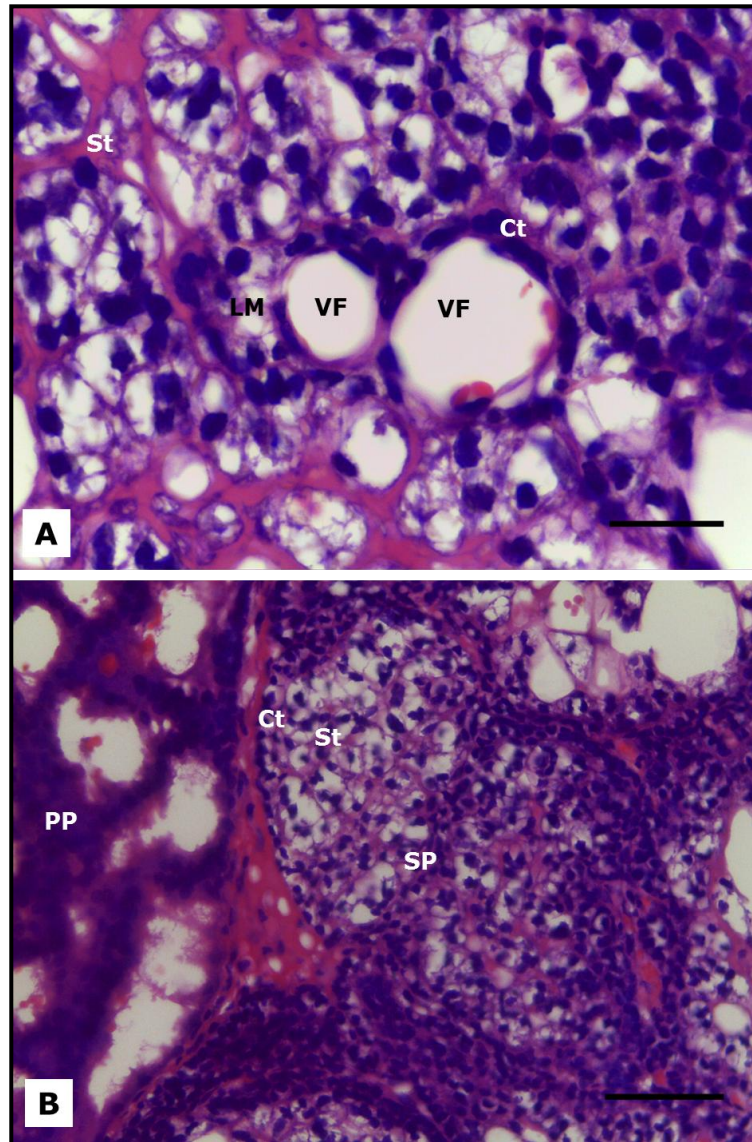


Figura 17 – subplacenta aos 45 dias de gestação. Observar em A, Proximidade dos vasos fetais (VF) com o sinciotrofoblasto (St), assim como com as lacunas maternas (LM) residuais. Barra, 20 μ m. Em B: relação das camadas citotrofoblásticas (Ct) com o sincício (St) na periferia da subplacenta (SP), notar que o citotrofoblasto permanece ocupando a periferia do órgão e que o tecido conjuntivo que separava a subplacenta (SP) da placenta (PP) diminui em relação ao período gestacional anterior. Barra, 20 μ m. Fonte: Acervo do autor.

5.2.5 Aos 53 e 55 dias de gestação:

Na gestação a termo, torna-se evidente a diminuição da área ocupada pelo tecido subplacentário em relação à placenta principal, bem como é, notório, o elevado grau de deterioração deste órgão, uma vez que quando corada pela técnica do tricrômio de Gomori, onde nota-se um aumento considerável no tecido conjuntivo que permeia a subplacenta e a diminuição de seu parênquima (Figura 18 A e B).

Além de sua evidente degeneração, a subplacenta apresenta, neste estágio, um aspecto de desorganização em todo seu tecido, esta condição é demonstrada pelo que se observa nas duas populações de células trofoblásticas que compõem a maior parte do tecido subplacentário. O citotrofoblasto é em sua maior parte reduzido a monocamadas que em alguns pontos são descontinuadas e expõem os vasos fetais ao sincício (Figura 18C). Além disto, figuras de mitose são dificilmente observadas e as células apresentam grande quantidade de vacúolos. Já o sinciciotrofoblasto encontra-se disperso, amorfo, contendo vacúolos e sugerem a presença de sinais de apoptose, especialmente, pela identificação de núcleos picnóticos (Figura 18D). Outra característica marcante deste tecido, no final da gestação, é a presença de uma grande quantidade de tecido amorfo que o permeia (Figura 18E).

Na região entre a placenta principal e a subplacenta o tecido conjuntivo permeado por vasos fetais ainda pode ser observado. No entanto, nas margens da subplacenta este tecido é ausente e os tecidos da subplacenta e placenta principal estão em contato direto. Já a zona juncional permanece como um tecido amorfo onde não são mais observadas células gigantes (Figura 18F).

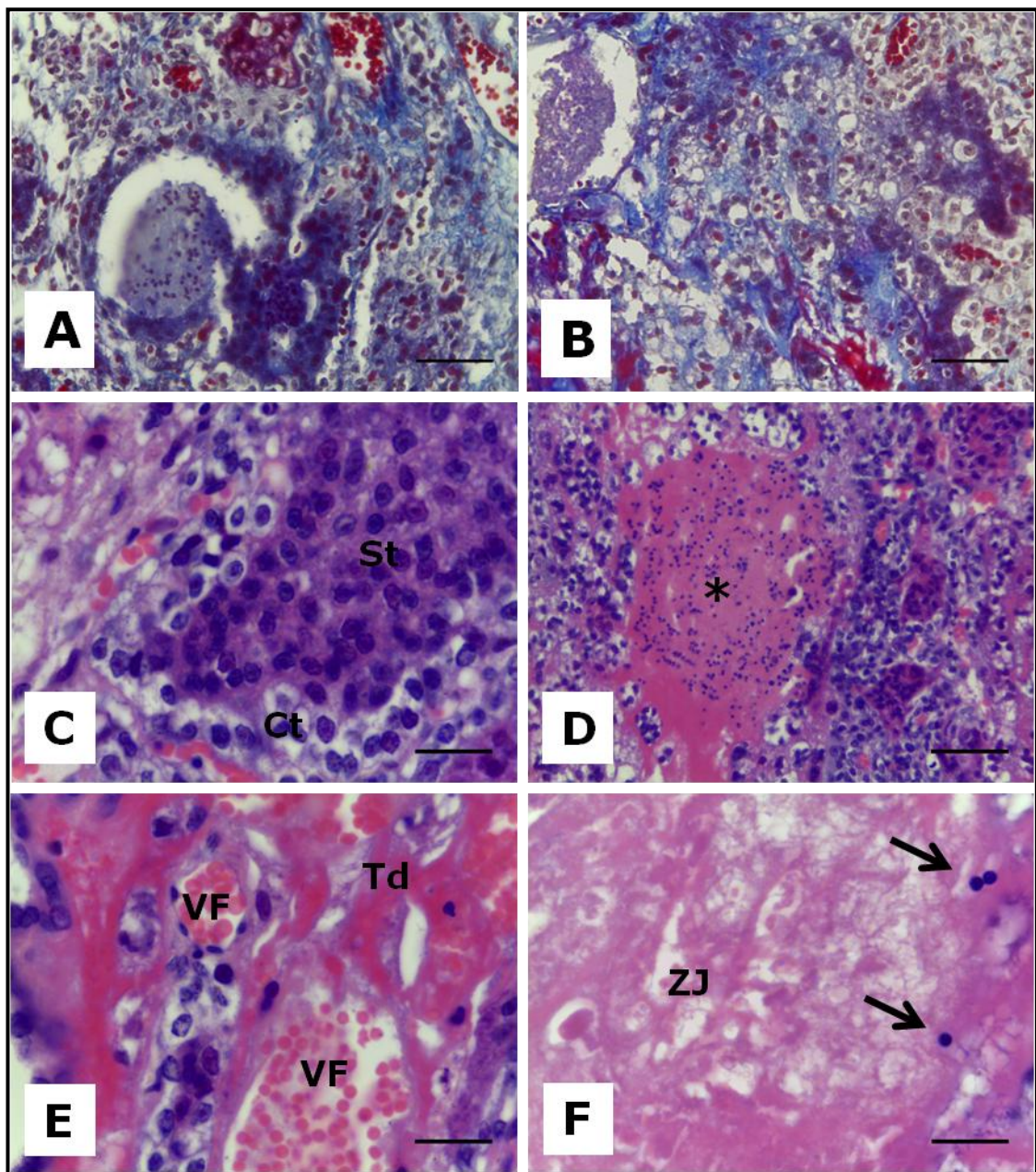


Figura 18 – subplacenta no final da gestação (53 e 55 dias). Observar em A e B, grande quantidade de tecido conjuntivo evidenciado pela técnica do tricrômio de Gomori. Barra, 50 μ m. Em C: uma ilhota de sinciciotrofoblasto (St) e uma monocamada de citotrofoblasto (Ct) que se torna descontínua, características marcantes desta fase da gestação. Barra, 20 μ m. Em D: região de tecido amorfo (*) contendo grande quantidade de núcleos picnóticos que ressaltam a deterioração deste tecido. Barra, 50 μ m. Em E: Vasos fetais (VF) expostos e presença de tecido conjuntivo denso no tesido subplacentário. Barra, 50 μ m. Em F: região onde situava-se a zona juncional composta em sua maior parte por tecido amorfo eosinofílico e presença de núcleos picnóticos. Barra, 20 μ m. Fonte: Acervo do autor.

5.3 REAÇÕES CITOQUÍMICAS E IMUNOCITOQUÍMICAS:

5.3.1 PAS:

Em se tratando da reação ao Ácido Periódico de Shiff na subplacenta, observou-se que durante todos os períodos de gestação estudados as áreas correspondentes ao sinciciotrofoblasto e a massa amorfa que emite projeções no interior da subplacenta demonstraram-se fortemente reativos ao PAS, enquanto que o citotrofoblasto apresentou uma reação fraca ou, como na maior parte dos casos, ausente (Figura 19). No entanto, pode-se notar que com o avanço da gestação e à medida que a área ocupada pelo sinciciotrofoblasto e pelo tecido conjuntivo, aumentavam as regiões que reagiam positivamente ao PAS, enquanto que as áreas onde não havia reação diminuía, em reflexo do processo de deterioração deste órgão (Figura 19E e F).

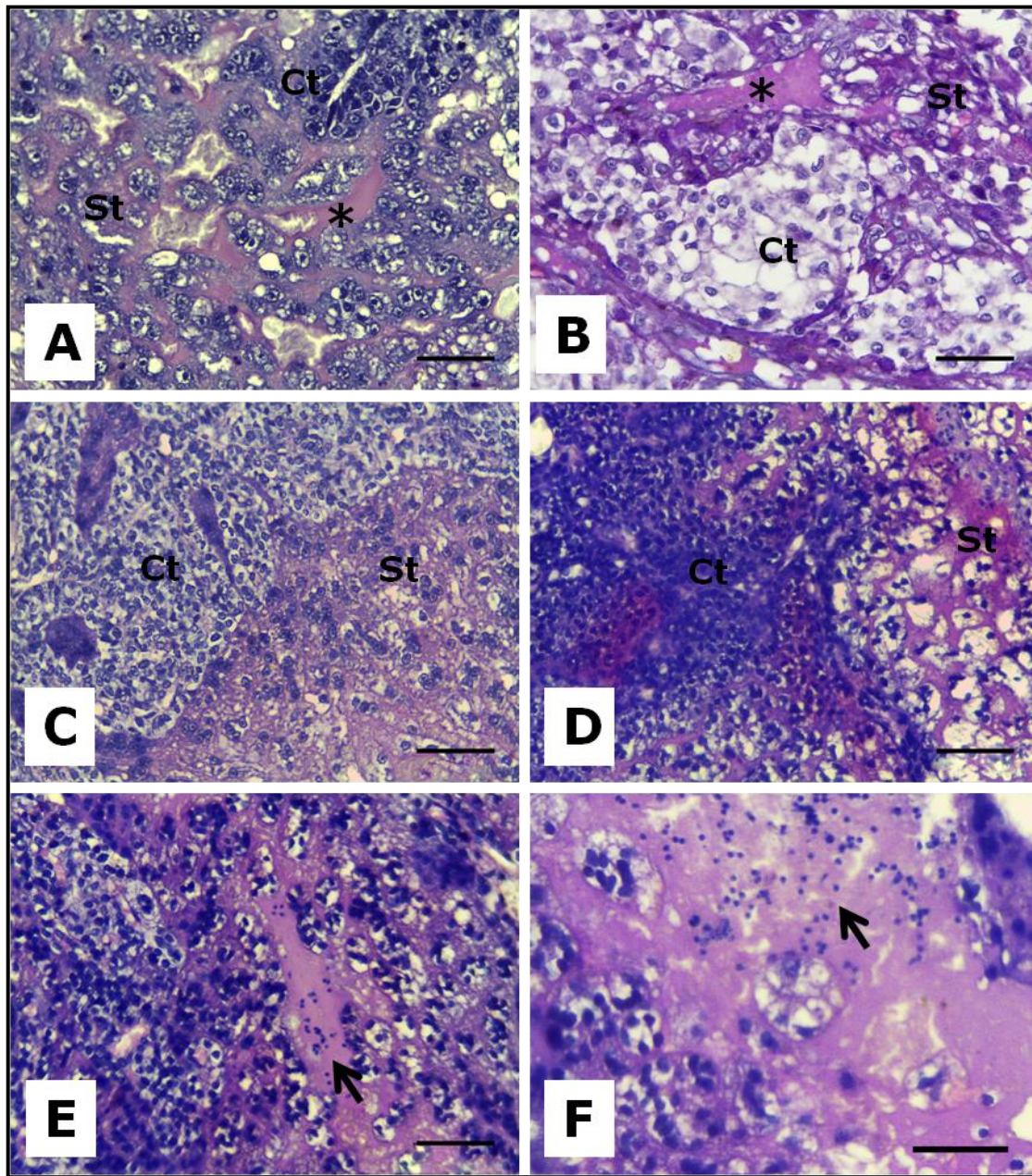


Figura 19 – Reação de PAS no tecido subplacentário nas diferentes idades gestacionais. Observar em A, o sinciotrofoblasto (St) PAS-positivo aos 15 dias de gestação, assim como as lacunas (*) possuem conteúdo que reage positivamente. Barra, 50 μ m. Em B: reação PAS-positiva no sinciotrofoblasto (St) e nas lacunas maternas (*) aos 23 dias de gestação, perceber ainda reação negativa no citotrofoblasto (Ct) e a íntima relação entre o sincício e as lacunas. Barra, 50 μ m. Em C: notar aos 30 dias de gestação a reação PAS-positiva novamente no sincício (St) e negativa no trofoblasto celular (Ct). Barra, 50 μ m. Em D: novamente a reação PAS-positiva no Sincício (St) aos 45 dias de gestação, perceber a maior quantidade de vacúolos no citoplasma sincicial nesta idade. Barra, 50 μ m. Em E e F: subplacenta no final de gestação aos 53 e 55 dias respectivamente, neste período devido a degeneração do tecido subplacentário, surge uma grande quantidade de tecido amorfo PAS positivo e que possui núcleos picnóticos. Barra 50 μ m e 20 μ m. Fonte: Acervo do autor.

5.3.2 PCNA e AgNOR:

A imunoreação ao Antígeno Nuclear de Proliferação Celular ou PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) apresentou um elevado grau de reatividade no citotrofoblasto das lamelas da subplacenta. O mesmo ocorreu em algumas células do sincício, assim como, em algumas células trofoblásticas gigantes, distribuídas no estroma endometrial e junto à parede dos vasos maternos, sendo este comportamento foi verificado durante todas as fases da gestação (Figura 20).

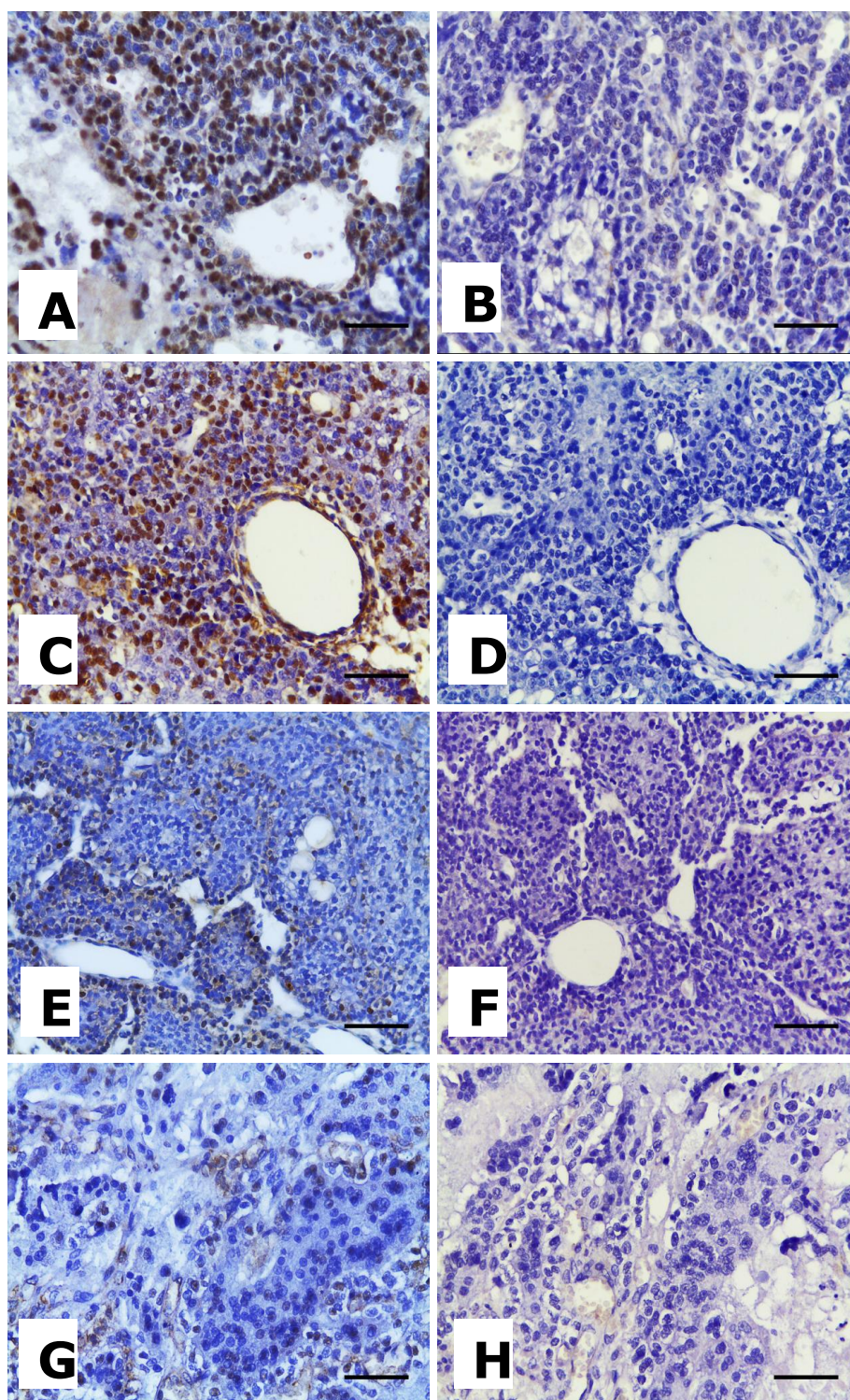


Figura 20 – Reação imunohistoquímica ao PCNA nas diferentes idades gestacionais. Observar em A, a reação positiva a PCNA 23 dias de gestação, e em B, Controle negativo. Barra, 50 μ m. Em C: notar aos 30 dias de gestação a intensa reação ao PCNA. E em D: controle negativo. Barra, 50 μ m. Em E: perceber a brusca diminuição da reação ao PCNA. Em F: controle negativo. Barra 50 μ m. Em G: reação ao PCNA praticamente ausente e em H controle negativo. Barra 50 μ m. Fonte: Acervo do autor.

A subplacenta é notadamente um órgão fornecedor de trofoblasto tanto para a placenta principal como para os processos de invasão ao tecido materno, fornecendo, a partir de seu trofoblasto, células invasivas que atuam neste processo. Sendo assim, a proliferação do seu tecido, especialmente o citotrofoblasto, ocorre de maneira intensa desde o início de sua formação, e de acordo com os resultados da reação ao PCNA (Figura 20) e do índice mitótico expostos na Figura 21, aos 15 dias de gestação a subplacenta apresenta seu máximo potencial mitótico (62%), a partir dos 23 dias (Figura 20A e B) este órgão mantém-se estável até o trigésimo dia de gestação (Figura 20C e D) com índice mitótico de 54% e a partir dos 45 dias (Figura 20 E e F) notou-se uma brusca queda neste índice (14%) e as células sinciciais e trofoblásticas gigantes raramente apresentam reação PCNA positiva em seus núcleos no final da gestação (Figura 20 G e H), indicando que o período de involução subplacentária inicia-se neste estágio, onde a atividade proliferativa é mínima (8%).

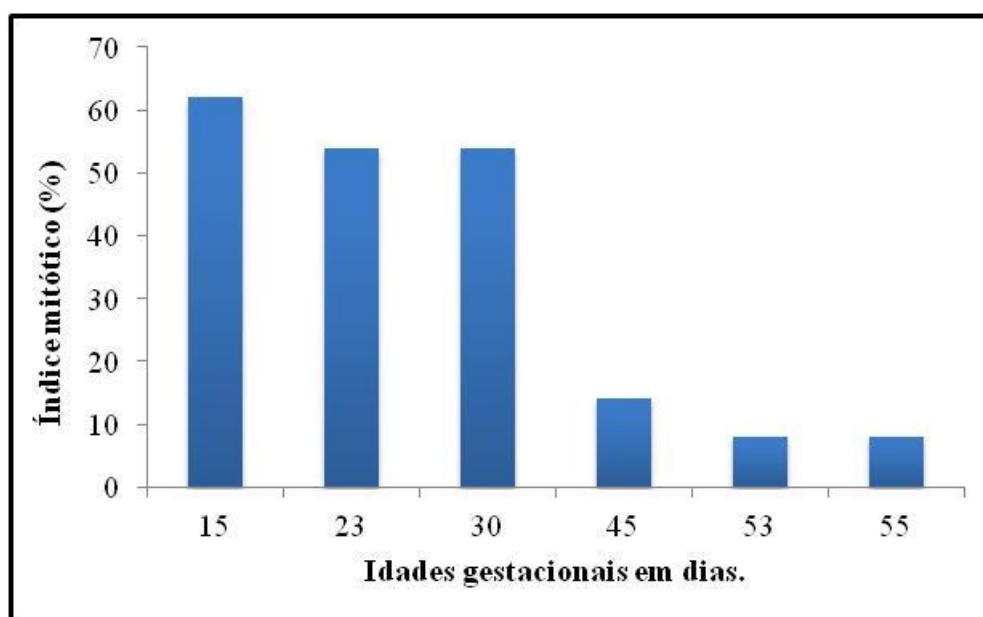


Figura 21: Gráfico do índice mitótico por idade gestacional durante o desenvolvimento subplacentário. Fonte: Acervo do autor.

Quando submetida à técnica de impregnação por prata das regiões organizadoras de nucléolo argirofílicas (AgNOR), o tecido subplacentário foi marcado intensamente pela reação (Figura 22A). Assim como constatado pelo índice mitótico, as médias das contagens

de AgNORs demonstraram que a atividade proliferativa da subplacenta esta presente desde o início da gestação e com o passar do tempo vai decaindo até chegar em seu mínimo no período próximo ao termo da gestação (Figura 22B). No entanto, ao contrário do PCNA que marca as células que estão se proliferando, a técnica de AgNOR indica que as células estão sendo recrutadas à proliferação, conferindo assim resultados acerca da cinética da proliferação das células marcadas, indicando que no inicio da gestação as células trofoblásticas dividem-se tanto em maior número como em maior velocidade.

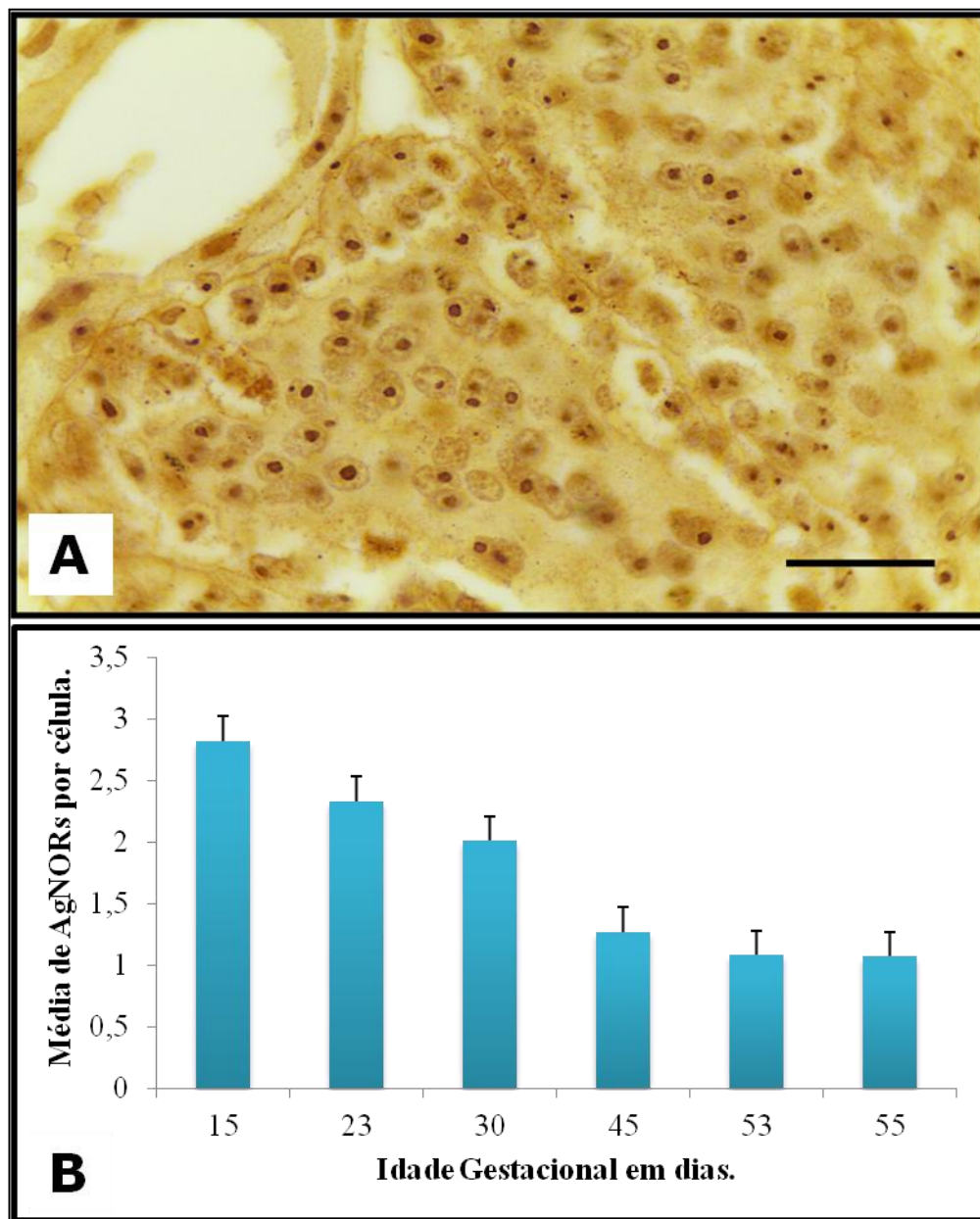


Figura 22 – Em A, fotomicrografia ilustrando o resultado da técnica de impregnação por prata das NORs. Barra 50 μ m. Em B: gráfico da média por idade gestacional da contagem de AgNORs durante o desenvolvimento subplacentário. Fonte Acervo do autor.

5.3.3 Vimentina e citoqueratina:

A vimentina é um filamento intermediário que compõe o citoesqueleto das células, especialmente, em tecidos de origem mesodermal, e de uma forma geral, a reação da peroxidase a vimentina mostra uma intensa reação positiva no revestimento endotelial dos vasos sanguíneos tanto na placenta principal como na subplacenta, em especial, nos vasos sanguíneos contidos no mesênquima fetal que permeia o tecido subplacentário, vasos em sua maioria de pequeno calibre. Por outro lado, as lacunas maternas, dada ausência de endotélio que foi removido e substituído por trofoblasto, não são marcadas por esta reação (Figura 23).

Aos 23 dias de gestação (Figura 23 A e B) nota-se a presença dos vasos fetais demarcados pela reação imunocitoquímica à vimentina na subplacenta, permitindo que se observe a característica desses vasos que possuem seu endotélio intacto e são envolvidos por citotrofoblasto, enquanto que as lacunas presentes no sincíotrofoblasto não estão coradas. Quando a idade gestacional chega aos trinta dias (Figura 23 C e D), os vasos fetais continuam bem demarcados e distribuídos por toda a subplacenta, com exceção dos espaços ocupados pelo sincício, porém, é possível notar que em alguns pontos determinados vasos fetais apresentam-se bastante próximos ao sincíotrofoblasto fugindo da conformação comumente observada, além de, também, estarem bastante próximos das lacunas maternas. No estágio seguinte, 45 dias (Figura 23 E e F), os vasos fetais continuam bem marcados pela reação e não são observadas lacunas maternas em sua forma característica, sendo possível ver somente seus resquícios. E quando a gestação aproxima-se do termo (Figura 23 G e H), ainda é possível encontrar vasos fetais marcados pela imunorreação à vimentina, mas, com a diminuição do tecido subplacentário a quantidade de vasos também diminui e seu conteúdo torna-se amorfo e observa-se notória a desorganização do trofoblasto que os envolve.

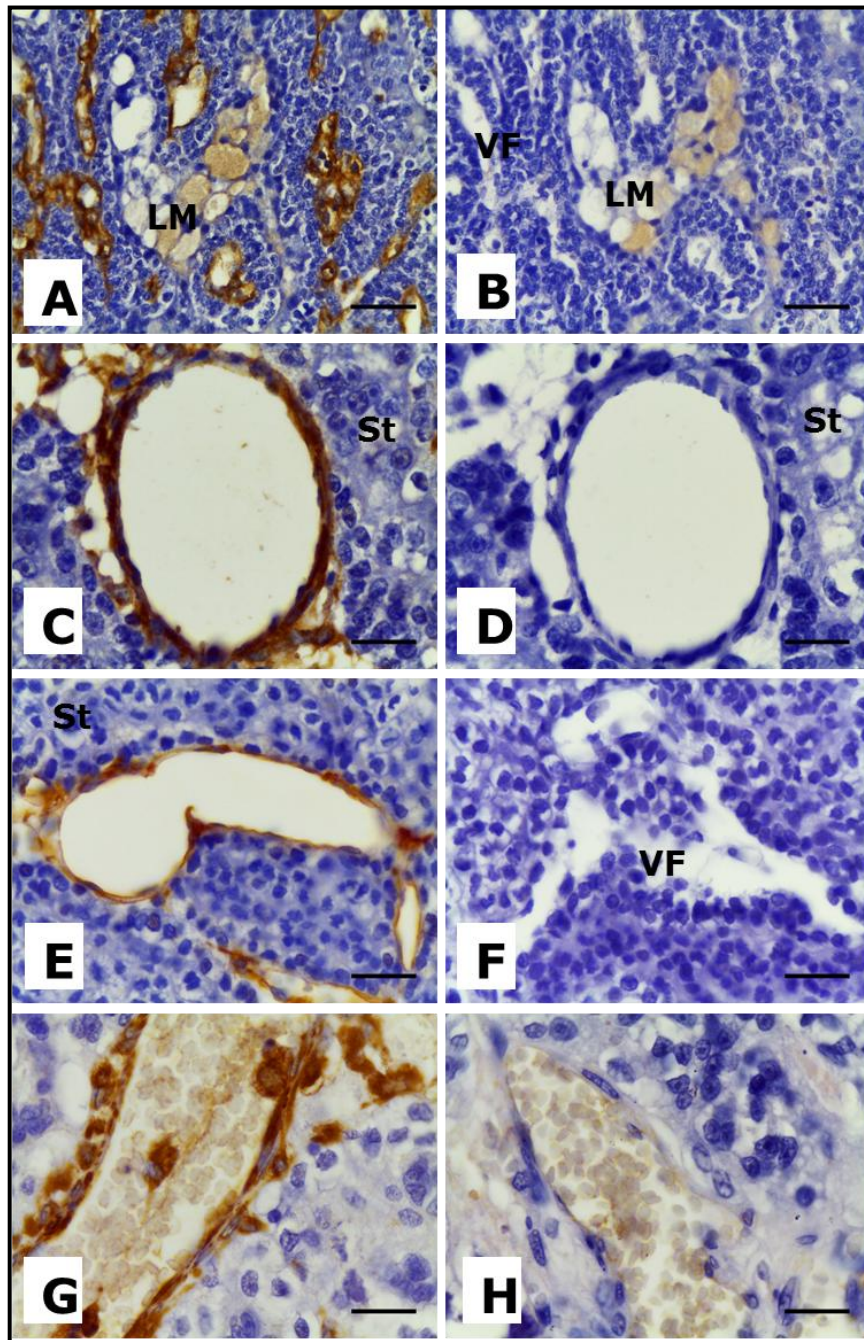


Figura 23: Reação imunohistoquímica à vimentina. Em A: reação positiva na subplacenta aos 23 dias de gestação, notar que o endotélio da rede capilar fetal é bem demarcado neste estágio e caracteriza-se pela proximidade com as lacunas maternas que não são marcados pela reação, e em B, controle negativo para a mesma idade gestacional. Barra 50 μ m. Em C: reação positiva do endotélio fetal aos 30 dias de gestação, notar a grande proximidade entre o vaso fetal e o sincitiotrofoblasto (St) e em D, o controle negativo aos 30 dias de gestação. Barra 20 μ m. Em E: reação positiva aos 45 dias de gestação, observar que nesta fase da gestação a maior parte do tecido nas proximidades do vaso fetal trata-se de sincitiotrofoblasto (St) e em F, o controle negativo para esta fase. Barra, 20 μ m. Em G: observa-se tecido subplacentário aos 55 dias de gestação, a desorganização e deterioração do tecido são evidentes, no entanto, vasos com endotélio intacto e preenchidos por material amorfo podem ser visualizados, e em H, têm-se o controle negativo para esta idade gestacional. Barra, 20 μ m. Fonte Acervo do autor.

Já a reação imunocitoquímica para citoqueratina, que é um filamento intermediário comum a tecidos epiteliais, foi positiva em células presentes na placenta principal e na subplacenta, tanto no citotrofoblasto como no sincíciotrofoblasto, no entanto, o citotrofoblasto marcou-se mais fortemente em comparação ao sincício. Além disto, alguns agregados celulares que estavam localizados no tecido endometrial e nas margens da subplacenta também reagiram positivamente (Figura 24).

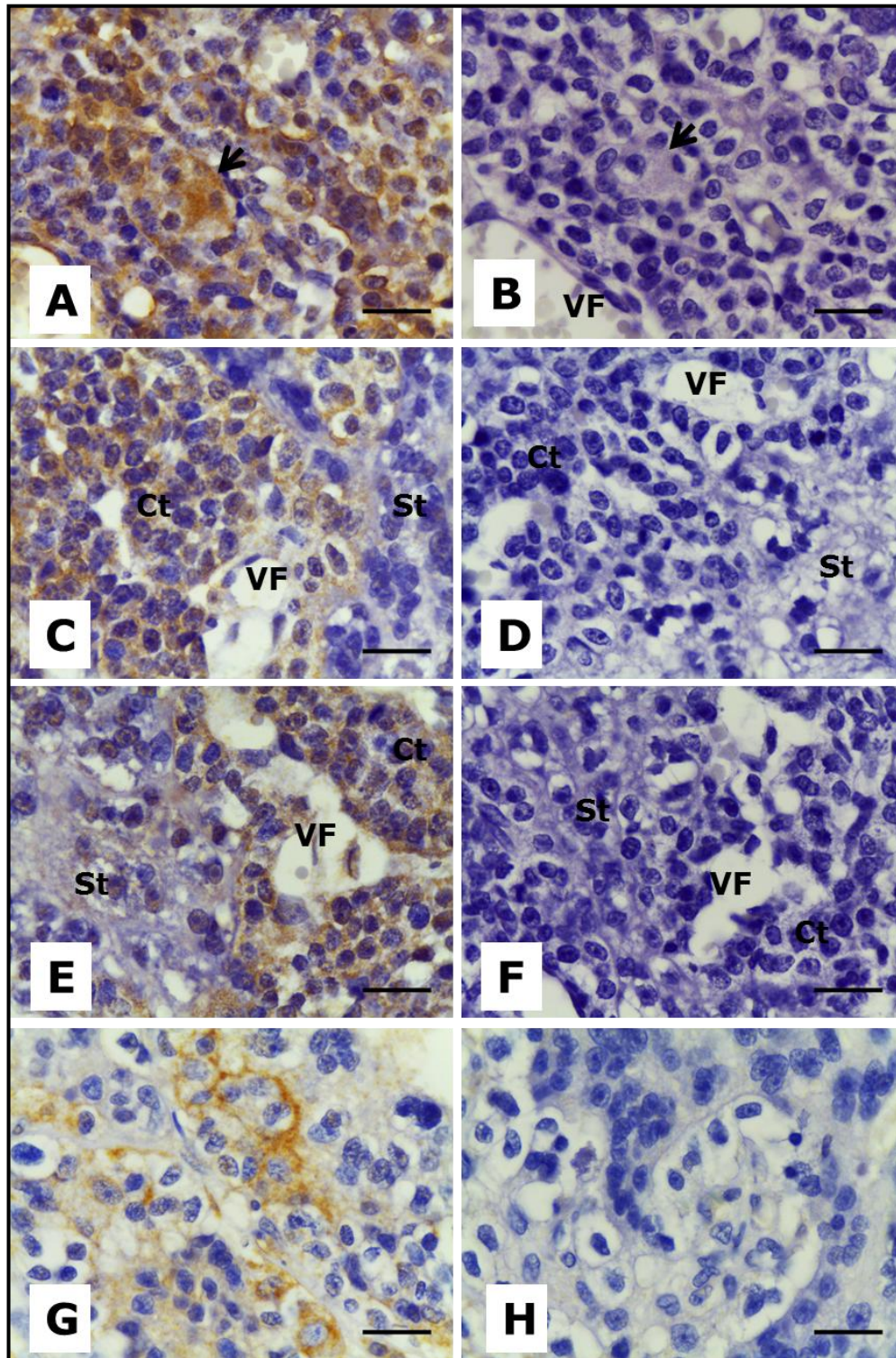


Figura 24 – Reação imunohistoquímica à citoqueratina durante as diferentes idades gestacionais. Em A: observar a reação positiva do citotrofoblasto aos 23 dias de gestação, a presença de células gigantes (→) e um vaso fetal (VF), e em B controle negativo para esta idade. Barra 20 μ m. Em C: notar aos 30 dias de gestação a reação positiva no citotrofoblasto (Ct) e com menor intensidade no sincício (St), e em D, o controle negativo. Barra, 20 μ m. Em E: Reação positiva aos 45 dias de gestação, e em F: controle negativo. Barra, 20 μ m. Em G: reação positiva aos 55 dias de gestação, notar a diminuição da população celular em comparação as outras idades. Em H: controle negativo. Barra, 20 μ m. Fonte: Acervo do autor.

Além da reação positiva do trofoblasto, celular e sincicial, as células gigantes também foram marcadas positivamente, no entanto, com menor intensidade e a reação foi negativa para a massa amorfa que em alguns pontos se projetava no tecido subplacentário. As paredes dos vasos sanguíneos que estavam localizados no endométrio, especialmente próximos a região apical da subplacenta, assim como os aglomerados de células presentes no tecido materno eram compostos por células de origem trofoblástica que também reagem positivamente a reação para citoqueratina (Figura 25).

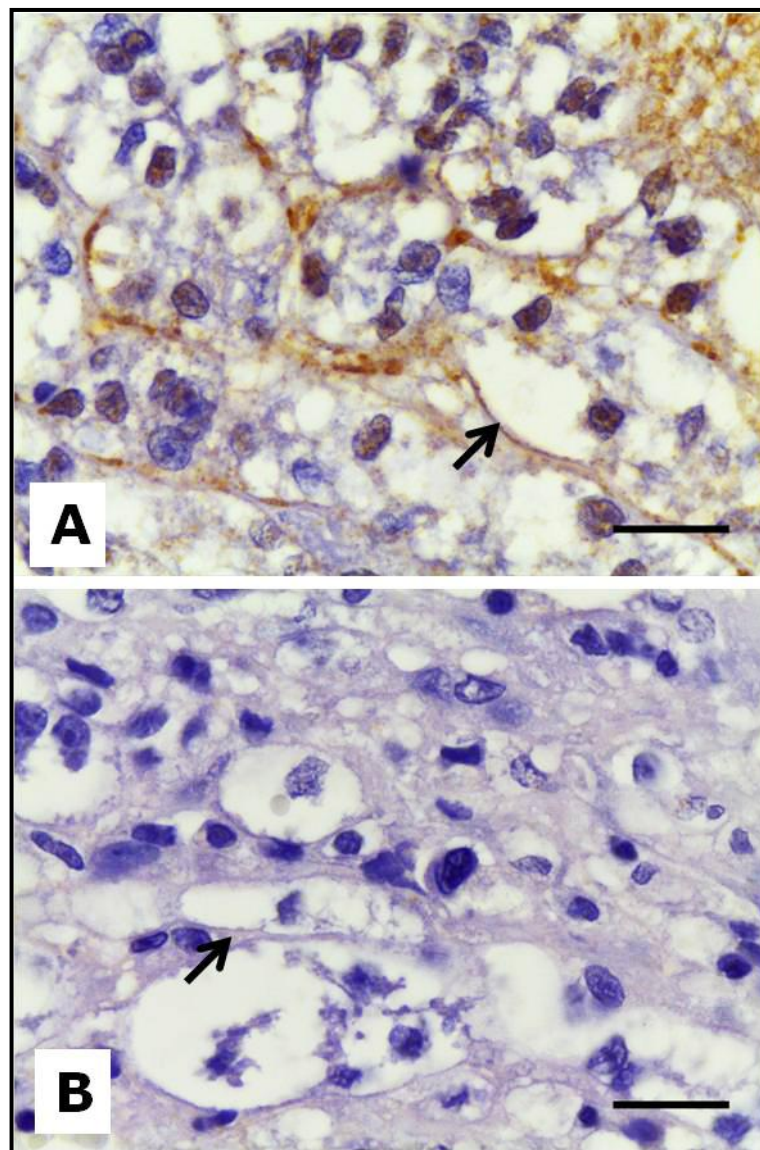


Figura 25: Aglomerado de células de origem trofoblástica presente nas margens subplacentárias aos 30 dias de gestação, ressalta-se também a presença de células trofoblásticas gigantes (→). Em A, reação positiva e em B, controle negativo. Barra, 20 μm. Reação imunohistoquímica a citoqueratina.

Com o avançar da idade gestacional não são visualizadas grandes alterações nos resultados obtidos para a citoqueratina, permanecendo os tecidos trofoblásticos marcando-se positivamente, em especial o citotrofoblasto. Todavia, notou-se que nos períodos mais avançados da gestação a relação entre o tecido trofoblástico e o tecido mesenquimal que não reage a citoqueratina foi alterada sendo que o tecido trofoblástico diminui consideravelmente com a proximidade do final da gestação. Já em relação aos vasos sanguíneos envolvidos por trofoblasto, as células gigantes estiveram mais presentes no início da gestação apresentando um declínio perceptível a partir do trigésimo dia de gestação.

5.4 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISSÃO:

A análise da ultraestrutura da subplacenta permitiu inferir que seu parênquima era composto por dois tipos celulares distintos, o citotrofoblasto e o sinciotrofoblasto, que se encontravam distribuídos em forma de lamelas e em alguns pontos com formações lobulares como o visto na microscopia óptica. As porções centrais das lamelas eram preenchidas por um tecido conjuntivo mesenquimal, que não é bem preservado nesta técnica e possuía poucos indícios de sua matriz extracelular e possui nele vasos sanguíneos de pequeno calibre, representados por capilares e vênulas intactos (Figura 26).

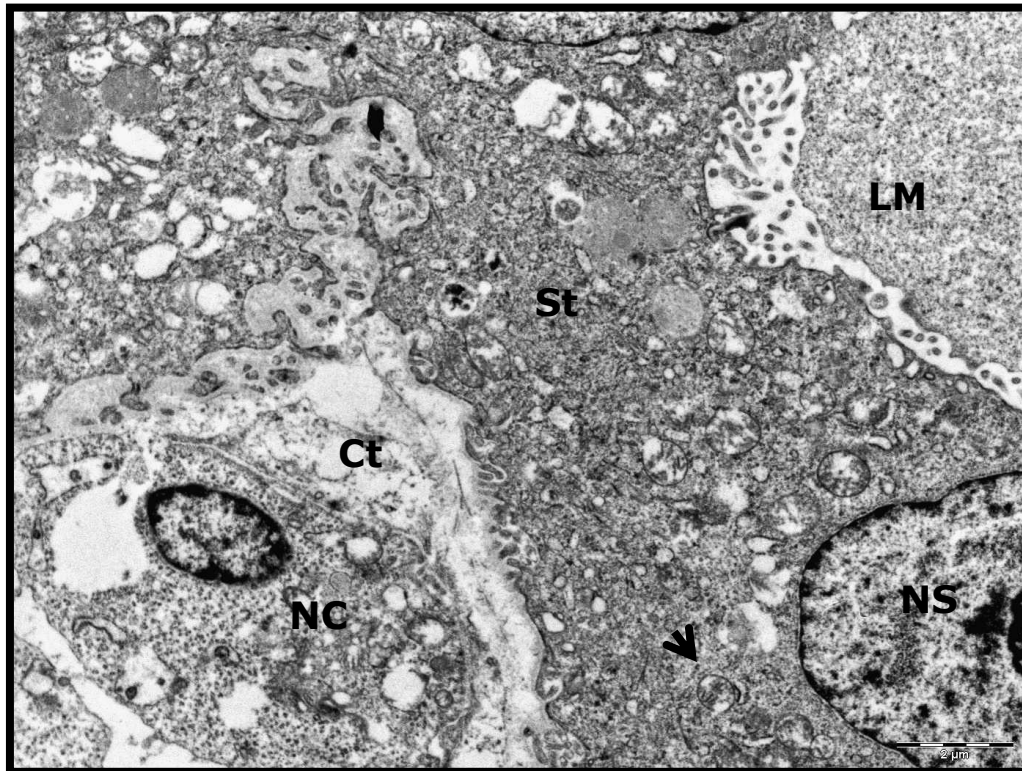


Figura 26: Eletrofotomicrografia do tecido subplacentário. Notar a presença do sinciciotrofoblasto (St) e do citotrofoblasto (Ct) em uma relação de justaposição, a presença de mitocôndrias (→) no sincício, uma lacuna materna e os núcleos de ambos os tipos celulares. Fonte: Acervo do autor.

Dos dois tipos celulares presentes na subplacenta o citotrofoblasto é o que mantém relação mais próxima com o mesênquima, permanecendo sua membrana basal esta em contato direto com este tecido (Figura 27A). As células citotrofoblásticas caracterizam-se por apresentarem um citoplasma finamente granular, contendo poucas mitocôndrias, um retículo endoplasmático rugoso pouco desenvolvido e núcleos com forma variável, cromatina organizada em forma de grumos que se distribuem uniformemente em sua área. O citotrofoblasto apresentava espaços tanto intra com intercelulares e sua relação estrutural com as outras células deste tecido são mantidas por meio de junções do tipo adesiva e desmossomos. Já quanto a sua relação com o sinciciotrofoblasto, pareciam unir-se por justaposição que é em alguns pontos irregular e ainda pode-se observar a presença de projeções do citotrofoblasto em direção ao sincício (figura 27B).

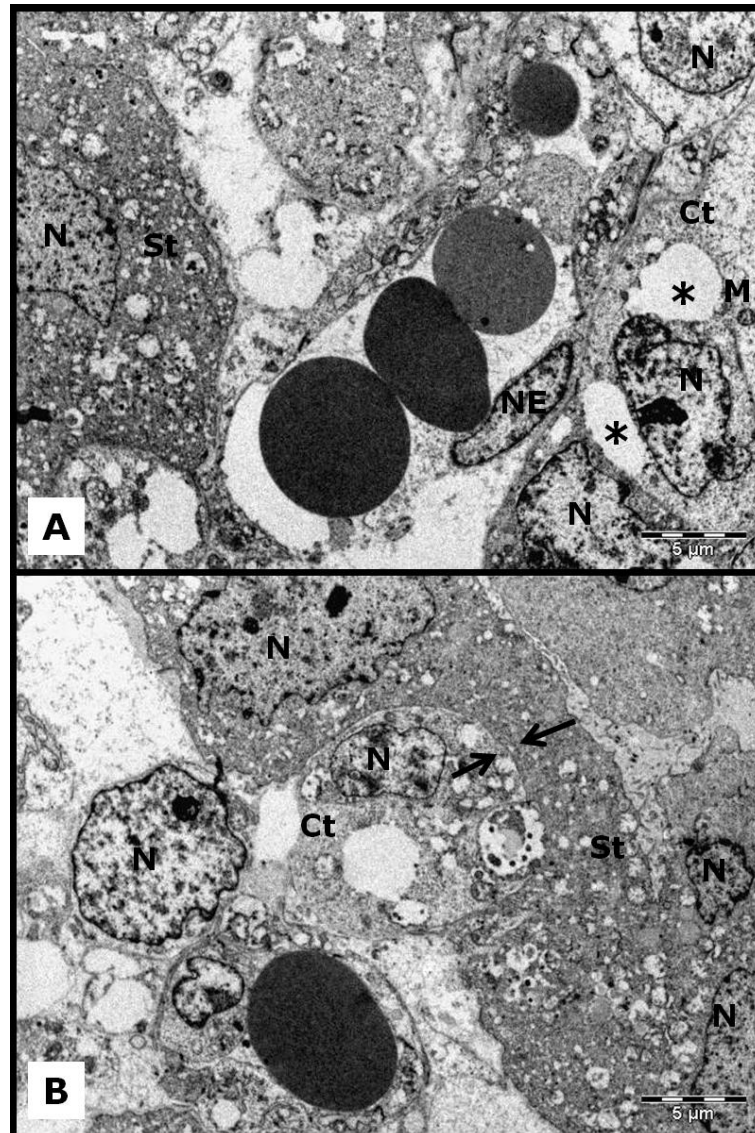


Figura 27 – Eletromicrografia ilustrando a disposição e características do citotrofoblasto (Ct) e sinciotrofoblasto (St). Em A: Observar o citotrofoblasto (Ct) com citoplasma finamente granular, poucas mitocôndrias (M), núcleos (N) com formato variável, cromatina em grumos e espaços intracelulares (*), e o sinciotrofoblasto com citoplasma grosseiramente granular, com vacúolos e mais eletrodenso que o citoplasma citotrofoblástico, notar ainda a presença de um vaso fetal com endotélio intacto, confirmado pela visualização do núcleo endotelial (NE). Em B: Observar a justaposição entre citotrofoblasto (Ct) e sincício (St). Fonte: Acervo do autor.

O sincítotrofoblasto caracterizou-se por ser uma massa celular facilmente identificável situada ao redor das lamelas de citotrofoblasto e constituída por uma grande quantidade de núcleos dispersos em um citoplasma mais eletrodenso que o citoplasma do tecido citotrofoblasto, além de apresentar quantidade considerável de inclusões eletrodensas de forma irregular. Seu citoplasma mostrou-se grosseiramente granular, principalmente quando comparado ao trofoblasto celular e apresentou uma maior quantidade de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, com considerável quantidade de vacúolos. Uma característica marcante presente neste tecido, em especial nas porções que estavam em contato com o tecido materno, foi a presença de projeções que assemelhavam-se a microvilos curtos e dispostos de forma irregular (Figura 28 A e B).

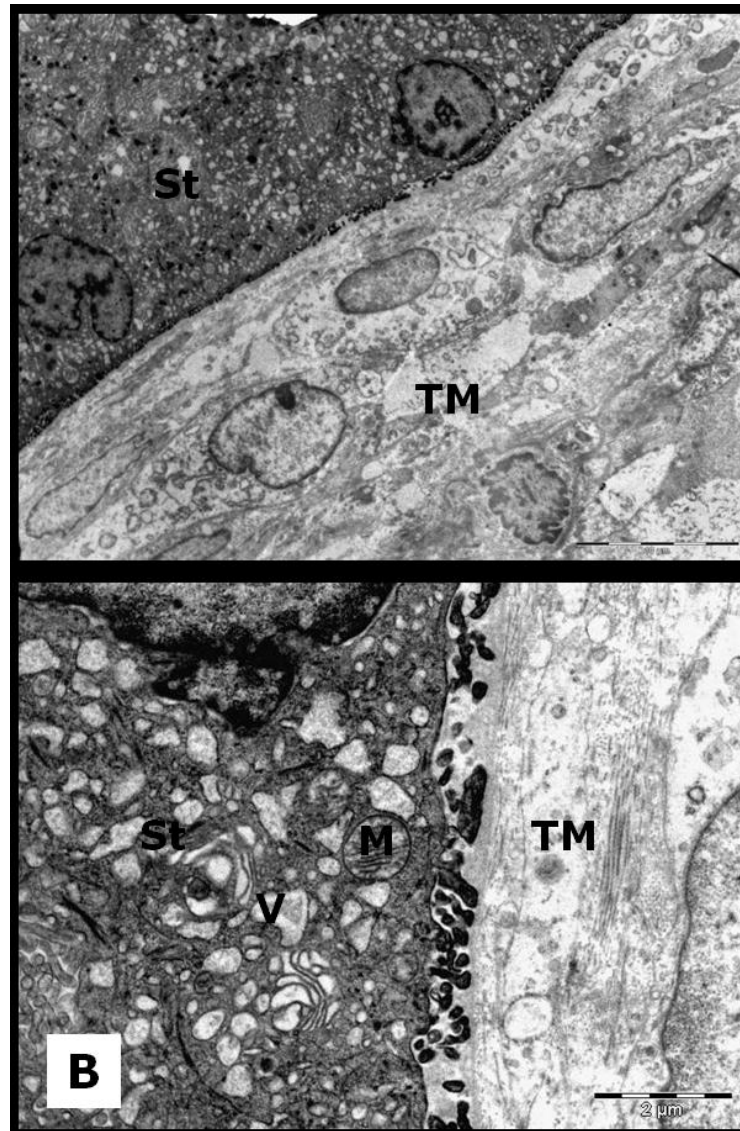


Figura 28 – Relação entre sincíotrofoblasto (St) e tecido materno (TM), ressaltando a presença de vilosidades na região de contato entre as estruturas. Em A, uma visão mais ampla e em B, em maior aumento detalhando as vilosidades, pode-se ainda notar a presença de mitocôndrias (M) e vacúolos (V). Fonte: Acervo do autor.

No sincício foi possível observar, ainda, lacunas de tamanhos diversos, identificadas já na microscopia convencional e, que quando analisadas por meio da microscopia eletrônica foi possível perceber que estas apresentam microvilosidades em sua borda e em seu interior. Neste tecido foi observado um material amorfo com diferentes eletrodensidades que preenchia estas lacunas. E sincíotrofoblasto que envolvia de forma mais íntima estas lacunas, estavam presentes gotículas de eletrodensidade média que pareciam direcionar-se à luz das lacunas (Figura 29).

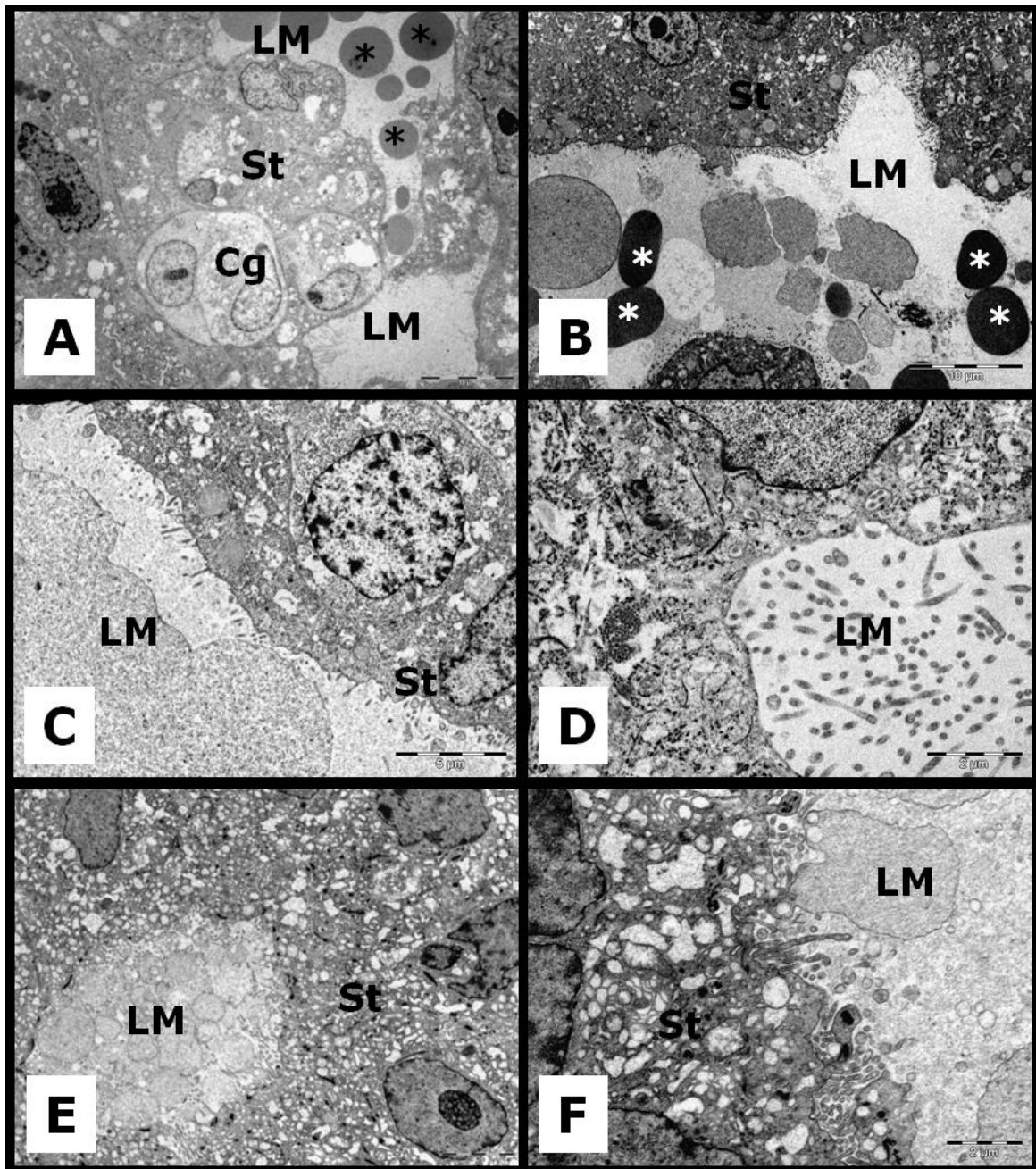


Figura 29 – Fotomicrografias de lacunas maternas nas diferentes idades gestacionais. Em A: Observar a presença de duas lacunas aos 15 dias de gestação, nas quais pode-se observar a presença de vilosidades consideravelmente alongadas e hemácias em sua luz, a lacuna é envolta por sincício (St) e visualiza-se células trofoblásticas gigantes (Cg). Em B: Aos 23 dias de gestação as lacunas mantém sua conformação, no entanto, as vilosidades aparecem menos alongadas, nota-se em seu interior a presença de material amorfo de diferentes densidades e hemácias (*). Em C: Lacuna materna aos 30 dias de gestação, observar a diminuição das vilosidades em sua luz e a presença de material amorfo de diferente aspecto, quando comparado as idade anteriores, em sua luz. Em D: notar a evidente degeneração das vilosidades aos 45 dias de gestação. Em E e F: exemplares aos 53 e 55 dias de gestação, respectivamente, é possível observar as lacunas preenchidas somente por material amorfo e a ausências das vilosidades. Fonte: Acervo do autor.

Especialmente na região de contato entre a subplacenta e o tecido endometrial, está presente, ainda na região de sinciotrofoblasto, uma população de células, também de origem trofoblástica, que possui características morfológicas distintas do que observa-se comumente neste órgão. Trata-se de células que se apresentam multinucleadas, em grande parte binucleadas, com a cromatina organizada no formato de grumos dispersos uniformemente, seus formatos apresentam-se variáveis e nota-se um espessamento na parede citoplasmática provavelmente devido ao agrupamento de feixes de filamento intermediário, como demonstrado pelas reações de imunohistoquímica. E à medida que estas células adentram ao tecido materno e se afastam do tecido fetal, observou-se que elas tornavam-se maiores, seu citoplasma continha uma quantidade considerável de grânulos, além de grandes espaços vazios, denominadas de células trofoblásticas gigantes (Figura 30).

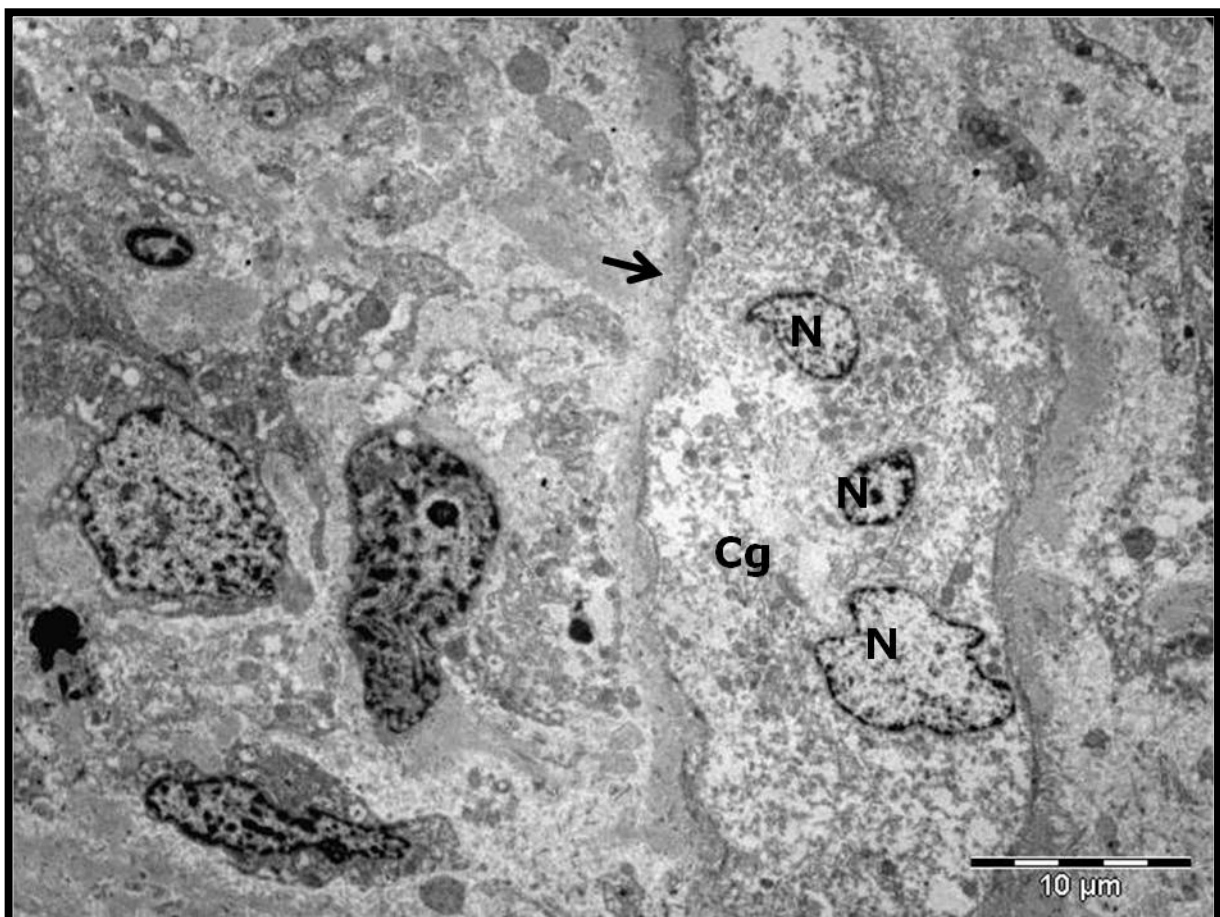


Figura 30 – Eletrofotomicrografia de uma célula trofoblástica gigante (Cg), caracterizada por apresentar multinucleações (N), cromatina dispenda e espessamento da membrana citoplasmática indicado pela seta (→). Fonte acervo do autor.

Ao analisar a ultraestrutura da subplacenta nas diferentes idades gestacionais nota-se que aos 15 dias a subplacenta apresenta um sinciciotrofoblasto já bastante vacuolado, sendo em sua maioria, vacúolos de pequeno diâmetro (Figura 31A). Apresentam formações circulares de baixa eletrodensidade principalmente nas proximidades das lacunas e núcleos com heterocromatina organizada em grumos que se distribuía por toda a sua extensão (Figura 31B), a presença de células trofoblásticas gigantes próximas a vasos endometriais com endotélio ainda intacto foi repetidamente observada (Figura 31C), assim como, lacunas com o revestimento endotelial substituído por um de origem trofoblástica também eram observadas e uma característica marcante era a presença de projeções vilosas do sinciciotrofoblasto em direção à sua luz e, além disto, estas projeções se notabilizavam por serem bastante delgadas e alongadas (Figura 29A).

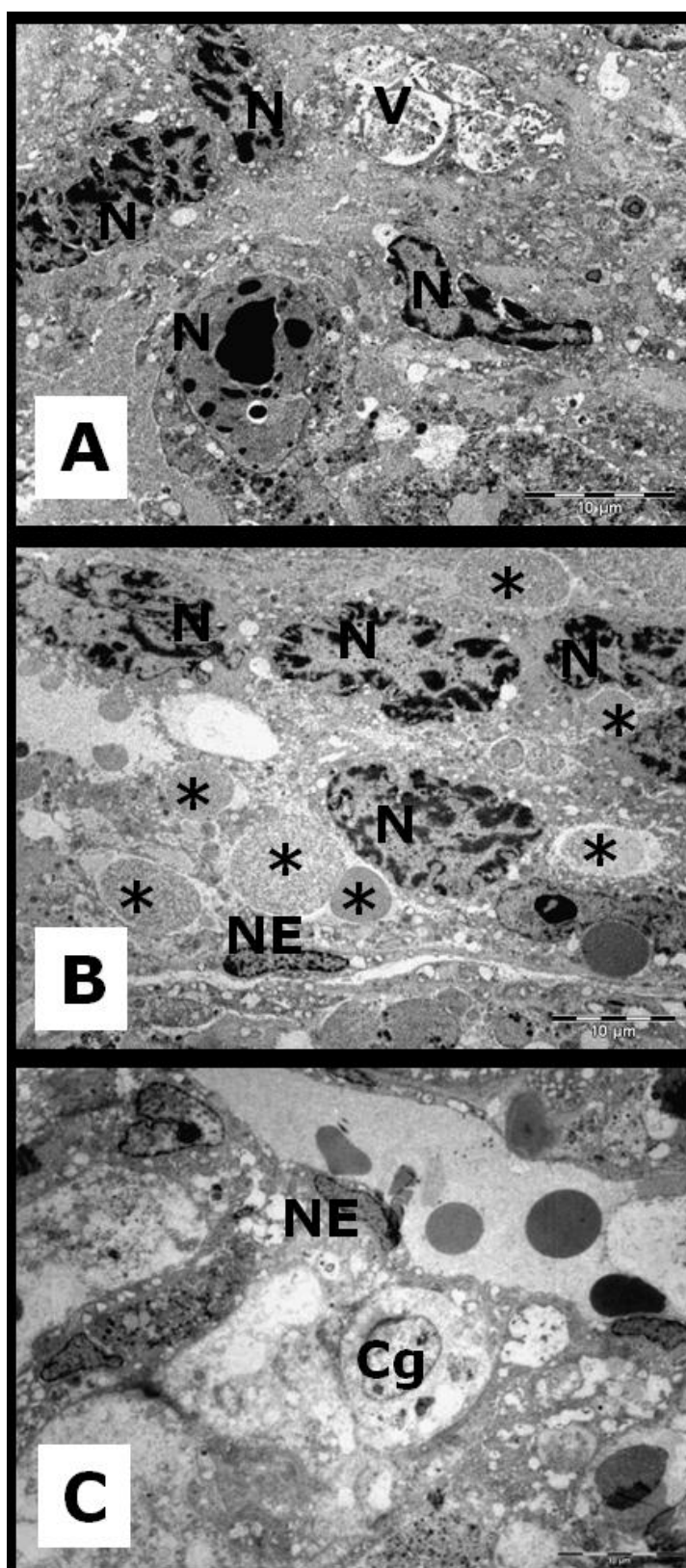


Figura 31 – Características ultraestruturais da subplacenta aos 15 dias de gestação. Em A: observar a presença de vacúolos (V) no sincício. Em B: é possível visualizar formações circulares de baixa eletrodensidade marcadas com asterisco (*). E em C: nota-se uma célula trofoblástica gigante (Cg) aproximando-se de um vaso com endotélio intacto, evidenciado pela presença do núcleo (NE). Fonte: Acervo do autor.

Aos 23 dias de gestação as características morfológicas do sinciciotrofoblasto mantiveram-se inalteradas, no entanto, as lacunas presentes nele apresentaram microvilosidades menos alongadas em relação à idade anterior (Figura 29B). Outra característica marcante nesta idade foi a presença de células trofoblásticas gigantes com diâmetro consideravelmente maior quando comparadas ao estágio anteriormente analisado e as multinucleações tornaram-se muito mais frequentes, sendo as binucleações e as trinucleações as mais comumente observadas (Figura 30).

A partir do trigésimo dia de gestação, como no visto na microscopia convencional, a subplacenta encontra-se completamente desenvolvida e com sua conformação característica. Ultraestruturalmente é nesta idade gestacional onde melhor são observadas as características morfológicas deste órgão, neste ponto a relação entre o citotrofoblasto e sincício é bem evidente, vasos fetais estão presentes no mesenquima fetal que esteve comumente envolto por camadas citotrofoblásticas, porém, em várias situações pode-se notar uma grande proximidade destas estruturas com o sinciciotrofoblasto (Figura 27A). O citotrofoblasto apresentou espaços tanto inter como intracelulares, os núcleos do sincício foram observados em formações aglomeradas com uma maior frequência do que o ocorrido nas idades anteriores e a cromatina mostrava-se comumente organizada em forma de nucléolo (Figura 32A). As lacunas permaneciam presentes e continham, além de poucas hemácias, um material amorfo com eletrodensidade variável, as vilosidades eram menos alongadas e um pouco mais espessas quando comparadas a idades anteriores (Figura 29C) e o sincício periférico apresentava uma grande quantidade gotículas que ocorriam ao redor de toda a lacuna (Figura 32B).

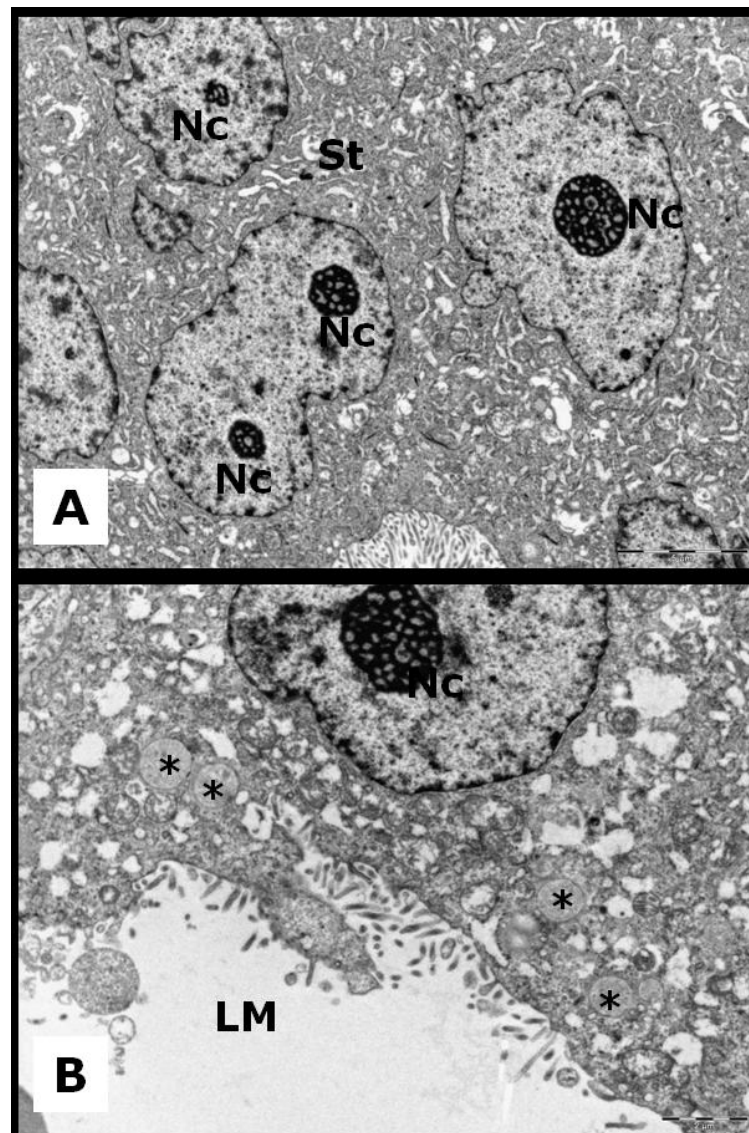


Figura 32 – Características notáveis da subplacenta aos 30 dias de gestação. Em A: notar a organização da da cromatina dos núcleos sinciciais (St) em nucléolo (Nc). E em B observar a formação de gotículas de baixa eletrodensidade no sincício que margeia as lacunas maternas. Fonte: acervo do autor.

Aos 45 dias de gestação já era possível notar os sinais de degeneração do tecido subplacentário, o citotrofoblasto esteve reduzido a poucas camadas e em alguns pontos mostrava sinais de desorganização, como o espaçamento entre suas células (Figura 33A). No sincício observou-se que os núcleos tinham tendência em formar aglomerados com um elevado grau de proximidade entre eles se comparado ao ocorrido no trigésimo dia de gestação e seu nucléolo era evidente (Figura 33A), as lacunas agora tornaram-se grandes

espaços que apresentavam gotículas de origem desconhecida em sua luz (Figura 33B), o citoplasma sincicial apresentava uma grande quantidade de inclusões eletrodensas, além de formações com elevada eletrodensidade nas proximidades dos núcleos (Figura 33A), outra característica facilmente notada era a diminuição na quantidade de organelas, no entanto a justa posição entre o cito e o sinciciotrofoblasto é mantida (Figura 33C). Por fim nos pontos onde o sinciciotrofoblasto e o tecido materno tocavam-se foi observado que os espaços anteriormente preenchidos projeções do sincício continham agora somente detritos destas projeções (Figura 33D).

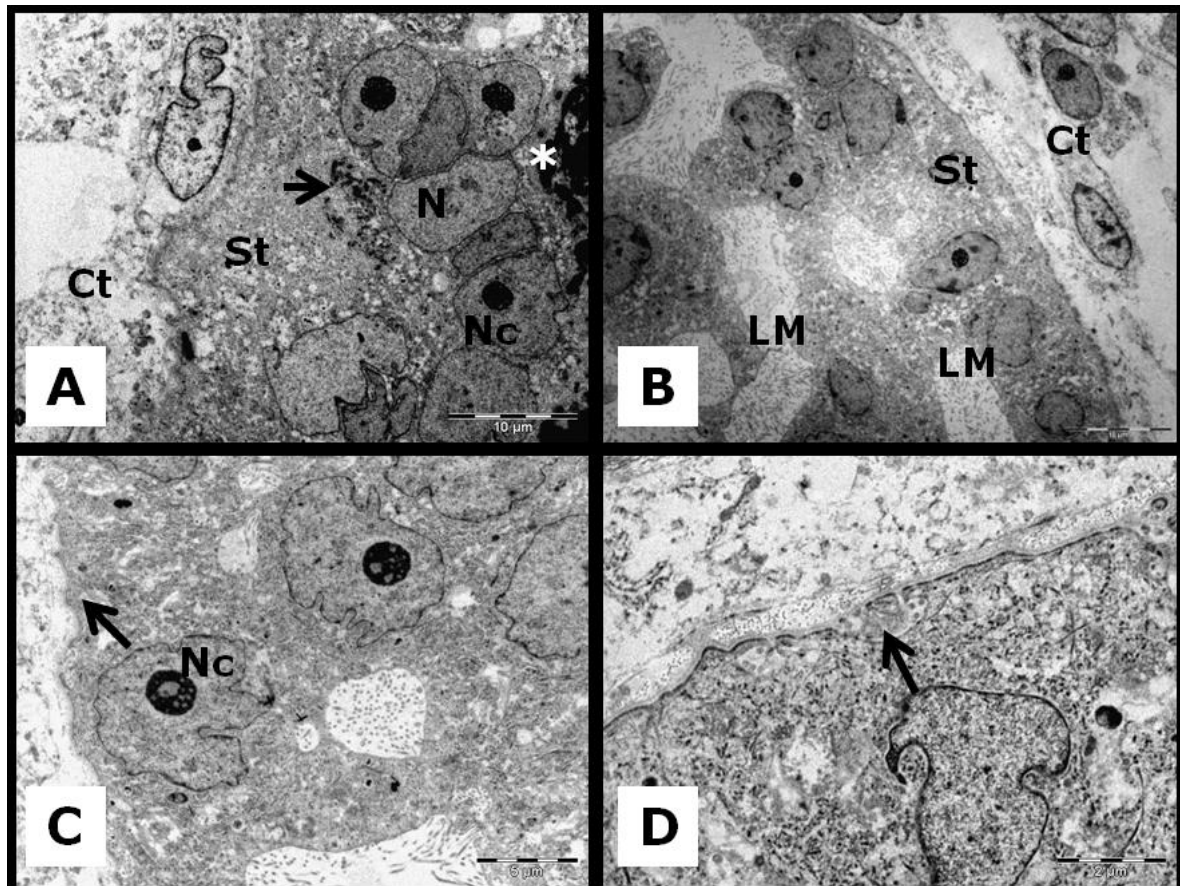


Figura 33 – Ilustração da ultraestrutura da subplacenta do preá aos 45 dias de gestação. Em A: Observar o espaçamento entre as células citotrofoblásticas (Ct), núcleos (N) do sincício (St) bastante aglomerados, inclusões eletrodensas (→) e formações de elevada densidade (*). Em B: perceber que as lacunas maternas (LM) são apenas resquícios e a apresentam gotículas em sua luz. Em C: notar a organização característica do nucléolo (Nc) e a justaposição do citotrofoblasto ao sinciciotrofoblasto (→). Em D: Verificar que nos espaços (→) onde antes havia projeções do sinciciotrofoblasto há agora apenas resquícios destas. Fonte: Acervo do autor.

Com a gestação chegando ao termo, neste caso entre os dias 53 e 55 da gestação, a degeneração do tecido subplacentário encontrava-se extremamente avançada, onde grande parte da subplacenta já havia desaparecido e a maior parte de seu tecido restante era composto por detritos celulares. O citotrofoblasto era constituído por monocamadas e muitas vezes apresentavam-se descontinuadas, no sincício eram observados uma grande quantidade de vacúolos que apresentavam material amorfo e de baixa eletrodensidade (Figura 34 A). os núcleos permaneciam aglomerados e apresentaram uma característica organização circular (Figura 34 A e B), além disso podia-se observar uma grande quantidade de restos celulares e sinais de apoptose por toda a extensão do tecido subplacentário (Figura 34 C e D).

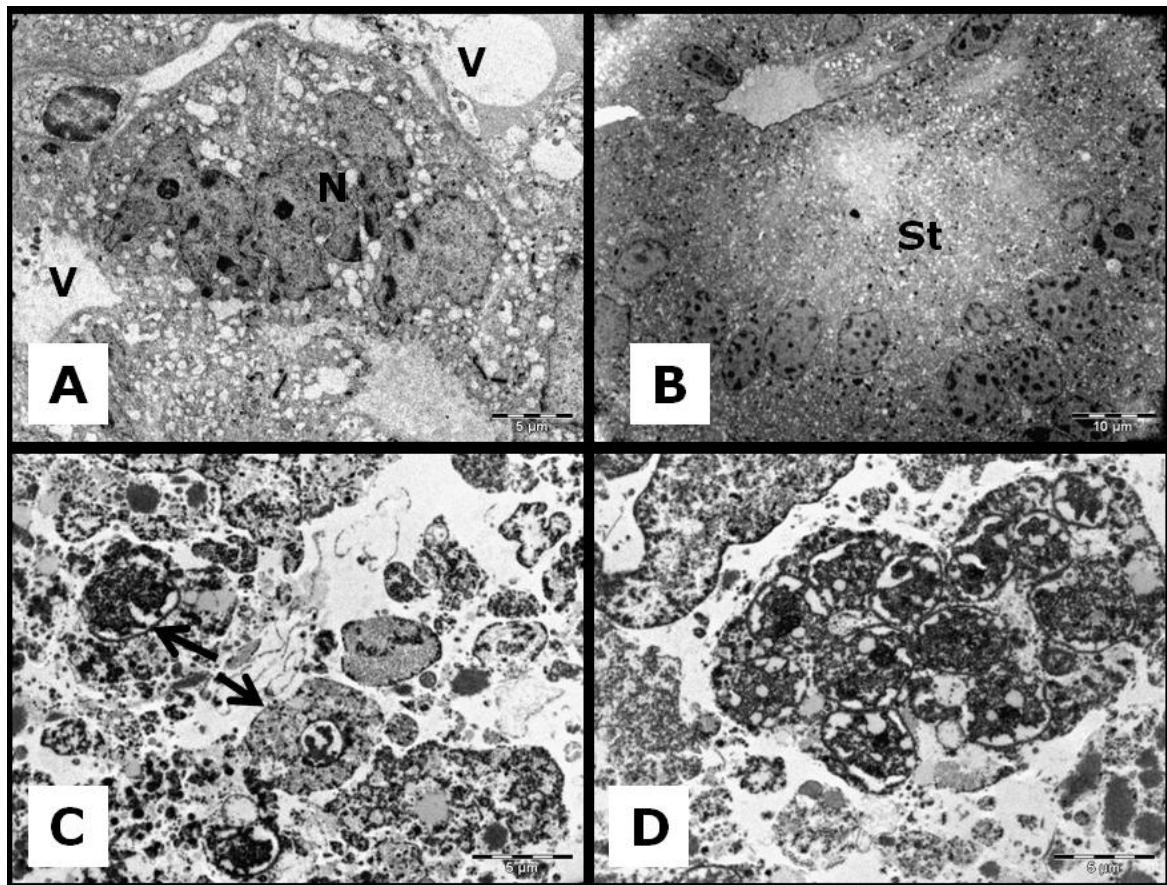


Figura 34 – Ilustração da ultraestrutura da subplacenta do preá no final da gestação. Em A: observar uma ilha de sinciotrofoblasto com seus núcleos (N) aglomerados e rodeada por tecido em degeneração com vacúolos (V). Em B: perceber que os núcleos do sinciotrofoblasto (St) organizam-se concentricamente, esta configuração foi observada em várias ocasiões onde ainda havia sincício intacto. Em C e D: notar o avançado grau de degeneração do tecido subplacentário evidenciado principalmente pelos sinais de morte celular (→). Fonte: Acervo do autor.

6. DISCUSSÃO:

A utilização de animais na pesquisa, principalmente como modelo experimental, é uma prática comum no meio científico e a maioria das espécies utilizadas, são de animais domesticados e de médio à grande porte, como os ovinos no estudo da fisiologia fetal. Todavia, as implicações éticas tendem a aumentar com o tamanho dos animais e são ainda mais ríspidas quando envolvem cães, gatos e animais de casco. Dessa maneira, os roedores surgem como uma alternativa viável que trazem consigo grandes vantagens para o desenvolvimento de pesquisas, como curtos períodos de gestação, grandes ninhadas e pequeno porte, o que os tornam animais de fácil manejo e acomodação, além de diminuir os custos para a pesquisa segundo descreve Carter (2007).

Os roedores possuem, também, como aspecto positivo a extraordinária capacidade de adaptação ecológica aos diversos tipos de ambientes e climas (BRASIL, 2002), associado a características reprodutivas que facilitam as pesquisas científicas no tocante a placentação. Estas características determinaram a escolha do preá como unidade experimental para o presente trabalho bem como pela escassa literatura científica acerca da utilização deste animal em pesquisas de placentação.

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; CARTER et al., 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).

Além disto, 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).

Dentre os roedores, a subordem histricomorfa é a que apresenta as maiores diversidades morfológicas e ecológicas, já que os indivíduos que a compõem, distribuem-se em praticamente toda a América do Sul e ocupam os mais diversos habitats, indo desde

animais semifossoriais até espécies de comportamento arbóreo (LARA, et al., 1996). Estes animais caracterizam-se, também, por possuírem sob sua estrutura placentária típica, um órgão exclusivo, denominado subplacenta (MESS, 2003; RODRIGUES et al., 2006).

A subplacenta, além de sua importância como estrutura placentária utilizada para estudos relacionados à evolução dos histricomorfos (MESS, 2007) é vista como fonte de trofoblasto para o desenvolvimento da placenta neste grupo de roedores, assim como, é ponto de origem de células que atuam no processo de invasão trofoblástica que ocorrem após a implantação. Dessa forma, Mess et al (2007), concluíram que os processos de invasão trofoblástica dos roedores desta subordem exibem grandes semelhanças ao ocorrido nos seres humanos e constituem-se como modelos experimentais adequados para o estudo deste fenômeno.

Sendo assim este órgão assume um papel de grande importância na placentação dos histricomorfos tanto no que confere a sua filogenia quanto em seus aspectos fisiológicos. Desta maneira, descrições morfofisiológicas tornam-se importantes para o melhor entendimento dos processos acerca do desenvolvimento deste órgão, em especial, para espécies como o preá que é um roedor de pequeno porte, facilmente adaptável ao cativeiro e de fácil manejo, podendo consequentemente ser utilizado como modelo animal para estudos com os anexos fetais e outros tipos de experimentos como reprodução animal, entre outros.

6.1 DESCRIÇÃO GERAL DO ÚTERO GRAVÍDICO E DOS ANEXOS FETAIS DO PREÁ

Em diferentes famílias e espécies de roedores os órgãos envolvidos no processo de placentação podem assumir comportamentos morfofuncionais que podem influenciar diretamente nas características morfofisiológicas da subplacenta. Dessa feita, optou-se por abordar, de forma sucinta, as características, especialmente macroscópicas do útero e dos principais anexos fetais presentes durante a gestação do preá.

O útero do preá mostrou-se como uma estrutura bicornual, com cornos longos e delgados, que confluíam em direção a um corpo curto que terminava em uma cérvix espessa. A medida em que a gestação evoluía, o útero moldava-se ao feto e tornava-se possível visualizar com clareza, em seu interior, o feto e a placenta, preenchendo toda sua luz. Estes

dados corroboram com o que descreve Egund e Carter (1974) ao caracterizarem o útero do porquinho da índia por meio de método angiográfico, assim como ao relatado por Oliveira (2004) descrevendo as características morfológicas do útero do mocó, em estudo acerca da placentação da espécie.

Quando removia-se as paredes uterinas percebia-se que a placenta era caracteristicamente discoidal e em sua porção voltada para o lado fetal sustentava o saco vitelino visceral e em um plano mais profundo observava-se o feto revestido pela membrana amniótica. Estas características são observadas de maneira semelhante por Oliveira (2004) descrevendo a placentação do mocó. Além disto, a característica discoidal da placenta assim como a presença do saco vitelino envolvendo o feto até o final da gestação é comum aos roedores (FERRAZ, 2001; OLIVEIRA et al, 2008; CONCEIÇÃO et al. 2008)

6.2 CARACTERIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO SUBPLACENTÁRIO

Em relação à subplacenta, esta se caracteriza por ser uma estrutura que surge a partir da diferenciação do citotrofoblasto e encontra-se encravada entre o tecido materno e a placenta principal em íntimo contato durante a gestação. Tal aspecto é evidente em outros roedores pertencentes a este grupo, por exemplo, Davies, Dempsey e Amoroso (1961a) descrevem a presença desta estrutura no porquinho da índia desde os períodos iniciais da gestação até próximo ao final. Mais recentemente, no mocó (OLIVEIRA, 2004), na paca (BONATELLI, 2005), na cutia (RODRIGUES et al. 2006) no *Octodon degus* e no *Petromus typicus* (MESS, 2007), na capivara (KANASHIRO et al; 2009), assim como no punaré (Oliveira et al. 2012) foi relatada a presença desta estrutura em pesquisas referentes ao modelo de placentação de histicomorfos.

Macroscopicamente a subplacenta pôde ser visualizada após secção transversal do disco placentário, localizada entre a placenta e a decídua basal e caracteriza-se por apresentar uma coloração, mais esbranquiçada, que a verificada na placenta principal. Destaca-se que a subplacenta pôde ser visualizada durante a maior parte da gestação, no entanto, sua melhor apresentação se dá no terço médio da gestação. Estas características são confirmadas por

Rodrigues et al (2006) descrevendo a subplacenta da cutia como uma região que se diferencia da placenta principal por sua coloração mais clara e forma que lembra um cálice.

Este órgão, específico dos histricimorfos, vem exercendo papel fundamental na discussão acerca da filogenia destes animais em relação a seus análogos africanos, pois a maioria dos estudos que buscam a elucidação deste problema levam em conta caracteres placentários sinapomórficos, que neste grupo de roedores, estão ligados a subplacenta (HUCHON; DOUZERY, 2001; HUCHON ET al. 2002; MESS, 2007). Além disto, os histricimorfos são roedores extremamente adaptados ao ecossistema brasileiro e de grande importância biológica em seus habitats, dessa maneira o conhecimento sobre sua biologia reprodutiva é de fundamental importância para geração de novos modelos animais, para que se esclareçam questões que envolvem sua própria biodiversidade e biologia da reprodução.

Dessa maneira O entendimento da organização estrutural dos anexos placentários, em especial a subplacenta, é de grande importância neste grupo de animais. Ademais, a compreensão a respeito do desenvolvimento dessas estrutura durante o período gestacional pode esclarecer importantes questões. Neste contexto Mess (2007) após descrever a subplacenta do degu e do *petromus* conclui que a subplacenta é homóloga a de outros roedores histricimorfos estudados, confirmando a homogeneidade destes animais. Para isto a autora comparou a semelhança de dezenove caracteres e somente o correspondente à presença ou ausência deste órgão ao termo da gestação não foi possível de se confirmar, devido à escassez de dados nesta fase da gestação. Dessa forma, considerando a semelhança nas outras dezoito características a autora afirma que a subplacenta surgiu antes da separação dos continentes, África e América do sul.

Outro aspecto que aumenta a importância do estudo da placentação dos histricimorfos é a grande similaridade entre este processo nestes animais e no ser humano, Bosco et al (2007) destacaram que o modelo de placentação do degu é ideal para estudos comparativos da placentação humana, assim como, afirmaram que processos patológicos da gravidez inicial relacionados a migração do trofoblasto extraviloso, por exemplo na pré-eclampsia, podem ser pesquisados utilizado-se como modelo experimental o degu. Do mesmo modo, Oliveira et al (2008) relatam que o modelo de placentação do preá possui grandes semelhanças com o de outros caviomorfos e, assim como no degu, este animal apresenta-se como um ótimo modelo para estudos com placentação humana, principalmente devido as semelhanças nos processos de invasão trofoblástica e de expansão destas células.

Neste cenário, onde o estudo deste órgão comum aos histricomorfos assume tal importância, Davies, Dempsey e Amoroso (1961a) relataram que na parede da escavação central, por volta do 16º dia de gestação do porquinho da Índia, há duas regiões distintas, uma superior constituída por um sincício grosseiro característico da placenta corioalantóide e uma inferior que representava a subplacenta. Para os autores este órgão diferencia-se da placenta principal pela espessura e dobras da camada citotrofoblástica, pela vacuolação do sincício e pelo grande número de excrescências invasivas. Células gigantes e endoderma parietal estavam presentes na borda da subplacenta. As células gigantes surgiam por diferenciação do sincício marginal e seus núcleos apresentavam-se grandes e com cromatina grosseira e o citoplasma era constituído por uma zona perinuclear basofílica e uma zona periférica acidofíla.

Os resultados obtidos para o preá aos 15 dias de gestação assemelham-se ao relatado no parágrafo anterior, onde a subplacenta trata-se de uma monocamada dobrada e com sincício vacuolado. Ressalta-se que podiam ser observadas figuras de mitose na região próxima à camada citotrofoblástica, concordando com o descrito por Bonatelli et al (2005) descrevendo a placentação da paca e por Mess (2007) descrevendo a subplacenta do degu, onde a autora caracteriza a cromatina das células neste estágio como dispersa. Evidencia-se também a presença de vasos maternos com o endotélio destruído e com revestimento trofoblástico concordando com o descrito por Kanashiro et al (2009) estudando o crescimento e desenvolvimento da placenta da capivara e por Oliveira et al (2012) descrevendo a subplacenta do punaré em estudo acerca da placentação desta espécie.

De acordo Bosco et al (2007) estudando a placentação do degu, a partir do tecido subplacentário surge um grupo celular denominado trofoblasto extrasubplacentário que emerge da subplacenta e marcham em direção a decídua atuando nos processos de invasão da mesma forma que o trofoblasto extraviloso age nos humanos. Estas células são para Mess (2007) estudando a subplacenta da mesma espécie, excrescências sinciciais ou células trofoblásticas gigantes que surgem a partir da subplacenta. Além disto para Carter e Mess (2013) discutindo acerca da evolução da placentação nos roedores caviomorfos, o processo invasivo no início da placentação destes animais se dá por células trofoblásticas invasivas oriundas da subplacenta.

No preá aos 15 dias de gestação observou-se que a medida que o sincício afastava-se da camada citotrofoblástica porções de sinciciotrofoblasto confluíam em direção ao tecido

materno e podiam ser visualizada células trofoblásticas gigantes. Esta condição foi relatada por Oliveira et al (2008) estudando a placentação do preá, ressaltando que estas células estão presentes principalmente no início da gestação sendo raras próximo ao fim. Com o observado pode-se dizer que estes grupos celulares participam ativamente nos processos de invasão e estabelecimento da placentação do preá.

Segundo a descrição de Mess (2007) para a subplacenta do degu no início da gestação, esta se trata principalmente de trofoblasto de natureza celular e que se caracteriza por apresentar núcleos grandes e com cromatina dispersa. E para Rodrigues et al (2006) estas células possuem citoplasma basófilo e repousam em membrana basal. Estas descrições condizem com o observado neste estudo, no entanto, deve-se ressaltar que no preá notou-se que as células eram cubicas e organizavam-se de forma pseudoestratificada.

Nesta fase da gestação, o sincício que estava nas proximidades do citotrofoblasto apresentou-se vacuolado e com presença de vasos de origem materna com endotélio destruído, assim como o descrito por Mess (2007). Ademais, os resultados concordaram com o relatado por Rodrigues et al (2006) na subplacenta da cutia, que apresenta um sinciciotrofoblasto com citoplasma eosinofílico e com núcleos irregulares, todavia, no preá aos 15 dias de gestação a maioria dos núcleos eram arredondados.

Tratando-se da subplacenta aos 23 dias de gestação, Mess (2007) descreve este órgão no degu em um estagio análogo da gestação como uma forma mais complexa de dobras de trofoblasto que está presente na face materna da escavação central, representando um estágio de desenvolvimento mais avançado da subplacenta, no entanto está permanecia como uma estrutura continua à placenta principal. Este órgão representa, para a autora, a ponta da lança do disco placentário triangular, que caminha em direção à zona de juncional. A subplacenta subdivide-se em lóbulos que possuem citotrofoblasto proeminente e constituído por multicamadas, enquanto que o sincício está diretamente relacionado aos canais de sangue materno.

No preá a subplacenta comportou-se de forma semelhante ao exposto no paragrafo acima. Todavia, não foi observou-se continuidade entre o tecido placentário e o subplacentário. Assim como divergiram do relatado por Davies, Dempsey e Amoroso (1961a), descrevendo a subplacenta do porquinho da Índia em idade gestacional análoga a esta, onde os autores destacam a grande quantidade de vacúolos presentes no sincício e a diminuição da característica invasiva da subplacenta. No entanto, Oliveira et al (2012)

realatam que em uma fase de gestação que pode ser comparada aos 23 dias de gestação no preá, a subplacenta era um órgão distinto e proeminente, assim como o observado neste estudo.

Para Davies, Dempsey e Amoroso (1961a), Mess (2007) e Oliveira et al (2012), o citotrofoblasto nesta fase da gestação caracteriza-se por apresentar um número considerável de camadas e apresentar-se com uma grande quantidade de dobras. No preá estas células organizaram-se em camadas, no entanto, estas estavam dispostas de forma concêntrica que eram envolvidas por células que pareciam estar em transição e uma tênue membrana basal.

A quantidade de sinciotrofoblasto em relação ao citotrofoblasto nesta fase da gestação é bastante discreta e esta intimamente ligada às regiões onde ocorrem lacunas com sangue materno, onde estas células organizam-se em agregados filiformes (MESS, 2007; OLIVEIRA et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2012). Esta organização do sinciotrofoblasto é condizente com o que ocorre no preá nesta fase da gestação.

Para Davies, Dempsey e amoroso (1961) o caráter invasivo do tecido subplacentário começa a diminuir neste período que para ele vai até os 25 dias de gestação no porquinho da Índia, enquanto que para Mess (2007) tanto células trofoblásticas gigantes como sincício invasivo ainda estão presentes nesta fase. No preá as células trofoblásticas gigantes foram estavam presentes em considerável quantidade concordando com o descrito por Oliveira et al (2008).

Kanashiro et al (2009) descrevendo placentação da capivara relata que neste estágio da gestação a zona juncional entre a subplacenta e a decídua possui células trofoblásticas gigantes e flâmulas de trofoblasto sincicial e o processo de destruição das paredes dos vasos maternos havia iniciado. Da mesma forma Oliveira et al (2012) relata a presença das células trofoblásticas gigantes e flamulas sinciciais na zona juncional no punaré. No preá esta zona não se mostrou bem definida neste estágio da gestação.

Com o avançar da gestação observou-se que aos 30 dias de gestação a subplacenta caracterizava-se como uma estrutura lamelar com eixos tecido mesenquimal, revestido por camadas citotrofoblásticas dando o aspecto lobulado da subplacenta e no centro do lóbulo estava presente o sinciotrofoblasto, assim como o descrito por Oliveira (2004) para o mocó. Esta característica lamelar também é encontrada em outros roedores histricomorfos tais como, o porquinho da Índia descrito por Davies, Dempsey e Amoroso (1961a), na cutia descrita por

Rodrigues et al (2006) o octodon degu e o *Petromus typicus* (MESS, 2007), na capivara (KANASHIRO et al, 2009) e no punaré (OLIVEIRA ET al, 2012).

Para Mess (2007) a subplacenta do degu neste estágio da gestação permanece como uma estrutura continua ao tecido placentário, de forma oposta a autora relata que no *Petromus typicus* estas duas estruturas são separadas por um tecido conjuntivo de origem mesenquimal. No preá aos trinta dias de gestação a subplacenta encontrava-se separada da placenta principal da mesma forma que o descrito para o *Petromus typicus*. No entanto, é importante evidenciar que nas margens da subplacenta do preá haviam pontos onde o tecido subplacentário tocava a placenta principal e nestes pontos notava-se citotrofoblasto da subplacenta adentrando no disco placentário.

Para Davies, Dempsey e Amoroso (1961a) a subplacenta apresenta grande aumento na quantidade e complexidade das camadas citotrofoblásticas e o sinciciotrofoblasto é mais compacto com aumento da vacuolização a medida que aproximava-se da decídua. Da mesma forma Mess (2007) descrevendo a subplacenta do degu e do *Petromus typicus*, relata este órgão em ambas as espécies como uma estrutura sólida e proeminente que está em adiantado processo de desenvolvimento. Além disto Kanashiro et al (2009) estudando a placentação da capivara afirma que esta estrutura está totalmente desenvolvida no terço médio da gestação. A subplacenta do preá no terço médio da gestação (30 dias) organiza-se de acordo com o citado pelos autores.

As células citotrofoblásticas são apontadas por Kliman (2000) como células indiferenciadas da placenta, com alto poder proliferativo, e fonte de outras células trofoblásticas em placentas de roedores como a capivara (KAUFMANN, 2004). No preá destaca-se que neste período da gestação ocorre um evidente aumento na quantidade de sinciciotrofoblasto subplacentário e consequente diminuição do citotrofoblasto em relação à fase gestacional anterior. Davies, Dempsey e Amoroso (1961a) destacam esta condição na subplacenta do porquinho da Índia citando que devido conversão de citotrofoblasto em sincício as camadas de trofoblasto celular reduzem-se a apenas uma camada em alguns pontos. Processo também relatado por Rodrigues ET al (2006) descrevendo a subplacenta da cutia.

O suprimento sanguíneo da subplacenta é inicialmente de origem materna por meio das lacunas, no entanto com o avançar da gestação a circulação fetal estabelece-se e a capilarização do mesênquima fetal torna-se evidente (MESS, 2007; OLIVEIRA et al, 2012).

No preá os vasos fetais podiam ser facilmente observados no mesenquima fetal e envoltos por citotrofoblasto, porem aos trinta dias de gestação observou-se que devido a diminuição das camadas citotrofoblásticas estes vasos relacionavam-se com o sinciotrofoblasto e com lacunas maternas que assim como descreve Oliveira et al (2012), estudando a placentação do punaré, são na maioria de natureza irregular.

No terço médio da gestação de acordo com Kanashiro et al (2009) em estudo com a placentação da capivara a zona juncional era constituída por células trofoblásticas grandes e pequenas, células trofoblásticas gigantes e flâmulas de sinciotrofoblasto, além disso Para Oliveira et al (2012) estas células estão presentes nesta região até o terço médio da gestação. No preá pode-se observar estas células aos 30 dias de gestação o que corresponde ao terço médio da gestação. Fato este também observado no degu e no *Petromus typicus* (MESS, 2007).

Após esta fase da gestação notava-se sinais de degeneração no tecido subplacentário e a partir do 45º dia de gestação estes sinais eram claros. Para Rodrigues ET al (2006) descrevendo a subplacenta da cutia e Kanashiro et al (2009) estudando a placentação da capivara em uma idade gestacional análoga aos 45 dias no preá o citotrofoblasto da subplacenta resume-se na maior parte em monocamadas e o citoplasma do sincício contem grandes espaços conferindo a ele uma aparência fragmentada. Do mesmo modo Bonatelli et al (2005) relatou que na paca a subplacenta torna-se mais compacta em relação ao seu tamanho e sofre degeneração. No preá assim como o citado para as outras espécies também é evidente este processo de degeneração o citotrofoblasto também se organiza em monocamadas e o sincício também possui a aparência fragmentada.

Além disso, concordado com o descrito por Davies, Dempsey e Amoroso (1961a), nota-se uma evidente escassez de figuras de mitose, o aparecimento de núcleos picnóticos e a escassez de células trofoblásticas gigantes. Esta diminuição nas células gigantes é relatada por Oliveira et al (2008) estudando a placentação do preá, onde os autores classificam como rara a presença destas células neste período da gestação.

Na fase seguinte da gestação, ou seja, 53 e 55 dias, Oliveira et al (2008) relata que a subplacenta do preá apresenta-se reduzida e apenas resquícios de seu tecido podem ser encontrados. Enquanto que Mess (2007) afirma que a subplacenta do *Petromus typicus* está reduzida a massas amorfas e restos celulares e que não possui vascularização.

Na subplacenta do preá observou-se um elevado grau de degeneração, no entanto, estes resultados assemelharam-se mais ao descrito por Mess (2007) para o degu onde há uma intensa substituição do trofoblasto tanto celular quanto sincicial por massas de tecido amorfo e detritos oriundos especialmente da elevada quantidade de morte celular.

O grau de degeneração mostrou-se bastante variável, pois assim como relata Davies, Dempsey e Amoroso (1961a), ainda era possível visualizar camadas de citotrofoblasto que em alguns pontos mostravam-se descontínuas e ilhotas de sinciciotrofoblasto podiam ser observadas. No entanto a maior parte do trofoblasto foi substituído por material amorfo com aspecto e consistência semelhante ao presente na região de contato entre a subplacenta e o tecido materno assim como relata Bonatelli (2005) descrevendo a subplacenta da paca.

6.3 CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO DESENVOLVIMENTO SUBPLACENTÁRIO.

Quando submetida à técnica de PAS o tecido subplacentário destaca-se pela intensa reação positiva no sinciciotrofoblasto (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961a; RODRIGUES et al, 2006; KANASHIRO et al, 2009), o que para Oliveira et al (2008) indica a presença de carboidratos como glicogênio e mucopolissacarídeos, assim como, glicoproteínas e proteoglicanos. E de acordo com Oliveira et al (2012) isto está relacionado a atividades de glicolisação no citoplasma sincicial.

Rodrigues (2005) descrevendo a subplacenta da cutia e Bonatelli (2005) descrevendo este órgão na paca relatam que além do sinciciotrofoblasto apresentar-se PAS-positivo o citotrofoblasto apresentou reação fraca ou ausente enquanto que a massa amorfa que entremeia o sincício apresenta intensa reação. Do mesmo modo Kanashiro et al (2009) relata que na capivara há uma forte reação ao ácido periódico de Shiff no sincício subplacentário da capivara.

No preá o sinciciotrofoblasto reagiu positivamente ao PAS durante todas as fases da gestação que foram avaliadas assim como descreve Davies, Dempsey e Amorosa (1961a) estudando a subplacenta do porquinho da Índia. Além disto concordando com os mesmos

autores com esta reação nota-se claramente o aumento do trofoblasto sincicial com o avançar da gestação.

Alem do sinciciotrofoblasto o material contido nas lacunas também foi PAS positivo o que para Mess (2003) trata-se de parte de seu produto de secreção, como, a produção de uma proteína ligante concentradora de progesterona. Os aspectos ultra-estruturais dessas células não indicam polarização que determine uma possível secreção. A interposição de duas ou mais camadas de citotrofoblasto entre o sincício e o leito vascular fetal, presente no eixo das lamelas, não condiz com a eficiência esperada de tecidos epiteliais, notadamente endócrinos, encontrados em outros órgãos.

No que diz respeito às reações imunohistoquímicas para vimentina e citoqueratina, Rodrigues (2005) relata que estas atestam que os vasos sanguíneos localizados na subplacenta, são de origem fetal e que seu revestimento endotelial permanece íntegro. Para a autora ao analisar os resultados destas imunoreações a vascularização intra-subplacentária é exclusivamente fetal.

No preá lacunas maternas foram observadas desde os 15 dias de gestação e os vasos fetais foram visualizados com o auxílio da imunorreação à vimentina a partir do 23º dia de gestação permanecendo até a proximidade do termo da gestação, de forma análoga Oliveira et al (2008) estudando a placentação do preá relatam que no início da gestação a vascularização subplacentária possui vasos fetais e lacunas contendo sangue materno e a partir do terço médio da gestação as lacunas passam a ser obstruídas por detritos e a irrigação deste órgão passa a ser exclusivamente fetal. No entanto no final da gestação, entre o 53º e o 55º dia, mesmo mantendo seu revestimento endotelial intacto os vasos fetais pareciam transportar somente um material amorfo, concordando com o descrito por Mess (2007) para o degu em final de gestação onde a autora informa que a subplacenta desta espécie neste estágio é avascular.

Segundo o que descreve Bonatelli (2005) e Rodrigues (2005) a capilarização no interior da subplacenta acompanha o eixo de tecido mesenquimal e dirige-se para vasos venosos. Para Mess (2007) a capilarização na subplacenta do degu torna-se evidente ainda no terço inicial da gestação e esta totalmente estabelecida no terço médio do mesmo modo a autora descreve que no *Petromus typicus* a capilarização está completada no terço médio da gestação, os vasos fetais são de origem alantoideana e estão situados entre os lóbulos com uma íntima relação com o trofoblasto celular. Este padrão de capilarização foi também

observado por Oliveira et al (2012) descrevendo a subplacenta do punaré, onde os autores afirmam que nos estágios iniciais do desenvolvimento subplacentário, esta estrutura faz contato com canais de sangue de origem materna, em fases posteriores a vascularização fetal inicia seu estabelecimento e os dois sistemas materno e fetal permanecem presentes até o terço médio da gestação, a partir deste momento as lacunas maternas passam por um processo de degeneração e a vascularização torna-se exclusivamente fetal. Da mesma forma que o descrito por estes autores para estas espécies de caviões, observa-se que no preá a capilarização inicia-se aos 23 dias de gestação e esta totalmente estabelecida aos 30 dias de gestação onde também inicia a degeneração das lacunas maternas e no final da gestação a vascularização é restrita ao sistema fetal.

Alem disso, Bonatelli (2005) discutindo acerca da vascularização subplacentária da paca destaca que a rede capilar fetal que se direciona aos vasos venosos pode atuar trazendo produtos do metabolismo das células subplacentárias que, antes de seu retorno ao feto por meio do ramo venoso do funículo umbilical, devem ser depurados e oxigenados. Enquanto que no porquinho da Índia Kaufmann (2004) relata que a vascularização da subplacenta ocorre através de uma artéria central que se capilariza na subplacenta e retorna em ramos de vasos venosos que confluem com os ramos venosos oriundos da placenta principal e direciona-se diretamente ao cordão umbilical. Com os resultados obtidos neste estudo não foi possível identificar de forma mais detalhada como ocorre a vascularização subplacentária, no entanto a presença de um grande vaso fetal na região central da subplacenta foi observada aos 30 dias de gestação, levando a crer que a vascularização subplacentária do preá assemelha-se ao descrito por Kauffman (2004) para o porquinho da Índia.

Outro aspecto que foi observado nos resultados da imunorreação, neste caso, para citoqueratina foi a evidente diminuição da população citotrofoblástica durante o decorrer da gestação, assim como, a notória degeneração das duas populações celulares (cito e sinciotrofoblasto) no final da gestação. Fato este observado no próprio preá por Oliveira et al (2008) e em outras espécies de caviões como a paca (BONATELLI et al, 2005), a cutia (RODRIGUES et al, 2006), O degu e o *Petromus typicus* (MESS, 2007), a capivara (KANASHIRO et al, 2009) e o punaré (OLIVEIRA et al, 2012).

6.4 CARACTERIZAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO SUBPLACENTÁRIO

A proliferação celular do tecido subplacentário do preá foi avaliada em todas as idades gestacionais e por dois métodos, a reação imunocitoquímica ao PCNA e pela técnica de impregnação por prata das regiões organizadoras de nucléolo argirofílicas (AgNORs).

O PCNA é uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta e sua expressão está relacionada com o estado proliferativo das células, sendo assim a imunorreação a este antígeno altamente correlacionado a métodos quantitativos da proliferação celular (IRAZUSTA, 1994; VANDIEST; BRUGAL; BAAK, 1998). Enquanto que de acordo com VanDiest, Brugal e Baak (1998) as NORs (regiões organizadoras de nucléolos) são segmentos de DNA associados a nucléolos e que contêm códigos genéticos para DNA ribossomal, ademais os autores afirmam que estas regiões estão diretamente relacionadas a síntese proteica e que podem ser utilizadas para avaliação da cinética celular, uma vez que, quanto mais rápido dividem-se as células maior a síntese de proteínas.

Segundo Zheng et al (2002) estudando a taxa de expressão do PCNA e a contagem por núcleo de NORs em carcinomas de células escamosas na região da laringe e da hipofaringe, estes dois métodos possuem grande correlação e que o estudo da proliferação celular com o uso desta técnica pode ser utilizado como meio de predição de malignidade e prognóstico para pacientes com as neoplasias estudadas.

Kliman (2000) chama o trofoblasto celular de células tronco da placenta, atribuindo a estas células a origem dos demais tipos celulares que compõem este órgão. Concordando com esta afirmação Davies, Dempsey e Amoroso (1961a) relatam que na subplacenta o sinciciotrofoblasto surge a partir do citotrofoblasto e a atividade proliferativa deste órgão encontra-se em seu máximo no terço médio da gestação, Bonatelli (2005) pondera que na paca tomando como base a intensa reação positiva do citotrofoblasto subplacentário ao PCNA estas células contribuem para o crescimento e desenvolvimento desta estrutura, mas não do próprio citotrofoblasto que é convertido principalmente em sincício que embora de maneira menos intensa também reage positivamente. Do mesmo modo o citotrofoblasto foi descrito como sendo PCNA positivo em várias espécies de caviões como a cutia (RODRIGUES, 2005), no próprio preá especialmente no terço médio da gestação (OLIVEIRA et al, 2008), na

capivara nos terços inicial e médio da gestação (KANASHIRO et al, 2009) e no punaré (OLIVEIRA et al, 2012) com comportamento semelhante ao observado para a capivara.

Neste estudo a imunorreação ao PCNA demonstrou através do índice mitótico que a subplacenta possui atividade proliferativa desde as fases iniciais da gestação até a fase final, sendo o maior índice aos 15 dias, enquanto que no final da gestação aos 55 dias este torna-se mínimo. Estes resultados corroboram com os descritos na capivara (KANASHIRO et al, 2009) e no punaré (OLIVEIRA et al, 2012), no entanto as fases finais não são abordadas quanto a este aspecto. Da mesma maneira é fato que assim como descrevem Oliveira et al (2008), o trofoblasto celular é altamente proliferativo no terço médio da gestação, porem os autores não relatam esta característica no início e final da gestação. Já comparando ao que argumentaram Davies, Dempsey e Amoroso (1961) para o porquinho da Índia os resultados obtidos para a subplacenta do preá divergem no ponto em os autores afirmam que o máximo da atividade proliferativa desta espécie se dá no terço médio da gestação.

A respeito dos resultados para a contagem de NORs no preá estes mostraram grande semelhança ao que se observou para a imunorreação ao PCNA, com seu máximo no início da gestação e mínimo com a aproximação do termo gestacional, dessa maneira é possível afirmar que além de uma maior proporção de células esta se dividindo, estas também dividem-se com maior velocidade. Comparações em relação aos dados para a contagem de NORs não são possíveis de serem feitas, pois a literatura com a utilização desta técnica em animais que possuam subplacenta é escassa ou inexistente. No entanto a semelhança entre os resultados do teste para o PCNA e o AgNOR também é relatada em trabalhos com a proliferação celular em tecidos neoplásicos (VANDIEST; BRUGAL; BAAK, 1998; ZHENG et al, 2002; GUPTA et al, 2014).

6.5 CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO DESENVOLVIMENTO SUBPLACENTÁRIO.

De acordo com Davies, Dempsey e Amoroso (1961b) estudando a subplacenta do porquinho da Índia por meio de microscopia eletrônica de transmissão, este órgão é constituído basicamente por dois topos celulares, o citotrofoblasto e o sinciotrofoblasto.

Para os autores o citotrofoblasto caracteriza-se por conter espaços intercelulares, citoplasma finamente granular, numerosas mitocôndrias, núcleo grande em relação ao citoplasma e cromatina assemelhando-se a novelos. O sincício apresentou relativa escassez de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso disperso, muitas inclusões eletrodensas. Rodrigues (2005) tratando da subplacenta da cutia relata que o citotrofoblasto organiza-se em um arranjo epitelial com junções celulares do tipo desmossomas e adesivas. A união de uma célula a outra forma espaços intercelulares irregulares, cujo interior não apresenta nenhum tipo de material.

Os resultados obtidos neste estudo concordam com o descrito no parágrafo, no entanto é importante que assim o descrito por Bonatelli (2005) em relação a subplacenta da paca, o citotrofoblasto parece conter um maior número de mitocôndrias quando comparado ao sinciciotrofoblasto. Além disto foram observados que o núcleo destas células apresentava heterocromatina dispersa que de acordo com Mess (2007) podem ser considerados como figuras de mitose.

No preá o sinciciotrofoblasto apresentou-se de forma semelhante ao descrito por Oliveira (2004) no mocó, Bonatelli (2005) na paca e Rodrigues (2005) na cutia, onde relatam que trata-se de uma região com núcleos dispersos em um citoplasma que continha pequenas vesículas com conteúdo eletrodense, podendo ser estes grânulos lisossomais, que promovem a digestão intracelular. Além disto o sinciciotrofoblasto caracterizou-se pela proximidade com o sistema vascular materno (OLIVEIRA et al, 2012) que para Davies, Dempsey e Amoroso (1961b) trata-se de um sistema complexo e, possivelmente, anastomosado de lacunas envoltas por sinciciotrofoblasto, que emitia projeções citoplasmáticas, e continham material eletrodense.

Ultraestruturalmente poucas alterações foram visualizadas na subplacenta do preá durante as fases gestacionais analisadas, no entanto as lacunas maternas passaram por algumas alterações no decorrer da gestação. Inicialmente aos 15 dias de gestação a vascularização fetal ainda não está estabelecida e o aporte sanguíneo da subplacenta provém do sangue materno (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961a; MESS, 2007), dessa forma as lacunas apresentavam hemácias em seu interior, caracterizavam-se por possuir vilosidades delgadas e alongadas e em suas proximidades podiam ser visualizadas células trofoblásticas gigantes assim como o descrito por Mess (2007) no degu, aos 23 dias de gestação a capilarização da subplacenta iniciou-se e nas lacunas podem ser observados materiais de

diferentes eletrodensidades, com hemácias ainda presentes e as vilosidades apresentam-se em um tamanho reduzido, aos 30 dias as lacunas também apresentam em sua luz material de diferentes eletrodensidades, no entanto as hemácias são raras, e as vilosidades estão em tamanho reduzido e em alguns pontos desaparecem, após esta idade gestacional a deterioração do tecido subplacentário torna-se evidente e as lacunas mostram-se com tamanho reduzido, contendo material amorfo de baixo eletrodensidade e as vilosidades dão lugar a gotículas que preenchem a luz das lacunas, já no final da gestação (53 e 55 dias), assim como o sincício as lacunas diminuem em quantidade e os núcleos do sincício tomam uma conformação circular ao redor das lacunas remanescentes. Estas informações concordam com o que descreve Davies, Dempsey e Amoroso (1961b) para estas estruturas no final da gestação, todavia a característica das vilosidades no início da gestação do preá são opostas ao que relatam os autores para o porquinho da Índia, além disto a degeneração das lacunas concorda com o relatado por Kanashiro et al (2009) para a capivara.

As células gigantes analisadas ao microscópio eletrônico apresentaram um citoplasma preenchido por diversas organelas, pequenas vesículas eletrodensas, e, em suas superfícies celulares inúmeras projeções do tipo microvilosidade. Além de serem multinucleadas, o citoplasma é vacuolizado e possui membrana plasmática espessa, observações estas descritas na paca (BONATELLI, et al. 2005; BONATELLI, 2005) e no mocó (OLIVEIRA, 2004). Assim como descreve Mess (2007) para o degu, estas células estão presentes principalmente no início da gestação, no preá o período onde estas encontram-se mais frequentes é aos 23 dias de gestação, foi também nesta fase que observou-se com maior frequências as multinucleações, assim como as principais características destas células.

7 CONCLUSÕES

1 - No preá a subplacenta encontra-se encravada entre a placenta principal e a decídua basal mantendo uma íntima relação e atuando como uma região de interface entre estas duas estruturas. Esta configuração é melhor observada aos 30 dias de gestação;

2 - Inicialmente, aos 15 dias de gestação, a subplacenta apresenta-se como uma monocamada citotrofoblástica envolta por sinciciotrofoblasto que possui lacunas com sangue de origem materna, conforme pôde ser constatado pela microscopia de luz e eletrônica de transmissão;

3 - Aos 15 dias de gestação o trofoblasto placentário e subplacentário eram contínuos. Todavia, a partir do 23º dia já é possível distinguir os tecidos placentários e subplacentários, sendo o citotrofoblasto predominante. Aos 30 dias percebe-se que o citotrofoblasto passa a se diferenciar em sinciciotrofoblasto, que passa a ocupar o centro dos lóbulos. Já a partir dos 45 dias da gestação este passa a ser mais abundante em relação ao trofoblasto celular, que nesta fase dispõem-se em monocamadas, determinadas regiões da subplacenta;

4 - Os resultados obtidos com base nas técnicas de imunohistoquímica permitem afirmar que a subplacenta é vascularizada, principalmente, por vasos fetais. Aos 15 dias a mesma apresenta apenas vascularização materna, mas a partir dos 23 dias, já pode ser identificada a presença de capilarização fetal, mas somente aos 30 dias de gestação esta se completa;

5 - Entre o 15º e 30º dias de gestação as lacunas maternas subplacentárias são características, embora neste último período já se observem lacunas em degeneração. Enquanto, entre o 45º e 55º dias estas são apenas residuais e desprovidas de sangue;

6 - Notadamente após os 45 dias de gestação deixam de serem observadas na subplacenta de preás, células trofoblásticas gigantes, o que pode indicar que estas estejam envolvidas em processos invasivos e destruição de vasos, uma vez que nas fases iniciais da gestação são observadas próximas a vasos decíduais;

7 - A atividade proliferativa do trofoblasto foi evidenciada com base nas técnicas de PCNA e AgNOR e permitiu afirmar que o mesmo é altamente proliferativo, tanto em quantidade como em velocidade, no início da gestação e, que decai a medida em que a mesma avança.

8 – Entre o 15º e 30º dias de gestação a subplacenta de preás apresenta lacunas repletas de hemácias e material amorfo com eletrondensidade variável. Contudo após os 45 dias de gestação não se observam mais hemácias nas lacunas e o material amorfo é de baixa eletrondensidade. Da mesma forma observa-se que aos 15 dias de gestação as microvilosidades dos espaços maternos são alongadas e delgadas. Aos 23 dias da gestação nota-se a diminuição e espessamento das microvilosidades. A partir dos 45 dias estas microvilosidades tornam-se pouco evidentes e na sua luz acham-se despesas como se fossem material de exocitose.

REFERENCIAS

ADAMSON, S. L., LU, Y., WHITELEY, K. J., HOLMYARD, D., HEMBERGER, M., PFARRER, C., CROSS, J. C. (2002). Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Developmental biology*, 250(2), 358-373.

ANSELL, J.D., BARLOW, P.W.; MCLAREN,. Binucleate and polyploid cells in the decidua of the mouse. /. *Embryol. exp. Morph.* 31, 223-227, 1974.

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.

BENIRSCHKE, K., KAUFMANN, P., BAERGEN, R. 2006. Maternal diseases complicating pregnancy: diabetes, tumors, preeclampsia, lupus anticoagulant. *Pathology of the human placenta*, 584-656.

BONATELLI, M. A subplacenta da paca (Agouti paca, Linnaeus 1766). 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BONATELLI, M., CARTER, A. M., MACHADO, M. R. F., OLIVEIRA, M. F., De LIMA, M. C., & MIGLINO, M. A. (2005). Placentation in the paca (Agouti paca L). *Reprod Biol Endocrinol*, 3(9).

BONATELLI, M., MACHADO, M. R. F., CRUZ, C., & MIGLINO, M. A. Análise morfológica da placenta da paca (Agouti paca, Linnaeus, 1766). Estudo ao microscópio de luz e à microscopia eletrônica de transmissão. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci*, 38(5), 0-0, 2001.

BONVICINO, C. R., OLIVEIRA, J. D., D'ANDREA, P. S. (2008). Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Centro Pan-Americano de Febre Aftosa-OPAS/OMS, Rio de Janeiro, 120.

BOSCO, C., BUFFET, C., BELLO, M. A., RODRIGO, R., GUTIERREZ, M., GARCÍA, G. 2007. Placentation in the degu (*Octodon degus*): Analogies with extrasubplacental trophoblast and human extravillous trophoblast. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 475-485.

BRANDT, J.F. 1835 *Mammalium rodentium exoticorum novorum vel minus rite cognitorum musei academici zoologici descriptiones et icones*. Mémoires de L'Académie Impériale des Sciences de Saint Petersburg, ser. 6 (tome III), pt. 2, 358–442 + 17 pls.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle de roedores. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2002. 132p.

BURTON, J., KAUFFMAN, P., HUPPERTZ, B., Anatomy and Genesis of the placenta. In, Knobil and Neill's, *Physiology of Reproduction*, v. 1, p. 189-232.

CADEMARTORI, C. V., SARAIVA, M., SARAIVA, C., de MIRANDA, J. A. (2009). Nota sobre a fauna de pequenos roedores em mosaico antropogênico com remanescente florestal do domínio mata atlântica, sul do Brasil. *Biodiversidade Pampeana*, 6(2).

CARPENTER, S. J., Light and electron microscopic observations on the morphogenesis of the chorioallantoic placenta of the golden Hamster (*Cricetus auratus*). Days seven through nine of gestation. *Amer J Anat* 135: 445-476, 1972.

CARTER, A. M. Animal models of human placentation – A review. *Placenta*. v. 21, p.41-47, 2007.

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., MESS, A. 2007. Evolution of the placenta in eutherian mammals. *Placenta*, 28(4), 259-262.

CARTER, A. M., MESS, A. M. 2013. Conservation of placentation during the tertiary radiation of mammals in south America. *Journal of morphology*, 274(5), 557-569.

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.; ENDERS, A. C.; KÜNZLE, H.; OKELO-ODUOR, D.; VOGEL, P. Placentation in species of phylogenetic importance: the Afrotheria. *Animal Reproduction Science*. v. 82-83, p. 35-48, 2004.

COAN, P. M., Conroy, N., Burton, G. J., & Ferguson-Smith, A. C. (2006). Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Developmental dynamics*, 235(12), 3280-3294.

COLBERT, E.H. Rodents and Rabbits. In: *Evolution of vertebrates: a history of the backboned animals through time*. 2. ed. New York, John Wiley and Sons, 1969. p. 321-334./

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.

DAVIES, J.; DEMPSEY, E. W.; AMOROSO, E. C. The subplacenta of the guinea-pig: development, histology and histochemistry. *J. Anat.*, v. 95, n. Pt 4, p. 457, 1961.a.

DAVIES, J.; DEMPSEY, E. W.; AMOROSO, E. C. The subplacenta of the guinea pig: An electron microscopic study. *J Anat Lond*, v. 95, p. 311-324, 1961.b.

DENKER, H.-W. 1993. Implantation: a cell biological paradox. *J. Exp. Zool.* 266:541-558

DÍAZ, M. M. 2000. Key to the Native Mammals of Jujuy Province, Argentina. Occasional Papers, Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History, 7: 1–29.

DOUTT, J. Kenneth. Two new mammals from South America. Journal of Mammalogy, v. 19, n. 1, p. 100-101, 1938.

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.

EISENBERG, J.F. & K.H. REDFORD. 1999. Mammals of the neotropics – the central neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. Chicago, University of Chicago Press, X+609p.

EMMONS, L.H. & FEER, F. Neotropical rainforest mammals: a field guide. 2. ed. Chicago, University of Chicago, 1997. 307 p.

ENDERS, A. C. 1965. Formation of syncytium from cytotrophoblast in the human placenta. Obstetrics & Gynecology, 25(3), 378-386.

ENDERS, A. C., WIMSATT, W. A. 1968. Formation and structure of the hemodichorial chorio-allantoic placenta of the bat (*Myotis lucifugus lucifugus*). American Journal of Anatomy, 122(3), 453-489.

ENDERS, A. C.; CARTER, A. M. (2004). What can comparative studies of placental structure tell us?—A review. Placenta, 25, S3-S9.

FAVARON, P. O. Placentação em roedores da família Cricetidae-Sigmodontinae. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FAVARON, P. O., CARTER, A. M., AMBRÓSIO, C. E., MORINI, A. C., MESS, A. M., de OLIVEIRA, M. F., & MIGLINO, M. A.. Placentation in Sigmodontinae: a rodent taxon native to South America. Reprod Biol Endocrinol, 9(1), 55, 2011.

FERRAZ, R. H. S. Estudo macro e microscópico da placenta de termo de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*–Carleton-MD. 1984). 2001. Tese de Doutorado.

FERRO, E. A. V. Cinética da infecção congênita de células trofoblásticas por "*Toxoplasma gondii*" na placenta de "*Calomys callosus*". 2000. Tese de Doutorado.

FISCHER, T. V. 1985. The subplacenta of the beaver: *Castor canadensis*. *Placenta*, 6(4), 311-321.

FISCHER, T. V. 1971. Placentation in the American beaver (*Castor canadensis*). *American Journal of Anatomy*, 131(2), 159-183.

FLAMINI, M. A., PORTIANSKY, E. L., FAVARON, P. O., MARTINS, D. S., AMBRÓSIO, C. E., MESS, A. M., BARBEITO, C. G. 2011. Chorioallantoic and yolk sac placentation in the plains viscacha (*Lagostomus maximus*)—A caviomorph rodent with natural polyovulation. *Placenta*, 32(12), 963-968.

GIBORI, G. (1994). The decidual hormones and their role in pregnancy recognition. In *Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions* (pp. 217-222). Springer US.

GILL, T. On the Characteristics of the Primary Groups of the Class of Mammals. *The American Naturalist*, Vol. 5, No. 8/9 (Sep., 1871), pp. 526-533

GUDE, N. M., ROBERTS, C. T., Kalionis, B., King, R. G. 2004. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis research*, 114(5), 397-407.

GUPTA, S., MISRA, S., GOYAL, M., KUMAR, V., CHATURVEDI, A. (2014). Prognostic significance of AgNOR Proliferative Index in gallbladder carcinoma—A potential alternative to frozen section analysis. *J Liver*, 3(143), 2167-0889.

HUCHON, D., DOUZERY, E. J. (2001). From the Old World to the New World: a molecular chronicle of the phylogeny and biogeography of hystricognath rodents. *Molecular phylogenetics and evolution*, 20(2), 238-251

HUCHON, D., MADSEN, O., SIBBALD, M. J., AMENT, K., STANHOPE, M. J., CATZEFLIS, F. Douzery, E. J. (2002). Rodent phylogeny and a timescale for the evolution of Glires: evidence from an extensive taxon sampling using three nuclear genes. *Molecular Biology and Evolution*, 19(7), 1053-1065.

JOHANSSON M, JANSSON T, POWELL TL. Na(+)-K(+)-ATPase is distributed to microvillous and basal membrane of the syncytiotrophoblast in human placenta. *Am J Physiol (Regul Integr Comp Physiol)* 2000; 279: R287-94.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 448p.

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*). *Reprod Biol Endocrinol*, 7(57), 1-13, 2009.

KANASHIRO, C. Estudo morfológico da placenta de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*): terço inicial. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2006.

KAUFMANN, P. Capybara – *Hydrochoeris hydrochoeris*. In: BENIRSCHKE, K. *Comparative Placentation*. 2004. Disponível em: <http://medicine.ucsd.edu/cpa/capyfs.htm>. Acesso em 17 nov.2013.

KAUFMANN, P., DAVIDOFF, M. (1977). The guinea-pig placenta. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 53(2), 5.

KLIMAN, H. J. 2000. Uteroplacental blood flow: the story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. *The American journal of pathology*, 157(6), 1759.

LARA, M. C., PATTON, J. L., da SILVA, M. N. F. (1996). The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(2), 403-413.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. *Experimental Clinical Endocrinology*, v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

LIMONGI, J. E.; FERRO, E. A. V. Barreira Placentária de *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). *Bioscience Journal*, v.19, n.3, p.89-94, 2003

MATA R., A., Fauna e Flora.
Em: <http://www.riodoceterra.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=631:,-prea-ou-piria&catid=20:fauna-e-flora&Itemid=99>. Acesso em: 10 de janeiro de 2014.

MESS, A. (2003). Evolutionary transformations of chorioallantoic placental characters in Rodentia with special reference to hystricognath species. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 299(1), 78-98.

MESS, A. (2007). The subplacenta in *Octodon degus* and *Petromus typicus*—two hystricognath rodents without significant placental lobulation. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 308(2), 172-188.

MESS, A., ZAKI, N., KADYROV, M. KORR, H. KAUFMANN, P. 2007. Caviomorph placentation as a model for trophoblast invasion. *Placenta*, 28(11), 1234-1238.

MEYEN, F. J. F. "Beitrage zur Zoologie, gesammelt auf einer reise um die Erde. Zweite Abhandlung. Saugethiere." *Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesariae Leopoldino-Carolinae Naturae Curiosorum* (Verhandlungen der Kaiserlichen Leopoldinisch-Carolinischen Akademie der Naturforscher) 16 (1833): 599-600.

MOOJEN, J. (1952). Os roedores do Brasil. Ministerio de Educação e Saúde, Instituto Nacional do Livro.

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. Vertebrate fetal membranes: Comparative ontogeny and morphology; evolution; phylogenetic significance: basic functions; research opportunities. London: The Macmillan Press, 1987. 383p.

NOWAK, R. M. Walker's Mammals of the World. Fifth Edition. Baltimore: The Johns Hopkins Univ. Press, 1999. 642 p.

ODUOR-OKELLO, D. An electron microscopic study of the chorioallantoic placenta and the subplacenta of the cane rat (*Thryonomys swinderianus/ temminck*). Placenta, v. 5, n. 5, p. 433-442, 1984.

OLIVEIRA, M. F. (2004). Placentação em mocós, *Kerodon rupestris* Wied, 1820. Biota Neotropica, 5(1).

OLIVEIRA, M. F., FAVARON, P. O., AMBRÓSIO, C. E., MIGLINO, M. A., e MESS, A. M.. Chorioallantoic and Yolk Sac Placentation in *Thrichomys laurentius* (Echimyidae) and the Evolution of Hystricognath Rodents. J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.) 318:13–25, 2012.

OLIVEIRA, M. F., MESS, A., AMBRÓSIO, C. E., DANTAS, C. A., FAVARON, P. O., & MIGLINO, M. A. Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). Reprod Biol Endocrinol, 6, 39, 2008.

PAGLIA, A., Fauna, In: Instituto Socioambiental (ISA). Almanaque Brasil Socioambiental, São Paulo: Instituto Socioambiental, 2008.p. 243-248.

PLACÍN, M., LASUNCIÓN, M. A. e HERRERA, E. Transporte de metabolitos a través de La placenta. Rev. Esp. Pediatr. 1984, 40, 3, 163 – 198.

REIG OA, 1984. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). Rev Bras Genet. 7:333-365.

RIBEIRO, N. A. B., Análises cromossômicas e filogenia de roedores do gênero *Proechimys* (Echimyidae, Rodentia), Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2006.

ROBERTS, C. T., BREED, W. G., & MAYRHOFER, G. (1994). Origin of the oocyte shell membrane of a dasyurid marsupial: an immunohistochemical study. *Journal of Experimental Zoology*, 270(3), 321-331.

RODRIGUES, R. F. Caracterização morfológica da subplacenta em cutia (*Dasyprocta leporina*). 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RODRIGUES¹, R. F., MIGLINO, M. A., dos Santos FERRAZ, R. H., & de MORAIS-PINTO, L. Placentação em cutias (*Dasyprocta aguti*, CARLETON, MD): aspectos morfológicos. *Braz J vet Res anim Sci*, 40, 2, 2003.

ROSSANT J and CROSS JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2: 538–548, 2001.

SIMMONS, D.G., CROSS, J.C., 2005. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. *Dev. Biol.* 284, 12–24.

SIMPSON G. the principles of classification and a classification of mammals *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 85: 1-350. 1945.

SOARES, M. J., CHAKRABORTY, D., KARIM RUMI, M. A., KONNO, T., RENAUD, S. J. 2012. Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta*, 33(4), 233-243.

SOARES, M. J., CHAPMAN, B. M., RASMUSSEN, C. A., Dai, G., Kamei, T., Orwig, K. E.. (1996). Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta*, 17(5), 277-289.

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.

VALE, A. M., OLIVEIRA, G. B., FAVARON, P. O., MIGLINO, M. A., PAULA, V. V., SILVA, A. R., OLIVEIRA, M. F. 2013. Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Pesq. Vet. Bras*, 33(8), 1033-1040.

VAN DIEST, Paul J.; BRUGAL, Gerard; BAAK, J. P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *Journal of clinical pathology*, v. 51, n. 10, p. 716, 1998

VAUGHAN, T. A., 1972. *Mammalogy*. W. B. Saunders Company, Philadelphia. 463 pp.
Wildman, D. E., Chen, C., Erez, O., Grossman, L. I., Goodman, M. e Romero, R. Evolution of the mammalian placenta revealed by phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 February 28; 103(9): 3203–3208.

WILSON, D. E., REEDER, D. M. (Eds.). (2005). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (Vol. 12). JHU Press.

WOLFF, J. O., SHERMAN, P. W. (Eds.). 2007. *Rodent societies: an ecological and evolutionary perspective*. University of Chicago Press.

WOOD, A. E. (1955). A revised classification of the rodents. *Journal of Mammalogy*, 165-187.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F., Placentation. In: *Marshall's Physiology of Reproduction* Ed. 4. p. 233–460 Ed. E Lamming. Chapman & Hall, London, 1994.

WOODS, C. A. (1982). The history and classification of South American hystricognath rodents: reflections on the far away and long ago. *Mammalian Biology in South America*, 6, 377-392.

ZHENG, M., TIAN, X., LI, H., CHENG, Y., CHEN, X. (2002). [Expression of PCNA and the count of AgNOR in squamous cell carcinoma of larynx and hypopharynx]. *Lin chuang er bi yan hou ke za zhi*= *Journal of clinical otorhinolaryngology*, 16(12), 653-655.

APÊNDICE

Caracterização morfológica do desenvolvimento subplacentário do preá (*Galea spixii* Wagler, 1831)¹

Ferdinando V. F. Bezerra^{2*}, Maria A. Miglino³, Phelipe O. Favaron³, Gleidson B. de Oliveira², Moacir F. de Oliveira².

ABSTRACT.- Ferdinando V. F. Bezerra, Gleidson B. de Oliveira, Maria A. Miglino, Phelipe O. Favaron, Moacir F. de Oliveira 2014. [**Morphological characterization of subplacental development of preá (*Galea spixii* Wagler, 1831).**] Caracterização morfológica do desenvolvimento subplacentário do preá (*Galea spixii* Wagler, 1831). Pesquisa Veterinária Brasileira 00(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: ferdinando_vinicios@hotmail.com

Aimed to morphologically describe the development of the subplacenta in the galea. In order to achieve that, 12 female specimens were vaginal cytology exams took place daily so as to ascertain mating had indeed occurred, separating the copulated females. After copulation and impregnation, the subplacentae were collected on days 15, 23, 30, 45, 53 and 55 through the sacrifice of impregnated females via a specific anesthetic protocol. The samples, therefore, were processed via techniques for conventional histology, cytochemistry, immunohistochemistry and electronic transmission microscopy. On the 15th day of gestation, it was observed that the subplacenta was made up of a single layer of cytotrophoblast enveloped in syncytium, which showed vacuoles and maternal gaps and presented invasive characteristics as it distanced itself from the cytotrophoblast layer. On the 23rd day of gestation, the subplacenta did not yet present a defined characteristic form, however, there was a conformation of lobes composed predominantly by cytotrophoblast and their syncytium was directly related to the areas where maternal gaps appeared. On the 30th day, the subplacenta was verified to be a compact organ with a defined form and very evident capillarity of the mesenchyme; the lobes were made up of cytotrophoblast which enveloped the mesenchyme and in their core syncytial trophoblast could be perceived. From the 45th day of gestation on, degeneration of sub placental tissue was evident and the amount of syncytial trophoblast surpasses that of cytotrophoblast; in addition, the syncytium showed a great amount of vacuoles and signs of cellular death could be noted. Towards the end of gestation (days 53 and 55), the subplacenta was in a state of advanced degeneration and signs of cellular death as well as tissue reduction were observable. Fetal circulation was present from the 23rd day onward, noticeable through the positive reaction to vimentin, and the reaction to cytokeratin was positive during all of the gestation, especially in cytotrophoblast. Proliferative activity of the subplacental tissue, evaluated through the PCNA and AgNOR techniques, proved to be greater in the early stages of pregnancy and lower as it progressed. Ultrastructurally, the characteristics of cellular and syncytial trophoblast could be made evident. The development of the subplacenta of the Spix's yellow-toothed cavy initiates around the 15th day of gestation, is at its peak around the 30th day and towards the end of gestation the subplacenta is necrotic. Besides that, it is very similar to the subplacenta of other species of the Caviidae family in what concerns organization and structure.

INDEX TERMS: Subplacenta. Cytotrophoblast. Syncytiotrophoblast. Development.

INTRODUÇÃO

¹ Recebido em.....
Aceito para publicação em.....

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN 59625-900, Brasil. *Autor para correspondência: Ferdinando_vinicios@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.

O preá é um roedor de pequeno porte pertencente ao gênero *Galea*, que possuem como característica um corpo coberto por pêlos macios, coloração variando do cinza ao marrom-claro, possui coloração acinzentada no dorso com tom brunáceo e ventre branco, podendo apresentar um anel periocular de pêlos mais curtos e claros comparados aos do dorso, estando a cauda ausente e as patas posteriores possuindo três dígitos. Estes animais apresentam uma mandíbula bastante especializada possuindo em sua face externa uma crista para inserção do masseter lateral e como característica que os diferencia das espécies do gênero *Cavia*, o *Galea* conta com dois dentes incisivos de coloração amarelada (BRANDT, 1835; DOUTT, 1938; MOOJEN, 1952).

O gênero *Galea* pertence à subordem histicomorfa, a qual apresenta as maiores diversidades ecológicas e morfológicas, já que os indivíduos que a compõem, distribuem-se em praticamente toda a América do Sul e ocupam os mais diversos habitats, indo desde animais semifossoriais até espécies de comportamento arbóreo (LARA, et al., 1995). Este grupo de animais tem ainda como característica própria a presença de uma estrutura placentária típica, um órgão exclusivo, denominado subplacenta (MESS, 2003; RODRIGUES et al., 2006).

A subplacenta trata-se de uma região coriônica especializada resultante da proliferação e preguçamento do ectoderma fetal na base da escavação central ou no centro da placenta corioalantóidea quando de origem mesodermal. Esta é formada por lamelas de citotrofoblasto inserido no mesênquima corioalantóideo, que se diferencia em sinciotrofoblasto, ao longo da gestação e é separado do citotrofoblasto por uma membrana basal tênue (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961).

A placentação em roedores tem sido estudada com base em vários aspectos na tentativa de se estabelecer relações filogenéticas entre os anexos fetais dos vários grupos de roedores, já que nestes indivíduos são observadas particularidades com relação ao formato da placenta, ao saco vitelínico que se mostra completamente invertido e funcional até o final da gestação e pela presença da subplacenta que além de sua contribuição como característica placentária para a definição da história evolucionária dos histicomorfos (MESS, 2007) é para Mess et al. (2007) modelo ideal para estudo da invasão trofoblástica em humanos. Dessa maneira objetivou-se descrever morfolologicamente o desenvolvimento da subplacenta do preá durante toda a gestação.

METODOLOGIA

Foram utilizadas 12 fêmeas não gestantes de preás para formação de três grupos experimentais contendo quatro fêmeas cada grupo. Os animais foram obtidos no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, licenciado junto ao IBAMA como criadouro científico (Registro nº 1478912). As fêmeas foram alocadas em boxes de 5m², diferenciadas por tintura capilar negra, em diferentes regiões anatômicas, sendo a cada grupo adicionado um macho. A cópula e o consequente início de gestação foram detectados mediante exames de citologia vaginal, cuja presença dos espermatozoides no exame colpocitológico, a fêmea era separada, classificando o dia zero da gestação.

O material destinado ao estudo da morfologia da subplacenta foi coletado em diferentes idades gestacionais, aos 15, 23, 30, 45, 53 e 55 dias. Para isso os animais foram submetidos a jejum sólido e líquido, pesados e pré-medicados com a associação de cloridrato de xilazina (1mg.kg⁻¹) e cetamina (15mg.kg⁻¹) seguida da indução anestésica com tiopental sódico (25mg.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 coleta da subplacenta.

Os fragmentos coletados foram processados no Laboratório de Morfofisiologia Aplicada (LABMOA) da UFERSA, onde as amostras destinadas a microscopia de luz foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% tamponado por 48h e transferidos para uma série de concentrações crescentes de álcool (70-100%). Posteriormente, foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Synt[®], granulada com ponto de fusão 58°C a 62°C, lote: 138199). Por fim foram corados segundo a técnica de hematoxilina e eosina (HE), azul de toluidina (AT) e ácido periódico de Schiff (PAS), sendo as imagens mais representativas fotomicrografadas em microscópio óptico (Leica ICC50 HD).

Para as reações de imunohistoquímicas foram realizadas vimentina, citoqueratina e PCNA. Para isso os cortes foram aderidos em lâminas silanizadas e submetidos a uma bateria de etanol em concentrações decrescentes (100% ao 70%). Em seguida realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com a utilização de peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos. Para recuperação antigênica os cortes foram tratados em tampão citrato 0,1M, Ph 7,4 e irradiados por três vezes em microondas de uso caseiro

(700MHz) e, logo, lavados em Tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4, seguido da adição da proteína Dako para bloquear as reações inespecíficas. Após este procedimento as amostras foram incubadas com anticorpo primário, Anti-Vimentina policlonal de cabra (cód. SC-1226, Santa Cruz Biotchnology, USA), Anti-citoqueratina policlonal de coelho (cód. PU071-UP, Biogenex) e Anti-PCNA monoclonal de camudongos (cód. 107904, Novocastra, UK) em câmara úmida por 12h entre 0 e 4°C. Depois foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase e revelados com diaminobenzidina/peróxido de hidrogênio em tampão TRis-HCl Ph 8,2 e por fim contracolorados com Hematoxilina de Harris e montados em resina sintética – Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Com o resultado obtido com a imunorreação ao PCNA foi também calculado o índice mitótico para cada idade gestacional. Para isso as lâminas foram fotomicrografadas, em objetiva de 100x e nas imagens obtidas foram contadas 1000 células diferenciando-as conforme a reação em positivas e negativas, sendo que o índice mitótico obtido pela razão entre o número de células positivas e o total de células contadas (1000) e o resultado multiplicado por cem e expresso em percentual.

Além da imunorreação ao PCNA, a atividade proliferativa na subplacenta foi também avaliada por meio da contagem de Regiões Organizadoras de Nucléolo Argirofílicas (AgNOR). Para isso cortes histológicos foram desparafinados em xilol e etanol (100 %), pós - fixadas em solução de etanol absoluto e ácido acético 3:1 durante 30 min e reidratadas. Para realização da coloração da NOR, duas soluções foram preparadas separadamente: a solução “A” composta por 2% de gelatina sem sabor em solução aquosa de ácido fórmico a 1 % e a solução “B” à base de nitrato de prata na concentração de 50% em água. A solução de coloração foi preparada imediatamente antes do procedimento, misturando uma solução com B a A 2:1 ao abrigo da luz. As secções foram coradas em um local escuro durante 30 min, em seguida, lavadas com água destilada e realizado o bloqueio com solução aquosa de tiosulfato de sódio a 5% por 5 min. As secções foram desidratadas numa série gradual de etanol ao xilol, e montadas.

AgNORs foram visualizados como pontos escuros intranucleares e aglomerados e contados na subplacenta (200 núcleos). A contagem foi feita pelo mesmo observador utilizando a imagem, em campos aleatórios de cada secção, capturados na objetiva de 100x. O número total de AgNOR (pontos e aglomerados) por núcleo foi expressa pela média em cada idade gestacional.

Para análise ultraestrutural, utilizaram-se fragmentos da subplacenta de cada idade gestacional estudada com aproximadamente 0,5cm². Estes foram fixados em glutaraldeído a 2,5% tamponado e pós-fixados em tetróxido de ósmio. Posteriormente, os fragmentos foram lavados em solução tampão de fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4 e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico: 50%, 70%, 80%, 90% e 100%. foram lavados em óxido de propileno sob rotação e depois, imersos em misturas de óxido de propileno e resina Spurr em diferentes concentrações até finalmente chegar a resina Spurr pura, onde foram emblocados em moldes específicos, para polimerização. Obtidos os blocos, foram realizados cortes semifinos com 0,4mm 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 0,07mm 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

Terço inicial da gestação (15 e 23 dias)

Aos 15 dias de gestação, a subplacenta era constituída por uma camada citotrofoblástica única que se dobrava dando origem a uma estrutura ininterrupta apoiada em uma membrana basal voltada à escavação central (Fig. 1A). A camada citotrofoblástica era constituída por células cúbicas pseudoestratificadas em toda sua extensão. O citoplasma destas células era levemente basofílico e seus núcleos predominantemente basais, arredondados, basófilos e com cromatina organizada em forma de grumos dispersos (Fig. 1A). Acima da camada citotrofoblástica surgia sinciotrofoblasto (Fig. 1B) que se caracterizava por apresentar um citoplasma eosinofílico, com vacúolos e permeado por vasos de origem decidual que nas proximidades da subplacenta tiveram o endotélio destruído e substituído por tecido de origem fetal originando lacunas revestidas por sinciotrofoblasto que emitia microvilosidades alongadas

e delgadas, seus núcleos eram arredondados, com nucléolos evidentes, apresentando figuras de mitose e caráter invasivo juntamente com células trofoblásticas gigantes (Fig. 1D, H).

Já aos 23 dias de gestação a subplacenta ainda não possui uma forma definida, no entanto, mostrava-se como uma estrutura lobulada e com sua área bem delimitada em relação ao disco placentário por uma faixa tênue de tecido conjuntivo e em alguns pontos com justaposição dos tecidos destas duas estruturas (Fig. 1E). Em sua borda que faz contato com a decídua basal, a subplacenta se expande por boa parte desta região, não havendo distinção clara entre as duas regiões (Fig. 1F). Os lóbulos são formados predominantemente por citotrofoblasto, composto por células arredondadas, com citoplasma eosinofílico e finamente granular com núcleos comumente basais e arredondados, estando as células dispostas de forma concêntrica com pequenas células de citoplasma bastante eosinofílico e de núcleo basófilo no centro, enquanto que o sincício aparece nos pontos onde há a presença de lacunas maternas possuindo como característica a presença de poucos vacúolos (Fig. 1E, G). O citoplasma destas células sinciciais é granular com núcleos em grande parte arredondados, podendo-se observar alguns com forma alongada e ainda figuras de mitose. A presença de vasos fetais foi evidenciada nesta fase, no entanto as lacunas maternas ainda pareciam funcionais na circulação subplacentária (Fig. 5).

Durante toda esta fase o sinciciotrofoblasto mostrou-se PAS positivo (Fig. 1C, G), assim como as lacunas continham material amorfo com mesma natureza, além disto o trofoblasto era altamente proliferativo (Fig. 2A, B)

Terço médio da gestação (30 e 45 dias)

Verificou-se que a subplacenta aos 30 dias de gestação era bem delimitada mostrando-se como um órgão isolado e separado da placenta principal por um tecido conjuntivo frouxo no qual estavam inseridos vasos fetais (Fig. 3A). Na região de contato entre a subplacenta e o tecido materno observava-se uma região denominada zona juncional, constituída por um tecido amorfo que apresentava uma considerável quantidade de células trofoblásticas gigantes, que ocupavam prioritariamente as regiões próximas a vasos sanguíneos, e mantinha uma relação estreita com o sinciciotrofoblasto (Fig. 3B).

Neste período de gestação a organização da subplacenta em forma de lamelas citotrofoblásticas que envolvem projeções de tecido mesenquimal torna-se clara. Esta conformação torna os lóbulos subplacentários evidentes, e neste período, estes são compostos por sincício ocupando as regiões centrais e citotrofoblasto envolvendo o sincício (Fig. 3C). O citotrofoblasto demonstrou um aumento na complexidade de suas lamelas, que em alguns pontos invadiam o tecido placentário por meio de evaginações. O citoplasma do citotrofoblasto era levemente basófilo e com uma pequena quantidade de grânulos, sendo seus núcleos basais e arredondados, com característica basófila e, na maioria das vezes, com o nucléolo evidente, observando-se, ainda, a presença de figuras de mitose. Já o sincício possuía citoplasma eosinofílico com vacúolos e núcleos arredondados. Chama a atenção neste período gestacional, o íntimo contato do sincício com os vasos de origem fetal recobertos por endotélio (Fig. 3E).

No 45º dia da gestação, a subplacenta do preá começa a apresentar sinais de degeneração e de diminuição da sua atividade celular, notadas especialmente pela redução das figuras de mitose e pela presença de núcleos picnóticos no sinciciotrofoblasto (Fig. 3F, G).

O Sinciciotrofoblasto ocupa um maior espaço e é notável sua maior quantidade quando comparado ao citotrofoblasto. Os vacúolos característicos do sincício apresentaram-se maiores e em maior número (Fig. 3G). As lacunas de origem materna resumiam-se a resquícios apresentando gotículas de exocitose em sua luz e em alguns pontos observava-se uma grande proximidade destas estruturas com os vasos fetais (Fig. 3K, L). Quanto ao trofoblasto celular, este apresentava-se em muitos pontos como monocamadas e com certo grau de desorganização (Fig. 3F). Seu comportamento periférico, nas proximidades da placenta principal ainda se mantinha, no entanto, não eram visualizados sinais de invasão do disco principal por parte do trofoblasto subplacentário. Entretanto as conformações que lembram lóbulos continuavam presentes até este período da gestação.

Em toda esta fase o sinciciotrofoblasto também manteve-se PAS-positivo (Fig. 3D, H), no entanto as lacunas não possuíam esta característica e o trofoblasto demonstrou uma brusca queda em sua atividade proliferativa (Fig. 3I, J) (Fig. 2A, B).

Terço final da gestação

Com a gestação chegando a termo, neste caso aos 53 e 55 dias, torna-se evidente a diminuição da área ocupada pelo tecido subplacentário em relação à placenta principal, assim como é notório o elevado grau de deterioração deste órgão. Além de sua evidente degeneração, a subplacenta apresenta, neste estágio, um aspecto de desorganização em todo seu tecido e esta condição, é demonstrada pelo que se observa nas duas populações de células trofoblásticas que compõem a maior parte do tecido subplacentário (Fig. 4A).

O citotrofoblasto é em sua maior parte reduzido a monocamadas (Fig. 4B) que em alguns pontos são descontinuadas e expõem os vasos fetais ao sincício, além disso, figuras de mitose são dificilmente observadas e as células apresentam grande quantidade de vacúolos. Por sua vez, o sinciotrofoblasto encontra-se disperso, sem morfologia aparente, com vacúolos ainda presentes (Fig. 4G) e com sinais de apoptose facilmente visualizados, especialmente os núcleos picnóticos (Fig. 4C, H). Outra característica marcante deste tecido no final da gestação é a presença de uma grande quantidade de tecido amorfo que o permeia (Fig. 4C).

Na região entre a placenta principal e a subplacenta o tecido conjuntivo permeado por vasos fetais ainda pode ser observado, no entanto, nas margens da subplacenta o tecido conjuntivo está ausente e os tecidos da subplacenta e placenta principal passam a manter um contato direto nesta região, sendo que a placenta principal também entra em contato com o tecido materno. Já a zona juncional permanece como um tecido amorfo onde não são mais observadas células gigantes (Fig. 4D).

Durante este período verificou-se uma grande quantidade de tecido amorfo PAS-positivo invadindo o tecido subplacentário (Fig. 4E) e a atividade proliferativa era praticamente nula (Fig. 4F) (Fig. 2A, B).

DISCUSSÃO

Os histricomorfos são roedores extremamente adaptados ao ecossistema brasileiro e de grande importância biológica em seus habitats, dessa maneira o conhecimento sobre sua biologia reprodutiva é de fundamental importância para geração de novos modelos animais, para que se esclareçam questões que envolvem sua própria biodiversidade e biologia da reprodução. A discussão acerca da filogenia destes animais em relação a seus análogos africanos cresce e a maioria dos estudos que buscam a elucidação deste problema levam em conta caracteres placentários sinapomórficos que nos histricomorfos estão ligados a subplacenta (HUCHON; DOUZERY, 2001; HUCHON ET al. 2002; MESS, 2007).

O entendimento da organização estrutural dos anexos placentários, em especial a subplacenta, é importante neste grupo de animais. Além disto, a compreensão a respeito do desenvolvimento dessas estrutura durante o período gestacional pode esclarecer importantes questões. Neste contexto Mess (2007) após descrever a subplacenta do degu e do *petromus* conclui que a subplacenta é homóloga a de outros roedores histricomorfos estudados, confirmando a homogeneidade destes animais. Para isto a autora comparou a semelhança de dezenove caracteres e somente o correspondente à presença ou ausência deste órgão ao termo da gestação não foi possível de se confirmar, devido à escassez de dados nesta fase da gestação. Dessa forma, considerando a semelhança nas outras dezoito características a autora afirma que a subplacenta surgiu antes da separação dos continentes, África e América do sul.

Os resultados obtidos para o preá aos 15 dias de gestação assemelham-se ao relatado por Davies, Dempsey e Amoroso (1961) descrevendo a subplacenta do porquinho da índia, onde a subplacenta trata-se de uma monocamada citotrofoblástica dobrada e com sincício vacuolado. Ressalta-se que podiam ser observadas figuras de mitose na região próxima à camada citotrofoblástica, concordando com o descrito por Bonatelli et al (2005) descrevendo a placentação da paca e por Mess (2007) descrevendo a subplacenta do degu, onde a autora caracteriza a cromatina das células neste estágio como dispersa. Evidencia-se também a presença de vasos maternos com o endotélio destruído e com revestimento trofoblástico concordando com o descrito por Kanashiro et al (2009) estudando o crescimento e desenvolvimento da placenta da capivara e por Oliveira et al (2012) descrevendo a subplacenta do punaré em estudo acerca da placentação desta espécie.

De acordo Bosco et al (2007) estudando a placentação do degu, a partir do tecido subplacentário surge um grupo celular denominado trofoblasto extrasubplacentário que emerge da subplacenta e marcham em direção a decídua atuando nos processos de invasão da mesma forma que o trofoblasto extraviloso age nos humanos. Estas células são para Mess (2007) estudando a subplacenta da mesma espécie, excrecências sinciciais ou células trofoblásticas gigantes que surgem a partir da subplacenta. Além disto para Carter e Mess (2013) discutindo acerca da evolução da placentação nos roedores

caviomorfos, o processo invasivo no início da placentação destes animais se dá por células trofoblásticas invasivas oriundas da subplacenta.

No preá aos 15 dias de gestação observou-se que a medida que o sincício afastava-se da camada citotrofoblástica porções de sinciciotrofoblasto confluíam em direção ao tecido materno e podiam ser visualizadas células trofoblásticas gigantes. Esta condição foi relatada por Oliveira et al (2008) estudando a placentação do preá, ressaltando que estas células estão presentes principalmente no início da gestação sendo raras próximo ao fim. Com o observado pode-se dizer que estes grupos celulares participam ativamente nos processos de invasão e estabelecimento da placentação do preá.

Estudando a subplacenta o degu em um estágio análogo aos 23 dias de gestação do preá, Mess (2007) descreve que uma forma mais complexa de dobras de trofoblasto está presente na face materna da escavação central, representando um estágio de desenvolvimento mais avançado da subplacenta, no entanto está permanecendo como uma estrutura contínua à placenta principal. Este órgão representa, para a autora, a ponta da lança do disco placentário triangular, que caminha em direção à zona de juncional. A subplacenta subdivide-se em lóbulos que possuem citotrofoblasto proeminente e constituído por multicamadas, enquanto que o sincício está diretamente relacionado aos canais de sangue materno. No preá a subplacenta comportou-se de forma semelhante no que diz respeito ao trofoblasto, todavia, não foi observada continuidade entre o tecido placentário e o subplacentário. Da mesma forma estes dados divergiram do relatado por Davies, Dempsey e Amoroso (1961), descrevendo a subplacenta do porquinho da Índia em idade gestacional análoga a esta, onde os autores destacam a grande quantidade de vacúolos presentes no sincício e a diminuição da característica invasiva da subplacenta. No entanto, Oliveira et al (2012) relatam que, em uma fase de gestação que pode ser comparada aos 23 dias de gestação no preá, a subplacenta do punaré era um órgão distinto e proeminente, assim como o observado neste estudo.

Para Davies, Dempsey e Amoroso (1961), Mess (2007) e Oliveira et al (2012), o citotrofoblasto nesta fase da gestação caracteriza-se por apresentar um número considerável de camadas e apresentar-se com uma grande quantidade de dobras. No preá estas células organizaram-se em camadas, no entanto, estas estavam dispostas de forma concêntrica que eram envolvidas por células que pareciam estar em transição e uma tênue membrana basal. A quantidade de sinciciotrofoblasto em relação ao citotrofoblasto nesta fase da gestação é bastante discreta e esta intimamente ligada às regiões onde ocorrem lacunas com sangue materno, onde estas células organizam-se em agregados filiformes (MESS, 2007; OLIVEIRA et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2012). Esta organização do sinciciotrofoblasto é condizente com o que ocorre no preá nesta fase da gestação.

Para Davies, Dempsey e Amoroso (1961) o caráter invasivo do tecido subplacentário começa a diminuir neste período que para ele vai até os 25 dias de gestação no porquinho da Índia, enquanto que para Mess (2007) tanto células trofoblásticas gigantes como sincício invasivo ainda estão presentes nesta fase. No preá as células trofoblásticas gigantes estavam presentes em considerável quantidade concordando com o descrito por Oliveira et al (2008). Kanashiro et al (2009) descrevendo placentação da capivara relata que neste estágio da gestação a zona juncional entre a subplacenta e a decídua possui células trofoblásticas gigantes e flâmulas de trofoblasto sincicial e o processo de destruição das paredes dos vasos maternos havia iniciado. Da mesma forma Oliveira et al (2012) relata a presença das células trofoblásticas gigantes e flâmulas sinciciais na zona juncional no punaré. No preá esta zona não mostrou-se bem definida neste estágio da gestação.

Aos 30 dias de gestação a subplacenta caracteriza-se como uma estrutura lamelar com eixos de tecido mesenquimal, revestido por camadas citotrofoblásticas dando o aspecto lobulado à subplacenta e no centro do lóbulo estava presente o sinciciotrofoblasto, assim como o descrito por Oliveira (2004) para o mocó. Esta característica lamelar também é encontrada em outros roedores histricomorfos tais como, o porquinho da Índia descrito por Davies, Dempsey e Amoroso (1961), na cutia descrita por Rodrigues et al (2006) o octodon degu e o *Petromus typicus* (MESS, 2007), na capivara (KANASHIRO et al, 2009) e no punaré (OLIVEIRA ET al, 2012).

Para Mess (2007) a subplacenta do degu neste estágio da gestação permanece como uma estrutura contínua ao tecido placentário, de forma oposta a autora relata que no *Petromus typicus* estas duas estruturas são separadas por um tecido conjuntivo de origem mesenquimal. No preá aos trinta dias de gestação a subplacenta encontrava-se separada da placenta principal da mesma forma que o descrito para o *Petromus typicus*. No entanto, é importante evidenciar que nas margens da subplacenta do preá haviam pontos onde o tecido subplacentário tocava a placenta principal e nestes pontos notava-se citotrofoblasto da subplacenta adentrando no disco placentário.

Para Davies, Dempsey e Amoroso (1961) a subplacenta apresenta grande aumento na quantidade e complexidade das camadas citotrofoblásticas e o sinciciotrofoblasto é mais compacto com aumento da vacuolização a medida que aproximava-se da decídua. Da mesma forma Mess (2007) descrevendo a subplacenta do degu e do *Petromus typicus*, relata este órgão em ambas as espécies como uma estrutura

sólida e proeminente que está em adiantado processo de desenvolvimento. Além disto Kanashiro et al (2009) estudando a placentação da capivara afirma que esta estrutura está totalmente desenvolvida no terço médio da gestação. A subplacenta do preá no terço médio da gestação (30 dias) organiza-se de acordo com o citado pelos autores.

As células citotrofoblásticas são apontadas por Kliman (2000) como células indiferenciadas da placenta, com alto poder proliferativo, e fonte de outras células trofoblásticas em placentas de roedores como a capivara (KAUFMANN, 2004). No preá destaca-se que neste período da gestação ocorre um evidente aumento na quantidade de sinciotrofoblasto subplacentário e consequente diminuição do citotrofoblasto em relação à fase gestacional anterior. Davies, Dempsey e Amoroso (1961) destacam esta condição na subplacenta do porquinho da Índia citando que devido conversão de citotrofoblasto em sincício as camadas de trofoblasto celular reduzem-se a apenas uma camada em alguns pontos. Processo também relatado por Rodrigues et al (2006) descrevendo a subplacenta da cutia.

O suprimento sanguíneo da subplacenta é inicialmente de origem materna por meio das lacunas, no entanto com o avançar da gestação a circulação fetal estabelece-se e a capilarização do mesênquima fetal torna-se evidente (MESS, 2007; OLIVEIRA et al, 2012). No preá os vasos fetais podiam ser facilmente observados no mesênquima fetal e envoltos por citotrofoblasto, porém aos trinta dias de gestação observou-se que devido a diminuição das camadas citotrofoblásticas estes vasos relacionavam-se com o sinciotrofoblasto e com lacunas maternas que assim como descreve Oliveira et al (2012), estudando a placentação do punaré, são na maioria de natureza irregular.

No terço médio da gestação de acordo com Kanashiro et al (2009) em estudo com a placentação da capivara a zona juncional era constituída por células trofoblásticas grandes e pequenas, células trofoblásticas gigantes e flâmulas de sinciotrofoblasto, além disso Para Oliveira et al (2012) estas células estão presentes nesta região até o terço médio da gestação. No preá pode-se observar estas células aos 30 dias de gestação o que corresponde ao terço médio da gestação. Fato este também observado no degu e no *Petromus typicus* (MESS, 2007).

A partir dos 45 dias da gestação do preá notava-se claramente os sinais de degeneração no tecido subplacentário. Para Rodrigues ET al (2006) descrevendo a subplacenta da cutia e Kanashiro ET al (2009) estudando a placentação da capivara em uma idade gestacional análoga aos 45 dias no preá o citotrofoblasto da subplacenta resume-se na maior parte em monocamadas e o citoplasma do sincício contem grandes espaços conferindo a ele uma aparência fragmentada. Do mesmo modo Bonatelli et al (2005) relatou que na paca a subplacenta torna-se mais compacta em relação ao seu tamanho e sofre degeneração. No preá assim como o citado para as outras espécies também é evidente este processo de degeneração o citotrofoblasto também se organiza em monocamadas e o sincício também possui a aparência fragmentada.

Além disso, concordado com o descrito por Davies, Dempsey e Amoroso (1961), nota-se uma evidente escassez de figuras de mitose, o aparecimento de núcleos picnóticos e a escassez de células trofoblásticas gigantes. Esta diminuição nas células gigantes é relatada por Oliveira et al (2008) estudando a placentação do preá, onde os autores classificam como rara a presença destas células neste período da gestação.

Nesta fase da gestação Oliveira et al (2008) relata que a subplacenta do preá apresenta-se reduzida e apenas resquícios de seu tecido podem ser encontrados. Enquanto que Mess (2007) afirma que a subplacenta do *Petromus typicus* está reduzida a massas amorfas e restos celulares e que não possui vascularização.

Neste estudo observou-se um elevado grau de degeneração da subplacenta, no entanto, estes resultados assemelharam-se mais ao descrito por Mess (2007) para o degu onde há uma intensa substituição do trofoblasto celular como sincicial por massas de tecido amorfo e detritos oriundos especialmente da elevada quantidade de morte celular.

O grau degeneração mostrou-se bastante variável, pois assim como relata Davies, Dempsey e Amoroso (1961), ainda era possível visualizar camadas de citotrofoblasto que em alguns pontos mostravam-se descontinuas e ilhotas de sinciotrofoblasto podiam ser observadas. No entanto a maior parte do trofoblasto foi substituído por material amorfo com aspecto e consistência semelhante ao presente na região de contato entre a subplacenta e o tecido materno assim como relata Bonatelli (2005) descrevendo a subplacenta da paca.

O sinciotrofoblasto destaca-se por ser PAS-positivo (DAVIES; DEMPSEY e AMOROSO, 1961; RODRIGUES et al, 2006; KANASHIRO et al, 2009), o que para Oliveira et al (2008) indica a presença de carboidratos como glicogênio e mucopolissacarídeos, assim como, glicoproteínas e proteoglicanos. E de acordo com Oliveira et al (2012) isto está relacionado a atividades de glicolização no citoplasma sincicial.

Rodrigues et al (2005) descrevendo a subplacenta da cutia e Bonatelli et al (2005) descrevendo a subplacenta relatam que além do sinciotrofoblasto apresentar-se PAS-positivo o citotrofoblasto

apresentou reação fraca ou ausente enquanto que a massa amorfa que entremeia o sincício apresenta intensa reação. Do mesmo modo Kanashiro et al (2009) relata uma forte reação ao ácido periódico de Shiff.

No preá o sinciciotrofoblasto reagiu positivamente ao PAS durante todas as fases da gestação que foram avaliadas assim como descreve Davies, Dempsey e Amorosa (1961) estudando a subplacenta do porquinho da Índia. Além disto concordando com os mesmos autores com esta reação nota-se claramente o aumento do trofoblasto sincicial com o avançar da gestação.

Alem do sinciciotrofoblasto o material contido nas lacunas também foi PAS positivo o que para Mess (2003) trata-se de parte de seu produto de secreção, como, a produção de uma proteína ligante concentradora de progesterona. Os aspectos ultra-estruturais dessas células não indicam polarização que determine uma possível secreção. A interposição de duas ou mais camadas de citotrofoblasto entre o sincício e o leito vascular fetal, presente no eixo das lamelas, não condiz com a eficiência esperada de tecidos epiteliais, notadamente endócrinos, encontrados em outros órgãos.

De acordo com Rodrigues (2005) as reações imunohistoquímicas para vimentina e citoqueratina, atestam que os vasos sanguíneos localizados na subplacenta, são de origem fetal e seu revestimento endotelial permanece íntegro. Para a autora ao analisar os resultados para estas imunoreações a vascularização intra-subplacentária é exclusivamente fetal.

No preá lacunas maternas foram observadas desde os 15 dias de gestação e os vasos fetais foram visualizados com o auxílio da imunorreação à vimentina a partir do 23º dia de gestação permanecendo até a proximidade do termo da gestação, de forma análoga Oliveira et al (2008) estudando a placentação do preá relatam que no inicio da gestação a vascularização subplacentária possui vasos fetais e lacunas contendo sangue materno e a partir do terço médio da gestação as lacunas passam a ser obstruídas por detritos e a irrigação deste órgão passa a ser exclusivamente fetal. No entanto no final da gestação, entre o 53º e o 55º dia, mesmo mantendo seu revestimento endotelial intacto os vasos fetais pareciam transportar somente um material amorfo, concordando com o descrito por Mess (2007) para o degu em final de gestação onde a autora informa que a subplacenta desta espécie neste estágio é avascular.

Segundo o que descreve Bonatelli (2005) e Rodrigues (2005) a capilarização no interior da subplacenta acompanha o eixo de tecido mesenquimal e dirige-se para vasos venosos. Para Mess (2007) a capilarização na subplacenta do degu torna-se evidente ainda no terço inicial da gestação e esta totalmente estabelecida no terço médio do mesmo modo a autora descreve que no *Petromus typicus* a capilarização está completada no terço médio da gestação, os vasos fetais são de origem alantoideana e estão situados entre os lóbulos com uma íntima relação com o trofoblasto celular. Este padrão de capilarização foi também observado por Oliveira et al (2012) descrevendo a subplacenta do punaré, onde os autores afirmam que nos estágios iniciais do desenvolvimento subplacentário, esta estrutura faz contato com canais de sangue de origem materna, em fases posteriores a vascularização fetal inicia seu estabelecimento e os dois sistemas materno e fetal permanecem presentes até o terço médio da gestação, a partir deste momento as lacunas maternas passam por um processo de degeneração e a vascularização torna-se exclusivamente fetal. Da mesma forma que o descrito por estes autores para estas espécies de caviões, observa-se que no preá a capilarização inicia-se aos 23 dias de gestação e esta totalmente estabelecida aos 30 dias de gestação onde também inicia a degeneração das lacunas maternas e no final da gestação a vascularização é restrita ao sistema fetal.

Alem disso, Bonatelli (2005) discutindo acerca da vascularização subplacentária da paca destaca que a rede capilar fetal que se direciona aos vasos venosos pode atuar trazendo produtos do metabolismo das células subplacentárias que, antes de seu retorno ao feto por meio do ramo venoso do funículo umbilical, devem ser depurados e oxigenados. Enquanto que no porquinho da Índia Kaufmann (2004) relata que a vascularização da subplacenta ocorre através de uma artéria central que se capilariza na subplacenta e retorna em ramos de vasos venosos que confluem com os ramos venosos oriundos da placenta principal e direciona-se diretamente ao cordão umbilical. Com os resultados obtidos neste estudo não foi possível identificar de forma mais detalhada como ocorre a vascularização subplacentária, no entanto a presença de um grande vaso fetal na região central da subplacenta foi observada aos 30 dias de gestação, levando a crer que a vascularização subplacentária do preá assemelha-se ao descrito por Kauffman (2004) para o porquinho da Índia.

Outro aspecto que foi observado nos resultados da imunorreação, neste caso, para citoqueratina foi a evidente diminuição da população citotrofoblástica durante o decorrer da gestação, assim como, a notória degeneração das duas populações celulares (cito e sinciciotrofoblasto) no final da gestação. Fato este observado no próprio preá por Oliveira et al (2008) e em outras espécies de caviões como a paca (BONATELLI et al, 2005), a cutia (RODRIGUES et al, 2006), O degu e o *Petromus typicus* (MESS, 2007), a capivara (KANASHIRO et al, 2009) e o punaré (OLIVEIRA et al, 2012).

A proliferação celular do tecido subplacentário do preá foi avaliada em todas as idades gestacionais e por dois métodos, a reação imunocitoquímica ao PCNA e pela técnica de impregnação por prata das regiões organizadoras de nucléolo argirofílicas (AgNORs).

O PCNA é uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta e sua expressão está relacionada com o estado proliferativo das células, sendo assim a imunorreação a este antígeno altamente correlacionado a métodos quantitativos da proliferação celular (DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998). Enquanto que de acordo com VanDiest, Brugal e Baak (1998) as NORs (regiões organizadoras de nucléolos) são segmentos de DNA associados a nucléolos e que contêm códigos genéticos para DNA ribossomal, ademais os autores afirmam que estas regiões estão diretamente relacionadas a síntese proteica e que podem ser utilizadas para avaliação da cinética celular, uma vez que, quanto mais rápido dividem-se as células maior a síntese de proteínas.

Segundo Zheng et al (2002) estudando a taxa de expressão do PCNA e a contagem por núcleo de NORs em carcinomas de células escamosas na região da laringe e da hipofaringe, estes dois métodos possuem grande correlação e que o estudo da proliferação celular com o uso desta técnica pode ser utilizado como meio de predição de malignidade e prognóstico para pacientes com as neoplasias estudadas.

Kliman (2000) chama o trofoblasto celular de células tronco da placenta, atribuindo a estas células a origem dos demais tipos celulares que compõem este órgão. Concordando com esta afirmação Davies, Dempsey e Amoroso (1961) relatam que na subplacenta o sinciotrofoblasto surge a partir do citotrofoblasto e a atividade proliferativa deste órgão encontra-se em seu máximo no terço médio da gestação, Bonatelli (2005) pondera que na paca tomando como base a intensa reação positiva do citotrofoblasto subplacentário ao PCNA estas células contribuem para o crescimento e desenvolvimento desta estrutura, mas não do próprio citotrofoblasto que é convertido principalmente em sincício que embora de maneira menos intensa também reage positivamente. Do mesmo modo o citotrofoblasto foi descrito como sendo PCNA positivo em várias espécies de caviões como a cutia (RODRIGUES, 2005), no próprio preá especialmente no terço médio da gestação (OLIVEIRA et al, 2008), na capivara nos terços inicial e médio da gestação (KANASHIRO et al, 2009) e no punaré (OLIVEIRA et al, 2012) com comportamento semelhante ao observado para a capivara.

Neste estudo a imunorreação ao PCNA demonstrou através do índice mitótico que a subplacenta possui atividade proliferativa desde as fases iniciais da gestação até a fase final, sendo o maior índice aos 15 dias, enquanto que no final da gestação aos 55 dias este torna-se mínimo. Estes resultados corroboram com os descritos na capivara (KANASHIRO et al, 2009) e no punaré (OLIVEIRA et al, 2012), no entanto as fases finais não são abordadas quanto a este aspecto. Da mesma maneira é fato que assim como descrevem Oliveira et al (2008), o trofoblasto celular é altamente proliferativo no terço médio da gestação, porém os autores não relatam esta característica no início e final da gestação. Já comparando ao que argumentaram Davies, Dempsey e Amoroso (1961) para o porquinho da Índia os resultados obtidos para a subplacenta do preá divergem no ponto em os autores afirmam que o máximo da atividade proliferativa desta espécie se dá no terço médio da gestação.

A respeito dos resultados para a contagem de NORs no preá estes mostraram grande semelhança ao que se observou para a imunorreação ao PCNA, com seu máximo no início da gestação e mínimo com a aproximação do termo gestacional, dessa maneira é possível afirmar que além de uma maior proporção de células esta se dividindo, estas também dividem-se com maior velocidade. Comparações em relação aos dados para a contagem de NORs não são possíveis de serem feitas, pois a literatura com a utilização desta técnica em animais que possuam subplacenta é escassa ou inexistente. No entanto a semelhança entre os resultados do teste para o PCNA e o AgNOR também é relatada em trabalhos com a proliferação celular em tecidos neoplásicos (VANDIEST; BRUGAL; BAAK, 1998; ZHENG et al, 2002; GUPTA et al, 2013).

Referencias

- Lara, M. C., Patton, J. L., & da Silva, M. N. F. 1996. The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(2), 403-413.
- Brandt, J.F. (1835) *Mammalium rodentium exoticorum novorum vel minus rite cognitorum musei academici zoologici descriptions et icones*. Mémoires de L'Académie Impériale des Sciences de Saint Petersburg, ser. 6 (tome III), pt. 2, 358-442 +17 pls.
- Doutt, J. K. Two new mammals from South America. *Journal of Mammalogy*, v. 19, n. 1, p. 100-101, 1938.

- Moojen, J. 1952. Os roedores do Brasil. Ministerio de Educação e Saúde, Instituto Nacional do Livro.
- Mess, A. 2003. Evolutionary Transformations of Chorioallantoic Placental Characters in Rodentia With Special Reference to Hystricognath Species. *Journal of Experimental Zoology*. v. 299, p. 78-98.
- Rodrigues, R. F., Carter, A. M., Ambrosio, C. E., Dos Santos, T. C., & Miglino, M. A. 2006. The subplacenta of the red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* L). *Reprod Biol Endocrinol*, 4(1), 31.
- Davies, J.; Dempsey, E. W. & Amoroso, E. C. 1961. The subplacenta of the guinea-pig: development, histology and histochemistry. *J. Anat.*, v. 95, n. Pt 4, p. 457.
- Mess, A., Zaki, N., Kadyrov, M., Korr, H., & Kaufmann, P. (2007). Caviomorph placentation as a model for trophoblast invasion. *Placenta*, 28(11), 1234-1238.
- Mess, A. (2007). The subplacenta in *Octodon degus* and *Petromus typicus*—two hystricognath rodents without significant placental lobulation. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 308(2), 172-188.
- Zheng, M., Tian, X., Li, H., Cheng, Y., & Chen, X. 2002. Expression of PCNA and the count of AgNOR in squamous cell carcinoma of larynx and hypopharynx. *Lin chuang er bi yan hou ke za zhi*= *Journal of clinical otorhinolaryngology*, 16(12), 653-655.
- Gupta, S., Misra, S., Goyal, M., Kumar, V., & Chaturvedi, A. 2014. Prognostic significance of AgNOR Proliferative Index in gallbladder carcinoma-A potential alternative to frozen section analysis. *J Liver*, 3(143), 2167-0889.
- Van Diest, P. J., Brugal, G., & Baak, J. P. 1998. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *Journal of clinical pathology*, 51(10), 716.
- Oliveira, M. F., Favaron, P. O., Ambrósio, C. E., Miglino, M. A., & Mess, A. M. 2012. Chorioallantoic and Yolk Sac Placentation in *Thrichomys laurentius* (Echimyidae) and the Evolution of Hystricognath Rodents. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 318:13–25.
- Kanashiro, C., Santos, T. C., Miglino, M. A., Mess, A. M., & Carter, A. M. 2009. Growth and development of the placenta in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Reprod Biol Endocrinol*, 7(57), 1-13.
- Bonatelli, M., Carter, A. M., Machado, M. R. F., Oliveira, M. F., De Lima, M. C., & Miglino, M. A. 2005. Placentation in the paca (*Agouti paca* L). *Reprod Biol Endocrinol*, 3(9).
- Kliman, H. J. 2000. Uteroplacental blood flow: the story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. *The American journal of pathology*, 157(6), 1759.
- VAN DIEST, Paul J.; BRUGAL, Gerard; BAAK, J. P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *Journal of clinical pathology*, v. 51, n. 10, p. 716, 1998
- OLIVEIRA, M. F., MESS, A., AMBRÓSIO, C. E., DANTAS, C. A., FAVARON, P. O., & MIGLINO, M. A. Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). *Reprod Biol Endocrinol*, 6, 39, 2008.
- RODRIGUES, R. F. Caracterização morfológica da subplacenta em cutia (*Dasyprocta leporina*). 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- KLIMAN, H. J. 2000. Uteroplacental blood flow: the story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. *The American journal of pathology*, 157(6), 1759.
- BONATELLI, M. A subplacenta da paca (*Agouti paca*, Linnaeus 1766). 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- KAUFMANN, P. Capybara – *Hydrochaeris hydrochaeris*. In: BENIRSCHKE, K. Comparative Placentation. 2004. Disponível em: <http://medicine.ucsd.edu/cpa/capyfs.htm>. Acesso em 17 nov.2013.
- OLIVEIRA, M. F. (2004). Placentação em mocós, *Kerodon rupestris* Wied, 1820. *Biota Neotropica*, 5(1).
- CARTER, A. M., MESS, A. M. 2013. Conservation of placentation during the tertiary radiation of mammals in south America. *Journal of morphology*, 274(5), 557-569.
- BOSCO, C., BUFFET, C., BELLO, M. A., RODRIGO, R., GUTIERREZ, M., GARCÍA, G. 2007. Placentation in the degu (*Octodon degus*): Analogies with extrasubplacental trophoblast and human extravillous trophoblast. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 475-485.
- HUCHON, D., DOUZERY, E. J. (2001). From the Old World to the New World: a molecular chronicle of the phylogeny and biogeography of hystricognath rodents. *Molecular phylogenetics and evolution*, 20(2), 238-251
- HUCHON, D., MADSEN, O., SIBBALD, M. J., AMENT, K., STANHOPE, M. J., CATZEFLIS, F. Douzery, E. J. (2002). Rodent phylogeny and a timescale for the evolution of Glires: evidence from an extensive taxon sampling using three nuclear genes. *Molecular Biology and Evolution*, 19(7), 1053-1065.

- Fig. 1. Subplacenta do preá no terço inicial da gestação. Em A: Visão panorâmica da subplacenta evidenciando sua monocamada de citotrofoblasto (Ct) envolta por tecido sincicial (St) que participa dos processo de invasão do tecido materno e da destruição e substituição do endotélio dos vasos deciduais, pode-se também observar a presença de grandes lacunas maternas (LM) nas margens da estrutura, além da presença do endoderma visceral (EV). Barra, 200 µm. Em B: observar a relação da camada citotrofoblástica (Ct) com o tecido sincicial (St) e a presença de vasos maternos com o endotélio substituído marcados pela cabeça de seta (>). Barra, 50 µm. Observar em C, o sinciciotrofoblasto (St) PAS-positivo aos 15 dias de gestação, enquanto o citotrofoblasto (Ct) não reage. Barra, 50 µm. Em D: Observar eletrofotomicrografia com a presença de duas lacunas aos 15 dias de gestação, nas quais pode-se observar a presença de microvilosidades (>) consideravelmente alongadas e hemácias em sua luz. Em E: notar a relação de justaposição da placenta principal (PP) e a subplacenta (SP). Barra, 50 µm. Em F: a relação entre o tecido subplacentário (SP) e a decídua basal (DB), onde ainda não há uma zona juncional bem definida e esta região assume aspecto desorganizado com tecido subplacentário adentrando profundamente na decídua. Barra, 50 µm. Em G: reação PAS-positiva no sinciciotrofoblasto (St) e nas lacunas maternas aos 23 dias de gestação, perceber ainda reação negativa no citotrofoblasto (Ct) e a íntima relação entre o sincício e as lacunas. Barra, 50 µm. Em H: Fotomicrografia de uma célula trofoblástica gigante (Cg), caracterizada por apresentar multinucleações (N), cromatina dispendosa e espessamento da membrana citoplasmática indicado pela seta (>).
- Fig. 2. Atividade proliferativa da subplacenta do preá durante as fases gestacionais. Em A: gráfico do índice mitótico nas diferentes fases gestacionais. Em B: gráfico da média de AgNORs por célula durante a gestação do preá.
- Fig. 3. Subplacenta do preá no terço médio da gestação. Em A: Observar a presença de um tecido conjuntivo frouxo entre a margem subplacentária composta por citotrofoblasto (Ct) com sincício (St) na região mais central e a placenta principal, e contem vasos de origem fetal (VF) Barra, 50 µm. Em B: fotomicrografia da zona juncional demonstrando sua característica de tecido amorfo com a presença de células gigantes (→). Em C: notar a organização dos lóbulos subplacentário nesta fase da gestação, com sincício (St) no centro e citotrofoblasto (Ct) em sua periferia. Barra, 200 µm. Em D: notar aos 30 dias de gestação a reação PAS-positiva no sincício (St) e negativa no trofoblasto celular (Ct). Barra, 50 µm. Em E: Observar o citotrofoblasto (Ct) com citoplasma finamente granular, cromatina em grumos e espaços intracelulares, e o sinciciotrofoblasto com citoplasma grosseiramente granular, com vacúolos e mais eletrodense que o citoplasma citotrofoblástico, notar ainda a presença de um vaso fetal com endotélio intacto. Em F: relação das camadas citotrofoblásticas (Ct) com o sincício (St) aos 45 dias, notar a manutenção do aspecto lobulado. Barra, 50 µm. Em G: Aos 45 dias perceber as características de degeneração do trofoblasto sincicial, como a grande quantidade de vacúolos (V) e a presença de núcleos picnóticos (→) evidenciando a presença de morte celular neste tecido. Barra, 50 µm. Em H: novamente a reação PAS-positiva no Sincício (St) aos 45 dias de gestação, perceber a maior quantidade de vacúolos no citoplasma sincicial nesta idade. Barra, 50 µm. Em I e J: Observar reação ao PCNA aos 30 e 45 dias respectivamente, notar também a notável diminuição do número de núcleos marcados. Barra, 50 µm. Em K: Lacuna materna aos 30 dias de gestação, observar a diminuição das microvilosidades em sua luz e a presença de material amorfo de diferente aspecto, quando comparado as idade anteriores, em sua luz. Em D: notar a evidente degeneração das vilosidades aos 45 dias de gestação.
- Fig. 4. Subplacenta do preá no terço final da gestação. Observar em A, grande quantidade de tecido conjuntivo evidenciado pela técnica do tricrômio de Gomori. Barra, 50 µm. Em B e C: Observar os sinais de degeneração do tecido subplacentário, Perceber a descontinuidade do citotrofoblasto (Ct) que envolve algumas ilhotas de sincício (St) e a grande quantidade de núcleos picnóticos (*). Barra, 50 µm. Em D: região onde situava-se a zona juncional composta em sua maior parte por tecido amorfo eosinofílico e presença de núcleos picnóticos. Barra, 20 µm. Em E: neste período devido a degeneração do tecido subplacentário, surge uma grande quantidade de tecido amorfo PAS positivo e que possui núcleos picnóticos (→). Barra 50 µm. Em F: reação ao PCNA praticamente ausente. Barra 50 µm. Em G: observar uma ilhota de sinciciotrofoblasto com seus núcleos (N) aglomerados e rodeada por tecido em degeneração com vacúolos (V). Em H: notar o avançado grau de degeneração do tecido subplacentário evidenciado principalmente pelos sinais de morte celular (*).
- Fig. 5. Reação imunohistoquímica à vimentina nas diferentes idades gestacionais. Em A: reação positiva na subplacenta aos 23 dias de gestação, notar que o endotélio da rede capilar fetal é bem demarcado neste estágio e caracteriza-se pela proximidade com as lacunas maternas que não são

marcados pela reação, e em B, controle negativo para a mesma idade gestacional. Barra 50 μ m. Em C: reação positiva do endotélio fetal aos 30 dias de gestação, notar a grande proximidade entre o vaso fetal e o sinciotrofoblasto (St) e em D, o controle negativo aos 30 dias de gestação. Barra 20 μ m. Em E: reação positiva aos 45 dias de gestação, observar que nesta fase da gestação a maior parte do tecido nas proximidades do vaso fetal trata-se de sinciotrofoblasto (St) e em F, o controle negativo para esta fase. Barra, 20 μ m. Em G: observa-se tecido subplacentário aos 55 dias de gestação, a desorganização e deterioração do tecido é evidente, no entanto, vasos com endotélio intacto e preenchidos por material amorfo podem ser visualizados, e em H, temos o controle negativo para esta idade gestacional. Barra, 20 μ m. Fonte Acervo do autor.

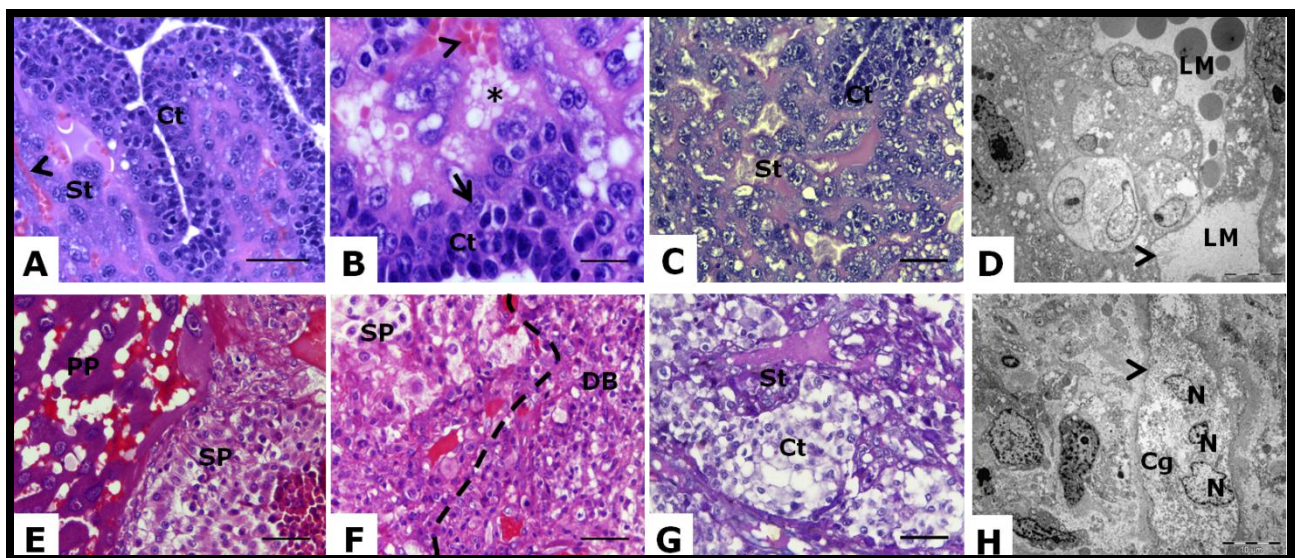


Figura 1.

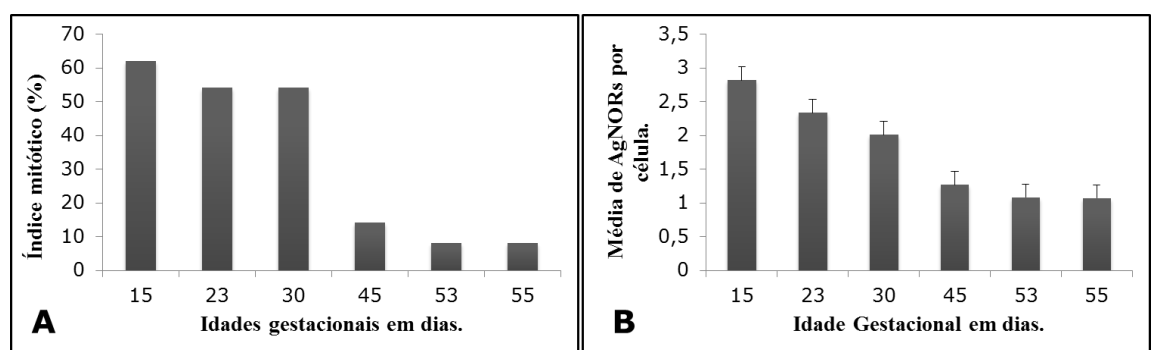


Figura 2.

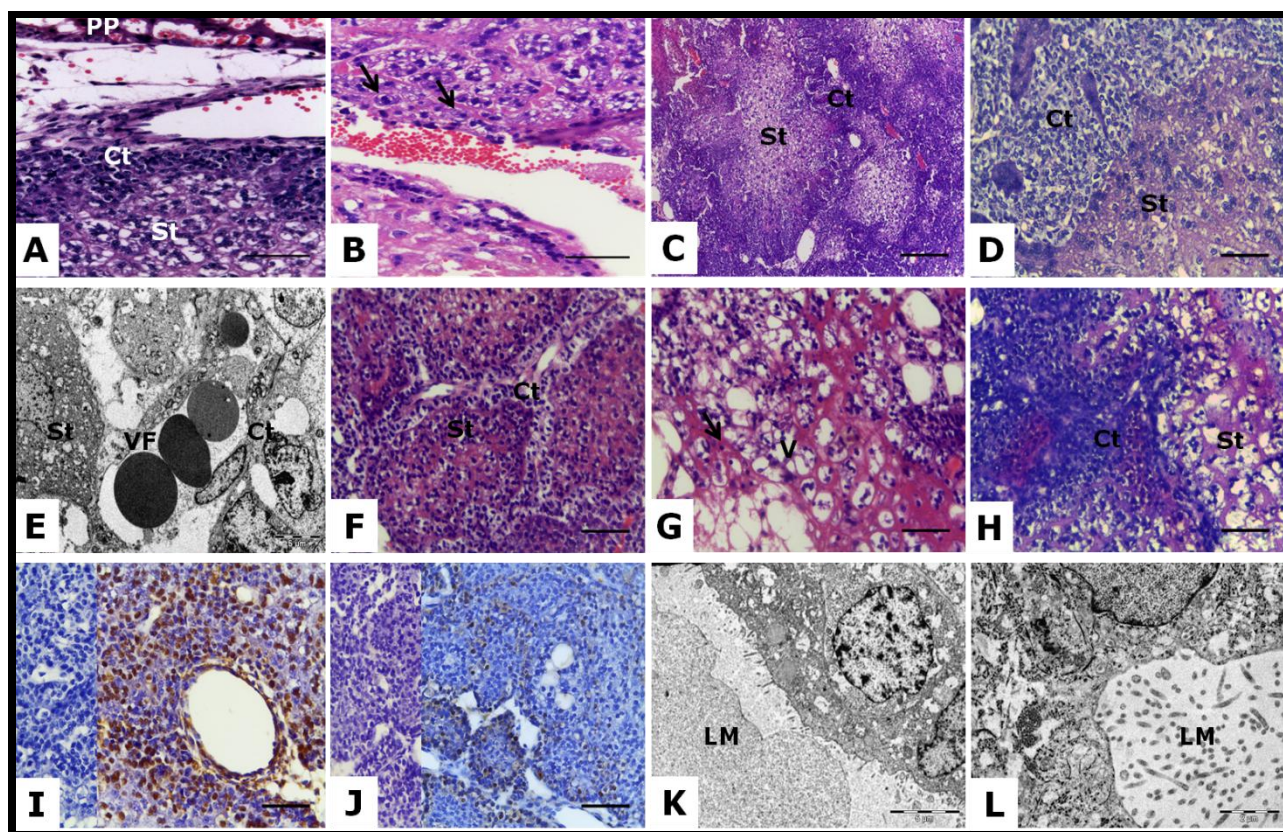


Figura 3.

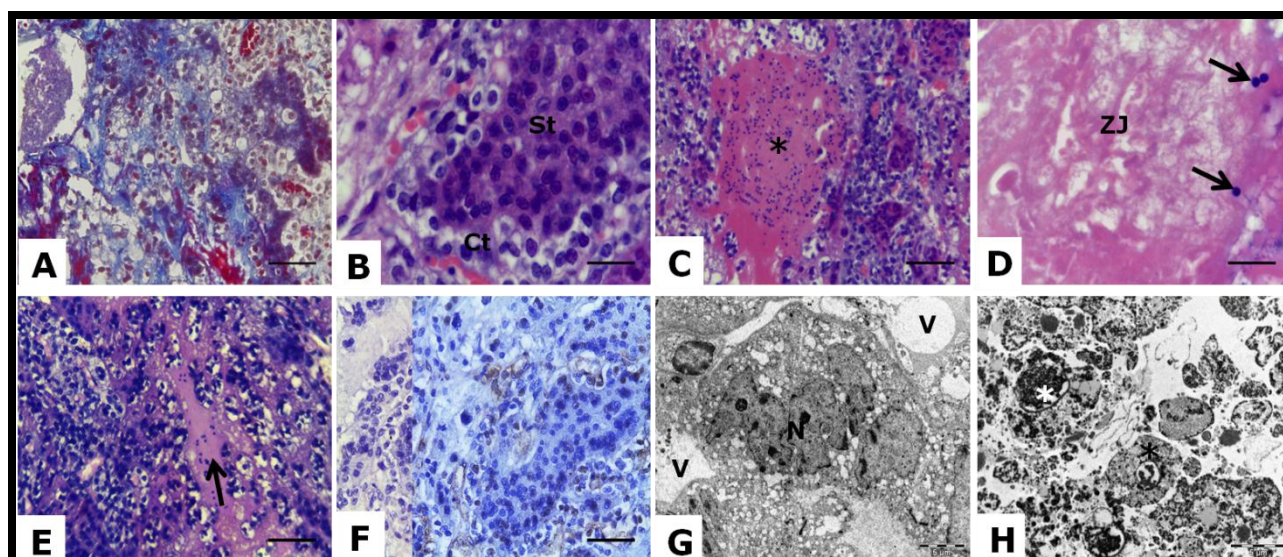


Figura 4.

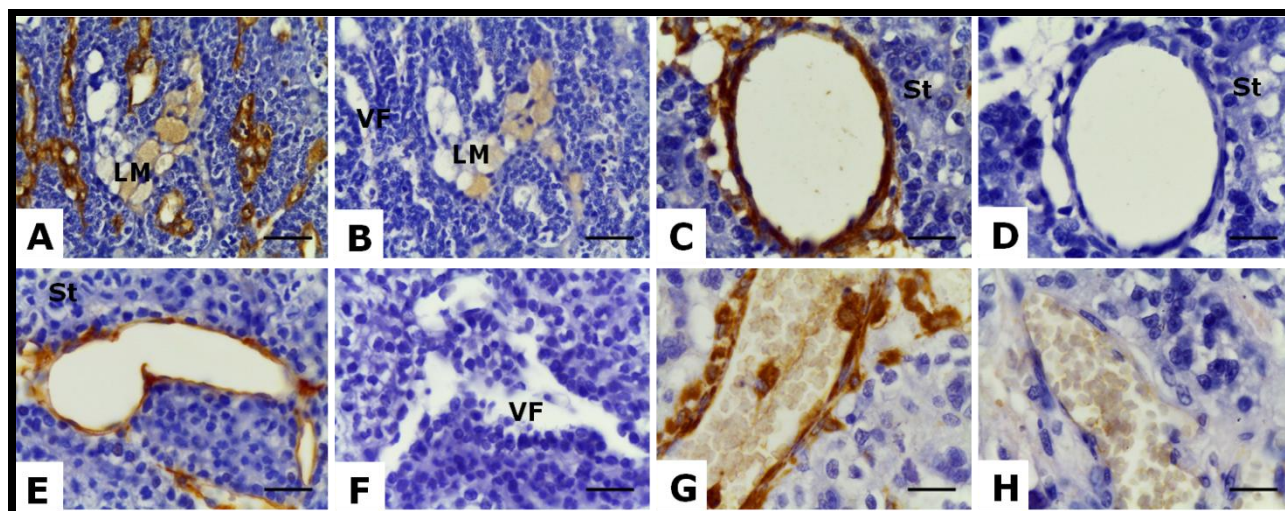


Figura 5.

ANEXO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 35231-1	Data da Emissão: 30/07/2012 16:07
Dados do titular	
Nome: MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA	CPF: 325.949.504-59
Título do Projeto: A SUBPLACENTA DO PREÁ, (<i>Galea spixii</i> , 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	Coleta de material para desenvolvimento de tese de mestrado na Pós-Graduação em Ciência Animal	08/2012	08/2013
2	Processamento do material coletado	09/2012	02/2013

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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.

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 exime 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 IBAMA nº 154/2007 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). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
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 e o material biológico coletado apreendido 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.

Outras ressalvas

1	o pesquisador deverá obter parecer favorável do comitê de ética da instituição a qual está vinculado e portá-lo juntamente com esta autorização. O planejamento e execução das atividades de contenção (física e química) e de coleta de material biológico em cativeiro são de responsabilidade da equipe técnica do mantenedor e devem ser acordadas previamente com os executores do projeto.
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Ferdinando Vinicius Fernandes Bezerra	Membro	068.828.364-00	001918977 SSP-RN	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MOSSORO	RN	Universidade Federal Rural do Semi-Árido	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 154/2007. 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: 92821879



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 35231-1	Data da Emissão: 30/07/2012 16:07
Dados do titular	
Nome: MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA	CPF: 325.949.504-59
Título do Projeto: A SUBPLACENTA DO PREÁ, (<i>Galea spixii</i> , Wagler, 1831)	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Galea spixii

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Fragmento de tecido/órgão, Outras amostras biológicas(Botões gestacionais para coleta de material placentário)
---	--	--

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 nº154/2007. 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: 92821879

Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 35231-1	Data da Emissão: 30/07/2012 16:07
Dados do titular	
Nome: MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA	CPF: 325.949.504-59
Título do Projeto: A SUBPLACENTA DO PREÁ, (<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 nº154/2007, 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 nº154/2007. 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: 92821879



Página 3/3