

## HISTOMORFOMETRIA MICROCOTILEDONAR PLACENTÁRIA NA RAÇA CRIOLA – DADOS PRELIMINARES.

GIOVANNA DA SILVA THIER<sup>1</sup>; GABRIELA CASTRO DA SILVA<sup>2</sup>; BRUNA DA ROSA CURCIO<sup>3</sup>; RAFAELA AMESTOY DE OLIVEIRA<sup>2</sup>; NICOLE BENTO FUNK<sup>2</sup>; CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – UFPel, *ghsthier@gmail.com*

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas, UFPel – *gabicastrovini@gmail.com*

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas, UFPel – *cewnogueira@gmail.com*

### 1. INTRODUÇÃO

Na espécie equina a placenta é classificada como epiteliocorial, difusa, microcotiledonária e adecídua (ABD-ELNAEIM, et al. 2006). Esta classificação ocorre uma vez que na égua por volta do 40º dia de gestação se desenvolvem os microcotilédones, fundamentais na função de trocas gasosas e metabólicas durante o período de vida intrauterino (WILSHER & ALLEN, 2002). Alterações no desenvolvimento microcotiledonário ou a destruição dos mesmos, resultam no comprometimento das trocas entre a mãe e o feto, implicando em risco a gestação. (MACPHERSON, 2006)

Técnicas de microscopia óptica, microscopia eletrônica e de estereologia já foram descritas para avaliação microcotiledonária da placenta (FERREIRA, 2011). Como descrito por Veronesi et al, 2010, em equinos, a estereologia tornou-se uma ferramenta extremamente útil para descrição morfológica quantitativa de tecidos e órgãos, permitindo a avaliação da composição estrutural tridimensional e do arranjo espacial de tecidos biológicos de seções bidimensionais.

Informações do ano de 2022 demonstram que o Brasil possui um total de 460 mil exemplares da raça Criola, sendo a maioria no Rio Grande do Sul (ABCCC, 2022). Tendo em vista a grande importância da raça Criola e a falta de literatura com informações específicas sobre a placentação nessa raça, este trabalho tem como objetivo descrever as características microcotiledonárias de placentas sadias de éguas Criolas

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizadas informações das placentas de 29 éguas Criolas com idade de  $8,5 \pm 0,7$  anos. Essas oriundas do plantel do Centro de Ensino e Experimentação em Equinocultura da Palma (CEEP), da Universidade Federal de Pelotas, e uma propriedade particular do município de Rio Grande-RS, durante 3 temporadas reprodutivas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFPel, sob o número 32594-2020.

Todas as éguas foram mantidas em piquetes de observação diária até o momento do parto. Imediatamente após a expulsão das membranas fetais, eram realizadas as pesagens e registro do tempo para a sua eliminação em minutos. Posteriormente, as membranas eram colocadas em um formato “F” para avaliação macroscópica, conforme descrito por Schlafer (2004). A superfície coriônica e alantóideana eram examinadas quanto a macroscopia. Cortes histológicos (espessura de 3 µm), fixados em formalina, foram montados em lâminas de vidro e

corados com hematoxilina e eosina. As lâminas de todas as porções corno gravídico, corno não gravídico e corpo uterino foram avaliadas usando microscopia óptica para analisar a estereotipia.

A avaliação histomorfométrica dos microcotilédones do corioalantoide foi realizada para todas as éguas. Imagens digitalizadas foram obtidas a partir dos segmentos do corpo uterino e do corno gravídico e não gravídico com o auxílio de uma câmera de alta resolução Olympus DP72 na Olympus BX51 (Olympus América, Center Valley, PA) microscópio. Em seguida, as imagens digitais foram processadas usando o software de código aberto NIH ImageJ (US National Institute of Health).

A histomorfometria foi realizada na área microcotiledonaria. As imagens foram avaliadas em cores RGB com o total de pixels calibrados para  $\mu\text{m}$ . As quantificações da área / campo microcotiledonário e capilar foram realizadas com a macro “Color Threshold”, e a faixa de cores foi ajustada pela escala RGB. Diferenças na intensidade da cor foram analisadas através do método de absorção diferencial. A área de campo (ampliação de 100x) para aquisição de imagens digitalizadas foi de  $158 \mu\text{m}^2$ . Realizada a mensuração a partir de 10 imagens de cada porção avaliada do tecido placentário.

Para a análise estatística foi realizado teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos dados. Por não possuírem distribuição normal foi realizada análise de Kruskal Wallis one-way e teste de Dunn como post-hoc. Os resultados estão apresentados como mediana e interquartis.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado como resultado na avaliação de 29 placentas sadias da raça Crioula diferenças na área microcotiledonária das estruturas placentárias conforme a tabela 1:

**Tabela 1:** Área de microcotilédones ( $\mu\text{m}^2$ ) de placentas saudáveis da raça Crioula (Mediana  $\pm$  interquartis, n=29).

Regiões da placenta	Mediana (interquartil)		
Corno Gravídico	47700 <sup>A</sup>	42950	50650
Corno não Gravídico	30680 <sup>B</sup>	29500	31630
Corpo Uterino	31110 <sup>B</sup>	29720	34100

<sup>A,B</sup> Letras diferentes na coluna indicam diferença entre as regiões da placenta ( $p < 0,05$ )

O Corno Gravídico apresentou uma maior área microcotiledonaria comparado ao Corno não gravídico e o corpo uterino. Esse resultado era esperado,

visto que já foi descrito na raça PSI. Em Puro Sangue Inglês (PSI) a área microcotiledonária foi evidenciada, o Corno não Gravídico apresentou a maior média de área microcotiledonária ( $51556 \pm 1380,5 \mu\text{m}^2$ ), seguida pelo Corpo Uterino ( $45897 \pm 1172,2 \mu\text{m}^2$ ) e Corno Gravídico ( $45065 \pm 1276,8 \mu\text{m}^2$ ) (PAZINATO et al., 2016).

Diferenças no padrão histológico também são descritas conforme as regiões placentárias, sendo o corno não gravídico apresenta vilos mais longos e ramificados, quando comparado ao corno gravídico e o corpo uterino (SAMUEL, et al. 1974). Conforme Allen, et al. (2002), os microcotiledones são consideravelmente maiores e mais densamente compactados no corno não gravídico, enquanto no corpo uterino e no corno gravídico eles são menores, devido ao maior estiramento do corpo uterino e do corno gravídico durante o crescimento do feto.

A análise digital se mostrou efetiva e confiável para avaliação da área microcotiledonar. A imagem da placenta oferece uma diferença entre as peças de interesse, a vilosidade fica em primeiro plano, enquanto o espaço interviloso fica em segundo plano, sendo muito eficaz na separação dos dois elementos. Além da avaliação histológica e macroscópica, esta avaliação morfométrica das estruturas placentárias pode ser utilizada como instrumentos precisos para a obtenção de informações quantitativas tridimensionais de estruturas microscópicas, baseadas nas observações feitas nos cortes histológicos. Dentre os softwares para análise de imagens, ImageJ caracteriza-se por ser um programa seguro, sendo muito utilizado na área de patologia (HELMY & ABDELAZIM, 2012).

Esse método de análise placenta é bem estipulado por Higgins, et al. (2011) para avaliar a relação entre o feto e a mãe em humanos e foi descrita em equinos por Veronesi e colaboradores, (2010). Ressaltando a importância da análise, pois a saúde e o crescimento fetal são diretamente influenciados pelo desenvolvimento e função placentária (MACDONALD, 2000), demonstrando a relevância do presente estudo de avaliação de parâmetro microcotiledonário das placentas em éguas da raça Crioula.

#### 4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a porção da placenta correspondente ao corno gravídico apresenta maior área de microcotilédones em comparação as outras porções avaliadas. Além disso, foi possível descrever as áreas microcotiledonárias nas porções de corno não gravídico e corpo uterino em placentas a termo de éguas crioulas saudáveis.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELNAEIM MMM, LEISER R, WILSHER S, ALLEN WR: Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. **Placenta** v. 27, p. 1103–1113, 2006.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; TURNBULL, C.; STEWART, F.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D.; FOWDEN, A. L. Influence of maternal size on placental, fetal

and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. **Reproduction**. v. 123, p. 445- 453, 2002

Associação Brasileira de Criadores de Cavalos. Regulamento do Registro Genealógico da Raça Crioula. Disponível em: <https://www.cavalocrioulo.org.br/noticias/detalhes/136931/registro-genealogicodara-raca-equina-crioula-e-atualizado>. Acesso em: 11 de agosto de 2023 FERREIRA, A. A.; KRAUSE, C. I.; COSTA, M. H.; RIVERO, E. R. C.; TARQUÍNIO, S. B. C. An image processing software applied to oral pathology. **Pathology – Research and Practice**. v. 207, p. 232-235, 2011

HELMY, I. M.; ABDEL-AZIM, A. M. Efficacy of ImageJ in the assessment of apoptosis. **Diagnostic Pathology**. Disponível em: <http://www.diagnosticpathology.org/content/1/9/19>, v. 7, n. 15, p. 1-6, 2012.

HIGGINS M.; FELLE P.; MOONEY EE.; BANNIGAN J.; MCAULIFFE FM. Stereology of the placenta in type 1 and type 2 diabetes. **Placenta**; v. 32, p. 564–569, 2011

MACDONALD, A.A.; CHAVATTE P.; FOWDEN A.L. Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (*Equus caballus*) in the latter half of gestation. **Placenta**, v.21, p. 565–574, 2000.

MACPHERSON, M. L. Diagnosis and treatment of equine placentitis. **Vet Clin Equine**. v. 22, p. 763-766, 2006

PAZINATO FM.; CURCIO BR.; FERNANDES CG.;FEIJÓ LS.; SCHMITH RA.; NOGUEIRA CEW. Histological features of the placenta and their relation to the gross and data from Thoroughbred mares. **Pesq. Vet. Bras**. v. 36(7), p.665-670, 2016.

SAMUEL, C. A.; ALLEN, W. R.; STEVEN, H. D. Studies on the equine placenta. I. Development of the microcotyledons. **J. Reprod. Fert**. v. 41, p. 441-445, 1974.

SCHLAFER, D. H. Postmortem examination of the equine placenta, fetus, and neonate: Methods and interpretation of findings. **Proceedings of the American Association on Equine Practitioners**. v. 50, p. 144-161, 2004.

VERONESI MC.; VILLANI M.; WILSHER S.; CONTRI A.; CARLUCCIO A. A comparative stereological study of the term placenta in the donkey, pony and Thoroughbred. **Theriogenology**. v. 74(4), p. 627-631, 2010.

WILSHER S.; ALLEN W. The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. **Equine Vet. J**. v.35, p. 476- 483, 2003.