



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

FERDINANDO VINÍCIUS FERNANDES BEZERRA

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA PLACENTA E NO OVÁRIO DE PREÁS
(*Galea spixii* Wagler, 1832) AOS 30 DIAS DE GESTAÇÃO SUBMETIDOS A
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ILUMINAÇÃO.**

MOSSORÓ-RN
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

FERDINANDO VINÍCIUS FERNANDES BEZERRA

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA PLACENTA E NO OVÁRIO DE PREÁS
(*Galea spixii* Wagler, 1832) AOS 30 DIAS DE GESTAÇÃO SUBMETIDOS A
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ILUMINAÇÃO.**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-Árido
como requisito para obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de
Oliveira

MOSSORÓ-RN
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

B574a Bezerra, Ferdinando Vinícius Fernandes .
Alterações morfológicas da placenta e no
ovário de preás submetidos a diferentes
condições de iluminação. / Ferdinando Vinícius
Fernandes Bezerra. - 2018.
95 f. : il.
Orientador: Moacir Franco de Oliveira.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2018.
1. Melatonina. 2. Receptores. 3. Interlóbulo.
4. Folículos. 5. Área vascular. I. Oliveira,
Moacir Franco de, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

FERDINANDO VINÍCIUS FERNANDES BEZERRA

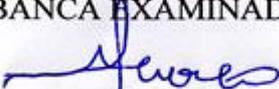
ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA PLACENTA E OVÁRIO DE PREÁS
(Galea spixii Wagler, 1832) AOS 30 DIAS DE GESTAÇÃO SUBMETIDOS A
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ILUMINAÇÃO.

Tese apresentada como requisito para obtenção
do título de Doutor em Ciência Animal pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal da Universidade Federal Rural do
Semi-Árido.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia Animal

Defendida em: 21 /02/ 2018.

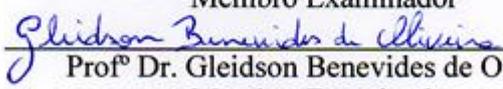
BANCA EXAMINADORA



Prof^o Dr. Moacir Franco de Oliveira (UFERSA)
Presidente



Prof^a Dra. Alessandra Fernandes Pereira (UFERSA)
Membro Examinador



Prof^o Dr. Gleidson Benevides de Oliveira
Membro Examinador



Prof^o. Dr. Danilo José Ayres de Menezes (UFRN)
Membro Examinador



Prof^o Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFERSA)
Membro Examinador



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO 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
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO 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
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

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

Dedico...



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO 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”.

A **minha esposa e filho** meus maiores refúgios nos momentos difíceis, onde sempre posso 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 tese 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.

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

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

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.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

Ao amigo **Mychel Raony Paiva Teixeira Morais**, 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 do Vale, Gelidson Benevides de Oliveira, Felipe Venceslau Câmara, Radan Elvis, Igor Renno, Hélio Norberto, Carlos Eduardo, Moisés, que nos momentos 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
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

“Sei o que é passar necessidade e sei o que é ter fartura. Aprendi o segredo de viver contente em toda e qualquer situação, seja bem alimentado, seja com fome, tendo muito, ou passando necessidade. Tudo posso Naquele que me fortalece.”

Filipenses 4:12,13



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA PLACENTA E NO OVÁRIO DE PREÁS
(*Galea spixii* Wagler, 1832) AOS 30 DIAS DE GESTAÇÃO SUBMETIDOS A
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ILUMINAÇÃO.**

BEZERRA, F. V. F. **Alterações morfológicas na placenta e no ovário de preás (*Galea spixii* Wagler, 1832) aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação.** 2018. XXXf. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2018.

RESUMO: O preá possui o corpo coberto por pêlos macios, cores variando do cinza ao marrom e são desprovidos de cauda. Os membros torácicos apresentam quatro dígitos e os pélvicos apenas três, e são curtos. Similaridades das características reprodutivas do preá com primatas superiores, os torna potenciais modelos experimentais, entre estas, o período gestacional, o tamanho da prole, o desenvolvimento dos filhotes, a placentação e a subplacenta. Em geral o ciclo reprodutivo é influenciado por mecanismos hormonais, dentre estes o regulado pela melatonina parece atuar sobre o preá, haja vista que esta espécie é tida como animal de hábito crepuscular. Assim, observando as características da espécie objetivou-se estudar a placenta, subplacenta e ovário do preá aos 30 dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação. Para isto utilizou-se 15 preás fêmeas com cópula monitorada citologia vaginal. Identificada a cópula separava-se as fêmeas em grupos, sendo um submetido a iluminação constante, chamado de grupo claro, outro submetido ao escuro constante chamado de grupo escuro e o terceiro grupo mantido em condições normais. Aos trinta dias de gestação coletava-se as placentas e os ovários que eram pesados e mensurados. As amostras eram fragmentadas fixadas por 48 h em paraformaldeído 4% em PBS 0.1M e pH 7.4, e incluídas em parafina segundo técnicas usuais. Secções de cinco micrômetros, foram coletados seriadamente e corados por HE. Pelo princípio de Cavalieri, o volume de referência foi calculado e com o auxílio de sistemas de testes de pontos e linhas, ImageJ[®] (bundled with 64-bit Java 1.6.0_24), foram calculados a densidade de volume, a densidade de superfície e a área de superfície para a placenta e para calcular a população folicular dos ovários de cada grupo experimental. Os dados foram analisados estatisticamente com uso do programa SigmaPlot (Systat Software Inc[®]) com grau de significância $p \leq 0,05$. realizou-se também imunofluorescência para receptores de melatonina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.[®]). A placenta do preá apresentou diferenças morfométricas significativas entre o grupo controle e os demais em todos os aspectos analisados. Quanto ao volume o maior foi observado no grupo controle ($5,37 \text{ cm}^3$) e o menor no grupo claro ($3,40 \text{ cm}^3$) e dentre os constituintes placentários os ligados ao interlóbulo foram mais influenciado pela ausência de luz, a subplacenta apresentou diferença no estágio de desenvolvimento entre os grupos, condição evidenciada pela diferença no volume. A área vascular apresentou aumento nos grupos claro e escuro em relação ao grupo controle, assim como a distribuição dos receptores no tecido placentário. Já os ovários apresentaram forma elipsoide, superfície lisa,



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

cor amarela. Os folículos mais abundantes foram os primordiais em todos os grupos sem diferença significativa. No entanto, os folículos antrais apresentaram o número significativamente superior no grupo escuro quando comparado aos demais grupos e a marcação para os receptores de melatonina foi mais evidente em folículos maduros e principalmente no grupo escuro. Assim, conclui-se que as diferentes condições de iluminação causam alterações morfológicas no tecido placentário e ovariano de preás e em especial a ausência de luz, influenciam na morfofisiologia do ovário.

Palavras-chave: Melatonina. Receptores. Interlóbulo. Folículos. Área vascular.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

MORPHOLOGICAL CHANGES IN PLACENTA AND OVARY OF SPIX'S YELLOW TOOTHED CAVY (*Galea spixii* Wagler, 1832) AT 30 DAYS OF GESTATION UNDER DIFFERENT LIGHTING CONDITIONS.

BEZERRA, F. V. F. **Morphological changes in placenta and female reproductive system of spix's yellow toothed cavy (*Galea spixii* wagler, 1832) at 30 days of gestation under different lighting conditions.** 2018. XXXf. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2018.

ABSTRACT: The spix's yellow toothed cavy has the body covered by soft hairs, colors ranging from gray to brown and are devoid of tail. The thoracic limbs present four digits and the pelvic limbs only three, and are short. Similarities of the reproductive characteristics of spix's yellow-toothed cavy with superior primates make them potential experimental models, among them, the gestational period, the size of the offspring, the development of the pups, the placentation and the subplacenta. In general the reproductive cycle is influenced by hormonal mechanisms, among them the one regulated by melatonin seems to act on the preá, since this species is considered like animal of twilight habit. Thus, observing the characteristics of the species, the objective was to study the placenta, subplacenta and ovary of preá at 30 days of gestation submitted to different lighting conditions. For this it was used 15 female pretas with copula monitored vaginal cytology. Once the females were identified, the females were separated into groups, one being subjected to constant lighting, called a light group, another being submitted to a constant dark called a dark group, and the third group maintained under normal conditions. The placentas and ovaries were collected at the thirty-day gestation, which were weighed and measured. The samples were fragmented fixed for 48 h in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS and pH 7.4, and embedded in paraffin according to usual techniques. Sections of five micrometers were serially collected and stained by HE. Based on the Cavalieri principle, the reference volume was calculated and, with the aid of ImageJ® (bundled with 64-bit Java 1.6.0_24) point-and-line test systems, the volume density, surface density and the surface area for the placenta and to calculate the follicular population of the ovaries of each experimental group. The data were statistically analyzed using SigmaPlot (Systat Software Inc) program with significance level $p \leq 0.05$. immunofluorescence was also performed for melatonin receptors (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). The spix's yellow-toothed cavy placenta presented significant morphometric differences between the control group and the others in all aspects analyzed. The largest volume was observed in the control group (5.37 cm³) and the lowest in the clear group (3.40 cm³) and among the placental constituents the ones connected to the interlobe were more influenced by the absence of light, the subplacenta presented difference in stage of development between groups, a condition evidenced by the difference in volume. The vascular area showed increase in the light and dark groups in relation to the control group, as well as the distribution of the receptors in the placental tissue. The ovaries had an ellipsoid shape, a smooth surface, a yellow color. The



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

most abundant follicles were the primordial in all groups with no significant difference. However, the antral follicles showed significantly higher numbers in the dark group when compared to the other groups and the marking for melatonin receptors was more evident in mature follicles and especially in the dark group. Thus, it is concluded that the different lighting conditions cause morphological changes in the placental and ovarian tissue of preas and especially the absence of light, influence the morphology of the ovary.

Keywords: Melatonin. Receptors. Interlobe. Follicles. Vascular area.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotomicrografia das alterações morfológicas da placenta de preá aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação. Em A, observa-se a organização usual dos núcleos sinciciais ([]) na região do lóbulo. Em B, tem-se o observado nos animais do grupo claro que apresentou núcleos aglomerados, evidenciados na região circunscrita. Em C, verifica-se a presença de substância eosinofílica amorfa (setas) em lacunas maternas do grupo escuro. Em D, nota-se o aspecto lobular da subplacenta (pontilhado) mais evidente no grupo escuro. Em E, observa-se, destacadas pelos asteriscos, regiões de vacuolização avançada. Em F, destaca-se pelas cabeças de seta a presença de sinais de morte celular no grupo claro. Em G, observa-se vaso fetal (VF) envolto por citotrofoblasto na região do interlóbulo. Em M relação da placenta com endoderma parietal ressaltando a presença de lacunas maternas (LM) e espongiotrofoblasto (ES). E em I, detalhe da imagem anterior identificando espongiotrofoblasto (ES amarelo) e membrana de Reichert (seta amarela).....
- Figura 2 – Fotomicrografia da placenta, subplacenta e endoderma parietal de preás com marcação fluorescente para receptores de melatonina (MT1 e MT2) submetidos a diferentes condições de iluminação. Em A, observa-se fotomicrografia da placenta dos preás pertencentes ao grupo controle (FTTC = 0,369) demonstrando a presença de receptores para melatonina distribuídos pelo tecido e em D o mapa de cor da figura A produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em B, observa-se fotomicrografia da placenta dos preás pertencentes ao grupo claro (FTTC = 0,166) evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação ao controle, e em E o mapa de cor da figura B produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em C, observa-se fotomicrografia da placenta dos preás pertencentes ao grupo escuro evidenciando marcação menos intensa neste grupo em relação tanto ao controle quanto ao grupo claro (FTTC = -0,699), e em F o mapa de cor da figura C produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em G, observa-se fotomicrografia da subplacenta dos preás pertencentes ao grupo controle (FTTC = 0,437) demonstrando a presença de receptores para melatonina distribuídos pelo tecido, e em J o mapa de cor da figura G produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em H, observa-se fotomicrografia da subplacenta dos preás pertencentes ao grupo claro (FTTC = 0,242) evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação ao



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

controle, e em K o mapa de cor da figura H produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em I, observa-se fotomicrografia da placenta dos preás pertencentes ao grupo escuro (FTTC = 0,357) evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação ao controle, no entanto menos intensa em comparação ao grupo claro, e em L o mapa de cor da figura B produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em M, observa-se fotomicrografia do endoderma parietal dos preás pertencentes ao grupo controle (FTTC = 0,245) demonstrando a presença de receptores para melatonina distribuídos pelo tecido, e em P o mapa de cor da figura M produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em N, observa-se fotomicrografia do endoderma parietal dos preás pertencentes ao grupo claro (FTTC = 0,261) evidenciando marcação levemente mais intensa neste grupo em relação ao controle, e em Q o mapa de cor da figura N produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em O, observa-se fotomicrografia do endoderma parietal dos preás pertencentes ao grupo escuro (FTTC = 0,249) evidenciando marcação que se assemelha ao controle, e em R o mapa de cor da figura O produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. As Imagens A, B, C, G, H e I foram adquiridas utilizando-se a objetiva de 40X, e as imagens M, N e O, foram adquiridas utilizando-se a objetiva de 100X.....

59

Figura 3 – Ovário de preás aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação. Em A, observa-se epitélio germinativo (seta) e túnica albugínea (colchete) ambas as estruturas não apresentaram diferença entre os grupos experimentais. Barra, 20 µm. Em B, Ovário de preá aos 30 dias de gestação do grupo escuro, nota-se a presença de folículos antrais (Asterisco) e corpo lúteo (CL). Barra, 200 µm. Em C, Ovário de preá aos 30 dias de gestação do grupo claro, observa-se folículo antral (asterisco). Barra, 200 µm. Em D, Ovário de preá aos 30 dias de gestação do grupo controle, observar folículo antral (asterisco) e corpo lúteo (CL). Barra, 200 µm.....

72

Figura 4 – Folículos ovarianos de preás aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação. Em A, observa-se aglomerado de folículos primordiais (cabeça de seta) próximo a túnica albugínea (colchete). Barra, 20 µm. Em B, folículo primário evidenciando o núcleo do oócito (N) e as células cúbicas da granulosa (seta). Barra, 20 µm. Em C, folículo secundário, destaca-se o núcleo central (N) e a



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

presença da evidente zona pelúcida (seta). Barra, 20 μm . Em D, folículo antral com núcleo evidente. Barra, 50 μm

73

Figura 5 – Fotomicrografia da reação de imunofluorescência para receptores de melatonina (MT1 e MT2) no ovário de preás aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação. Em A, observa-se fotomicrografia de folículo antral de preá pertencente ao grupo controle (FTTC = 0,369) demonstrando a presença de receptores para melatonina distribuídos no folículo, especialmente nas células da granulosa, e em D o mapa de cor da figura A produzido pelo software ImageJ®, evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em B, observa-se fotomicrografia de folículo antral de preá pertencente ao grupo claro (FTTC = 0,166) evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação ao controle, e em E o mapa de cor da figura B produzido pelo software ImageJ®, evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em C, observa-se fotomicrografia de folículo antral de preá pertencente ao grupo escuro evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação tanto ao controle quanto ao grupo claro (FTTC = -0,699), e em F o mapa de cor da figura C produzido pelo software ImageJ®, evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em G, observa-se fotomicrografia de folículo pré-antral de preá pertencente ao grupo controle (FTTC = 0,437) demonstrando a presença de receptores para melatonina, e em J o mapa de cor da figura G produzido pelo software ImageJ®, evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em H, observa-se fotomicrografia de folículo pré-antral de preá pertencente ao grupo claro (FTTC = 0,242) evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação ao controle, e em K o mapa de cor da figura H produzido pelo software ImageJ®, evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em I, observa-se fotomicrografia de folículo pré-antral de preá pertencente ao grupo escuro (FTTC = 0,357) evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação ao controle e ao grupo claro, e em L o mapa de cor da figura B produzido pelo software ImageJ®, evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em M, observa-se fotomicrografia de corpo lúteo de preá pertencente ao grupo controle (FTTC = 0,245) demonstrando a presença de receptores para melatonina nas células luteais, e em P o mapa de cor da figura M produzido pelo software ImageJ®, evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em N, observa-se fotomicrografia de corpo lúteo de preá pertencente ao grupo claro (FTTC = 0,261) evidenciando marcação de intensidade semelhante ao controle, e em Q o mapa de cor da figura N produzido pelo software ImageJ®,



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em O, observa-se fotomicrografia de corpo lúteo de preá pertencente ao grupo escuro (FTTC = 0,249) evidenciando marcação que se assemelha ao controle, e em R o mapa de cor da figura O produzido pelo software ImageJ®, evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. As Imagens A, B, C, M, N e O foram adquiridas utilizando-se a objetiva de 40X, e as imagens G, H e I, foram adquiridas utilizando-se a objetiva de 100X.....



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 – Dados morfométricos da placenta, embrião e cordão umbilical de preá aos trinta dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação.....	51
Tabela 2 – Volume da placenta do preá e seus constituintes aos trinta dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação.....	52
Tabela 3 – Densidade de volume da placenta do preá e seus constituintes, aos trinta dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação.....	53
Tabela 4 – Área de superfície e densidade de superfície da placenta do preá, e seus constituintes, aos trinta dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação.....	54
Tabela 5 – Morfometria do ovário de preá, aos trinta dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação.....	71
Tabela 6 – População folicular de preás aos trinta dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação.....	74



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
FSH	Hormônio folículo estimulante
LH	Hormônio luteinizante
V	Volume de Referencia
Vv	Densidade de Volume
Sv	Desnsidade de superfície
Sa	Área de superfície



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

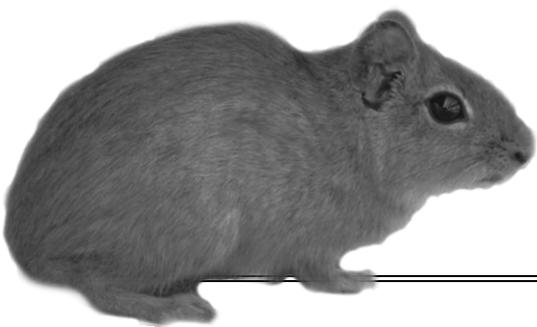
SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3	CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA.....	30
3.1	MELATONINA.....	30
3.2	CICLO CIRCADIANO.....	33
3.3	REPRODUTOR.....	34
3.4	PLACENTA.....	37
3.5	EMBRIÃO.....	40
4	CAPÍTULO 2 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA PLACENTA DE PREÁ (<i>GALEA SPIXII</i> WAGLER, 1832) AOS TRINTA DIAS DE GESTAÇÃO, SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ILUMINAÇÃO.....	44
4.1	RESUMO	44
4.2	INTRODUÇÃO.....	44
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.3.1	Animais.....	46
4.3.2	Protocolo anestésico.....	46
4.3.3	Coleta do material.....	47
4.3.4	Fluorescência.....	48
4.3.5	Volume referência da placenta (princípio de Cavalieri, 1635).....	48
4.3.6	Densidade de volume (Vv).....	49
4.3.7	Área de superfície (Sa) e Densidade de superfície (Sv).....	49
4.3.8	Análise estatística.....	50



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

4.4	RESULTADOS.....	50
4.5	DISCUSSÃO.....	60
4.6	CONCLUSÃO.....	62
4.7	REFERÊNCIAS.....	63
5	CAPÍTULO 3 – ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS NO OVÁRIO DE PREÁS (<i>GALEA SPIXII</i> WAGLER, 1831) AOS 30 DIAS DE GESTAÇÃO SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ILUMINAÇÃO.....	67
5.1	RESUMO.....	67
5.2	INTRODUÇÃO.....	67
5.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	68
5.4	RESULTADOS.....	70
5.5	DISCUSSÃO.....	77
5.6	CONCLUSÃO.....	79
5.7	REFERÊNCIAS.....	79
6	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXOS.....	93
	ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 1.....	94
	ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 2.....	95



1. Introdução;

1. INTRODUÇÃO

O preá é um roedor Histricomorfa, que se caracteriza por possuir o corpo coberto por pêlos macios e com cores variando do cinza ao marrom-claro. Especificamente o *Galea spixii*, espécie alvo deste estudo, possui coloração dorsal acinzentada, com tom brunáceo e ventre branco, presença de anel periocular de pêlos mais curtos e claros que os do dorso, são desprovidos de cauda, e os membros torácicos apresentam quatro dígitos e os membros pélvicos apresentam apenas três, respectivamente e são relativamente curtos.

Afirma-se que o preá habita 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 ocorrer em qualquer época do ano e quando em período gestacional, as fêmeas fazem seus ninhos preferencialmente em locais protegidos seja por pedras ou vegetação, em média são gerados dois filhotes por gestação, que nascem totalmente cobertos de pêlos e já apresentam os olhos abertos e com capacidade para locomoção logo após o nascimento.

As características reprodutivas do preá apresentam grande similaridade com primatas superiores, tornando estes animais potenciais modelos experimentais para estudos voltados à reprodução (OLIVEIRA et al., 2008), entre estas características cita-se o tamanho do período gestacional, o tamanho da prole e o elevado grau de desenvolvimento dos filhotes. Além disso, aspectos ligados à placentação destes animais também apresentam semelhanças com humanos, a exemplo, da barreira placentária do tipo hemomonocorial, uma vantagem em relação modelo hemotricorial dos miomorfos, e os processos de crescimento placentário e de invasão trofoblástica, que nestes indivíduos ocorre a partir de um órgão exclusivo, denominado subplacenta (MESS, 2003; RODRIGUES et al., 2006).

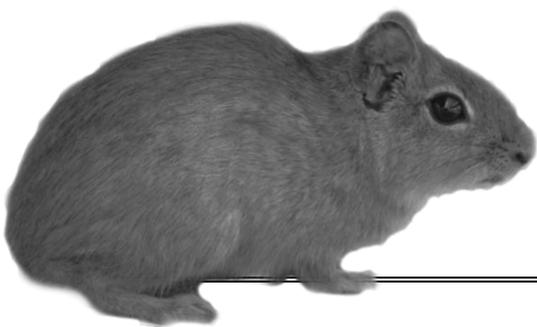
Assim como ocorre para a maioria dos mamíferos o ciclo reprodutivo do preá é influenciado por mecanismos fisiológicos e, dentre estes, mecanismos hormonais como o regulado pela melatonina parece atuar nesta espécie, haja vista que esta espécie é tida como animal de hábito crepuscular (MENDES, 1987) e que procura abrigos em locais protegidos não somente da temperatura, mas também da luz. Este hormônio, além de sua produção na glândula pineal, pode ser encontrado no trato reprodutor em locais como no fluido folicular com grande concentração nos folículos maduros sendo a produção deste nas células da granulosa e *cumulus oophorus* e em machos também pode ser detectado a sua presença nos testículos, especialmente nas células intersticiais, o q reflete uma possível autorregulação por

parte destes órgãos (COHEN et al., 1978; NILES et al., 1999; NAKAMURA et al., 2003; ITOH et al., 1997; TIJMES; PEDRAZA; VALLADARES, 1996; TINAJERO; FABBRI; DUFAU, 1992; VERA et al., 1993).

No entanto, a secreção de melatonina modulada pela iluminação tem mostrado um importante papel na reprodução dos mamíferos, tanto em animais sazonais como em animais não sazonais. Esta influência ocorre pela regulação na produção de estrógeno e progesterona, inibição da contratilidade uterina, regulação da atividade funcional e crescimento ovariano, redução do estresse oxidativo em folículos ovarianos e diminuição de gonadotrofinas que regulam a concentração de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) por extenso conforme descreve Graham *et al.*, (2004).

Da mesma forma, também se coloca que em ratas pinealectomizadas ou submetidas à iluminação constante, ocorre uma redução no número de sítios implantados, o que estaria relacionado à interferência desse hormônio no processo de ovulação de acordo com Dai *et al.*, (2008).

Sendo assim, considerando as características reprodutivas da espécie estudada, que podem ser reguladas pela melatonina, tendo em vista seus hábitos crepusculares, e as características que a tornam um possível modelo experimental para estudos voltados a placentação decidiu-se por analisar possíveis influências dos períodos de iluminação sobre o desenvolvimento placentário no *Galea spixii*, além de ainda observar o fato de que habitam em uma região onde o período luminoso é curto, quando comparado a outras regiões. Do exposto, justifica-se estudar a placenta, subplacenta, ovário e embrião do preá aos 30 dias de gestação submetidos às condições de iluminação constante e ausência de luz constante, por ser ainda 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. OBJETIVOS

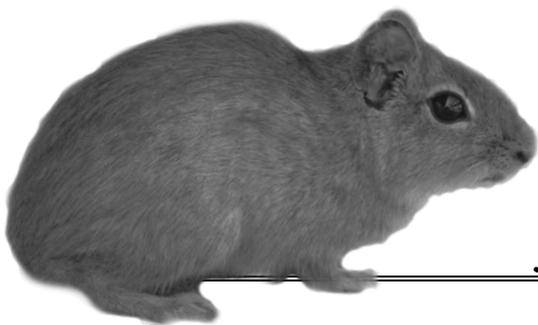
2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar morfológicamente a placenta, ovário e embrião do préa aos 30 dias de gestação submetidos à condição de iluminação e escuridão constantes e ainda as alterações no sistema reprodutor masculino e feminino nestas mesmas condições.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Considerando as condições de iluminação e o período gestacional propostas acima pretende-se:

- a) Descrever a placenta de préas;
- b) Analisar morfometricamente a placenta;
- c) Quantificar quanto a densidade de volume e a proporção volumétrica da placenta de préas;
- d) Estimar a densidade de volume da placenta e subplacenta do préa;
- e) Estimar a densidade de superfície e área de superfície da placenta e subplacenta do préa;
- f) Estimar a densidade de superfície e área de superfície da região de contato entre o tecido materno e fetal;
- g) Verificar a distribuição dos receptores de melatonina na placenta de préas
- h) Descrever o ovário de préas submetidos à condições de iluminação constante e ausência de luz constante;
- i) Avaliar morfometricamente e esteriológicamente o ovário de préas submetidos à condições de iluminação constante e ausência de luz constante;
- j) Quantificar a população ovariana;
- k) Verificar a distribuição dos receptores de melatonina no ovário de préas;
- l) Caracterizar morfológicamente e morfometricamente o embrião de préas;
- m) Verificar a distribuição dos receptores de melatonina no embrião de préas;



3. Capítulo 1: Revisão de literatura

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma pequena indolamina lipofílica sintetizada principalmente na glândula pineal que é secretada de forma circadiana, com altos níveis séricos durante os períodos de ausência de luz em todas as espécies. Nos mamíferos, incluindo o humano, o ritmo de secreção da melatonina é controlado por um ciclo circadiano endógeno induzido pelas variações de luz, estas variações são captadas interpretadas pelos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) do hipotálamo através de uma via multisináptica que transmite este sinal por meio de fibras eferentes presentes nestes núcleos nervosos simpáticos e assim comunicam-se diretamente com a glândula pineal estimulando a síntese de melatonina. Dessa forma, o período de secreção de melatonina é proporcional a duração da escuridão, e, portanto, este hormônio atua como transdutor neuroendócrino de informações acerca do fotoperíodo (REITER, 2005).

O precursor inicial da biossíntese de melatonina é um aminoácido, triptofano. Os pinealócitos absorvem o triptofano do sangue e o convertem em serotonina por hidroxilação e descarboxilação. A serotonina é então convertida em N-acetil-serotonina pela enzima N-acetiltransferase de arilalquilamina (NAT), a N-acetil-serotonina é então metilada para formar melatonina pela enzima hidroxindole-Omtiltransferase (HIOMT).

A melatonina desempenha um papel fundamental em uma variedade de fatores fisiológicos vitais à vida do animal, incluindo a regulação dos ritmos circadianos e funções ligadas a visão, a reprodução, a atividade cerebrovascular, a atividade neuroendócrina e a atividade neuroimunológica (BRZEZINSKI, 1997). Esta também tem papel fundamental nas atividades reprodutivas sazonais de diversas espécies mamíferas, incluindo a ovelha, o bisão, o ferret, o skunk, o cavalo, o hamster e ratos selvagens (REITER, 2005; ARENDT et al., 1995), podendo também, no caso da fêmea do hamster sírio, causar depressões nos níveis do hormônio folículo estimulante (FSH) o que diminui o desenvolvimento folicular desencadeando anestro nesta espécie. Da mesma forma, machos desta espécie que são submetidos a um curto período de iluminação (8h de luz e 16h de escuro) apresentam atrofia testicular e uma redução nos hormônios associados ao desenvolvimento deste órgão. Tal relação entre a melatonina e os eventos reprodutivos é confirmada quando se observa que hamsters sírios de ambos os sexos ao passarem por pinealectomia têm seus eventos reprodutivos inibidos da mesma forma que em animais submetidos a curtos períodos de

iluminação, além disso, quando administra-se a melatonina para estes animais o desenvolvimento testicular é mantido (GUNDUZ; STETSON, 2003). Dessa forma a duração do sinal diário que a melatonina transmite modula diretamente a atividade reprodutiva.

Inicialmente, os sítios de ligação para a melatonina foram classificados com base nas diferenças farmacológicas e farmacocinéticas, dando origem a dois subtipos, o ML-1 e ML-2. O sítio de ligação denominado ML-1 representa receptores de melatonina de alta afinidade. Estes receptores de alta afinidade (ML-1) são acoplados às proteínas G, uma vez que os análogos de GTP inibem a ligação de 125I-Mel de alta afinidade. Já o sítio de ligação com baixa afinidade pela melatonina denominado ML-2, foi inicialmente detectado no cérebro de hamster (DUNCAN et al., 1989). Os sítios ML-2 têm um perfil farmacológico distinto (DUBOCOVICH, 1988).

Tentativas de purificação dos receptores de membrana para a melatonina de alta afinidade foram realizadas com material a partir de várias fontes consideradas ricas em proteínas receptoras de melatonina (cérebro de lagarto, cérebro de frango, ovelha e rato PT) sendo todas mal sucedidas. O primeiro receptor de melatonina de alta afinidade purificado com sucesso foi clonado usando uma biblioteca de cDNA construída de melanóforos dérmicos de *Xenopus* e de uma estratégia de clonagem de células mamíferas que expressavam os receptores (EBISAWA et al. 1994). Este cDNA de receptor de melatonina derivado do *Xenopus* codifica uma proteína de 420 aminoácidos com sete regiões transmembranas, consistentes com a classificação deste tipo de receptor dentro da superfamília de receptores acoplados a proteína G (EBISAWA et al., 1994). A identificação de uma sequência do receptor *Xenopus* permitiu a homologia de métodos de triagem, levando à identificação subsequente de três tipos de receptores de melatonina de vertebrados (REPPERT et al. 1996).

Dois subtipos de receptores de mamíferos com alta afinidade para a melatonina foram clonados e caracterizados (REPPERT et al. 1994, 1995) e inicialmente foram denominados de receptores de melatonina Mel1a e Mel1b. Um terceiro subtipo de receptor de melatonina de alta afinidade foi clonado de uma biblioteca de cérebro de frango (REPPERT et al., 1995) e denominado subtipo Mel1c. O receptor *Xenopus* isolado primeiro é um receptor Mel1c. A comparação das sequências de receptores de várias espécies revelou que a família dos receptores de melatonina de vertebrados consiste de três subtipos (REPPERT et al., 1995). Até agora não há homólogos em mamífero para o receptor Mel1c que foi isolado, e nenhuma sequência de comprimento total está disponível para receptor Mel1b em não mamífero. Assim, da família de três subtipos de receptores de melatonina em vertebrados, apenas dois estão presentes em mamíferos.

No embrião os períodos de luz e escuridão, assim como o ritmo de produção de melatonina, aos quais a mãe está submetida influenciam diretamente o desenvolvimento da gestação, pois a melatonina induz o aumento da produção de progesterona pelas células do corpo lúteo, assim como elimina radicais oxidáveis e regula a expressão de genes antioxidantes, pró-apoptóticos e anti-apoptóticos (TAMURA et al, 2008; KORKMAZ et al, 2012), que atuam regulando a apoptose no embrião durante o período implantacional.

A melatonina apresenta importante função no desenvolvimento embrionário (DAI et al., 2008), principalmente por seus efeitos ligados a apoptose do embrião durante os processos de implantação. Estas ações estão ligadas aos genes BAX, caspase-3 e Bcl-2, onde a melatonina atua diminuindo a expressão dos dois primeiros, que são genes pró-apoptóticos e aumentando a expressão do Bcl-2 que atua de forma anti-apoptótica nas células embrionárias. Em adição há aumento nos níveis de glutathione intracelular, além do já citado papel antioxidante da melatonina reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio, melhorando os processos que antecedem a implantação, bem como promove a eficiência do processo implantacional (REITER et al., 2009; GAO et al., 2012; MOHSENI et al., 2012; WANG et al., 2013).

Durante a gestação há passagem de melatonina materna para o embrião por meio das trocas placentárias, fazendo com que o ritmo circadiano da melatonina materna esteja ligado à geração dos ritmos circadianos no feto, o que é observado principalmente na glândula adrenal fetal (SIMONNEAUX, 2011). Ligada a esta informação tem-se que a melatonina materna diminui a produção de cortisol na glândula adrenal fetal em uma espécie de macaco (TORRES-FARFAN et al., 2004) e que em ovelhas esta promove efeitos inibidores sobre as contrações das artérias cerebrais do feto, que são estimuladas pela noradrenalina hormônio, também produzido pela adrenal, que além de inibir a liberação de glicerol pelo tecido adiposo multilocular promove a redução da secreção de cortisol pela adrenal fetal (MILLER et al., 2005).

Estas variações nos níveis de melatonina na circulação materna devido às alterações no período de luz foram relatadas em ovinos (McMILLEN, 1995; YELLON, 1987) e ratos (DEGUCHI, 1975). Segundo os autores estas variações podem causar danos consideráveis ao embrião, tendo em vista que o período de implantação embrionária coincide com a expressão dos receptores de melatonina nas espécies mamíferas em geral (SHANG; ZHDANOVA, 2007), especialmente receptores como o MT1 e MT2 (DUBOCOVICH, 2007) que atuam por inibição da adenilato ciclase. O MT1 atua principalmente sobre os eventos reprodutivos, sobre o metabolismo e sobre os vasos causando vasoconstrição (SAMPAIO et al., 2012),

enquanto que o MT2 apresenta suas ações ligadas ao ciclo circadiano na pineal, a produção de dopamina na retina e a vasodilatação na circulação periférica (DUBOCOVICH, 2007).

Durante a fase fetal o ciclo circadiano do feto é totalmente estabelecido pela passagem de melatonina materna por via trans-placentária como documentado por Naitoh et al., (1998) estudando alterações maternas e fetais após pinealectomia. Neste estudo os autores verificaram que após injeção de melatonina ligada a iodo como sonda radioativa, este era verificado na circulação fetal um minuto após a injeção, demonstrando o livre transito deste metabólito pela via placentária. No mesmo estudo os pesquisadores observaram que os sítios de ligação à melatonina no feto foram afetados aumentando a densidade de sítios de ligação no núcleo supraquiasmático, no corpo estriado e na substância negra.

A comunicação dos períodos de luz durante o dia por via trans-placentária também foi documentado em hamster siberiano (*Phodopus sungorus*), tendo papel fundamental no crescimento e desenvolvimento gonadal tanto no período pré quanto pós-natal com os períodos de luz apresentando correlação indireta com o crescimento gonadal, ou seja, períodos menores de luz (10h a 12h) favorecem um maior crescimento gonadal quando comparados a períodos mais longos (14h a 16h) (WEAVER, REPERT, 1986; GUNDUZ, STETSON, 2003; SHAW, GOLDMAN, 2007).

3.2 CICLO CIRCADIANO

O controle fisiológico circadiano se origina no sistema nervoso central (SCN), no núcleo supraquiasmático, que tem um ciclo circadiano intrínseco de um pouco mais de 24 horas (SAPER, 2013; SLAT; FREEMAN; HERZOG, 2013). Porém, devido à falta de precisão o controle do ciclo circadiano durante a evolução sofreu modificações e tornou-se sincronizado pelos os níveis de variação de luz no dia.

A partir do SCN o sinal para controle do ciclo circadiano é transferido para os tecidos periféricos por meio do sistema nervoso autónomo. Na periferia, este sistema regula mudanças na fisiologia das células durante o período de 24h. Dependendo do tipo de célula, até 20% dos genes podem apresentar independência deste sistema de sincronização (AKHTAR et al., 2002; PANDA et al., 2002). Sendo assim, para que expressão dos demais genes seja ideal o ritmo circadiano deve ser regulado com precisão pelo SCN. Por isso,

quando há perturbação nos períodos de luz durante o dia, os ritmos celulares também são afetados negativamente em sua fisiologia.

Um segundo caminho pelo qual o ciclo circadiano é regulado é pela ação da melatonina derivada da glândula pineal, este ciclo é um mecanismo universal característico de todos os vertebrados (STANKOV; REITER, 1990). Presumivelmente, o controle do ciclo circadiano por um hormônio, no caso da melatonina, exige a presença de receptores. Há pelo menos dois receptores de membrana conhecidos para melatonina, MT1 e MT2, que estão amplamente distribuídos no corpo animal (TAN et al., 2012; SLOMINSKI et al., 2012); atualmente se sabe que esses receptores podem existir nas membranas de todas as células cuja atividade deva ser sincronizada pelo ciclo da melatonina. No entanto, a melatonina também afeta a fisiologia celular por processos que são independente dos receptores, quando atua como agente antioxidante (GALANO; TAN; REITER, 2013; REITER et al., 2014), de modo que os mediadores de membrana não são um requisito para a melatonina influenciar o ciclo circadiano da expressão gênica em células periféricas.

A primeira manifestação identificada do ciclo circadiano controlado pela melatonina é na fisiologia reprodutiva em referência à reprodução sazonal baseada no fotoperíodo (HOFFMAN; REITER, 1965; REITER, 1993). Em seu habitat natural, muitas espécies dependem da mudança nos elevados níveis de melatonina noturna (HOFFMAN; REITER, 1965), conforme determinado pelo tempo de duração do período noturno, para mudanças na fisiologia do eixo neuro-endócrino-reprodutivo, que por sua vez altera as funções dos órgãos reprodutivos periféricos (CARTER; GOLDMAN, 1983; REITER, 1993). Esta mensagem cíclica é essencial tanto para uma reprodução bem sucedida e para máxima fertilidade tanto de fêmeas como de machos. Hamsters privados do ritmo da melatonina por pinealectomia não respondem às mudanças sazonais do fotoperíodo (REITER, 1993). Da mesma forma, estabilizar o ciclo luz-escuro ao qual esses animais estão expostos muitas vezes permite que eles se reproduzam continuamente, assim como pode melhorar índices reprodutivos de animais não sazonais e ainda pode influenciar em características zootécnicas.

3.3 REPRODUTOR

A relação entre o fotoperíodo e a reprodução nos mamíferos é de fundamental importância na regulação de processos reprodutivos e na época de reprodução de diversas espécies. Para Heideman e Bronson (1990), especialmente estudando roedores de regiões com pouca variação dos períodos de iluminação, estes animais provavelmente evoluíram em três

direções no que diz respeito a sua relação com o fotoperíodo e a reprodução. Como primeira direção o grupo de animais fotorresponsivos que são influenciados pelos diferentes períodos de luz durante o dia para orientar seus ciclos reprodutivos. Uma segunda direção composta por animais que são fotorresponsivos, mas sua fisiologia reprodutiva não é regulada pelos diferentes períodos de luz durante o dia o que torna este grupo capaz de se reproduzir durante todo o ano e uma terceira direção onde animais em que a melatonina não apresenta influência sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e em consequência não regula processos reprodutivos.

No entanto, de maneira geral a variação nos períodos de luz no dia causa alterações morfológicas nos órgãos que compõem o sistema reprodutor de mamíferos, entre estas alterações ocorre a diminuição de tamanho das gônadas como relatado por Hoffman e Reiter (1965) para hamsters e também Carter e Goldman (1983) em estudos com o hamster (*Phodopus sungorus*), pois também relatam a alteração morfológica causada pelo excesso de suplementação de melatonina. Além disso, há a regulação do peso corporal de acordo com a variação sazonal da abundância de alimento e, que no centro de todos os processos modulados pela quantidade de luz durante o dia atua a melatonina (BARRET; BOLBERA, 2012).

A melatonina é caracterizada por ser uma pequena indolamina lipofílica sintetizada principalmente na glândula pineal e secretada de forma circadiana. Nos mamíferos o ritmo de secreção da melatonina é controlado nos núcleos supraquiasmáticos (SCN) do hipotálamo por meio de atividade neural simpática direta para a glândula pineal, estimulando assim a síntese da melatonina. O período de secreção de melatonina é proporcional à duração da escuridão e, portanto, atua como um transdutor neuroendócrino de informações fotoperiódicas (REITER, 2005).

No que diz respeito ao sistema reprodutor feminino, os níveis de melatonina no fluido folicular aumentam gradualmente à medida que o folículo aumenta. Dessa forma os pesquisadores presumem que a melatonina contribui para o desenvolvimento do oócito e reduz os danos pelo estresse oxidativo. Estes níveis elevados de melatonina, que em folículos de Graaf podem superar em até três vezes os níveis séricos, provavelmente derivam de vários sítios de síntese, sendo os mais prováveis do sangue que derivam da glândula pineal, do corpo lúteo em desenvolvimento e, além disso, a melatonina auxilia a produção de progesterona (REITER et al., 2014).

Especificamente no período da ovulação há a produção de uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio juntamente com elevada produção de prostaglandinas, citocinas e o aumento da ação de enzimas proteolíticas e da permeabilidade vascular (BRANNSTROM;

ENSKOG, 2002; RICHARDS, 2005). Observando esta situação, e a elevação nos níveis de melatonina neste período, pesquisadores têm especulado que esta é a razão pela qual se tem observado a presença de melatonina em células do cumulus oophorus e do oócito, além da participação na maturação do corpo lúteo e na produção de progesterona (TAMURA et al., 1998; AMIREAULT; DUBE, 2005; TAMURA et al., 2009; SAKAGUCHI et al., 2013;).

Itoh et al., (1997) detectou a presença da melatonina em ovário de ratas sugerindo que a melatonina presente neste órgão pode atuar regulando os eventos reprodutivos ligados ao folículo. Os autores embasam esta conclusão em três fatores: a presença de receptores de melatonina no ovário descrita nestes animais por Cohen et al., (1978), a diminuição do peso ovariano devido a períodos longos de iluminação relatado por Wurtman et al., (1963) e o aumento da produção de progesterona *in vitro* induzido pela adição de melatonina no meio de cultura como descreve Fiske et al., (1984).

Além da presença da melatonina no ovário de mamíferos, há também, receptores para este hormônio na membrana no núcleo das células foliculares, indicando que as alterações na fisiologia ovariana causadas pela melatonina provavelmente envolvem estes receptores, principalmente os de membrana (VINCENTET et al., 2010; REITER et al., 2014; TAMURA et al., 2014). Estes receptores estão distribuídos em diversos órgãos do corpo animal atuando em todo organismo e especificamente nos ovários foi relatada a presença dos receptores para melatonina nas células da granulosa e da teca, que se encontram em folículos maduros e no corpo lúteo, indicando que a melatonina atua diretamente na fisiologia do ovário (Yonei et al., 2010).

Estando localizado nestas regiões do ovário a interação da melatonina com seus receptores atuam nas funções fisiológicas destas células, ou seja, nas células da teca afeta a esteroidogênese, influenciando também a síntese de progesterona, androstenediona e estrogênio (ADRIAENS et al., 2006; TAMURA et al., 2009). Promove também o desenvolvimento folicular promovendo o aumento da produção do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) que estimula a mitose das células da granulosa (PICINATO et al., 2008).

Por outro lado, a presença da melatonina nestas estruturas também está relacionada com seu potencial antioxidante, reduzindo o acúmulo de danos oxidativos, por exemplo, em ovócitos incubados com agentes oxidantes. Tamura et al, (2008) pesquisando a ação da melatonina como antioxidante incubou folículos pré-ovulatórios de camundongos durante doze horas em uma solução contendo várias concentrações de peróxido hidrogênio (H₂O₂) e após doze horas, os oócitos contendo os primeiros corpos polares foram encontrados. Dessa

forma a presença de melatonina como antioxidante no ovário provavelmente ajuda a manter um equilíbrio essencial entre a necessidade das espécies oxigenadas e seu potencial danoso e atua como protetor das células da granulosa que originarão o corpo lúteo e produzem progesterona (TAMURA et al., 2014).

Tais efeitos antioxidantes são desempenhados de maneira indireta pela melatonina, sendo as principais vias de ação o estímulo de enzimas antioxidantes, ao mesmo em tempo que inibe enzimas pró-oxidativas (ADRIAENS et al., 2006) e influencia as concentrações de RNA mensageiro dessas proteínas sob condições fisiológicas e oxidativas (RODRIGUEZ et al., 2004). Um aspecto importante da melatonina, tanto na fisiologia endógena quanto na utilização, por exemplo, em cultura de ovócitos, é a sua natureza multifuncional e a sua distribuição por praticamente todos os órgãos do corpo animal (REITER et al., 2013).

3.4 PLACENTA

Por ser o órgão de comunicação materno-fetal e especialmente em roedores onde há uma grande intimidade entre as circulações maternas e fetais apresentando uma região de sincício capilarizado denominada labirinto, que nos roedores histricomorfos apresenta somente uma camada de tecido fetal entre as circulações materna e fetal, a placenta apresenta papel de fundamental importância no desenvolvimento de uma gestação de sucesso (FERRAZ, 2001; KANASHIRO, 2009 e 2011; FAVARON, 2009; OLIVEIRA, et al. 2008). Para este fim, o estabelecimento das estruturas placentárias principalmente a diferenciação do citotrofoblasto em sinciotrofoblasto e outros tipos celulares, estes processos são desencadeados por expressões de genes principalmente no sinciotrofoblasto e modulados endocrinamente (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961 a e b; FISHER, 1971; ODUOR-OKELO, 1984; MOSSMAN, 1987; BONATELLI et al., 2001; MESS, 2003; RODRIGUEZ et al., 2003; OLIVEIRA, et al., 2008; FAVARON, 2011).

Neste contexto, a melatonina, uma indolamina que regula o ciclo circadiano e que também desempenha diversas funções no organismo, normalmente, por meio de ligações com seus receptores (MT1 e MT2), está diretamente envolvida com o sucesso reprodutivo e dessa maneira com a placentação. Dentre suas ações a melatonina apresenta uma poderosa ação antioxidante, atua eliminando espécies reativas de oxigênio e age como um modulador tanto endócrino quanto imunológico e como agente citoprotetor (TAMURA et al., 2008). No

entanto, a síntese local de melatonina na placenta só foi comprovada recentemente, estando presente nas células trofoblásticas tanto o hormônio como seus receptores, por Lanoix et al., (2008) em estudo com placentas humanas.

Todavia, mesmo com a placenta produzindo melatonina os ciclos de luz e escuridão apresentam influencia no desenvolvimento deste órgão, podendo de acordo com Silva, Teixeira e Teixeira (2015) ao estudarem a influência da luz sobre a placenta de ratas que a iluminação constante pode acarretar em alterações tanto morfológicas quanto em alguns aspectos morfométricos como por exemplo a área do disco placentário, o que pode ocasionar redução no crescimento placentário. Os mesmos autores confirmaram que estas alterações foram devido a influência dos períodos de luz que influenciaram a produção de melatonina, pois verificaram que a administração de melatonina exógena pode reverter esta condição.

A morfogênese placentária, especialmente no que diz respeito ao estabelecimento dos diferentes tipos de trofoblasto, está diretamente ligada ao sucesso da diferenciação do citotrofoblasto em sinciotrofoblasto e seus demais subtipos, este processo ocorre por meio da fusão dos citoplasmas celulares e é geneticamente regulado para que a morte celular seja retardada, permitindo assim que as células se diferenciem em sincício, tendo em vista essa necessidade de maior tempo antes que ocorra a morte celular a ação antioxidante da melatonina contribui diretamente no desenvolvimento placentário possibilitando o cumprimento de sua principal função que é a manutenção da relação materno fetal durante o período gestacional (HUPPERTZ; KINGDOM, 2004; VAILLANCOURT et al., 2009).

Para Soliman et al (2015) estudando o papel da melatonina durante a gestação, esta indolamina apresenta papel fundamental para o bom desenvolvimento do órgão em si e da gestação como um todo e especificamente no que se refere a diferenciação trofoblástica os autores observaram que no início do processo de diferenciação a expressão do receptor MT1 apresenta um aumento, enquanto que o MT2 diminui sua expressão, o que de acordo com os autores pode representar diferente papel destes receptores durante este processo de diferenciação, além da ação antioxidante já citada.

Além das funções discutidas e de ser um demarcador do ciclo circadiano para o feto por via transplacentária, a melatonina apresenta funções protetoras nos vasos sanguíneos, impedindo o comprometimento endotelial pelo estresse oxidativo tanto em vasos sistêmicos como da placenta. O que traz consigo a associação dos níveis de melatonina na placenta e a sua associação potencial com pré-eclâmpsia, pois durante a pré-eclâmpsia grave tanto as concentrações séricas de melatonina quanto seus níveis na placenta e a expressão de seus receptores estão diminuídas (NAKAMURA et al., 2001; LANOIX et al., 2012). Outro indício

para esta correlação é a elevada produção de espécies reativas de oxigênio que contribui para a pré-eclâmpsia, e o fato de que após o parto da placenta a pré-eclâmpsia rapidamente desaparece (TAMURA et al., 2008).

Nesse contexto, o preá que apresenta hábitos crepusculares (MENDES, 1987), ou seja, possivelmente possui um ciclo reprodutivo influenciado pela variação de luz durante o dia. E tendo em vista a crescente preocupação com a poluição luminosa, além das implicações éticas que 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 como os crescentes estudos com modelos de placentação de roedores tem se tornado uma ferramenta interessante para a o conhecimento da biologia reprodutiva das espécies, favorecendo, conseqüentemente, a preservação e manutenção em cativeiro com vistas à domesticação. Adicionalmente, proporcionam 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 embrionárias 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).

Em contraste com os benefícios da prevenção da morte celular programada do citotrofoblasto, o prolongamento da meia-vida celular reduzindo a probabilidade de apoptose seria contraproducente para a organismo no caso de células cancerígenas placentárias. Várias linhagens de células de coriocarcinoma estão disponíveis para estudo, por exemplo, BeWo (LEWIS; SULLIVAN; ELDER, 1994; SAINZ et al., 2003). Essas células são frequentemente usadas como modelo para estudos com trofoblasto, porque elas se fundem para formar um sincício. Da mesma forma, elas também sintetizam melatonina e contêm seus receptores (LANOIX et al., 2008). Ao contrário do citotrofoblasto normal, células BeWo sofrem apoptose em resposta a melatonina (AMIREAULT; DUBE, 2005). Como em outras células, na placenta, as ações da melatonina são claramente específicas (SAINZ et al., 2003). Assim, a melatonina muitas vezes mata células cancerosas promovendo a morte celular programada ao

ter a ação oposta em células normais. Os mecanismos dessas ações diferenciais da melatonina em células normais e cancerígenas ainda não estão completamente claros, especialmente na placenta (BIZZARRI et al., 2013).

3.5 EMBRIÃO

No embrião os períodos de luz e escuridão, assim como o ritmo de produção de melatonina, aos quais a mãe está submetida influenciam diretamente o transcorrer da gestação, pois a melatonina induz o aumento da produção de progesterona pelas células do corpo lúteo, assim como elimina radicais oxidáveis e regula a expressão de genes antioxidantes, pró-apoptóticos e anti-apoptóticos (TAMURA et al, 2008; KORKMAZ et al, 2012).

A melatonina apresenta importante função no desenvolvimento embrionário (Dai et al., 2008), principalmente por seus efeitos ligados a apoptose do embrião durante os processos de implantação. Estas ações estão ligadas aos genes BAX, caspase-3 e Bcl-2, onde a melatonina atua diminuindo a expressão dos dois primeiros, que são genes pró-apoptóticos e aumentando a expressão do Bcl-2 que atua de forma anti-apoptótica nas células embrionárias, em adição há também aumento nos níveis de glutathiona intracelular, além do já citado papel antioxidante da melatonina reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio, melhorando os processos que antecedem a implantação, bem como promove a eficiência do processo implantacional (REITER et al., 2009; GAO et al., 2012; MOHSENI et al., 2012; WANG et al., 2013).

Há também passagem de melatonina materna para o embrião por meio das trocas placentárias, fazendo com que o ritmo circadiano da melatonina materna esteja ligado à geração dos ritmos circadianos no feto e sendo observado principalmente na glândula adrenal fetal (SIMONNEAUX, 2011). Ligada a esta informação tem-se que a melatonina materna diminui a produção de cortisol na glândula adrenal fetal do macaco capuchinho (TORRES-FARFAN et al., 2004) e que em ovelhas a melatonina apresenta efeitos inibidores sobre as contrações das artérias cerebrais do feto, que são estimuladas pela noradrenalina hormônio, também produzido pela adrenal, que além de inibir a liberação de glicerol pelo tecido adiposo multilocular promove a redução da secreção de cortisol pela adrenal fetal (MILLER et al., 2005).

Estas variações nos níveis de melatonina na circulação materna devido às alterações no período de luz foram relatadas em ovinos (McMILLEN, 1995; YELLON, 1987) e ratos (DEGUCHI, 1975). E podem causar danos consideráveis ao embrião, tendo em vista que o período de implantação embrionária coincide com a expressão dos receptores de melatonina nas espécies mamíferas em geral (SHANG; ZHDANOVA, 2007), sendo os principais receptores o MT1 e MT2 (DUBOCOVICH, 2007) ambos receptores ligados a proteína G e atuando por inibição da adenilato ciclase. o MT1 atua principalmente sobre os eventos reprodutivos, sobre o metabolismo e sobre os vasos causando vasoconstricção, este é o primeiro transcrito por volta do sétimo dia de gestação (SAMPAIO et al., 2012), enquanto que o MT2 atua nas ações ligadas ao ciclo circadiano na pineal produção de dopamina na retina e vasodilatação (DUBOCOVICH, 2007).

No que diz respeito ao papel antioxidante da melatonina durante o desenvolvimento embrionário em animais submetidos à diferentes níveis de iluminação, ressalta-se seu papel sobre o metabolismo dos lipídeos no início da gestação, pois neste período são de fundamental importância para a obtenção de energia pelo embrião, no entanto os metabólitos destas espécies químicas tornam o embrião mamífero muito susceptível ao estresse oxidativo (STURMEY et al., 2009). Tal fato é confirmado em ensaios *in vitro*, onde a produção de espécies reativas de oxigênio e sua associação com os lipídios embrionários tornam o estresse oxidativo consideravelmente maior (CHOI et al., 2008; TAMURA et al., 2012). Em relação a isto, Kang et al., 2009 observaram que em embriões de camundongo a melatonina utilizada como enriquecimento do meio de cultura melhora o desenvolvimento *in vitro* e ainda reduz o estresse oxidativo promovendo um melhor desenvolvimento inicial em embriões obtidos por fertilização *in vitro*, assim como contribui na formação dos blastocistos, favorecendo a implantação (ISHIZUKA et al., 2000; WANG et al., 2013).

Durante a fase fetal o ciclo circadiano do feto é totalmente estabelecido pela passagem de melatonina materna por via trans-placentária como documentado por Naitoh et al., (1998) estudando alterações maternas e fetais após pinealectomia. Neste estudo os autores verificaram que após injeção de melatonina ligada a iodo como sonda radioativa, este era verificado na circulação fetal um minuto após a injeção, demonstrando o livre trânsito deste metabólito pela via placentária. No mesmo estudo os pesquisadores observaram que os sítios de ligação à melatonina no feto foram afetados aumentando a densidade de sítios de ligação no núcleo supraquiasmático, no corpo estriado e na substância negra.

A comunicação dos períodos de luz durante o dia por via trans-placentária também foi documentado em hamster siberiano (*Phodopus sungorus*), tendo papel fundamental no

crescimento e desenvolvimento gonadal tanto no período pré quanto pós-natal com os períodos de luz apresentando correlação indireta com o crescimento gonadal, ou seja, períodos menores de luz (10h a 12h) favorecem um maior crescimento gonadal quando comparados a períodos mais longos (14h a 16h) (WEAVER, REPERT, 1986; GUNDUZ, STETSON, 2003; SHAW, GOLDMAN, 2007).

4. Capítulo 2: Alterações morfológicas na placenta de preá (*Galea spixii* Wagler, 1832) aos trinta dias de gestação, submetidos a diferentes condições de iluminação.



4. CAPÍTULO 2 – INTERFERÊNCIA DOS PERÍODOS DE LUZ NA PLACENTA DE PREÁ (*GALEA SPIXII* WAGLER, 1832) AOS TRINTA DIAS DE GESTAÇÃO, SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ILUMINAÇÃO.

Interferência dos períodos de luz na placenta de preá (*Galea spixii* Wagler, 1832) aos trinta dias de gestação, submetidos a diferentes condições de iluminação.

4.1 RESUMO

RESUMO: Objetivou-se descrever as alterações morfológicas da placenta de preás aos 30 dias de gestação em animais submetidos a sistemas de iluminação constante e escuridão constante. Para isto utilizou-se 15 preás fêmeas em três grupos com mesmo manejo alimentar e com cópula monitorada por meio de citologia vaginal. Identificada a cópula separava-se as fêmeas em grupos, sendo um submetido a iluminação constante, chamado de grupo claro, outro submetido ao escuro constante chamado de grupo escuro e o terceiro grupo mantido em condições normais. Atingidos os trinta dias de gestação realizava-se a coleta das placentas que eram pesadas e mensuradas. Em seguida fragmentadas para uso segundo técnicas de esterilogia eram fixados por 48 h em paraformaldeído 4% em PBS 0.1M e pH 7.4, e incluído em parafina segundo técnicas usuais. Secções de cinco micrômetros, foram coletados de forma seriada e corados pela técnica de HE. Com base no princípio de Cavalieri, o volume de referência do órgão foi calculado e a partir deste e com o auxílio de sistemas de testes de pontos e linhas, ImageJ[®] (bundled with 64-bit Java 1.6.0_24), foram calculados a densidade de volume, a densidade de superfície e a área de superfície. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com uso do programa SigmaPlot (Systat Software Inc[®]) com grau de significância $p \leq 0,05$. Além disso realizou-se imunofluorescência para receptores de melatonina por meio de protocolo disponibilizado pela Santa Cruz Biotechnology, Inc.[®]. A placenta do preá apresentou diferenças morfométricas significativas entre o grupo controle e os demais em todos os aspectos analisados. Quanto ao volume placentário o maior volume foi observado no grupo controle (5,37 cm³) e o menor no grupo claro (3,40 cm³) e dentre os constituintes placentários os ligados ao interlóbulo foi mais influenciado pela ausência de luz, a subplacenta apresentou diferença no estágio de desenvolvimento entre os grupos, condição evidenciada pela diferença no volume desta estrutura. A área vascular apresentou aumento nos grupos claro e escuro em relação ao grupo controle, assim como a distribuição dos receptores no tecido placentário. Assim, conclui-se que as diferentes condições de iluminação causam alterações morfológicas no tecido placentário de preás.

4.2. INTRODUÇÃO

Os ciclos reprodutivos de mamíferos são influenciados por mecanismos diversos fenômenos fisiológicos e, dentre estes, citam-se os mecanismos hormonais como a melatonina. A característica da produção e secreção de melatonina sinalizam se é dia ou noite

para o organismo pela alteração da concentração do hormônio na circulação e demais líquidos corpóreos, e através do seu perfil plasmático noturno, qual a estação do ano. Assim, juntamente com regiões do hipotálamo, constitui parte importante do sistema neuroendócrino que regula a organização temporal dos eventos fisiológicos e comportamentais (MARKUS et al. 2003; HISSA et al, 2008).

A secreção de melatonina tem importante papel na reprodução dos mamíferos, tanto em animais sazonais como em não sazonais, influenciando na regulação da produção de estrógeno e progesterona, inibição da contratilidade uterina, regulação da atividade funcional e crescimento ovariano, redução do estresse oxidativo em folículos ovarianos e diminuição de gonadotrofinas que regulam a concentração de FSH e LH (GRAHAM *et al.*, 2004).

Em ratas, foi relatada a presença de receptores de melatonina nos ovários e no estroma antimesometrial uterino (SOARES JR. *et al.*, 2003). Durante o decorrer do processo de decidualização do estroma uterino, os sítios de ligação ao hormônio reduzem progressivamente e se limitam ao estroma antimesometrial. Além disso, ratas pinealectomizadas ou submetidas à iluminação constante, quando acasaladas, apresentam redução no número de sítios implantados, relacionando tal efeito à interferência com o processo de ovulação (SOARES *et al.*, 2003; DAI *et al.*, 2008).

Nesse contexto, o preá, roedor pertencente a subordem Histricomorfa com hábitos crepusculares, apresenta características reprodutivas com grande similaridade com primatas superiores, tornando estes animais potenciais modelos experimentais para estudos voltados à reprodução (OLIVEIRA et al., 2008), entre estas características estão, gestação relativamente longa, pequenas ninhadas, filhotes bem desenvolvidos ao nascer (KLEIMAN; EISENBERG; MARINIAK, 1979; ROBERTS, MARINIAK; DEAL, 1984; MESS; MOHR; MARTIN, 2001; MARTIN, 2008). Além disso, aspectos ligados à placentação destes animais também apresentam semelhanças com humanos, por exemplo, a barreira placentária do tipo hemomonocorial, uma vantagem em relação modelo hemotricorial dos miomorfos, e os processos de crescimento placentário e de invasão trofoflástica, que nestes indivíduos ocorre a partir de um órgão exclusivo, denominado subplacenta (MESS, 2003; RODRIGUES et al., 2006).

Desse modo, como forma de estabelecer critérios fisiológicos acerca dos processos reprodutivos e de placentação do preá, desenvolveu-se experimentação visando verificar a influência de diferentes períodos de iluminação sobre a morfogênese placentária, associando-os a ação da melatonina, já que a secreção deste hormônio no organismo animal é modulada pelos períodos de luz e escuridão, para isto descreveu-se a morfologia da placenta de preás

aos 30 dias de gestação submetidos a sistemas de iluminação constante e escuridão constante, considerando que as condições de fotoperíodo estavam sendo modificadas.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Animais

Foram selecionadas 15 fêmeas e três machos de preás adultos em três grupos com relação macho/fêmeas de 1:5 identificando-se com tintura capilar em diferentes regiões anatômicas, que foram mantidos em recintos telados e com dimensões de 5 m² e alimentados com ração para roedores, frutos, milho e água *ad libitum*, de modo a garantir o mesmo manejo alimentar.

Após adaptação dos animais, foi realizado acompanhamento diário por meio de citologia vaginal e, quando identificada a presença de espermatozoides em esfregaço vaginal considerou-se este dia como o dia zero (d0) da gestação, sendo as fêmeas positivas direcionadas a formação dos grupo com iluminação constante (lâmpada fluorescente - PHILLIPS[®], 40W), chamado de grupo claro ou ao grupo submetido a escuro constante denominado grupo escuro. Um terceiro grupo foi mantido em condições normais de iluminação e que correspondeu ao grupo controle.

As coletas do material eram realizadas no trigésimo dia de gestação, por esse ser o terço médio da gestação e período no qual a morfologia da placenta deve estar completamente estabelecida.

4.3.2 Protocolo anestésico

Completado os 30 dias de gestação, os animais eram submetidos a jejum sólido de doze horas e líquido de seis horas, eram pesados e submetidos a procedimento anestésico. Foi administrado como medicação pré-anestésica a associação de cloridrato de xilazina (Xilazin[®] 2%, 1mg.kg⁻¹, fabricante Syntec) e cloridrato de cetamina (Quetamina[®] 10% na dose de

15mg.kg⁻¹, fabricante Vetnil) ambos IM. Estabelecida a pré-analgia (± 10 min) era administrado tiopental 1 g (Tiopental sódico® 1 g na dose de 25 mg.kg⁻¹, fabricante Richmond, División Veterinaria S.A.), IV, como fármaco indutor da anestesia. Atingido o plano anestésico, administrava-se KCl (Cloreto de potássio® 19,1% na dose de 2,56 mEq.kg⁻¹, fabricante Halexistar) também por via endovenosa. Confirmando o óbito do animal prosseguia-se com os demais procedimentos de coleta.

4.3.3 Coleta do material

Uma incisão longitudinal mediana pós-umbilical com aproximadamente 4 a 5 cm, foi realizada para retirada do útero gravídico e consequente s sacos gestacionais para coleta e análise morfométrica da placenta, embrião e cordão umbilical.

Nas placentas foram realizadas uma secção mediana paralela ao seu eixo vertical de modo a se obter duas hemiplacentas que foram fixadas por 48 h em solução de paraformaldeído 4% tamponado com solução de fosfato de sódio 0.1M e pH 7.4 e após esse período foram submetidos a técnicas de coloração para hematoxilina-eosina.

Completada as etapas de desidratação, diafanização, parafinização e emblocagem secções de cinco micrometros foram obtidas em micrótomo (LEICA RM 2125 RT) e coletadas em lâminas com base numa seleção aleatória e sistemática com um iniciador 1 a 5. Os cortes foram levados a estufa a 60 °C “overnight”, para aderência às lâminas e desparafinização. Em seguida, procedeu-se a coloração das secções pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), sendo que, previamente, estas foram submetidos a dois banhos de xilol por 10 min, reidratados em álcool 100%, 95%, 70% e em água corrente, durante três minutos em cada álcool de maneira a garantir total hidratação. As imagens foram adquiridas em microscópio acoplado a sistema capturador de imagem (Leica ICC50 HD).

4.3.4 Fluorescência

Para realização da imunofluorescência cortes de 5 μm de espessura foram aderidos a lâminas silanizadas (STAR FROST[®]) e levados a estufa a 60 °C “overnight”, após o período na estufa o material foi desparafinado em três banhos de imersão de cinco minutos cada em xilol (Xileno P.A. – ACS; DINAMICA[®]) e hidratado por meio de banhos de imersão em álcool, sendo dois banhos em álcool 100% e dois banhos em álcool 90% todos tendo a duração de quinze minutos, e em água deionizada por um minuto sob agitação. Realizada a hidratação, o excesso de líquido foi aspirado dos cortes e procedeu-se com a recuperação antigênica, que foi feita por tratamento térmico em aparelho de micro-ondas (Eletrolux[®], MEF-28) em potência máxima (60 Hz) com as lâminas imersas em tampão citrato 10 mM e pH 6.0, durante 10 min. Na sequência, com o material já em temperatura ambiente, lavou-se as lâminas por três vezes em água deionizada durante dois minutos cada lavagem para então, pós aspirar o excesso de líquido dos cortes, realizar o bloqueio das ligações inespecíficas incubando as amostras com UltraCruz[®] Blocking Reagent (sc-516214) por 30 min em câmara úmida. Passados os 30 min as lâminas eram lavadas três vezes em PBS 0.1M e pH 7.2, durante cinco minutos cada lavagem, aspirava-se o excesso de líquido dos cortes e incubava-se com o anticorpo primário (MEL-1A/B-R (B-8): sc-398788) “overnight” em câmara úmida a 4 °C. No dia seguinte, lavava-se três vezes em PBS 0.1M e pH 7.2 durante cinco minutos cada lavagem, aspirava-se o excesso de líquido e era realizada a incubação com anticorpo secundário ligado ao fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína (m-IgG κ BP-FITC: sc-516140) por uma hora em câmara úmida. Por fim, lavava-se em PBS como anteriormente descrito, as lâminas eram montadas utilizando UltraCruz[®] Mounting Medium (sc-24941) e analisadas em microscópio para fluorescência (Olympus BX51).

4.3.5 Volume referência da placenta (princípio de Cavalieri, 1635)

Cada hemiplacenta foi seccionada de forma transversal ao longo do seu eixo horizontal a uma distância entre cortes conhecida (d) de 25 μm , sendo que a primeira secção coletada era a seguinte após o primeiro corte observado. Na sequência, após confeccionadas as lâminas, eram realizadas fotomicrografias de todas as secções e sobrepostas à estas um

sistema teste de pontos com o auxílio do software analisador de imagens ImageJ[®] (bundled with 64-bit Java 1.6.0_24) para calcular a área de cada secção da placenta de modo que fosse obtido o somatório do número total de pontos que tocassem a superfície da amostra, multiplicado pela área de cada ponto corrigida com o aumento da objetiva. Assim o volume global da estrutura foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$V_{\text{placentária}} = (d \cdot \sum a) \cdot 2$$

Onde $V_{\text{placentário}}$ é o volume placentário, d é a distância conhecida entre as secções do tecido placentário, $\sum a$ é o somatório do número de pontos das secções multiplicado pela área de cada ponto já corrigido pelo aumento da objetiva e por fim o resultado da equação é multiplicado por 2, tendo em vista que as secções foram obtidas de uma hemiplacenta e considerando que a placenta do preá apresenta simetria entre suas metades utilizou-se esse artifício.

4.3.6 Densidade de volume (Vv)

Para estabelecer a densidade de volume das diferentes estruturas e regiões que compõem a placenta do preá foi utilizado um sistema de pontos sobreposto a imagem microscópica da placenta com auxílio do software analisador de imagens ImageJ[®] (bundled with 64-bit Java 1.6.0_24) e o número de pontos que tocavam as estruturas ou regiões de interesse eram contados e então pela razão entre o número de pontos contados (P_f) e o total de pontos do sistema teste (P_t) obtinha-se a densidade de volume (Vv) pela seguinte fórmula: $V_v = (P_f / P_t)$

4.3.7 Área de superfície (Sa) e Densidade de superfície (Sv);

a área de superfície dos vasos placentários foi estabelecida após ter sido definida a densidade de superfície vasos. utilizou-se um sistema teste de pontos e um de linhas, colocado sobre as imagens com auxílio do software analisador de imagens ImageJ[®]. Foram calculados o número total de pontos que tocam os vasos placentários ($\sum P_v$) e o número total

de interseções ($\sum I$) que cruzam os mesmos, adquiridos estes valores foram então inseridos na fórmula: $S_v = (2 \cdot \sum I / 1 \cdot \sum P_v)$

Onde ℓ corresponde ao aumento da imagem projetada. Obtida a densidade de superfície das estruturas, calculou-se então a área de superfície multiplicando-se a densidade de superfície pelo valor do volume de referência: $S_a = S_v \cdot V_{planecário}$.

4.3.8 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente e expressos em média \pm desvio padrão e avaliados pelo programa estatístico SigmaPlot for Windows (SigmaPlot; Systat Software Inc[®]) versão 12.0. Todos os dados foram primariamente avaliados quanto à normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk, e homocedasticidade, por Levene. Para evidenciar a diferença estatística entre os grupos experimentais, quando os dados foram paramétricos, utilizou-se o teste t para medidas independentes e Mann-Whitney quando não paramétricos. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.

4.4 RESULTADOS

A placenta do preá não demonstrou alterações morfológicas que pudessem ser observadas a olho nu, porém, como está exposto na Tabela 1, detectou-se que nas variáveis morfométricas comprimento e peso da placenta, do embrião e do cordão umbilical, neste caso somente o comprimento, o grupo controle apresentou tanto placenta quanto embrião mais pesados e com maior tamanho em comparação aos grupos claro e escuro e no caso do cordão umbilical a diferença só foi significativa entre o grupo controle e o claro. Já quando comparamos os grupos claro e escuro entre si verificamos que as variáveis morfométricas ligadas a placenta não apresentaram diferença entre si, a exemplo do que ocorreu com o comprimento do cordão umbilical e no caso do embrião observou-se diferença estatística tanto para o peso como para o comprimento.

Tabela 1 – Dados morfométricos da placenta, embrião e cordão umbilical de preá aos trinta dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação.

Estruturas	Variáveis	Controle	Claro	Escuro
Placenta	Comprimento	1.75 ± 0.19 ^a	1.39 ± 0.27 ^b	1.49 ± 0.21 ^b
	Peso	1.85 ± 0.11 ^a	1.40 ± 0.07 ^b	1.26 ± 0.18 ^b
Embrião	Comprimento	3.11 ± 0.28 ^a	1.28 ± 0.14 ^b	2.13 ± 0.27 ^c
	Peso	2.69 ± 0.23 ^a	1.67 ± 0.23 ^b	2.04 ± 0.28 ^c
C. umbilical	Comprimento	0.87 ± 0.07 ^a	0.77 ± 0.04 ^b	0.85 ± 0.1 ^{ab}

Os resultados para comprimento estão expressos em centímetros e para peso em gramas.

No caso da placenta adotou-se o comprimento como sendo o diâmetro. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P \leq 0.05$).

Todas as placentas de preá analisadas nesta pesquisa apresentaram as regiões características deste órgão, ou seja, em todos os casos observou-se a presença do lóbulo, do interlóbulo e da subplacenta. Porém, no que diz o respeito ao volume placentário observou-se diferença significativa entre o grupo controle e os demais grupos, sendo o maior volume o do grupo controle (5,37 cm³), assim como observou-se diferença entre o grupo claro, que apresentou o menor volume placentário (3,40 cm³) e o grupo escuro, (Tabela 2). Já nos constituintes placentários observou-se que o interlóbulo dos animais do grupo claro apresentou maior volume assim como proporcionalmente ocupou maior espaço no volume total da placenta (Tabela 2 e 3).

Tabela 2 – Volume da placenta do preá e seus constituintes aos trinta dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação.

Variável	Controle	Claro	Escuro
Vol. da placenta (cm ³)	5.37 ± 0.30 ^a	3.40 ± 0.21 ^b	3.84 ± 0.28 ^c
Vol. lóbulo (cm ³)	2.55 ± 0.21 ^a	1.67 ± 0.27 ^b	1.48 ± 0.31 ^b
Vol. Sinciciotrofoblasto (cm ³)	0.48 ± 0.09 ^a	0.35 ± 0.07 ^b	0.39 ± 0.10 ^b
Vol. Citotrofoblasto (cm ³)	0.32 ± 0.06 ^a	0.17 ± 0.03 ^b	0.24 ± 0.06 ^c
Vol. Vasos lobulares (cm ³)	1.75 ± 0.15 ^a	1.15 ± 0.20 ^b	1.01 ± 0.38 ^b
Vol. Lac. maternas (cm ³)	0.99 ± 0.06 ^a	0.60 ± 0.12 ^b	0.56 ± 0.09 ^b
Vol. Vasos fetais (cm ³)	0.75 ± 0.12 ^a	0.54 ± 0.10 ^b	0.29 ± 0.06 ^c
Vol. interlóbulo (cm ³)	1.16 ± 0.10 ^a	1.48 ± 0.06 ^{bc}	1.37 ± 0.15 ^{ad}
Vol. Sinciciotrofoblasto (cm ³)	0.41 ± 0.04 ^a	0.54 ± 0.04 ^b	0.48 ± 0.05 ^c
Vol. Citotrofoblasto (cm ³)	0.06 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.01 ^b	0.08 ± 0.03 ^{ab}
Vol. Vasos interlobulares (cm ³)	0.70 ± 0.06 ^a	0.87 ± 0.05 ^b	0.65 ± 0.10 ^a
Vol. Lac. maternas (cm ³)	0.66 ± 0.07 ^a	0.82 ± 0.07 ^b	0.63 ± 0.09 ^a
Vol. Vasos fetais (cm ³)	0.04 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.02 ^a	0.03 ± 0.01 ^a
Vol. subplacenta (cm ³)	1.47 ± 0.18 ^a	0.39 ± 0.16 ^b	0.31 ± 0.14 ^b
Vol. Sinciciotrofoblasto (cm ³)	0.90 ± 0.09 ^a	0.28 ± 0.12 ^b	0.23 ± 0.11 ^b
Vol. Citotrofoblasto (cm ³)	0.57 ± 0.11 ^a	0.11 ± 0.04 ^b	0.07 ± 0.03 ^b
Vol. Espongiotrofoblasto (cm ³)	0.02 ± 0.02 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.02 ^b
Vol. Cél. trofoblásticas gigantes (cm ³)	0.010 ± 0.003 ^a	0.002 ± 0.001 ^b	0.002 ± 0.001 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P \leq 0.05$). cm³ – centímetros cúbicos; Dv – densidade de volume;

Tabela 3 – Densidade de volume da placenta do pré-a e seus constituintes, aos trinta dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação.

Variáveis	Controle	Claro	Escuro
Dens. Vol. Lóbulo	0.47 ± 0.04 ^a	0.48 ± 0.06 ^{ac}	0.38 ± 0.07 ^{bd}
Dens. Vol. Sinciciotrofoblasto	0.19 ± 0.03 ^a	0.21 ± 0.03 ^{ac}	0.26 ± 0.02 ^{bd}
Dens. Vol. citotrofoblasto	0.13 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.02 ^b
Dens. Vol. Vasos lobulares	0.69 ± 0.04 ^a	0.68 ± 0.04 ^a	0.57 ± 0.02 ^b
Dens. Vol. Lacunas maternas	0.57 ± 0.03 ^a	0.52 ± 0.04 ^b	0.66 ± 0.01 ^c
Dens. Vol. Vasos fetais	0.43 ± 0.03 ^a	0.48 ± 0.04 ^b	0.34 ± 0.01 ^c
Dens. Vol. Interlóbulo	0.21 ± 0.01 ^a	0.43 ± 0.05 ^b	0.36 ± 0.03 ^c
Dens. Vol. Sinciciotrofoblasto	0.35 ± 0.02 ^a	0.36 ± 0.02 ^b	0.39 ± 0.03 ^a
Dens. Vol. citotrofoblasto	0.05 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.02 ^a
Dens. Vol. Vasos interlobulo	0.60 ± 0.03 ^a	0.58 ± 0.02 ^a	0.54 ± 0.04 ^b
Dens. Vol. Lacunas maternas	0.94 ± 0.02 ^a	0.95 ± 0.02 ^a	0.96 ± 0.01 ^a
Dens. Vol. Vasos fetais	0.06 ± 0.02 ^a	0.05 ± 0.02 ^a	0.04 ± 0.01 ^a
Dens. Vol. Espongiotrofoblasto	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^b
Dens. Vol. Subplacenta	0.27 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.05 ^b	0.08 ± 0.03 ^b
Dens. Vol. Sinciciotrofoblasto	0.61 ± 0.04 ^a	0.71 ± 0.03 ^b	0.76 ± 0.04 ^c
Dens. Vol. Citotrofoblasto	0.39 ± 0.04 ^a	0.30 ± 0.03 ^b	0.24 ± 0.04 ^c
Dens. Vol. CTG	0.007 ± 0.002 ^a	0.004 ± 0.001 ^b	0.005 ± 0.003 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P \leq 0.05$).

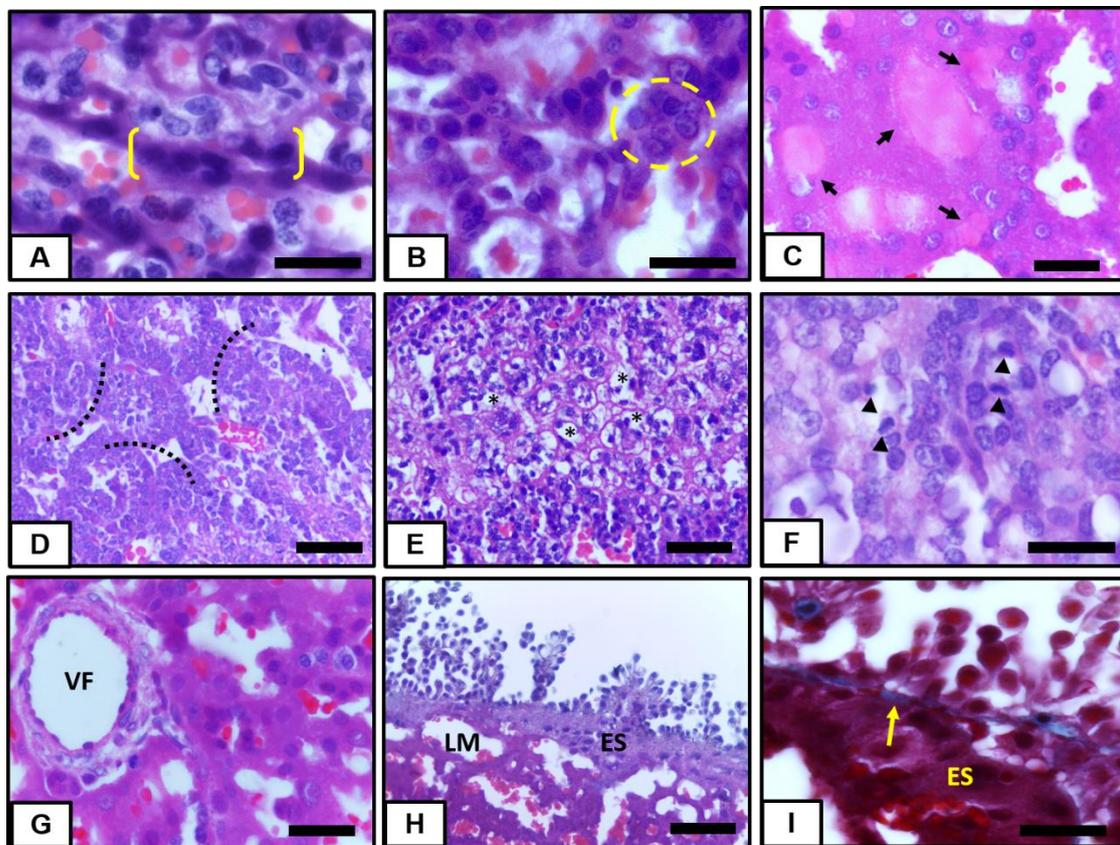
cm³ – centímetros cúbicos; Dv – densidade de volume.

No lóbulo placentário observou-se uma maior compactação no tecido dessa região no grupo escuro em relação ao observado nos demais grupos experimentais, aspecto ressaltado pela menor densidade de volume dos vasos lobulares (Tabela 3), por mais que quando comparamos o volume, o maior observado foi o do grupo controle (1,75 cm³), isto se dá pelo maior volume da placenta como um todo, como visto na Tabela 2. Quanto aos constituintes celulares verificou-se que em todos os grupos o sinciciotrofoblasto foi mais abundante. Em relação ao citotrofoblasto, observou-se que o do grupo escuro ocupou um maior volume na placenta quando comparado aos outros (Tabela 3). Nas tabelas 2 e 3 também é possível observar que no grupo escuro os vasos fetais diminuíram em volume em comparação aos demais grupos. Além disso, notou-se nos animais que permaneceram sem iluminação uma

organização dos núcleos diferente do usualmente observado que é em fila, pois estes apresentavam-se formando aglomerados circulares (Figura 1A e B).

O interlóbulo apresentou em todos os grupos o sinciciotrofoblasto com características semelhantes, marcado por núcleos distribuídos de forma espaçada, por intensa eosinofilia com esporádicos vasos fetais (Figura 1C e G). Quanto ao seu volume proporcionalmente as demais regiões da placenta os grupos claro e escuro apresentaram um interlóbulo mais volumoso em comparação ao grupo controle sendo mais significativa essa característica no grupo claro, como esta ilustrado nas Tabelas 2 e 3. Outro aspecto que marcou o interlóbulo foi a dominância das lacunas maternas que ocuparam cerca de 95% do volume vascular desta região, com o volume vascular do grupo claro apresentando diferença significativa (Tabela 2 e 3). Morfologicamente é digno de nota que nos animais que permaneceram no escuro algumas lacunas maternas apresentavam material eosinofílico amorfo (Figura 1C).

Figura 1 – Fotomicrografia das alterações morfológicas da placenta de preá aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação. Em A, observa-se a organização usual dos núcleos sinciciais ([]) na região do lóbulo. Em B, tem-se o observado nos animais do grupo claro que apresentou núcleos aglomerados, evidenciados na região circunscrita. Em C, verifica-se a presença de substância eosinofílica amorfa (setas) em lacunas maternas do grupo escuro. Em D, nota-se o aspecto lobular da subplacenta (pontilhado) mais evidente no grupo escuro. Em E, observa-se, destacadas pelos asteriscos, regiões de vacuolização avançada. Em F, destaca-se pelas cabeças de seta a presença de sinais de morte celular no grupo claro. Em G, observa-se vaso fetal (VF) envolto por citotrofoblasto na região do interlóbulo. Em M relação da placenta com endoderma parietal ressaltando a presença de lacunas maternas (LM) e espongiotrofoblasto (ES). E em I, detalhe da imagem anterior



Fonte: acervo do autor

O interlóbulo apresentou em todos os grupos o sinciotrofoblasto com características semelhantes, marcado por núcleos distribuídos de forma espaçada, por intensa eosinofilia com esporádicos vasos fetais (Figura 1C e G). Quanto ao seu volume, proporcionalmente as demais regiões da placenta os grupos claro e escuro apresentaram um interlóbulo mais destacado em comparação ao grupo controle sendo mais significativa essa característica no grupo claro, como esta ilustrado nas Tabelas 2 e 3. Outro aspecto que marcou o interlóbulo foi a dominância das lacunas maternas que ocuparam cerca de 95% do volume vascular desta

região, com o volume vascular do grupo claro apresentando diferença significativa (Tabela 2 e 3). Morfologicamente é digno de nota que nos animais que permaneceram no escuro algumas lacunas maternas apresentavam material eosinofílico amorfo (Figura 1C).

observou-se no grupo controle que a periferia placentária se apresentou constituída por tecido característico do interlóbulo com lacunas maternas grandes que em alguns casos apresentavam um calibre maior do que o comumente observado nas demais regiões de interlóbulo (Figura 1H e I), uma íntima relação com a placenta vitelínica parietal sendo distanciada em alguns pontos pela presença de espongiotrofoblasto (Figura 1H e I). Nos grupos experimentais as características morfológicas se mantiveram, no entanto, dois aspectos chamaram a atenção, primeiro o aparente aumento do calibre das lacunas maternas nos animais submetidos a escuro e claro constante, o que foi confirmado pela densidade de superfície dos vasos placentários mesmo apresentando uma menor área que o grupo controle (Tabela 4) assim como a diminuição no espongiotrofoblasto nestes animais, enquanto que no grupo submetido a iluminação constate o espongiotrofoblasto mostrou-se mais evidente.

Tabela 4: Área de superfície e densidade de superfície da placenta do preá, e seus constituintes, aos trinta dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação.

VARIÁRVEIS	Controle	Claro	Escuro
Sa Vasos placentários (cm ²)	91,8 ± 14,4 ^a	71,9 ± 12,3 ^b	85,3 ± 9,64 ^a
Sa Lacunas maternas (cm ²)	61,5 ± 11,5 ^a	49,2 ± 7,28 ^b	62,5 ± 6,48 ^a
Sa Vasos fetais (cm ²)	30,3 ± 3,41 ^a	22,8 ± 5,12 ^b	22,7 ± 3,42 ^b
Sv vasos placentários (cm ⁻¹)	171,9 ± 32,4 ^a	210,6 ± 26,6 ^b	222,2 ± 22,1 ^b
Sv Lacunas maternas (cm ⁻¹)	115,3 ± 25,6 ^a	144,1 ± 15,4 ^b	163,0 ± 16,1 ^b
Sv Vasos fetais (cm ⁻¹)	56,5 ± 7,17 ^a	66,5 ± 11,9 ^b	59,2 ± 7,15 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P \leq 0,05$).

cm² – centímetros cúbicos; Sv – densidade de superfície; Sa – área de superfície;

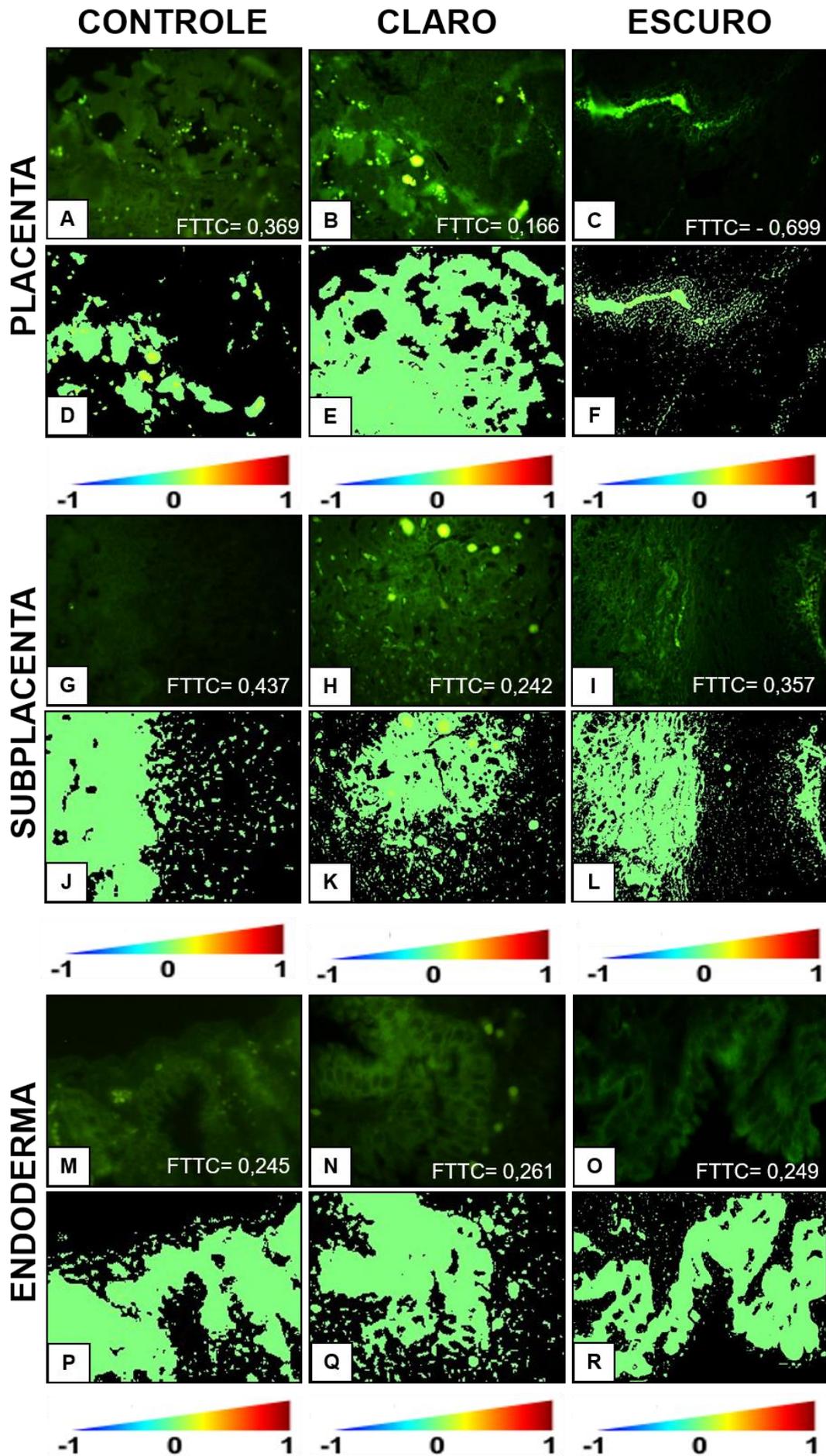
Ao analisarmos a área de superfície placentária observou-se que os animais do grupo escuro apresentaram um acentuado aumento na área vascular quando comparado aos demais grupos (Tabela 4), principalmente quando consideramos que o volume placentário é significativamente menor que o volume do grupo controle e a área vascular não apresenta diferença significativa entre estes grupos (Tabela 2 e 4).

A terceira porção que compõe a placenta do preá é a subplacenta que, como se observa nas Tabelas 2 e 3, apresentou um volume bastante reduzido nos grupos claro e escuro em

comparação ao grupo controle e caracterizou-se como uma estrutura individualizada, com a organização do citotrofoblasto e sinciotrofoblasto com aspecto lobulado que foi mais destacado, principalmente pelo aspecto menos compacto do tecido subplacentário, no grupo submetido ao escuro (Figura 1D), o sinciotrofoblasto nesta região foi predominante em relação ao citotrofoblasto (Tabela 2 e 3), apresentava regiões com vacúolos, principalmente e em estado mais avançado, no grupo submetido a luz constante, que também apresentava células com núcleos deformados dando indício de morte celular (Figura 1E e F). Outro aspecto que chamou a atenção foi a diminuição no volume ocupado pelas células trofoblásticas gigantes nos grupos experimentais (Tabela 2 e 3).

Na placenta a presença de receptores de melatonina foi evidenciada em todos os grupos (Figura 2). No entanto, observou-se que no grupo claro a intensidade da fluorescência foi maior, principalmente se compararmos a placenta com o grupo escuro. No grupo escuro verificou-se que no tecido placentário as regiões fluorescentes estavam localizadas principalmente ao redor dos vasos de origem fetal e que o sincício apresentava fluorescência reduzida.

Figura 2 – Fotomicrografia da placenta, subplacenta e endoderma parietal de preás com marcação fluorescente para receptores de melatonina (MT1 e MT2) submetidos a diferentes condições de iluminação. Em A, observa-se fotomicrografia da placenta dos preás pertencentes ao grupo controle (FTTC = 0,369) demonstrando a presença de receptores para melatonina distribuídos pelo tecido e em D o mapa de cor da figura A produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em B, observa-se fotomicrografia da placenta dos preás pertencentes ao grupo claro (FTTC = 0,166) evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação ao controle, e em E o mapa de cor da figura B produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em C, observa-se fotomicrografia da placenta dos preás pertencentes ao grupo escuro evidenciando marcação menos intensa neste grupo em relação tanto ao controle quanto ao grupo claro (FTTC = -0,699), e em F o mapa de cor da figura C produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em G, observa-se fotomicrografia da subplacenta dos preás pertencentes ao grupo controle (FTTC = 0,437) demonstrando a presença de receptores para melatonina distribuídos pelo tecido, e em J o mapa de cor da figura G produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em H, observa-se fotomicrografia da subplacenta dos preás pertencentes ao grupo claro (FTTC = 0,242) evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação ao controle, e em K o mapa de cor da figura H produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em I, observa-se fotomicrografia da placenta dos preás pertencentes ao grupo escuro (FTTC = 0,357) evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação ao controle, no entanto menos intensa em comparação ao grupo claro, e em L o mapa de cor da figura I produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em M, observa-se fotomicrografia do endoderma parietal dos preás pertencentes ao grupo controle (FTTC = 0,245) demonstrando a presença de receptores para melatonina distribuídos pelo tecido, e em P o mapa de cor da figura M produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em N, observa-se fotomicrografia do endoderma parietal dos preás pertencentes ao grupo claro (FTTC = 0,261) evidenciando marcação levemente mais intensa neste grupo em relação ao controle, e em Q o mapa de cor da figura N produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em O, observa-se fotomicrografia do endoderma parietal dos preás pertencentes ao grupo escuro (FTTC = 0,249) evidenciando marcação que se assemelha ao controle, e em R o mapa de cor da figura O produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. As Imagens A, B, C, G, H e I foram adquiridas utilizando-se a objetiva de 40X, e as imagens M, N e O, foram adquiridas utilizando-se a objetiva de 100X.



Fonte: Acervo do autor

Na subplacenta os grupos claro e escuro apresentaram uma fluorescência mais evidente que o grupo controle, porém todos demonstraram a presença dos receptores de melatonina. Já o endoderma parietal mostrou-se com abundante expressão de receptores para a melatonina em todos os grupos analisados.

4.5 DISCUSSÃO

A placenta do preá apresentou significativa redução no volume parenquimal quando comparado o grupo controle com os grupos experimentais mesmo não apresentando grandes diferenças nas características morfométricas entre os grupos. Redução no tamanho dos órgãos ligados a reprodução devido a variação nos períodos de luz é relatado em diferentes grupos animais (HOFFMAN; REITER, 1965; CARTER; GOLDMAN, 1983). De maneira geral, estas alterações morfológicas estão ligadas a maiores períodos de iluminação e uma consequente diminuição da produção de melatonina. No preá, no entanto, verificou-se a redução do volume placentário observada tanto nos animais do grupo claro como nos animais do grupo escuro, o que poderia ser explicado pelo excesso de produção de melatonina como descreve Carter e Goldman (1983) para Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*), embora não tenha sido mensurado os níveis de melatonina no preá. A redução no volume placentário também é observada em ratas suplementadas com melatonina, cujos efeitos resultam em alterações morfológicas em placentas de ratas (SILVA; TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2015).

No que remete a constituição placentária, ou seja, a regiões distintas que a compõem, a placenta do preá não mostrou alteração em sua constituição apresentando as regiões de lóbulo, interlóbulo e subplacenta, características dos histricomorfos (OLIVEIRA et al., 2008; KANASHIRO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012), o que reforça a tese levantada por Silva, Teixeira e Teixeira (2015) que defendem que as alterações placentárias causadas pelos diferentes períodos de iluminação estão voltados ao crescimento placentário e não a sua constituição celular.

Porém, sabe-se que a melatonina desempenha papel fundamental nos processos de diferenciação celular ocorridos na placenta em função de sua ação antioxidante (HUPPERTZ; KINGDOM, 2004; VAILLANCOURT et al., 2009), dessa forma mesmo todas as regiões placentárias estando presentes é possível observar que na placenta do preá ocorreu um aumento no volume do interlóbulo nos grupos claro e escuro, o que pode estar associado

tanto a presença como a ausência de luz, ou seja, da produção de melatonina pela glândula pineal, possivelmente, como ação compensatória por parte da placenta na produção de melatonina, fato possível pelo relatado por Lanoix et al., (2008) quando afirma que a placenta que a placenta produz melatonina assim como expressa seus receptores, e pela maior presença de receptores para melatonina no grupo claro em relação o grupo escuro como evidenciado pela reação de imunofluorescência e pelos diferentes papéis destes receptores em seus órgãos alvos (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005; ; SOLIMAN et al., 2015).

No grupo escuro o sincítio trofoblasto ocupou um maior volume na região do lóbulo em relação aos demais grupos principalmente quando comparado ao grupo controle o que diverge do ocorrido em ratas onde os animais mantidos no escuro foram semelhantes aos mantidos em condições normais e o grupo que apresentou diferença foi o mantido sob iluminação constante (SILVA; TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2015). Este achado não diverge totalmente desta pesquisa, pois o grupo claro também apresentou variação comparado ao grupo controle. Essa maior abundância do sincício pode indicar uma ação contraproducente da melatonina sobre o desenvolvimento da circulação fetal no órgão (LEWIS; SULLIVAN; ELDER, 1994; SAINZ et al., 2003) podendo prejudicar o desenvolvimento embrionário nestes animais.

O citotrofoblasto placentário, principalmente na região do lóbulo, ocupou volume considerável na constituição placentária como já descrito para roedores da subordem histricomorfa (OLIVEIRA et al., 2008; KANASHIRO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012), todavia observou-se, principalmente nos grupos claro e escuro a presença de esporádicos vasos fetais envoltos por citotrofoblasto no interlóbulo o que pode estar relacionado com o grau de desenvolvimento placentário modificado pelas condições as quais estavam submetidos os animais.

Na subplacenta do preá a ação antioxidante da melatonina ficou bastante evidenciado, pois observou-se que em relação ao grupo controle as subplacentas dos animais do grupo claro e escuro apresentaram desenvolvimento avançado e retardado respectivamente. Isto ficou claro pelas lobulações presentes no grupo escuro, características de períodos anteriores aos de 30 dias de gestação no preá e devido a numerosa presença de vacúolos e sinais de morte celular condizentes com fases posteriores aos 30 dias de gestação de acordo com Oliveira et al., (2008) e Bezerra (2014). Além disso, chamou a atenção o reduzido volume da subplacenta nos grupos claro e escuro, o que pode também estar associado ao efeito antioxidante da melatonina neste órgão, observando que seus efeitos que reduzem a ação de espécies reativas de oxigênio podem atuar sobre a velocidade de deterioração e

desenvolvimento dos tecidos (HUPPERTZ; KINGDOM, 2004; TAMURA et al., 2009; VAILLANCOURT et al., 2009).

Na placenta do preá aos 30 dias de gestação observou-se que a área vascular dos grupos claro e escuro apresentou aumento proporcionalmente significativo em relação ao grupo controle, principalmente no que diz respeito à vascularização de origem materna, aspecto que chamou muito a atenção no grupo escuro. Este aumento de área vascular pode estar ligado a correlação da melatonina na placenta com quadros de pré-eclampsia (NAKAMURA et al., 2001; LANOIX et al., 2012). A melatonina apresenta função protetora nos vasos placentários, o que explicaria a presença de seus receptores no tecido que envolve os vasos fetais principalmente no grupo escuro, com base no que se evidenciou por meio da imunofluorescência. Além disso, Tamura et al., (2009) relata que de maneira geral após o parto da placenta a pré-eclampsia desaparece, o que ressalta a relação entre a placenta e este quadro patológico

4.6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que as diferentes condições as quais os animais foram submetidos causam alterações morfológicas na placenta, principalmente no que diz respeito a parâmetros volumétricos ligados ao interlóbulo, sendo a maior influência observada nos animais submetidos à iluminação constante.

A subplacenta que apresentou diferentes estágios de desenvolvimento e diminuição significativa de seu volume;

A área vascular, em especial a de origem materna apresentou aumento nos grupos experimentais podendo estar relacionado a compensações hemodinâmicas vinculadas a quadros de hipertensão.

Assim como, demonstrou alterações na distribuição dos receptores de melatonina no tecido placentário, especialmente no grupo escuro.

4.7 REFERÊNCIAS

- BEZERRA, F.V. F. A Subplacenta do preá *Galea spixii* Wagler, 1831 / **Dissertação** de Mestrado em Ciência Animal – Universidade Federal Rural do Semi-Árido/ Pró-reitoria de Pós-Graduação (2014)
- CARTER DS, GOLDMAN BD. Antigonadal effect of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. **Endocrinology** 1983;113:1261–67.
- DAI M, CUI P, YU M, HAN J., LI H, XIU, R. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 α induced by CoCl₂ in cultured cancer cells. **J. Pineal Res** 2008; 44(2):121-26.
- DUBOCOVICH ML, MARKOWSKA M. Functional MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine** 2005;27(2):101-10.
- GRAHAM L. H., SWANSON W. F., WILDT D. E., BROWN J. L. Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin-induced ovarian function in the domestic cat. **Theriogenology** 2004;61(6):1061-76.
- HISSA MN, LIMA GG, JULIANA CS, NUNES RTL. Melatonin is pineal gland. **Rev. bras. educ. med.** 2008;2(4):1-10.
- HOFFMAN RA, REITER RJ. Pineal gland: influence on gonads of male hamsters. **Science** 1965;148:1609-11.
- HUPPERTZ B, KINGDOM JC. Apoptosis in the trophoblast—role of apoptosis in placental morphogenesis. **J Soc Gynecol Investig** 2004;11(6):353-62.
- KANASHIRO C, SANTOS TC, MIGLINO MA, MESS AM, CARTER AM. Growth and development of the placenta in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **RB&E** 2009;7(1):57.
- KLEIMAN DG, EISENBERG JF, MALINIAK E. Reproductive parameters and productivity of cavimorph rodents. In: John F. Eisenberg, editor. *Vertebrate ecology in the northern neotropics*, Washington DC: **Smithsonian Institution Press**; 1979, p. 173-183.
- LANOIX D, BEGHADADI H, LAFOND J, VAILLANCOURT C. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. **J. Pineal Res** 2008;45(1):50-60.
- LANOIX D, ST-PIERRE J, LACASSE AA, VIAU M, LAFOND J, VAILLANCOURT C. Stability of reference proteins in human placenta: general protein stains are the benchmark. **Placenta** 2012; 33, 151-156.
- LEWIS MP, SULLIVAN MHF, ELDER MG. Regulation by interleukin-1 β of growth and collagenase production by choriocarcinoma cells. **Placenta** 1994;15(1):13-20.

MARKUS RP, CIPOLLA-NETO J, AFECHE SC, LOTUFO CMC, BARBOSA JR EM, FERREIRA ZS. Glândula pineal e Melatonina. **In:** L.S.MENNA-BARRETO; N.MARQUES, editors. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. São Paulo: EDUSP; 2003, p. 191-222.

MARTIN, R. D. 2008. Evolution of placentation in primates: implications of mammalian phylogeny. **Evolutionary Biology** 35:125–145.

MESS A, MOHR B, MARTIN T. Transformations in the stem species pattern of Hystricognath Rodentia and the climatic change in the Eocene to late Oligocene time interval. **Mitt Mus Naturk, Zoologische Reihe** 2001;77:193-206.

MESS A. Evolutionary transformations of chorioallantoic placental characters in Rodentia with special reference to hystricognath species. **J Exp Zool (Comp Exb Biol) A** 2003;299:78-98.

NAKAMURA Y, TAMURA H, KASHIDA S, TAKAYAMA H, YAMAGATA Y, KARUBE A, et al. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. **J Pineal Res** 2001;30:29–33.

OLIVEIRA MF, FAVARON PO, AMBRÓSIO CE, MIGLINO MA, MESS, AM. Chorioallantoic and yolk sac placentation in *Thrichomys laurentinus* (Echimyidae) and the evolution of hystricognath rodents. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution** 2012;318(1):13-25.

OLIVEIRA MF, MESS A, AMBRÓSIO CE, DANTAS CAG, FAVARON PO, MIGLINO MA. Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Reprod Biol Endocrinol** 2008, 6:39.

ROBERTS M; MALINIAK E, DEAL M. The reproductive biology of the rock cavy, *Kerodon rupestris*, in captivity. A study reproductive adaptation in the trophic specialist. **Mammalia** 1984;48(2):253-64.

RODRIGUES RF, CARTER A, AMBROSIO CE, DOS SANTOS TC, MIGLINO MA. The subplacenta of the red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* L). **Reprod Biol Endocrinol** 2006;4:31.

SAINZ RM, MAYO JC, TAN DX, LOPEZ-BURILLO S, NATARAJAN M, REITER RJ. Antioxidant activity of melatonin in Chinese hamster ovarian cells: changes in cellular proliferation and differentiation. **Biochemical and biophysical research communications** 2003;302(3):625-34.

SILVA FCA, TEIXEIRA AAC, TEIXEIRA VW. The effect of constant illumination on the placenta in rats: a morphological, morphometric and immunohistochemical study. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 2015;67(3):698-706.

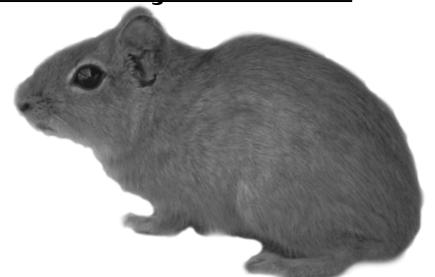
SOARES Jr JM, MASANA MI, ERSAHIN C, DUBOCOVICH ML. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. **J Pharmacol Exp Ther.** 2003;306(2):694–702.

SOLIMAN A, LACASSE AA, LANOIX D, SAGRILLO-FAGUNDES L, BOULARD V, VAILLANCOURT C. Placental melatonin system is present throughout pregnancy and regulates villous trophoblast differentiation. **J. Pineal Res** 2015;59(1):38-46.

TAMURA H, NAKAMURA Y, KORKMAZ A, MANCHESTER LC, TAN DX, SUGINO N, et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertil Steril** 2009;92:328–43.

VAILLANCOURT C, LANOIX D, Le BELLEGO F, DAOUD G, LAFOND J. Involvement of MAPK signalling in human villous trophoblast differentiation. **Mini reviews in medicinal chemistry** 2009;9(8):962-73.

5. Capítulo 3: Alterações morfofisiológicas no ovário de preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação.



5. CAPÍTULO 3 – ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS NO OVÁRIO DE PREÁS (*GALEA SPIXII* WAGLER, 1831) AOS 30 DIAS DE GESTAÇÃO SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ILUMINAÇÃO.

Alterações morfofisiológicas no ovário de preás (*galea spixii* wagler, 1831) aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação.

5.1 RESUMO

RESUMO: objetivou-se descrever as alterações morfológicas no ovário de preás aos trinta dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação. Para isto utilizou-se 15 preás fêmeas em três grupos com mesmo manejo alimentar e com cópula monitorada por meio de citologia vaginal. Identificada a cópula separava-se as fêmeas em grupos, sendo um submetido a iluminação constante, chamado de grupo claro, outro submetido ao escuro constante chamado de grupo escuro e o terceiro grupo mantido em condições normais. Atingidos os trinta dias de gestação realizava-se a coleta dos ovários que eram mensurados. Em seguida eram fixados por 48 h em paraformaldeído 4% em PBS 0.1M e pH 7.4, e incluído em parafina segundo técnicas usuais. Secções de cinco micrômetros, foram coletados de forma seriada e corados pela técnica de HE. Foi então calculada a população folicular dos diferentes grupos experimentais e realizada marcação imunofluorescente para receptores (MT1 e MT2) de melatonina. Observou-se que os ovários de preá apresentaram formato ovóide e superfície lisa com coloração amarelada e que os folículos mais abundantes foram os primários em todos os grupos experimentais não apresentando diferença significativa. No entanto no que se refere aos folículos antrais verificou-se que o número deste tipo de folículos foi significativamente superior no grupo escuro quando comparado aos demais grupos e que a marcação para receptores de melatonina foi mais evidente em folículos maduros e principalmente no grupo escuro. Dessa maneira conclui-se que as diferentes condições de iluminação, em especial a ausência de luz, influenciam na morfofisiologia do ovário.

Palavras chave: Imunofluorescência; População folicular; Folículos antrais; melatonina

5.2 INTRODUÇÃO

A relação entre o fotoperíodo e a reprodução nos mamíferos é de fundamental importância na regulação de processos reprodutivos e na época de reprodução de diversas espécies. Para Heideman e Bronson (1990), especialmente estudando roedores de regiões com pouca variação dos períodos de iluminação afirma que estes animais provavelmente evoluíram em três direções no que diz respeito a sua relação com o fotoperíodo e a reprodução. Como primeira direção o grupo de animais fotorresponsivos que são

influenciados pelos diferentes períodos de luz durante o dia para orientar seus ciclos reprodutivos, uma segunda direção composta por animais que são fotorresponsivos mas sua fisiologia reprodutiva não é regulada pelos diferentes períodos de luz durante o dia o que torna este grupo capaz de se reproduzir durante todo o ano, como terceira direção animais que a melatonina não apresenta influência sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e em consequência não regula processos reprodutivos.

No sistema reprodutor feminino as alterações do dia e a consequente variação nos níveis de melatonina produzida pelos animais influenciam diretamente na morfofisiologia ovariana, visto que no ovário os níveis de melatonina nos folículos variam de acordo com o avançar do seu desenvolvimento, sendo influenciado por melatonina produzida em diferentes locais, como a pineal e corpo lúteo que também auxiliam na produção de progesterona (REITER et al., 2004). Além disso a presença de receptores para este hormônio neste órgão acentua a importância da melatonina no desenvolvimento folicular e consequente função ovariana observando que os receptores estão localizados nas células da granulosa, da teca e no corpo lúteo, ou seja, em regiões chave para a função endócrina do ovário (Yonei et al., 2010).

Nesse sentido, o preá, um roedor histricomorfo que vem sendo alvo de estudos relacionados a seus aspectos reprodutivos como placentação (OLIVEIRA et al., 2008; BEZERRA, 2014), fisiologia ovariana (PRAXEDES et al. 2016) e aspectos morfológicos ligados a glândula pineal (CÂMARA et al., 2015), e que ainda alia aspectos ligados a diminuição de sua população pela caça e a necessidade do melhoramento das técnicas conservacionistas e de manejo em cativeiro. Observou-se que estudos relacionados aos efeitos de diferentes níveis de iluminação na morfofisiologia ovariana podem contribuir com o conhecimento dos processos reprodutivos nesta espécie e ainda auxiliar em possíveis técnicas de manejo para criação em cativeiro. Dessa forma, objetivou-se com esta pesquisa descrever as alterações morfológicas no ovário de preás aos trinta dias de gestação submetidos a diferentes períodos de iluminação.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 15 fêmeas e três machos de preás adultos com os quais foram formados três grupos com cinco fêmeas e um macho cada, estes animais identificados com a utilização de tintura capilar em diferentes regiões anatômicas e foram alocados em recintos

com dimensões de 5 m² e alimentados com ração para roedores, frutos, milho e água *ad libitum*, de modo que cada grupo tivera o mesmo manejo alimentar adequado.

Formados os grupos, foi realizado acompanhamento diário por meio de citologia vaginal e, quando identificada a presença de espermatozoides em esfregaço vaginal considerou-se este o dia zero da gestação. Constatada essa condição as fêmeas eram separadas do grupo, direcionadas a formação dos grupos, sendo um submetido a iluminação constante por meio de lâmpada fluorescente (PHILLIPS[®], 40W), chamado de grupo claro, enquanto que o grupo submetido a escuro constante teve o recinto completamente vedado à iluminação e foi chamado de grupo escuro e o terceiro grupo foi mantido em condições normais de iluminação foi chamado controle.

Completados os 30 dias de gestação, os animais eram submetidos a jejum sólido de doze horas e líquido de seis horas, eram pesados e submetidos a procedimento anestésico. Como medicação pré-anestésica a associação de cloridrato de xilazina (Xilazin[®] 2%, 1mg.kg⁻¹, fabricante Syntec) e cloridrato de cetamina (Quetamina[®] 10% na dose de 15mg.kg⁻¹, fabricante Vetnil) ambos im. Estabelecida a pré analgesia (± 10 min) era administrado o anestésico tiopental 1 g (Tiopental sódico[®] 1 g na dose de 25 mg.kg⁻¹, fabricante Richmond, División Veterinaria S.A.), iv, como fármaco indutor da anestesia. Atingido o plano anestésico, procedia-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, e assim, confirmando o óbito do animal após a parada cardiorrespiratória do mesmo seguia-se com os demais procedimentos de coleta.

Para este fim era realizada uma incisão longitudinal mediana pós-umbilical com aproximadamente 4 a 5 cm, para expor os ovários dos animais, que eram coletados e analisados morfométricamente. A partir deste procedimento os ovários foram fixados por 48 h em solução de paraformaldeído 4% tamponado com PBS 0.1M e pH 7.4, e incluídos em parafina histológica (Synt[®], granulada com ponto de fusão 58 °C a 62 °C, lote: 138199) por meio de protocolo usual do laboratório. Posteriormente as amostras foram cortadas a cinco micrometros de espessura com o auxílio de micrótomo (LEICA RM 2125 RT) e coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e as imagens foram adquiridas em microscópio acoplado a um sistema capturador de imagem (Leica ICC50 HD).

Para a estimativa da população folicular de ovários de preás em diferentes condições de iluminação foi realizada de acordo com Gougeon e Chainy (1987), sendo que foram contados somente os folículos que apresentavam núcleo foram contados para que o mesmo folículo não fosse contado mais de uma vez. Para isso utilizou-se o fator de correção $Pf = Nf$

$x N_s \times E_c / NSO \times DMN$. Onde Pf é a população folicular, Nf é o número de folículos contados, Ns é o número total de secções do ovário, Ec é a espessura de cada corte, NSO é o número de secções observadas e DMN é o diâmetro médio dos núcleos de cada ovócito.

Para a identificação dos receptores de melatonina no ovário de preás realizou-se imunofluorescência em cortes de 5 μ m de espessura foram aderidos a lâminas silanizadas (STAR FROST®) na sequência removeu-se a parafina e reidratou-se os cortes para a realização da recuperação antigênica por tratamento térmico em aparelho de micro-ondas (Eletrolux® MEF-28) com as lâminas imersas em tampão citrato 10 mM e pH 6.0, durante 10 min. Na sequência, realizou-se bloqueio das ligações inespecíficas incubando as amostras com UltraCruz® Blocking Reagent (sc-516214) por 30 min em câmara úmida. Para então incubar com o anticorpo primário (MEL-1A/B-R (B-8): sc-398788) “overnight” em câmara úmida a 4 °C. No dia seguinte, era realizada a incubação com anticorpo secundário ligado ao fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína (m-IgGκ BP-FITC: sc-516140) por uma hora em câmara úmida e por fim, as lâminas eram montadas utilizando UltraCruz® Mounting Medium (sc-24941) e analisadas em microscópio para fluorescência (Olympus BX51).

5.4 RESULTADOS

Não foram observadas alterações na morfologia ovariana do preá aos 30 dias de gestação entre os grupos experimentais, em todos os casos os ovários apresentaram um formato ovoide envolto por uma abundante camada de tecido adiposo com corpos lúteos que se destacavam na estrutura do tecido. Sua coloração era amarelada com corpo lúteo em um tom mais claro que o ovário além de pontos enegrecidos que sugerem regiões de necrose tecidual possivelmente devido a ovulação.

Morfometricamente não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no que diz respeito ao comprimento onde a média do comprimento $2,81 \pm 0,10$, $2,67 \pm 0,16$, $2,69 \pm 0,10$ mm, para os grupos controle, claro e escuro respectivamente enquanto que a largura apresentou diferença estatística entre o grupo claro e os demais sendo as médias $2,57 \pm 0,08$ mm para o grupo controle, $2,34 \pm 0,05$ mm para o grupo claro e $2,536 \pm 0,09$ mm para o grupo controle (Tabela 5).

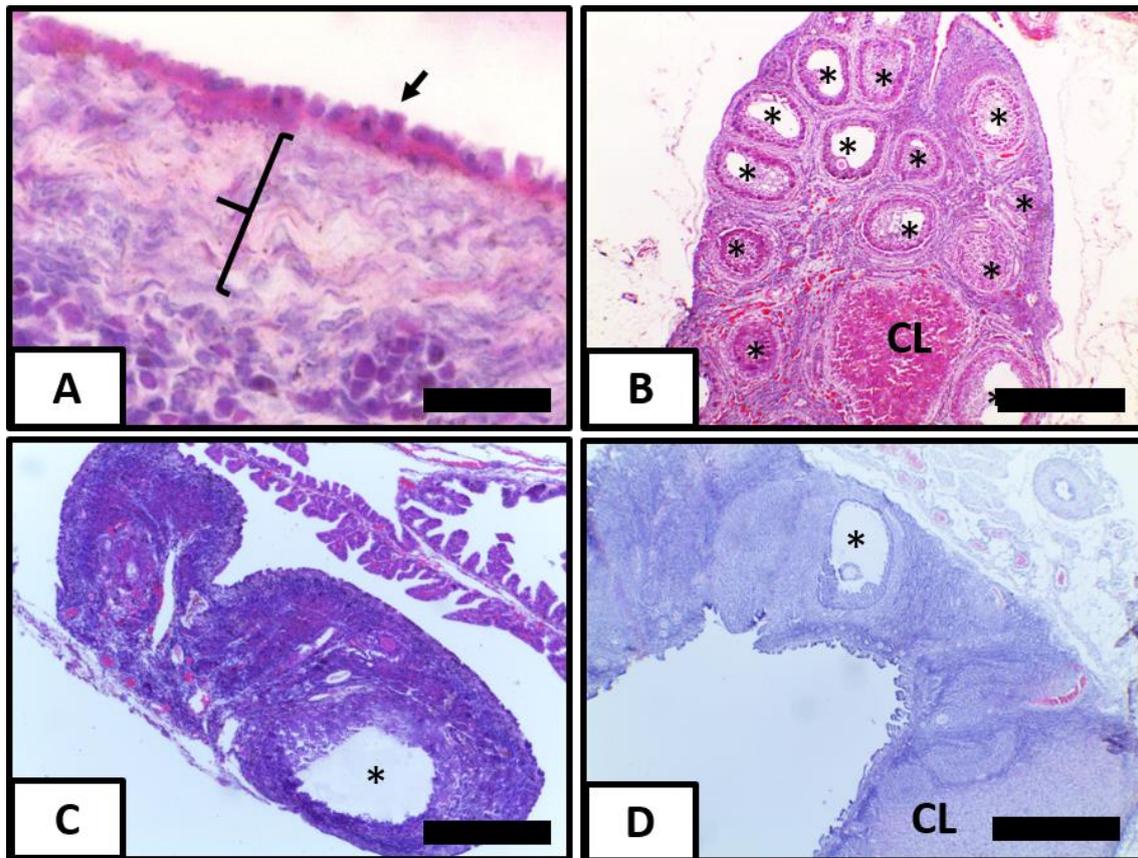
Tabela 5: Morfometria do ovário de preá, aos trinta dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação.

VARIÁRVEIS	Controle	Claro	Escuro
Comprimento (mm)	2,81 ± 0,10 ^a	2,67 ± 0,16 ^a	2,69 ± 0,10 ^a
Largura (mm)	2,57 ± 0,08 ^a	2.34 ± 0,05 ^b	2.53 ± 0,09 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P \leq 0,05$).

Quanto as suas características microscópicas o ovário de preá apresentou-se semelhante em todos os grupos com um epitélio germinativo constituído por células que variaram de pavimentosas à cúbicas sem apresentar estratificações, este epitélio repousava sobre uma camada de tecido conjuntivo denso que caracterizava a túnica albugínea do ovário que apresentou espessura média de $15,6 \pm 6,1 \mu\text{m}$, sem diferença estatística entre os grupos (Figura 3A). Sob a túnica albugínea observou-se um estroma de tecido conjuntivo com grande densidade celular no qual estavam distribuídos os folículos, com destaque para o maior número de folículos antrais no grupo escuro (Figura 3A, B e C).

Figura 3 – Ovário de preás aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação. Em A, observa-se epitélio germinativo (seta) e túnica albugínea (colchete) ambas as estruturas não apresentaram diferença entre os grupos experimentais. Barra, 20 μ m. Em B, Ovário de preá aos 30 dias de gestação do grupo escuro, nota-se a presença de folículos antrais (Asterisco) e corpo lúteo (CL). Barra, 200 μ m. Em C, Ovário de preá aos 30 dias de gestação do grupo claro, observa-se folículo antral (asterisco). Barra, 200 μ m. Em D, Ovário de preá aos 30 dias de gestação do grupo controle, observar folículo antral (asterisco) e corpo lúteo (CL). Barra, 200 μ m.

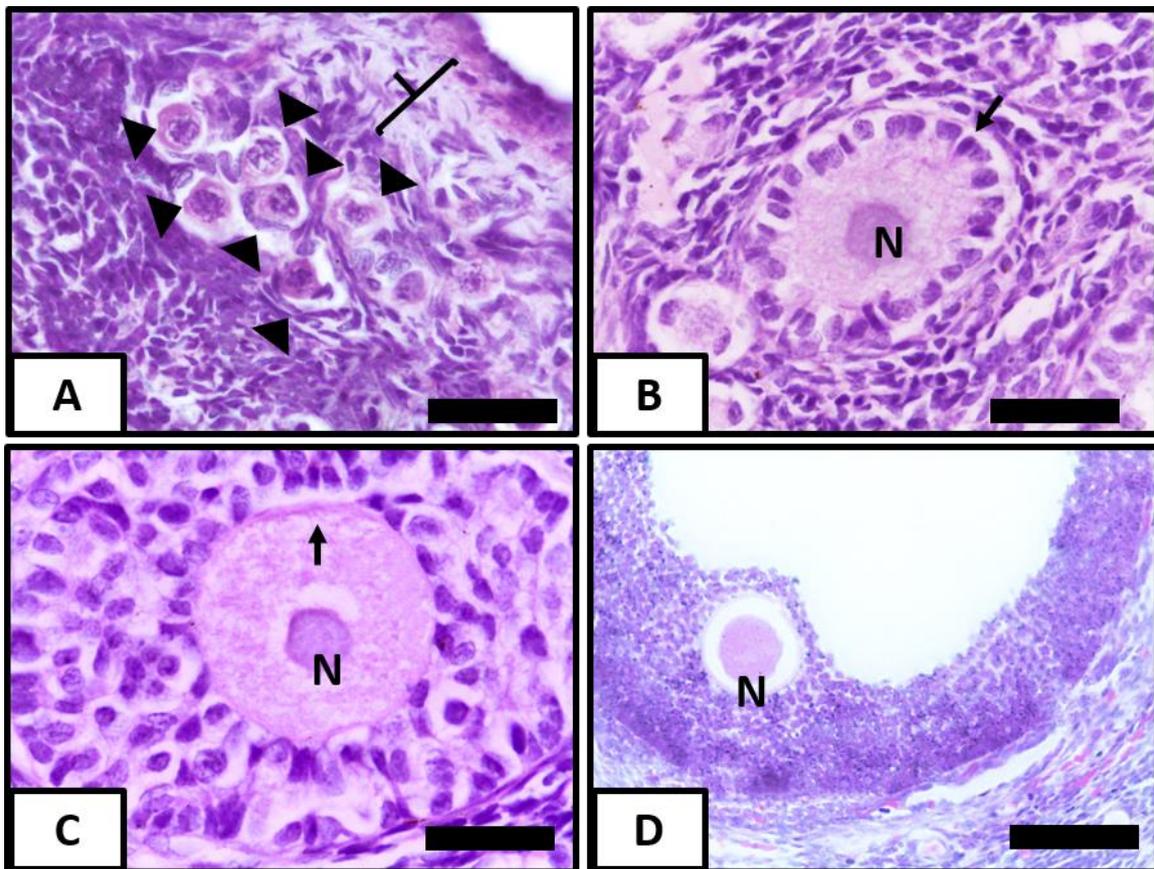


Fonte: Acervo do autor.

Foram observados folículos em todos os estágios de desenvolvimento (Figura 4) sendo os mais numerosos os folículos primordiais (Figura 4A e Tabela 6) em todos os grupos sem apresentar diferença estatística entre os grupos, encontravam-se nas proximidades da túnica albugínea e organizavam-se comumente em aglomerados. Os folículos primários (Figura 4B) se caracterizaram por apresentar uma camada de células cúbicas podendo ou não apresentar zona pelúcida e os secundários caracterizaram-se pelo maior número de camadas de células da granulosa em formato cúbico ao redor do ovócito e já apresentavam uma zona pelúcida

espessa (Figura 4C) e apresentaram-se em maior número no grupo escuro em comparação aos demais grupos como ilustrado pela tabela 6.

Figura 4 – Folículos ovarianos de preás aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação. Em A, observa-se aglomerado de folículos primordiais (cabeça de seta) próximo a túnica albugínea (colchete). Barra, 20 μ m. Em B, folículo primário evidenciando o núcleo do oócito (N) e as células cúbicas da granulosa (seta). Barra, 20 μ m. Em C, folículo secundário, destaca-se o núcleo central (N) e a presença da evidente zona pelúcida (seta). Barra, 20 μ m. Em D, folículo antral com núcleo evidente. Barra, 50 μ m.



Fonte: Acervo do autor.

Tabela 6: População folicular de preás aos trinta dias de gestação submetidos à diferentes condições de iluminação.

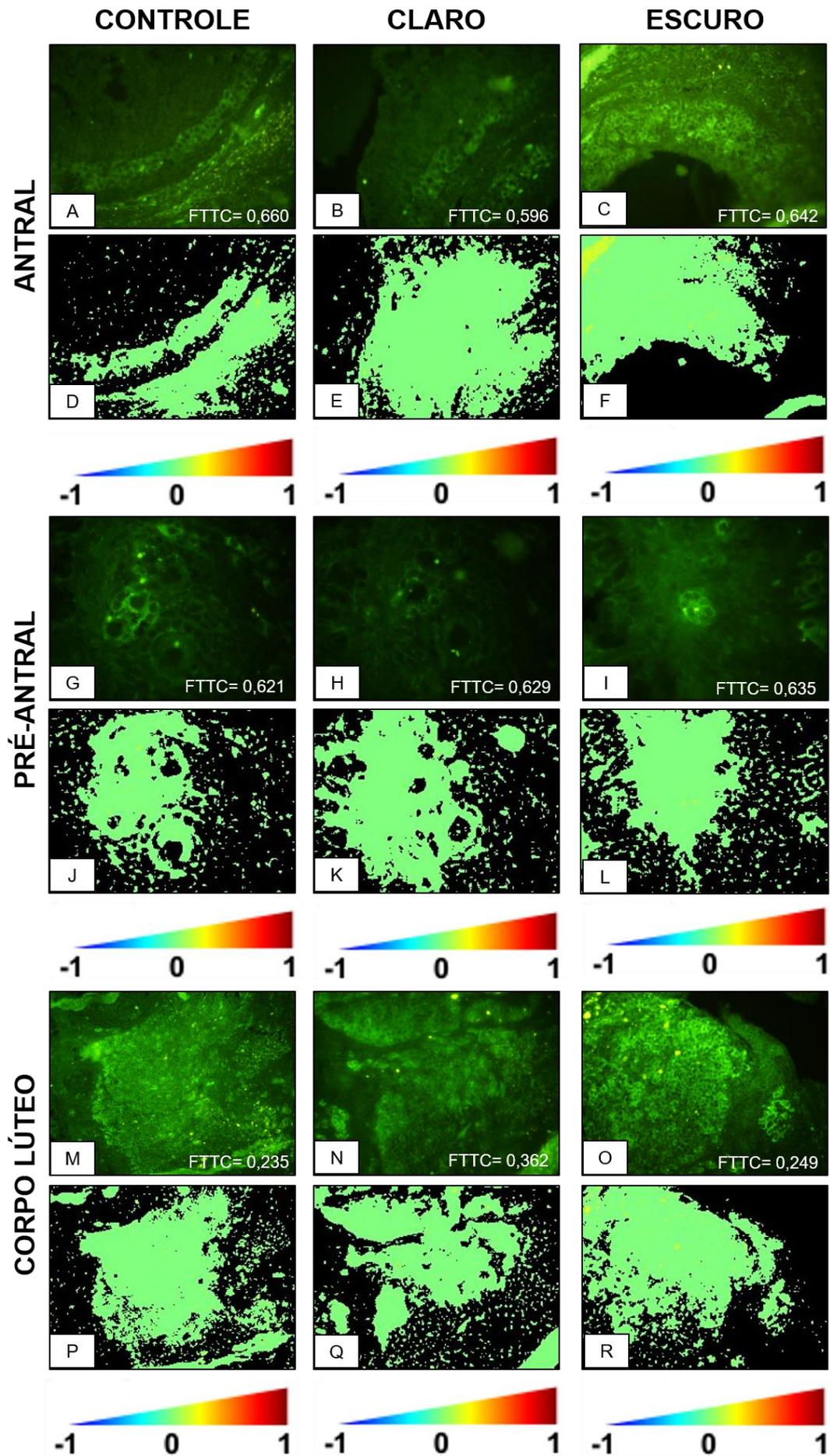
Categoria	População folicular		
	Controle	Claro	Escuro
Primordiais	262,8,5 ± 71,8 ^a	257,7 ± 72,2 ^a	261,2 ± 84,4 ^a
Primários	133,6 ± 13,2 ^a	134,6 ± 11,4 ^a	129,2 ± 10,2 ^a
Secundários	19,8 ± 9,09 ^a	18,6 ± 11,17 ^a	37,0 ± 12,18 ^b
Antrais	4,8 ± 2,38 ^a	6,0 ± 1,58 ^b	14,0 ± 2,54 ^c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P \leq 0,05$).

Quanto aos folículos antrais (Figura 4D), caracterizados pela presença do antro folicular, tanto o grupo claro quanto o grupo escuro apresentaram diferença estatística em comparação ao grupo, no entanto o grupo escuro apresentou maior diferença sendo o que mais apresentou folículos antrais (Tabela 6), como observa-se na figura 3A estes folículos ocuparam grande parte da região cortical do tecido ovariano juntamente com o corpo lúteo. Devido ao fato de as fêmeas analisadas nesta pesquisa estarem em período gestacional observou-se um volumoso corpo lúteo em todos os grupos experimentais.

Quando submetidos a técnica de imunofluorescência para marcação dos receptores de melatonina os ovários de preá marcaram positivamente principalmente nas células da granulosa e nas células luteínicas (Figura 5). Nas células da granulosa observou-se que a marcação foi mais intensa em folículos antrais e principalmente nos animais submetidos ao escuro, onde a marcação foi mais abrangente em comparação aos grupos claro e controle onde nem todas as células da granulosa apresentaram marcação, principalmente as que mais se aproximavam do ovócito, sendo as mais fortemente marcadas as células da granulosa da borda.

Figura 5 – Fotomicrografia da reação de imunofluorescência para receptores de melatonina (MT1 e MT2) no ovário de preás aos 30 dias de gestação submetidos a diferentes condições de iluminação. Em A, observa-se fotomicrografia de folículo antral de preá pertencente ao grupo controle (FTTC = 0,369) demonstrando a presença de receptores para melatonina distribuídos no folículo, especialmente nas células da granulosa, e em D o mapa de cor da figura A produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em B, observa-se fotomicrografia de folículo antral de preá pertencente ao grupo claro (FTTC = 0,166) evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação ao controle, e em E o mapa de cor da figura B produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em C, observa-se fotomicrografia de folículo antral de preá pertencente ao grupo escuro evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação tanto ao controle quanto ao grupo claro (FTTC = -0,699), e em F o mapa de cor da figura C produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em G, observa-se fotomicrografia de folículo pré-antral de preá pertencente ao grupo controle (FTTC = 0,437) demonstrando a presença de receptores para melatonina, e em J o mapa de cor da figura G produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em H, observa-se fotomicrografia de folículo pré-antral de preá pertencente ao grupo claro (FTTC = 0,242) evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação ao controle, e em K o mapa de cor da figura H produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em I, observa-se fotomicrografia de folículo pré-antral de preá pertencente ao grupo escuro (FTTC = 0,357) evidenciando marcação mais intensa neste grupo em relação ao controle e ao grupo claro, e em L o mapa de cor da figura I produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em M, observa-se fotomicrografia de corpo lúteo de preá pertencente ao grupo controle (FTTC = 0,245) demonstrando a presença de receptores para melatonina nas células luteais, e em P o mapa de cor da figura M produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade de marcação. Em N, observa-se fotomicrografia de corpo lúteo de preá pertencente ao grupo claro (FTTC = 0,261) evidenciando marcação de intensidade semelhante ao controle, e em Q o mapa de cor da figura N produzido pelo software ImageJ[®], evidenciando as regiões de maior intensidade



Do mesmo modo, nem todas as células do corpo lúteo apresentaram-se marcadas positivamente para a presença de receptores de melatonina, nesta região foram observadas ilhas de células que apresentaram fluorescência, no entanto não foi possível observar exatamente qual tipo celular apresentava marcação positiva, no entanto pela localização das células ligadas ao fluoróforo presume-se que células positivas eram as oriundas da granulosa.

5.5 DISCUSSÃO

Macroscopicamente os resultados observados nesta pesquisa assemelharam-se a estudos anteriores realizados em preás como Vale (2017) descrevendo eventos reprodutivos nesta espécie e relata a forma do ovário como elipsoide, assim como Reis et al., (2011) e Praxedes et al., (2015) que tratam da caracterização do ovário de paca e preá respectivamente descrevem o ovário como ovóide com uma superfície lisa. Além disso ambos os autores relatam a presença frequente de corpos lúteos no ovário de preás, fato que foi marcante nos ovários analisados tendo em vista que estavam em período gestacional. Quanto aos dados morfométricos também se assemelharam ao descrito por Praxedes et al., (2015) e com Mayor, Bodmer e Lopez-Bejar (2011) estudando a anatomia dos órgãos genitais da *Dasyprocta fuliginosa*, tanto no comprimento quanto na largura do ovário a não ser pelo grupo claro que apresentou diferença estatística em relação aos demais grupos analisados.

Morfologicamente os ovários de preá apresentaram características usuais para o órgão com um epitélio germinativo variando de pavimentoso a cúbico, uma túnica albugínea bem delimitada e imediatamente sob esta camada observava-se tecido conjuntivo com aglomerados de folículos primordiais assim como relataram Jori et al., (2002) estudando a anatomia dos ovários de porco espinho e Sánchez-Toranzo et al., (2014) estudando o ovário da chinchila. A presença de folículos no ovário não é influenciada pela gestação como relata Mayor, Bodmer e Lopez-Bejar (2011) para a cutia, da mesma forma em preás aos 30 dias de gestação o período gestacional parece não ter influência na presença de folículos em todos os estágios de desenvolvimento pois o número de folículos neste estudo assemelhou-se ao que descreve Praxedes et al., (2015) em animais não gestantes da mesma espécie.

Os folículos primordiais foram os mais numerosos em preás gestantes e se caracterizaram por apresentar uma camada de células cúbicas ao redor do núcleo do ovócito assim como em outros roedores (JORI et al., 2002; MAYOR; BODMER; LOPEZ-BEJAR,

2011; SÁNCHEZ-TORANZO et al., 2014; PRAXEDES et al., 2015). O desenvolvimento dos demais folículos iniciam no mesmo período, no entanto poucos chegam até ao estágio ovulatório (SÁNCHEZ-TORANZO et al., 2014), o que pode explicar o maior número de folículos primordiais em relação aos demais folículos, concordando com o que foi relatado em chinchilas (SÁNCHEZ-TORANZO et al., 2014). Porém, Praxedes et al., 2015 observou também em preás o que os folículos mais numerosos foram os primários o que pode ser uma característica para fêmeas de preá em final de vida reprodutiva, visto que os autores não relatam a idade dos animais pesquisados.

Dentre os folículos pre-antrais não foram observadas diferenças morfológicas nem populacionais entre os grupos experimentais, todavia, os folículos secundários no grupo escuro apresentaram-se em número significativamente superior ao observado nos demais grupos. Este fenômeno pode evidenciar a influência da iluminação e de forma indireta da melatonina sobre a fisiologia ovariana. De acordo com Heideman e Bronson (1990) estudando roedores de regiões com pouca variação dos períodos de iluminação afirmam que a variação nos períodos de luz durante o dia afeta os animais de diferentes modos tendo em comum a modulação por parte da melatonina. Esta indolamina atua sobre a fisiologia do ovário principalmente pela ação sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal por vias ligadas a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), a hipófise e aos ovários.

Além do aumento no número de folículos secundários entre os grupos experimentais este número também variou quando comparado ao que relata Praxedes et al., (2015) também para preás. Ademais, o número de folículos antrais também variou consideravelmente no grupo escuro em comparação ao que se observou nos grupos claro e controle. Acredita-se que esta variação na fisiologia ovariana seja devido a ação da melatonina visto que para Roy et al., (2001) estudando a secreção de GnRH regulada por melatonina em camundongos, a ação da melatonina influencia a reprodução de maneira inibitória por meio de sua ação sobre a secreção do GnRH, todavia Belinguer et al., (2009) relatam que a melatonina ativa a liberação de FSH e LH por meio de uma via que apresenta como centro a Kisspeptina que para Revel et al., (2007) atua como elo de ligação entre a melatonina e o sistema reprodutor o que cria um ambiente hormonal propício para o crescimento folicular.

Belinguer et al., (2009) estudando a dinâmica folicular em cabras, afirmaram ainda que a melatonina altera a onda folicular nestes animais causando um aumento no número de folículos por onda folicular, sendo provavelmente o ocorrido nos preás do grupo escuro. O fato da influência da melatonina sobre a fisiologia ovariana do preá é mais evidenciado pela presença dos receptores de melatonina nas células da granulosa principalmente nos animais

do grupo escuro. Porém a relatos da presença desses receptores no oócito e células do cumulus oophorus (EL-RAEY et al., 2011) algo que não foi observado em preás.

Para Reiter et al., (2014) a influencia da melatonina, especificamente, no folículo aumenta de acordo com que seu desenvolvimento avança, o que é confirmado por Nakamura et al., (2003) quando estudando a ação da melatonina sobre os folículos, reportaram que grandes folículos apresentam maior quantidade de melatonina que pequenos folículos. Além disso, estudando os folículos de suínos Shi et al., (2009) relatam que folículos médios apresentam o menor nível de melatonina. Estas afirmações são confirmadas ao observarmos a marcação dos receptores de melatonina em folículos de preá que demonstram a marcação com maior fluorescência em folículos maiores, sendo folículos secundários, ou seja, de tamanho médio apresentaram marcação discreta a nula.

Outro aspecto importante no ovário de preá foi a marcação de receptores de melatonina no corpo lúteo, especialmente nas células originadas da granulosa o que evidencia a contribuição deste hormônio na produção progesterona por parte do corpo lúteo (TAMURA et al., 2008; TAMURA et al., 2009; SHI et al., 2009).

5.6 CONCLUSÃO

Baseado nos dados discutidos pode-se afirmar que as diferentes condições de iluminação, em especial a ausência de luz, influenciam a morfofisiologia ovariana. Este fato é evidenciado no maior número de folículos secundários e antrais observados neste grupo e na marcação de receptores (MT1 e MT2) para melatonina nas células da granulosa de folículos antrais.

5.7 REFERÊNCIAS

BERLINGUER F., LEONI G.G., SUCCU S., SPEZZIGU A., MADEDDU M., SATTA V., BEBBERE D., CONTRERAS-SOLIS I., GONZALEZ-BULNES A. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. **Journal of Pineal Research**. 46 (4): 383–391, 2009.

BEZERRA, F.V. F. A Subplacenta do preá *Galea spixii* Wagler, 1831 / **Dissertação de Mestrado em Ciência Animal – Universidade Federal Rural do Semi-Árido/ Pró-reitoria de Pós-Graduação** (2014)

CÂMARA, F.V., GUIMARÃES, I. R. L, BENEVIDES, G. O, BEZERRA, F. V. F, OLIVEIRA, R. E. M, OLIVEIRA JUNIOR, C.M., SILVA, A. R., OLIVEIRA, M.F. The morphology of the pineal gland of the yellow-toothed cavy (*Galea Spixii* Wagler, 1831) and red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine* Linnaeus, 1758). **Microscopy Research and Technique** (Print), v.78, p. 660-666, 2015.

EL-RAEY, M., GESHI, M., SOMFAI, T., KANEDA, M., HIRAKO, M., ABDEL-GHAFFAR, A.E., SOSA, G.A., EL-ROOS, M.E. NAGAI, T. (2011). Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. **Mol. Reprod. Dev.** 78, 250–62.

GOUGEON, A.; CHAINY, G. B. N. 1987. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **Journal Reproduction and Fertility**, 81: 433- 442.

HEIDEMAN, P. D.; BRONSON, F. H.; Photoperiod, Melatonin Secretion, and Sexual Maturation in a Tropical Rodent. **Biology of Reproduction** 43, 745-750 (1990).

JORI, F., LÓPEZ-BÉJAR, M., MAYOR, P., LÓPEZ, C. (2002). Functional anatomy of the ovaries of wild brush-tailed porcupines (*Atherurus africanus*, Gray 1842) from Gabon. **Journal of Zoology**, 256(1), 35-43.

MAYOR, P.; BODMER, R.E.; LOPEZ-BEJAR, M.; Functional anatomy of the female genital organs of the wild black agouti (*Dasyprocta fuliginosa*) female in the Peruvian Amazon. **Animal Reproduction Science**. Vol. 123. 2011. P.247-257.

NAKAMURA Y., TAMURA H., TAKAYAMA H., KATO H. 2003. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertility and Sterility**. 80 (4): 1012-1016.

OLIVEIRA MF, MESS A, AMBRÓSIO CE, DANTAS CAG, FAVARON PO, MIGLINO MA: Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Reprod Biol Endocrinol** 2008, 6:39.

PRAXEDES. E. C., LIMA, G. L., SILVA, A. M., APOLINÁRIO, C. A., BEZERRA, J. A., SOUZA, A. L, OLIVEIRA, M. F., RODRIGUES, A. P., SILVA, A. R. Characterisation and Cryopreservation of the ovarian preatral follicle population from Spix. **Reproduction, Fertility and Development**, doi: 10.1071/RD15249, 2015.

REIS, A. C. G., GERBASI, S. H. B., MARTINS, C., MACHADO, M. R. F., OLIVEIRA, C. A. (2011). Morfologia do sistema genital feminino da paca (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 183-191.

REITER R.J., TAN D., TAMURA H., CRUZ M.H.C., FUENTES-BROTO L. 2014. Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology: a review. **Gynecol. Endocrinol.** 30(2):83-89.

ROY, D., ANGELINI, N. L., FUJIEDA, H., BROWN, G. M., BELSHAM, D. D. (2001). Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. **Endocrinology**, 142(11), 4711-4720.

SÁNCHEZ-TORANZO G., TORRES-LUQUE A., Gramajo-Bühler M. C., BÜHLER MI., Histology of the ovary of Chinchilla lanigera in captivity. **Anim Reprod**. 2014

SHI J.M., TIAN X.Z., ZHOU G.B., WANG L., GAO C., ZHU S.E., ZENG S.M., TIAN J.H., LIU G.S. 2009. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal of Pineal Research**. 47 (4): 318-323.

TAMURA H., NAKAMURA Y., KORKMAZ A., MANCHESTER L. C., TAN D. X., SUGINO N., REITER R. J. 2009. Melatonin and the ovary: Acta Veterinaria Brasilica, v.5, n.2, p.147-157, 2011 157 physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**. 92 (1): 328 – 343.

TAMURA H., TAKASAKI A., MIWA I., TANIGUCHI K., MAEKAWA R., ASADA H., TAKETANI T., MATSUOKA A., YAMAGATA Y., SHIMAMURA K., MORIOKA H., ISHIKAWA H., REITER R. J., SUGINO N. 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of Pineal Research**. 44 (3): 280-287.

VALE, A. M. Caracterização dos eventos reprodutivos em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). 2017. 308 f. **Tese** (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2017.

YONEI, Y., HATTORI, A., TSUTSUI, K., OKAWA, M., ISHIZUKA, B. Effects of Melatonin: Basics Studies and Clinical Applications. **Anti- Aging Medicine**, v. 7, p. 85-91, 2010.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados obtidos observou-se que as diferentes condições as quais os animais foram submetidos causam alterações morfológicas na placenta, principalmente no que diz respeito a parâmetros volumétricos ligados ao interlóbulo, sendo a maior influência observada nos animais submetidos à iluminação constante. Da mesma maneira a subplacenta também se verificou interferência dos diferentes manejos luminosos, em especial nos estágios de desenvolvimento e diminuição significativa de seu volume. E a área vascular da placenta, em especial a de origem materna, apresentou aumento nos grupos experimentais podendo estar relacionado a compensações hemodinâmicas vinculadas a quadros de hipertensão. Assim como, demonstrou alterações na distribuição dos receptores de melatonina no tecido placentário, especialmente no grupo escuro.

Já em relação ao ovário, baseado nos dados discutidos pode-se afirmar que as diferentes condições de iluminação, em especial a ausência de luz, influenciam a morfofisiologia ovariana. Este fato é evidenciado no maior número de folículos secundários e antrais observados neste grupo e na marcação de receptores (MT1 e MT2) para melatonina nas células da granulosa de folículos antrais.

REFERÊNCIAS

ADRIAENS, I., JACQUET, P., CORTVRINDT, R., JANSSEN, K., SMITZ, J. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**, v. 228, n. 2-3, p. 333-343, 2006.

AKHTAR, R.A. REDDY, A.B. MAYWOOD, E.S. CLAYTON, J.D. KING, V.M. SMITH, A.G. GANT, T.W. HASTINGS, M.H. KYRIACOU, C.P. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. **Curr. Biol.**, 12, 2002, pp. 540-550

AMIREAULT, P.; DUBÉ, F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 2, p. 358-365, 2005.

ARENDRT, J., DEACON, S., ENGLISH, J., HAMPTON, S., MORGAN, L. Melatonin and adjustment to phase shift. **Journal of sleep research**, 1995,4, 74-79

BARRETT P, BOLBOREA M. Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. **J Pineal Res** 2012;52 : 376–88.

BERLINGUER F., LEONI G.G., SUCCU S., SPEZZIGU A., MADEDDU M., SATTA V., BEBBERE D., CONTRERAS-SOLIS I., GONZALEZ-BULNES A. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. **Journal of Pineal Research**. 46 (4): 383–391, 2009.

BEZERRA, F.V. F. A Subplacenta do preá Galea spixii Wagler, 1831 / **Dissertação de Mestrado em Ciência Animal – Universidade Federal Rural do Semi-Árido/ Pró-reitoria de Pós-Graduação** (2014)

BIZZARRI, M., PROIETTI, S., CUCINA, A., REITER, R. J. Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 17, n. 12, p. 1483-1496, 2013.

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

BRANNSTROM M, ENSKOG A. Leukocyte networks and ovulation. **J Reprod Immunol** 2002;57:47–60.

BRZEZINSKI, Amnon. Melatonin in humans. **New England journal of medicine**, v. 336, n. 3, p. 186-195, 1997.

CÂMARA, F.V., GUIMARÃES, I. R. L, BENEVIDES, G. O, BEZERRA, F. V. F, OLIVEIRA, R. E. M, OLIVEIRA JUNIOR, C.M., SILVA, A. R., OLIVEIRA, M.F. The morphology of the pineal gland of the yellow-toothed cavy (Galea Spixii Wagler, 1831) and

red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine* Linnaeus, 1758). **Microscopy Research and Technique** (Print), v.78, p. 660-666, 2015.

CARTER DS, GOLDMAN BD. Antigonadal effect of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. **Endocrinology** 1983;113:1261–67.

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

CHOI, S.; JOO, S.; YOO, Y. Melatonin prevents nitric oxide-induced apoptosis by increasing the interaction between 14-3-3 β and p-Bad in SK-N-MC cells. **Journal of pineal research**, v. 44, n. 1, p. 95-100, 2008.

COHEN, M., ROSELLE, D., CHABNER, B., SCHMIDT, T. J., LIPPMAN, M., Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. **Nature** 274:894–895, 1978.

COHEN, R., WEATHERFORD, D. L.; Effects of Route Traveled on the Distance Estimates of Children and Adults. **Journal of experimental child psychology**. 29, 403-412. 1978.

DAI M, CUI P, YU M, HAN J., LI H, XIU, R. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 α induced by CoCl₂ in cultured cancer cells. **J. Pineal Res** 2008; 44(2):121-26.

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.

DEGUCHI, T. Characteristics of serotonin-acetyl coenzyme AN-acetyltransferase in pineal gland of rat. **Journal of neurochemistry**, v. 24, n. 5, p. 1083-1085, 1975.

DUBOCOVICH ML, MARKOWSKA M. Functional MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine** 2005;27(2):101-10.

DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation. **Sleep medicine**, v. 8, p. 34-42, 2007.

DUBOCOVICH, M. L. Pharmacology and function of melatonin receptors. **The FASEB journal**, v. 2, n. 12, p. 2765-2773, 1988.

DUNCAN, M.J. TAKAHASHI, J.S. DUBOCOVICH, M.L. Characteristics and autoradiographic localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. **Endocrinology**, 125 (1989), p. 1011

EBISAWA, T., KARNE, S., LERNER, M. R., REPERT, S. M. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1994, 91(13), 6133-6137.

- EL-RAEY, M., GESHI, M., SOMFAI, T., KANEDA, M., HIRAKO, M., ABDEL-GHAFFAR, A.E., SOSA, G.A., EL-ROOS, M.E. NAGAI, T. (2011). Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. **Mol. Reprod. Dev.** 78, 250–62.
- FAVARON, P. O. Placentação em roedores da família Cricetidae-Sigmodontinae. 2009. **Tese de Doutorado.** Universidade de São Paulo. 125f.
- 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, RHS. Estudo macro e microscópico da placenta de termo de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris* CARLETON, MD 1984). 2001. 75 f. 2001. **Tese de Doutorado.** Dissertação (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos)–Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FISCHER, T. V. 1971. Placentation in the American beaver (*Castor canadensis*). **American Journal of Anatomy**, 131(2), 159-183
- FISKE, V. M., PARKER, K. L., ULMER, R. A., OW, C. H., AZIZ, N. Effect of melatonin alone or in combination with human chorionic gonadotropin or ovine luteinizing hormone on the in vitro secretion of estrogens or progesterone by granulosa cells of rats. **Endocrinology**, 1984,114(2), 407-410.
- GALANO A, TAN DX, REITER RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **J Pineal Res.** 2013 Apr;54(3):245-57
- GAO, C., HAN, H. B., TIAN, X. Z., TAN, D. X., WANG, L., ZHOU, G. B., LIU, G. S. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. **Journal of pineal research**, v. 52, n. 3, p. 305-311, 2012.
- GOUGEON, A.; CHAINY, G. B. N. 1987. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **Journal Reproduction and Fertility**, 81: 433- 442.
- GRAHAM L. H., SWANSON W. F., WILDT D. E., BROWN J. L. Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin-induced ovarian function in the domestic cat. **Theriogenology** 2004;61(6):1061-76.
- GÜNDÜZ, B.; STETSON, M. H. Maternal transfer of photoperiodic information in Siberian hamsters. vi. effects of time-dependent 1-hr melatonin infusions in the mother on photoperiod-induced testicular development of her offspring. **Journal of pineal research**, v. 34, n. 3, p. 217-225, 2003.
- HEIDEMAN, P. D.; BRONSON, F. H.; Photoperiod, Melatonin Secretion, and Sexual Maturation in a Tropical Rodent. **Biology of Reproduction** 43, 745-750 (1990).
- HISSA MN, LIMA GG, JULIANA CS, NUNES RTL. Melatonin is pineal gland. **Rev. bras. educ. med.** 2008;2(4):1-10.

HOFFMAN RA, REITER RJ. Pineal gland: Influence on gonads of male hamsters. **Science**. 1965 Jun 18;148(3677):1609-11

HUPPERTZ, B.; KINGDOM, J. C.P. Apoptosis in the trophoblast—role of apoptosis in placental morphogenesis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 353-362, 2004.

ISHIZUKA, B., KURIBAYASHI, Y., MURAI, K., AMEMIYA, A., & ITOH, M. T. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. **Journal of pineal research**, v. 28, n. 1, p. 48-51, 2000.

ITOH, M. T., ISHIZUKA, B., KUDO, Y., FUSAMA, S., AMEMIYA A, SUMI Y Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. **Mol Cell Endocrinol** 136:7–13, 1997.

JORI, F., LÓPEZ-BÉJAR, M., MAYOR, P., LÓPEZ, C. (2002). Functional anatomy of the ovaries of wild brush-tailed porcupines (*Atherurus africanus*, Gray 1842) from Gabon. **Journal of Zoology**, 256(1), 35-43.

KANASHIRO C, SANTOS TC, MIGLINO MA, MESS AM, CARTER AM. Growth and development of the placenta in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **RB&E** 2009;7(1):57.

KANASHIRO, C. Análise da dinâmica da origem e destino das células trofoblásticas na interface materno-fetal do útero gestante do cobaio na elucidação da organização da placenta vitelina invertida. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. 2011, 122f.

KLEIMAN DG, EISENBERG JF, MALINIAC E. Reproductive parameters and productivity of cavimorph rodents. In: John F. Eisenberg, editor. *Vertebrate ecology in the northern neotropics*, Washington DC: **Smithsonian Institution Press**; 1979, p. 173-183.

KORKMAZ, A.; ROSALES-CORRAL, S.; REITER, R. J. Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena. **Gene**, v. 503, n. 1, p. 1-11, 2012.

LANOIX D, ST-PIERRE J, LACASSE AA, VIAU M, LAFOND J, VAILLANCOURT C. Stability of reference proteins in human placenta: general protein stains are the benchmark. **Placenta** 2012; 33, 151-156.

LANOIX, D., BEGHADADI, H., LAFOND, J., VAILLANCOURT, C. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. **Journal of pineal research**, v. 45, n. 1, p. 50-60, 2008.

LANOIX, D.; GUÉRIN, P.; VAILLANCOURT, C. Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy. **Journal of pineal research**, v. 53, n. 4, p. 417-425, 2012.

LEWIS, M. P.; SULLIVAN, M. H. F.; ELDER, M. G. Regulation by interleukin-1 β of growth and collagenase production by choriocarcinoma cells. **Placenta**, v. 15, n. 1, p. 13-20, 1994.

MARKUS RP, CIPOLLA-NETO J, AFECHE SC, LOTUFO CMC, BARBOSA JR EM, FERREIRA ZS. Glândula pineal e Melatonina. **In:** L.S.MENNA-BARRETO; N.MARQUES, editors. Cronobiologia: Princípios e Aplicações. São Paulo: EDUSP; 2003, p. 191-222.

MARTIN, R. D. 2008. Evolution of placentation in primates: implications of mammalian phylogeny. **Evolutionary Biology** 35:125–145.

MAYOR, P.; BODMER, R.E.; LOPEZ-BEJAR, M.; Functional anatomy of the female genital organs of the wild black agouti (*Dasyprocta fuliginosa*) female in the Peruvian Amazon. **Animal Reproduction Science**. Vol. 123. 2011. P.247-257.

MCMILLEN, I. C.; HOUGHTON, D. C.; YOUNG, I. R. Melatonin and the development of circadian and seasonal rhythmicity. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 49, p. 137-146, 1995.

MENDES, B.V. **Plantas e animais para o nordeste**. Rio de Janeiro: Globo, 1987. 167p.

MESS A, MOHR B, MARTIN T. Transformations in the stem species pattern of Hystricognath Rodentia and the climatic change in the Eocene to late Oligocene time interval. **Mitt Mus Naturk, Zoologische Reihe** 2001;77:193-206.

MESS A. Evolutionary transformations of chorioallantoic placental characters in Rodentia with special reference to hystricognath species. **J Exp Zoolog (Comp Exb Biol) A** 2003;299:78-98.

MILLER, S. L., YAN, E. B., CASTILLO-MELÉNDEZ, M., JENKIN, G., WALKER, D. W. Melatonin provides neuroprotection in the late-gestation fetal sheep brain in response to umbilical cord occlusion. **Developmental neuroscience**, 2005. 27(2-4), 200-210.

MOHSENI, M., MIHANDOOST, E., SHIRAZI, A., SEPEHRIZADEH, Z., BAZZAZ, J. T., GHAZI-KHANSARI, M. Melatonin may play a role in modulation of bax and bcl-2 expression levels to protect rat peripheral blood lymphocytes from gamma irradiation-induced apoptosis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 738, p. 19-27, 2012.

MOOJEN, J. **Os roedores do Brasil**. Ministério de Educação e Saúde, Instituto Nacional do Livro. 1952, Rio de Janeiro, GB (Brazil). 1952. 214 p..

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

NAITOH, N., WATANABE, Y., MATSUMURA, K., MURAI, I., KOBAYASHI, K., IMAI-MATSUMURA, K., WATANABE, Y. Alteration by maternal pinealectomy of fetal and neonatal melatonin and dopamine D1 receptor binding in the suprachiasmatic nuclei. **Biochemical and biophysical research communications**, 1998, 253(3), 850-854.

NAKAMURA Y., TAMURA H., TAKAYAMA H., KATO H. 2003. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertility and Sterility**. 80 (4): 1012-1016.

NAKAMURA, Y., TAMURA, H., KASHIDA, S., TAKAYAMA, H., YAMAGATA, Y., KARUBE, A., KATO, H. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. **Journal of pineal research**, v. 30, n. 1, p. 29-33, 2001.

NAKAMURA-Kubo M, NAKAMURA, T., HIRATA, A., SHIMODA, C. (2003) The fission yeast spo14+ gene encoding a functional homologue of budding yeast Sec12 is required for the development of forespore membranes. **Mol Biol Cell** 14(3):1109-24.

NILES, L.P., WANG, J. SHEN, L. LOBB, D.K., YOUNGLAI, E.V. Melatonin receptor mRNA expression In human granulosa cells. **Mol Cell Endocrinol**, Oct 25; 156(1-2); 107-10; 1999.

ODUOR-OKELO, 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 MF, FAVARON PO, AMBRÓSIO CE, MIGLINO MA, MESS, AM. Chorioallantoic and yolk sac placentation in *Thrichomys laurentinus* (Echimyidae) and the evolution of hystricognath rodents. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution** 2012;318(1):13-25.

OLIVEIRA MF, MESS A, AMBRÓSIO CE, DANTAS CAG, FAVARON PO, MIGLINO MA. Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Reprod Biol Endocrinol** 2008, 6:39.

PANDA S , SATO TK , CASTRUCCI AM , ROLLAG MD , DEGRIP WJ , HOGENSCH JB , PROVENCIO I , KAY AS. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase-shifting. **Science**, 2002, 298:2213-2216.

PICINATO, M. C., HIRATA, A. E., CIPOLLA-NETO, J., CURI, R., CARVALHO, C. R. O., ANHE, G. F., & CARPINELLI, A. R. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. **Journal of pineal research**, 2008, 44(1), 88-94.

PRAXEDES. E. C., LIMA, G. L., SILVA, A. M., APOLINÁRIO, C. A., BEZERRA, J. A., SOUZA, A. L, OLIVEIRA, M. F., RODRIGUES, A. P., SILVA, A. R. Characterisation and Cryopreservation of the ovarian pretral follicle population from Spix. **Reproduction, Fertility and Development**, doi: 10.1071/RD15249, 2015.

REIS, A. C. G., GERBASI, S. H. B., MARTINS, C., MACHADO, M. R. F., OLIVEIRA, C. A. (2011). Morfologia do sistema genital feminino da paca (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 183-191.

REITER R.J., TAN D., TAMURA H., CRUZ M.H.C. FUENTES-BROTO L. Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology: a review. **Gynecol. Endocrinol.** 2014. 30(2):83-89.

REITER RJ. Melatonin and human reproduction. **Ann Med J Pineal Res** 1998;30:103–8. 2005;38:217–22.

REITER, J. Tan, R., Rosales-Corral, D. X., S., Manchester, C L. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. **Mini reviews in medicinal chemistry**, 2013, 13(3), 373-384.

REITER, R. J. Static and extremely low frequency electromagnetic field exposure: reported effects on the circadian production of melatonin. **Journal of cellular biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 394-403, 1993.

REITER, R. J., PAREDES, S. D., MANCHESTER, L. C., TAN, D. X. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, 2009, 44(4), 175-200.

REITER, R. J., TAMURA, H., TAN, D. X., XU, X. Y. Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 2, p. 321-328, 2014.

REPPERT, S. M., GODSON, C., MAHLE, C. D., WEAVER, D. R., SLAUGENHAUPT, S. A., GUSELLA, J. F. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1995, 92(19), 8734-8738.

REPPERT, S. M., WEAVER, D. R., EBISAWA, T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. **Neuron**, 1994, 13(5), 1177-1185.

REPPERT, S. M., WEAVER, D. R., EBISAWA, T., MAHLE, C. D., KOLAKOWSKI, L. F. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. **FEBS letters**, 1996, 386(2-3), 219-224.

RICHARDS JS. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. **Mol Cell Endocrinol** 2005;234:75–9.

ROBERTS M; MALINIAK E, DEAL M. The reproductive biology of the rock cavy, *Kerodon rupestris*, in captivity. A study reproductive adptation in the trophic specialist. **Mammalia** 1984;48(2):253-64.

RODRIGUES RF, CARTER A, AMBROSIO CE, DOS SANTOS TC, MIGLINO MA. The subplacenta of the red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* L). **Reprod Biol Endocrinol** 2006;4:31.

RODRIGUEZ, C., MAYO, J.C., SAINZ, R.M., ANTOLIN, I., HERRERA, F., MARTIN, V., REITER, R.J. Regulação de enzimas antioxidantes: um papel significativo para a melatonina. **Journal of pineal research** , v. 36, n. 1, p. 1-9, 2004.

ROY, D., ANGELINI, N. L., FUJIEDA, H., BROWN, G. M., BELSHAM, D. D. (2001). Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1–7 GnRH-secreting neurons by melatonin. **Endocrinology**, 142(11), 4711-4720.

SAINZ RM, MAYO JC, TAN DX, LOPEZ-BURILLO S, NATARAJAN M, REITER RJ. Antioxidant activity of melatonin in Chinese hamster ovarian cells: changes in cellular proliferation and differentiation. **Biochemical and biophysical research communications** 2003;302(3):625-34.

SAINZ, R. M., MAYO, J. C., RODRIGUEZ, C., TAN, D. X., LOPEZ-BURILLO, S., REITER, R. J. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 60, n. 7, p. 1407-1426, 2003.

SAKAGUCHI K, ITOH MT, TAKAHASHI N, TARUMI W, ISHIZUKA B. The rat oocyte synthesises melatonin. **Reprod Fertil Dev** 2013;25:674–82.

SAMPAIO, R. V., CONCEIÇÃO, D. S. B., MIRANDA, M. S., LUCIA De FATIMA, S. S., OHASHI, O. M. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2012, 10(1), 103.

SÁNCHEZ-TORANZO G., TORRES-LUQUE A., Gramajo-Bühler M. C., BÜHLER MI., Histology of the ovary of Chinchilla lanigera in captivity. **Anim Reprod**. 2014

SAPER, C. B., The central circadian timing system. **Current Opinion in Neurobiology** 2013, 23:747–751.

SHANG, E. H.; ZHDANOVA, I. V. The circadian system is a target and modulator of prenatal cocaine effects. **PloS one**, v. 2, n. 7, p. e587, 2007.

SHAW, D.; GOLDMAN, B. D. Developmental changes in male Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*) exposed to different gestational and postnatal photoperiods. **Journal of pineal research**, v. 43, n. 1, p. 25-34, 2007.

SHI J.M., TIAN X.Z., ZHOU G.B., WANG L., GAO C., ZHU S.E., ZENG S.M., TIAN J.H., LIU G.S. 2009. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal of Pineal Research**. 47 (4): 318–323.

SILVA FCA, TEIXEIRA AAC, TEIXEIRA VW. The effect of constant illumination on the placenta in rats: a morphological, morphometric and immunohistochemical study. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. 2015;67(3):698-706.

SIMONNEAUX, V. Naughty melatonin: how mothers tick off their fetus. **Endocrinology**, V. 152, I. 5, 1, 2011, Pages 1734–1738.

SLAT, E., FREEMAN, G.M., HERZOQ, E.D. The clock in the brain: neurons, glia, and networks in daily rhythms. **Handb Exp Pharmacol**. 2013; (217):105-23.

SLOMINSKI AT, ZMIJEWSKI MA, SKOBOWIAT C, et al. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. **Adv Anat Embryol Cell Biol**. 2012;212(v, vii):1–115.

SOARES Jr JM, MASANA MI, ERSAHIN C, DUBOCOVICH ML. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. **J Pharmacol Exp Ther.** 2003;306(2):694–702.

SOLIMAN A, LACASSE AA, LANOIX D, SAGRILLO-FAGUNDES L, BOULARD V, VAILLANCOURT C. Placental melatonin system is present throughout pregnancy and regulates villous trophoblast differentiation. **J. Pineal Res** 2015;59(1):38-46.

SOLIMAN, A., LACASSE, A. A., LANOIX, D., SAGRILLO-FAGUNDES, L., BOULARD, V., VAILLANCOURT, C. Placental melatonin system is present throughout pregnancy and regulates villous trophoblast differentiation. **Journal of pineal research**, v. 59, n. 1, p. 38-46, 2015.

STANKOV, B.; REITER, R. J. Melatonin receptors: current status, facts, and hypotheses. **Life sciences**, v. 46, n. 14, p. 971-982, 1990.

STURMEY, R. G., REIS, A., LEESE, H. J., & MCEVOY, T. G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. s3, p. 50-58, 2009.

TAMURA H, NAKAMURA Y, TAKIGUCHI S, KASIDA S, YAMAGATA Y, SUGINO N, et al. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. **J Pineal Res** 1998;25:135–41.

TAMURA H, TAKASAKI A, TAKETANI T, TANABE M, LEE L, TAMURA I, et al. Melatonin and female reproduction. **J Obst Gynec Res** 2014;40:1–11.

TAMURA H., NAKAMURA Y., KORKMAZ A., MANCHESTER L. C., TAN D. X., SUGINO N., REITER R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**. 2009. 92 (1): 328 – 343.

TAMURA H., TAKASAKI A., MIWA I., TANIGUCHI K., MAEKAWA R., ASADA H., TAKETANI T., MATSUOKA A., YAMAGATA Y., SHIMAMURA K., MORIOKA H., ISHIKAWA H., REITER R. J. SUGINO N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of Pineal Research**. 2008, 44 (3): 280–287.

TAMURA, H., NAKAMURA, Y., TERRON, M. P., FLORES, L. J., MANCHESTER, L. C., TAN, D. X., SUGINO, N., REITER, R. J. Melatonin and pregnancy in the human. **Reproductive Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 291-303, 2008.

TAMURA, H., TAKASAKI, A., TAKETANI, T., TANABE, M., KIZUKA, F., LEE, L., SUGINO, N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of ovarian research**, v. 5, n. 1, p. 5, 2012.

TAN DX, HARDELAND R, MANCHESTER LC, KORKMAZ A, MA S, ROSALES-CORRAL S, REITER RJ. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. **J Exp Bot.** 2012 Jan;63(2):577-97

TIJMES, M., PEDRAZA, R., VALLADARES, L. Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. **Steroids**, 1996 Feb, 61(2); 65-8.

TINAJERO JC, FABBRI A, DUFAU ML Regulation of corticotropin-releasing factor secretion from Leydig cells by serotonin. **Endocrinology**. 1992 Apr;130(4):1780-8.

TORRES-FARFAN, C., RICHTER, H. G., GERMAIN, A. M., VALENZUELA, G. J., CAMPINO, C., ROJAS-GARCÍA, P., SERÓN-FERRÉ, M. Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. **The Journal of physiology**, v. 554, n. 3, p. 841-856, 2004.

VAILLANCOURT C, LANOIX D, LE BELLEGO F, DAOUD G, LAFOND J. Involvement of MAPK signalling in human villous trophoblast differentiation. **Mini reviews in medicinal chemistry** 2009;9(8):962-73.

VALE, A. M. Caracterização dos eventos reprodutivos em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). 2017. 308 f. **Tese** (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2017.

VERA. H., TIJMES, M., RONCO, A. M., VALLADARES, L. E., Melatonin binding sites in interstitial cells from immature rat testes. **Biol Res** 26:337–340, 1993.

VINCENT L., COHEN W., DELAGRANGE P., BOUTIN J.A. NOSJEAN O. Molecular and cellular pharmacological properties of 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine (MCA-NAT): a nonspecific MT3 ligand. **Journal of Pineal Research**. 2010, 48 (3): 222–229.

WANG, P., SUN, X., LI, C., WEI, Z., LIANG, D., MA, F. Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 292-302, 2013.

WEAVER, D. R.; REPPERT, S. M. Maternal melatonin communicates daylength to the fetus in Djungarian hamsters. **Endocrinology**, v. 119, n. 6, p. 2861-2863, 1986.

WURTMAN, R. J.; AXELROD, J.; CHU, E. W. Melatonin, a pineal substance: effect on the rat ovary. **Science**, v. 141, n. 3577, p. 277-278, 1963.

YELLON, STEVEN M.; LONGO, L. D. Melatonin rhythms in fetal and maternal circulation during pregnancy in sheep. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 252, n. 6, p. E799-E802, 1987.

YONEI, Y., HATTORI, A., TSUTSUI, K., OKAWA, M., ISHIZUKA, B. Effects of Melatonin: Basics Studies and Clinical Applications. **Anti- Aging Medicine**, v. 7, p. 85-91, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 1

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 2

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Pesquisa Veterinária Brasileira

Manuscript ID

PVB-5824

Title

Alterações morfológicas na placenta de preá (*Galea spixii* Wagler, 1832) aos trinta dias de gestação, submetidos a diferentes condições de iluminação.

Authors

Bezerra, Ferdinando
 Tertulino, Moisés
 Câmara, Felipe
 Miglino, Maria
 Silva, Alexandre
 Pereira, Alexsandra
 Oliveira, Moacir

Date Submitted

05-Feb-2018

[Author Dashboard](#)

Submission Confirmation



Thank you for your submission

Submitted to

Microscopy Research and Technique

Manuscript ID

MRT-18-044

Title

Morphophysiological changes in spix's yellow-toothed cavy ovary (*Galea spixii* Wagler, 1831) of pregnant females submitted to different lighting conditions

Authors

Bezerra, Ferdinando

Lopes, Igor

Araújo Júnior, Hélio

Rebouças, Carlos Eduardo Vale

Oliveira Junior, Carlos Magno de

Moura, Carlos

Oliveira, Moacir

Date Submitted

05-Feb-2018

[Author Dashboard](#)