

## TÉCNICA DE HISTOMORFOMETRIA MICROCOTILEDONAR PLACENTÁRIA EQUINA ASSISTIDA POR COMPUTADOR

LETÍCIA DA SILVA SOUZA<sup>1</sup>; FERNANDA MARIA PAZINATO<sup>2</sup>, NATHÁLIA DE OLIVEIRA FERREIRA<sup>3</sup>, CRISTINA GEVEHR FERNANDES<sup>4</sup>, ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR<sup>5</sup>; BRUNA DA ROSA CURCIO<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – leticia\_050@hotmail.com

<sup>2</sup> Unoesc Xanxerê – fernandamariapazinato@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas - nati.of@hotmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas - crisgevf@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas - varelajras@gmail.com

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas- curciobruna@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A saúde e o crescimento fetal são diretamente influenciados pelo desenvolvimento e função placentária. A placenta fornece o caminho para os gases essenciais, nutrientes e produtos residuais entre os sistemas vasculares fetal e materno durante toda a gestação (MACDONALD, 2000).

A placenta equina é difusa, não invasiva epiteliocoriônica, onde o trofoblasto é organizado em vilosidades coriônicas ramificadas que interdigitam com o epitélio endometrial para formar os microcotilédones. Anormalidades estruturais ou funcionais que afetam a função placentária podendo ser refletidas em deficiências de crescimento fetal bem como em sua maturação (BUCCA, 2006).

Microscopia, microscopia eletrônica e técnicas de estereologia foram usadas para avaliação morfométrica da placenta equina (FERREIRA, 2011). A análise de imagem digital baseada em computador de amostras de tecido mostram-se promissoras tanto para reduzir a subjetividade das avaliações tradicionais de tecidos quanto para reduzir o tempo necessário para analisar cada amostra.

O objetivo do presente estudo foi descrever a técnica de análise digital de imagens para analisar parâmetros histomorfométricos da placenta de éguas mestiças Crioulas.

### 2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado com as placenta de 30 éguas mestiças Crioulas com idade de  $8,9 \pm 0,9$  anos. Essas oriundas do plantel do Centro de Ensino e Experimentação em Equinocultura da Palma (CEEP), da Universidade Federal de Pelotas, nas temporadas reprodutivas de 2012, 2013 e 2014.

As éguas foram mantidas em piquetes de observação diária até o momento do parto. Após a ruptura do corioalantoide, as éguas eram conduzidas a cocheira maternidade para o acompanhamento do parto. Imediatamente após a expulsão das membranas fetais, as mesmas eram pesadas e o tempo para a sua eliminação registrada em minutos.

Posteriormente, cada placenta foi colocada em um formato "F" para avaliação macroscópica, conforme descrito por Schlafer (2004). A superfície coriônica e alantóide da corioalantóide foram examinadas quanto a anormalidades na coloração, áreas desprovidas de vilosidades, áreas espessadas e presença

de exsudato. Amostras de 3 x 3 cm de dimensão foram obtidas a partir de quatro pontos de cada placenta: área da estrela cervical, corno gravídico, corno não gravídico e corpo uterino. Todas as amostras foram fixadas usando formalina 10% antes do processamento para histologia. Cortes histológicos (espessura de 3 a 5  $\mu\text{m}$ ) foram montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina. As lâminas de todas as porções amostradas das membranas fetais de cada égua foram avaliadas usando microscopia óptica para descartar anormalidades histológicas.

A avaliação histomorfométrica dos microcotilédones do corioalantoide foi realizada para todas as éguas. Imagens digitalizadas do foram obtidas a partir dos segmentos da estrela cervical, corpo uterino e do corno gravídico e não gravídico com o auxílio de uma câmara de alta resolução Olympus DP72 na Olympus BX51 (Olympus América, Center Valley, PA) microscópio. Em seguida, as imagens digitais foram processadas usando o software de código aberto NIH ImageJ 1.48r (US National Institute of Health, disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

A histomorfometria foi realizada na área microcotiledonar. A área capilar das microcotilédones foi realizada no epitélio coriônico da corioalantóide. As imagens foram avaliadas em cores RGB com o total de pixels calibrados para  $\mu\text{m}$ . As quantificações da área / campo microcotiledonário e capilar foram realizadas com a macro “Color Threshold”, e a faixa de cores foi ajustada pela escala RGB. Diferenças na intensidade da cor foram analisadas através do método de absorção diferencial. Quando não havendo eritrócitos nos capilares, a correção das medidas de área / campo capilar foi realizada pelo plug-in “Freehand”. A área de campo (ampliação de 100x) para aquisição de imagens digitalizadas foi de 146,673  $\mu\text{m}^2$ . Realizada a mensuração da medida do menor diâmetro da rede microcotiledonar, por meio de amostragem 5 por 10 de cada porção avaliada do tecido placentário.

Os procedimentos foram realizados aleatoriamente dez vezes em cada seção em quatro amostras separadas para cada égua, correspondendo a estrela cervical, ao corpo uterino, ao corno gravídico e não gravídico, perfazendo um total de 40 estimativas por placenta.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise digital de imagens mostrou-se confiável e eficiente em segmentação, cálculo, extração de delineamento de vilosidades e também resultou em imagens de teste amostradas. O desempenho do método é devido à sobreposição de visão computacional e humana: a visão humana é inherentemente baseada em objetos, em oposição à representação amplamente baseada em pixels da visão computacional. A imagem da placenta oferece intrinsecamente uma diferença entre objetos de interesse (vilosidade = primeiro plano) e fundo (espaço interviloso), de modo que o limiar é altamente eficaz na separação dos dois componentes. Vários autores destacam a eficiência da análise digital na avaliação da placenta humana (CROSS, 1994; ARORA, 2011) já que a área da interface feto-materna funcional é o fator mais importante no estabelecimento de troca placentária adequada. Demostrando a relevância do presente estudo na avaliação dos parâmetros histomorfométricos quantitativos do desenvolvimento de vilosidades em placenta equina.

Diferenças histológicas são observadas de acordo com cada região placentária, como as regiões de avilosidades na estrela cervical, devido contato direto com a cérvix, e a maior densidade microcotiledonária, com vilos mais longos e

ramificados no corno não gravídico quando comparado ao corno gravídico e ao corpo uterino da placenta (SAMUEL, et al. 1974; MACDONALD, et al. 2000). A avaliação histopatológica da placenta pode revelar disfunções não detectadas durante a gestação ou na avaliação macroscópica dos envoltórios fetais. Segundo Schlafer (2004) e Macpherson & Bailey (2008) alterações inflamatórias na placenta são facilmente identificadas na histologia, sendo os quadros de placentite os mais comumente encontrados no terço final de gestação.

Em estudo de Allen, et al. (2002) a avaliação morfológica da placenta equina demonstrou que a área microscópica de contato materno-fetal é afetada pelos genótipos maternos e fetais. O genótipo materno controla a densidade microcotiledonária, e o genótipo fetal pode ser responsável pela área placentária total. Em outro estudo Wilsher e Allen (2012) também demonstraram correlação positiva entre a densidade microcotiledonária e o peso do potro, além da relação entre idade da égua e densidade microcotiledonária.

Além das avaliações macroscópicas e histológicas da placenta, os métodos morfométricos podem ser utilizados como ferramentas precisas para a obtenção de informações quantitativas tridimensionais acerca de estruturas microscópicas, baseadas nas observações feitas nos cortes histológicos. Dentre os softwares para análise de imagens, ImageJ apresenta fácil aplicabilidade e caracteriza-se como um programa seguro, sendo utilizado principalmente na área de patologia, para auxiliar na mensuração de resultados em diferentes técnicas (HELMY & ABDEL-AZIM, 2012; OZERDEM, et al. 2013).

#### 4. CONCLUSÕES

A utilização da histomorfometria a partir da análise digital de imagens, pode ser proposta como ferramenta histológica auxiliar na avaliação placentária equina.

**AGRADECIMENTOS:** A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico) pelo apoio financeiro ao projeto e concessão de bolsas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; TURNBULL, C.; STEWART, F.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D.; FOWDEN, A. L. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. **Reproduction**. v. 123, p. 445-453, 2002
- ARORA, S.K , P. Dey Fractal e dimensão lacunar das vilosidades coriônicas da gravidez molar Anal Quant Cytol **Histologia** , 33 ( 2011 ) , pp. 82 - 84
- BUCCA, S. Diagnosis of the compromised equine pregnancy. **Vet Clin Equine**.v. 22, p. 749-761, 2006.

CROSS, S.S , AJ Howat , TJ Stephenson , DW Cotton , JC Underwood Análise geométrica do material de gestações molares e não molares **J Pathol** , 173 ( 1994 ) , pp. 115 - 118

FERREIRA, A. A.; KRAUSE, C. I.; COSTA, M. H.; RIVERO, E. R. C.; TARQUÍNIO, S. B. C. An image processing software applied to oral pathology. **Pathology – Research and Practice**. v. 207, p. 232-235, 2011

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

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

MACPHERSON, M. L.; BAILEY, S. Treating the mare with placentitis: A clinical approach. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 28, n. 11, p. 703-708, 2008.

OZERDEM, U.; WOJCIK, E. M; BARKAN, G. A.; DUAN, X.; ERŞAHIN, Ç. A practical application of quantitative vascular image analysis in breast pathology. **Pathology – Research and Practice**. v. 209, p. 455-458, 2013.

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

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

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. Factors influencing placental development and function in the mare. **Equine Veterinary Journal**. v. 44, suppl (41), p. 113-119, 2012.