

**Maria Raquel Pereira Moura**

**CITOLOGIA DOS LÍQUIDOS EXTRA-EMBRIONÁRIOS E MORFOMETRIA DO  
PLACENTOMO DA VACA NOS TERÇOS INICIAL, MÉDIO E FINAL DA GESTAÇÃO**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência  
Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Antônio de Pinho Marques Jr.

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2008

Ficha catalográfica

Assinaturas

Página

em

branco

*“... Talvez eu não aprenda todas as lições necessárias, mas terei consciência que os verdadeiros ensinamentos ficam gravados em minha alma... Talvez eu não tenha motivos para grandes comemorações, mas não deixarei de me alegrar com pequenas conquistas...”*

*(Autor desconhecido)*

Página em branco

***Dedico***

*Aos meus pais Oscar Moura Leite e Virginia, Por TUDO!*

*Às minhas irmãs Aninha e Kika que são anjos que Deus colocou no meu caminho.*

*Ao meu marido Carlos Henrique, pelo seu amor e paciência.*

*Ao meu filho Gabo a luz da minha vida!*

*Amo muito vocês!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem Ele nada seria.

Agradeço a todas as pessoas que de uma forma ou de outra me incentivaram e tornaram possível a realização deste trabalho, em especial:

Aos meus Pais que sempre me incentivaram e vibraram com as minhas conquistas.

Ao meu marido Carlinhos pelo apoio e compreensão.

Às minhas irmãs no auxílio do dia a dia

Ao Gabriel meu filho por me ensinar a viver de forma diferente.

Ao meu MESTRE Professor Antônio de Pinho Marques Jr., por seu exemplo de vida como profissional e como pessoa. Pois ele não se limitou às teorias e foi muito além. E a Faride, que se não fosse a sua compreensão, carinho e dedicação nada disso seria possível.

A minha amiga Érika Christina Santos Oliveira por ter me aceito em seu projeto, me ensinado a trabalhar, me incentivado e o mais importante ter se tornado minha querida amiga.

Ao Professor Vicente Ribeiro do Vale Filho pelo incentivo e carinho.

Aos meus colegas do GruPinho: Raquel, Audrey, Evandro, Pablo e Jack pela convivência.

Ao Leonardo Lara e Lanna pela paciência, apoio e carinho.

A Fabrízia Lima pelos ensinamentos, auxílio na tese e pela amizade.

A Val pelo auxílio na pesquisa.

Aos meus colegas de pós-graduação.

Aos professores do setor de Reprodução Animal da EV-UFGM, que me auxiliaram durante este período.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação em especial a Nilda pela disponibilidade e atenção.

A Martinha e Janinha que cuidaram do meu bem mais precioso, o Gabriel, me proporcionando tempo e sossego para os estudos.

*Muito obrigada!*



Em branco

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	14
<b>ABSTRACT</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 Morfofisiologia da placenta bovina.....	18
2.1.1 <i>Placentação</i> .....	18
2.1.2 <i>Morfologia da placenta bovina</i> .....	19
2.1.3 <i>Fisiologia da placenta bovina</i> .....	21
2.2 Desenvolvimento e maturação da placenta.....	22
2.3 Anexos extra-embrionários.....	23
2.4 Líquidos extra-embrionários.....	23
2.4.1 <i>Citologia dos líquidos extra-embrionários</i> .....	25
2.5 Histologia do placentomo.....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Local e data.....	27
3.3 Colheita do material.....	27
3.4 Cálculo gestacional.....	28
3.5 Citologia dos líquidos extra-embrionários.....	28
3.6 Histologia do placentomo.....	28
3.6.1 Contagem de células maternas do placentomo.....	28
3.6.2 Proporção volumétrica do placentomo.....	29
3.7 Análise estatística.....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	31
4.1 Avaliação macroscópica.....	31
4.2 Citologia dos líquidos extra-embrionários.....	31
4.3 Quantificação de células maternas do placentomo.....	33
4.4 Proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo.....	33
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	38
5.1 Avaliação macroscópica.....	38
5.2 Citologia dos líquidos extra-embrionários.....	38
5.3 Quantificação de células maternas do placentomo.....	38
5.4 Proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo.....	39
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	40
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41
<b>8. ANEXO</b> .....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Média do número de células totais, eosinofílicas com e sem núcleo, cianofílicas com e sem núcleo e orangeofílicas, do líquido amniótico dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação da vaca.	31
<b>Tabela 2</b>	Quantificação das células maternas do placentomo da vaca nos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.	33
<b>Tabela 3</b>	Proporções volumétricas das células maternas do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.	34
<b>Tabela 4</b>	Proporções volumétricas das células fetais do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.	34
<b>Tabela 5</b>	Proporções volumétricas das células binucleadas do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.	34
<b>Tabela 6</b>	Proporções volumétricas das células gigantes do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.	35
<b>Tabela 7</b>	Proporções volumétricas dos vasos do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.	35
<b>Tabela 8</b>	Proporção volumétrica do tecido conjuntivo fetal do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.	36
<b>Tabela 9</b>	Proporção volumétrica do tecido conjuntivo materno do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.	36
<b>Tabela 10</b>	Artefatos das lâminas de proporção volumétrica do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.	36

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema representativo dos cortes do placentomo da vaca para processamento histológico.	30
<b>Figura 2</b>	Representação do cálculo gestacional pelo comprimento ápico-caudal, em cm, e os dias de gestação, separados pelos terços inicial, médio e final da gestação da vaca.	30
<b>Figura 3</b>	Representação da disposição dos pontos na ocular integradora. Estes pontos são sobrepostos ao corte histológico para determinação da proporção volumétrica dos componentes estruturais.	30
<b>Figura 4.</b>	Descrição da técnica de rotina das lâminas para coloração por Hematoxilina-eosina (HE).	45
<b>Figura 5.</b>	Seqüência de fotos dos procedimentos da coleta do material: Líquidos extra-embrionários e placentomos da vaca:	46
<b>Figura 6.</b>	Seqüência de fotos dos procedimentos dos líquidos extra-embrionários da vaca para citologia no laboratório.	47
<b>Figura 7.</b>	Seqüência da avaliação histológica do placentomo da vaca, quantificação das células maternas e proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo da vaca:	48
<b>Figura 8.</b>	Célula multinucleada do placentomo da vaca corte histológico corado por Hematoxilina-eosina no terço médio da gestação 40x e Zoom.	49
<b>Figura 9.</b>	Célula trinucleada do placentomo da vaca corte histológico corado por Hematoxilina-eosina no terço final da gestação. 40x e Zoom.	49
<b>Figura 10.</b>	Corte histológico do placentomo da vaca corado por Hematoxilina-eosina no terço médio da gestação. Cripta materna (PM), epitélio cuboidal com núcleos vesiculosos. Placenta parte fetal (PF), célula binucleada (seta grossa), célula gigante (seta fina) 40x.	50
<b>Figura 11.</b>	Corte histológico do placentomo da vaca corado por Hematoxilina-eosina no terço final da gestação. Tecido conjuntivo fetal (TCF). 40x e zoom.	50
<b>Figura 12.</b>	Células dos fluidos extra-embrionários da vaca agrupadas conforme morfologia, coloração e origem.	51

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Número de células: Células totais, eosinofílicas com e sem núcleo, cianofílicas com e sem núcleo e orangeofílicas, presentes no líquido amniótico no terço inicial da gestação da vaca.	32
<b>Gráfico 2</b>	Número de células: Células totais, eosinofílicas com e sem núcleo, cianofílicas com e sem núcleo e orangeofílicas, presentes no líquido amniótico no terço médio da gestação da vaca.	32
<b>Gráfico 3</b>	Número de células: Células totais, eosinofílicas com e sem núcleo, cianofílicas com e sem núcleo e orangeofílicas, presentes no líquido amniótico no terço final da gestação da vaca.	32
<b>Gráfico 4</b>	Número de células maternas do placentomo da vaca presentes nos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação da vaca.	33
<b>Gráfico 5</b>	Proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo: células maternas, células fetais, células binucleadas, células gigantes, vasos, tecido conjuntivo fetal e materno e artefatos no terço inicial da gestação da vaca.	37
<b>Gráfico 6</b>	Proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo: células maternas, células fetais, células binucleadas, células gigantes, vasos, tecido conjuntivo fetal e materno e artefatos no terço médio da gestação da vaca.	37
<b>Gráfico 7</b>	Proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo: células maternas, células fetais, células binucleadas, células gigantes, vasos, tecido conjuntivo fetal e materno e artefatos no terço final da gestação da vaca.	37

## RESUMO

Este trabalho foi realizado com o propósito de caracterizar o perfil citológico dos líquidos extra-embrionários, a quantificação das células maternas e a proporção volumétrica de componentes estruturais do placentomo da vaca nos terços inicial, médio e final da gestação, determinados por biometria fetal. Foram utilizados dez úteros gestantes, de cada terço gestacional, de vacas abatidas em frigorífico da Região Metropolitana de Belo Horizonte – MG. Foram colhidos 20ml de líquido amniótico e alantoidiano que foram centrifugados por 10 minutos a 200g. Dos sedimentos de cada alíquota foram feitos esfregaços, os quais foram corados com Panótico Rápido. Os placentomos foram colhidos e fixados em solução de formol a 10% e processados para avaliações histológicas. Os resultados obtidos indicam que o número de células totais do líquido amniótico foi menor no terço inicial da gestação. No terço final as células maternas do placentomo diminuíram, enquanto a proporção volumétrica das células fetais, binucleadas, gigantes e vasos não variaram nos tempos medidos. Entretanto, a proporção volumétrica das células maternas diminuiu no terço final, do tecido conjuntivo fetal foi menor no terço inicial e do tecido conjuntivo materno foi maior no terço final da gestação. Conclui-se que a citologia do líquido amniótico, a quantificação das células maternas do placentomo e a proporção volumétrica de alguns componentes estruturais do placentomo diferem durante a gestação da vaca.

*Palavras-chaves:* bovino, morfologia, placenta, líquidos extra-embrionários.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the cytology of extraembryonic fluids, to quantificate maternal cells and volumetric proportions of structural components of the cow placentome in the first, second and third trimester of pregnancy. For each trimester were used ten pregnant uterus, collected in slaughterhouse. A volume of 20 ml of amniotic and allantoic fluids was collected, and centrifuged at 200 g for ten minutes. The sediments were taken and processed on a slide for cytology examination after staining with Panoptic stain. The trimester of pregnancy was determined using the crown-rump length. The placentomes were fixed in formalin 10% and processed for histological examination. The total cell number of the amniotic fluid increased during the gestation. At the third trimester the maternal cells of the placentome decreased. The volumetric proportions of the fetal cells, binucleate cells, giant cells and vessels did not vary during the gestation. The volumetric proportions of the maternal cells of the placentome decreased in the third trimester of pregnancy. The volumetric proportions of the fetal placentome connective tissue were lower in the first trimester. The maternal connective tissue was higher in the third trimester of pregnancy. The results of this work indicate that the cytology of the amniotic fluid, the quantification of maternal cells and the volumetric proportion of some structural components of the cow placentome change during the pregnancy.

*Keywords:* cow, cytology, placenta, fetal fluids.

## 1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura ocupa lugar de destaque na pecuária brasileira, pelo seu número populacional e pela importância na produção de carne e leite para o mercado interno e externo, além de contribuir de forma efetiva no modelo experimental em pesquisas de biotecnologias e na sua aplicação prática, principalmente na área de reprodução animal.

O estudo e aplicação de novas tecnologias, como transferência de embriões (TE), fertilização *in vitro* (FIV) e clonagem têm aumentado de forma expressiva e, como decorrência, têm sido mais diagnosticadas patologias como, por exemplo, a acumulação anormal de líquidos fetais. Vacas gestantes com fetos provenientes de transferência nuclear para células somáticas (TN) mostram alta incidência da síndrome do feto grande, hidroalantóide e placentomegalia no terço final da gestação, com aumento da mortalidade fetal (Li et al., 2005). Falhas nas gestações oriundas de TN poderiam estar associadas a um desenvolvimento anormal da placenta, a um retardo na placentação e ou um atraso no desenvolvimento do trofoblasto nos estádios iniciais da placentação (Hashizume et al., 2002).

Concomitantemente aos avanços tecnológicos, parte do rebanho brasileiro ainda é considerado de baixa produtividade, quando comparado ao de outros países. Os índices reprodutivos são um dos fatores responsáveis por esse baixo desempenho, destacando-se os problemas no pós-parto, com o aumento do período de serviço, intervalo de partos e, conseqüentemente, a baixa eficiência reprodutiva do rebanho.

O conhecimento adequado da atividade e do ciclo reprodutivo do bovino passa, obrigatoriamente, pelo conhecimento das estruturas e da fisiopatologia do seu aparelho reprodutivo, incluindo também a placenta e seus componentes. A placenta, sendo um órgão efêmero e dinâmico, dificulta mensurações

exatas, principalmente quando se analisam grupos de diferentes idades gestacionais (Silva et al., 2004).

A placenta dos bovinos é classificada macroscopicamente como cotiledonária, com os cotilédones se desenvolvendo em correspondência às carúnculas uterinas formando os placentomos (Silva et al., 2004). O placentomo é a unidade fisiologicamente funcional da placenta e tem a função de proteção, de transferir nutrientes da mãe para o feto, de eliminar metabólitos do feto e de sintetizar enzimas e hormônios essenciais no desenvolvimento fetal (Roberts, 1986).

Apesar da importância da espécie bovina para a pecuária brasileira e para o desenvolvimento de novas tecnologias na área de biotecnologia da reprodução, pesquisas que envolvem um conhecimento mais amplo sobre a placenta e seus componentes estruturais são escassas, principalmente para as raças zebuínas, que perfazem a maioria do rebanho. A busca de mais informações e maior conhecimento que possibilitem melhor descrição dos componentes estruturais e da fisiologia da placenta nos terços inicial, médio e final da gestação da vaca, poderão contribuir para a abordagem acadêmica, científica e técnica de problemas gestacionais decorrentes do uso de biotecnologias reprodutivas, bem como de problemas decorrentes da retenção de placenta, uma patologia que pode afetar os índices reprodutivos do rebanho e, certamente, aumenta os custos de serviços veterinários e dos insumos e medicamentos relacionados ao seu tratamento (Bretzlaff, 1987; Williams et al., 2007).

Com base na literatura e na necessidade de aprofundamento do conhecimento sobre a fisiologia da gestação e da estrutura da placenta foram formuladas as hipóteses e os objetivos a seguir:



## **Hipóteses**

1. O perfil citológico do líquido amniótico difere no terço inicial, médio e final da gestação da vaca;
2. O número de células maternas e a proporção volumétrica de diferentes componentes estruturais do placentomo variam no terço inicial, médio e final da gestação da vaca.

## **Objetivos**

1. - Avaliar o perfil citológico do líquido amniótico nos terços inicial, médio e final da gestação da vaca;
2. - Quantificar o número de células maternas do placentomo nos terços inicial, médio e final da gestação da vaca;
3. - Determinar a proporção volumétrica dos diferentes componentes estruturais do placentomo nos terços inicial, médio e final da gestação da vaca.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Morfofisiologia da placenta bovina

As formas de reprodução dos seres vivos apresentam grande diversidade. O processo fisiológico da gestação, com a retenção e desenvolvimento do zigoto até o final do estágio fetal e parto, pode ser considerada uma adaptação com função primária de proteção do indivíduo em desenvolvimento, que atinge seu clímax nos mamíferos. Como regra geral, poucos ovos, dentro do número potencial, se desenvolvem e são mantidos dentro do organismo materno, que lhes dá proteção extra através de estruturas especializadas para a nutrição do embrião e do feto dentro do útero (Amoroso, 1952).

A placenta, órgão formado por tecidos fetais, tem funções nutritiva, protetora,

respiratória, endócrina e imunossupressora. Nos mamíferos da subclasse Eutheria ela é responsável pelo intercâmbio metabólico materno-fetal durante a maior parte do período de gestação (Amoroso, 1952).

A placenta apresenta grande diversidade estrutural entre as diferentes espécies, o que leva à utilização de vários aspectos para sua classificação. No caso da vaca, a placentação é considerada vilosa, sendo classificada como cotiledonária, adeciuada e epiteliocorial (Bjorkman, 1982).

#### 2.1.1 Placentação

Após a fertilização, em torno do 7º ou 8º dia o embrião atinge o estágio de blastocisto e, na seqüência do seu desenvolvimento, ocorre a quebra da zona pelúcida e o blastocisto fica livre de sua estrutura protetora no ambiente uterino (Derivaux *et al.*, 1988). A parede do embrião, até esse ponto, é constituída de epitélio uni laminar denominado trofoblasto. Em seguida desenvolve-se uma camada de mesoderma e a membrana composta resultante constitui o córion. O âmnio, uma vesícula ectodérmica, circunda o embrião e o sustenta em líquido. Além do âmnio, outras duas vesículas participam da formação da placenta: o saco vitelino, em comunicação com o intestino médio, e o alantóide, que é um divertículo do intestino posterior (Perry, 1981).

As glândulas endometriais secretam o histotrofo, que inicialmente é responsável pela manutenção do embrião. A seguir, a implantação é necessária para assegurar o suprimento adequado de oxigênio e de nutrientes para o desenvolvimento do conceito. A implantação se caracteriza por vascularização e pelo estabelecimento do contato entre as membranas embrionárias e o endométrio (Dantzer, 1993). A contribuição nutricional do histotrofo diminui, relativamente, com o desenvolvimento dos placentomas, porém ele pode ter importância durante toda a gestação (Hradecky *et al.* 1988a).

Nos bovinos a migração transuterina do embrião é rara. O blastocisto inicia o alongamento entre o 12º e o 13º dia após a fertilização. O embrião normalmente se encontra no terço médio do corno ipsilateral ao corpo lúteo, enquanto o córion continua seu alongamento até ocupar todo o lume do útero (King *et al.*, 1982).

O endométrio da vaca apresenta áreas especializadas, as carúnculas uterinas, as quais não apresentam glândulas endometriais, mas que são responsáveis pela interação com a membrana corioalantóidea para formação do placentomo. Há indícios da interação materno fetal em áreas não carunculares (King *et al.*, 1982).

A implantação, na vaca, é superficial, uma vez que o blastocisto permanece no lume uterino, sendo diferente da implantação intersticial, na qual o embrião se insinua na parede uterina (Perry, 1981). O estágio de justaposição se inicia por volta do 18º ao 20º após a fertilização. A presença de protrusões citoplasmáticas de células trofoblásticas e a migração das células binucleadas junto à abertura das glândulas endometriais são importantes para fixação do conceito. Por volta do terceiro mês de gestação é que se completa o processo de aderência das membranas fetais ao endométrio (Derivaux *et al.*, 1988).

A placenta é formada quando o tecido fetal entra em contato com o materno permitindo a interação fisiológica entre mãe e feto. Ela é composta pelas estruturas avasculares córion e âmnio e pelo alantóide (vascular), sendo esta sua composição definitiva e que permanece assim até o final da gestação. No seu

### 2.1.2 Morfologia da placenta bovina

A placentação dos bovinos pode ser definida como uma aposição das membranas fetais e dos tecidos maternos, a qual possibilita que ocorram trocas fisiológicas entre ambos (Mossman, 1937). Os mamíferos, no seu desenvolvimento inicial, possuem uma característica única, que é a passagem de nutrientes da mãe para o feto através da placenta (Noden & Lahunta, 1985), que tem as funções nutritiva, protetora, respiratória, endócrina e imunossupressora, além de ser a responsável pela troca metabólica materno-fetal ao longo da gestação (Bjorkman, 1982). Ainda, a placenta e, em especial, as estruturas fetais, atuam como uma barreira prevenindo a mistura do sangue fetal com o materno (Noden & Lahunta, 1985).

O tamanho e a dinâmica fisiológica da placenta mudam continuamente ao longo da gestação, possibilitando ao feto condições de flutuação e liberdade de movimentos, suporte, condições térmicas, químicas e osmóticas constantes, favorecendo o seu desenvolvimento (Bjorkman, 1982).

No início da gestação, a formação da placenta está intimamente relacionada com as membranas extra-embriônicas, saco vitelino, âmnio, alantóide, e córion. As membranas fetais participam na formação da placenta de forma diferenciada, isoladas ou associadas, originando três tipos de placentação que se diferem segundo a identidade das membranas fetais envolvidas: coriônica, corioalantóide e vitelina. A placenta corioalantóide, característica de todos os animais domésticos origina-se da fusão do alantóide com o córion (Hafez, 2004).

O período inicial de gestação da vaca, como nos ungulados em geral, é caracterizado pela presença de um grande saco vitelino. A nutrição inicial do embrião é histotrófica e a circulação é corio-vitelina. Em torno da quarta ou quinta semana de gestação essa circulação torna-se cório-alantóidea, coincidindo com o desenvolvimento do alantóide que passa a ocupar ambos os cornos do útero (Hafez, 2004).

Vários métodos foram elaborados para classificação morfológica da placenta, incluindo

estádio inicial a placenta é cório-vitelínica, formada pelas associações do córion com o saco vitelino (Perry, 1981). Isso ocorre porque o saco vitelino é rapidamente suplantado pelo crescimento do alantóide e, após três semanas, começa a se degenerar (Bjorkman, 1982).

a distribuição de contato, as membranas extra-embriônicas, o grau de implantação, a configuração da conexão coriônica e a combinação destes, para descrever a placenta de uma espécie em particular (Banks, 1991).

De acordo com a configuração da junção materno-fetal, a placenta dos bovinos é classificada como cotiledonária; e os cotilédones e vilos coriônicos agrupados, que se desenvolvem em correspondência às carúnculas uterinas, formam os placentomos, (Amoroso, 1952; Steven, 1975; Silva *et al.*, 2004), estando os cotilédones separados por áreas de córion liso, conhecidas como porção intercaruncular (Ramsey, 1982).

A placenta também pode ser classificada de acordo com o grau de interação entre os vilos coriônicos e o endométrio. Nos bovinos a placenta é considerada adecuada, pois componentes fetais interagem com o tecido uterino que permanece relativamente intacto e do qual podem ser separados com facilidade, sem maiores danos à mucosa uterina (Steven, 1975; Wooding, 1992; Schlafer, *et al.*, 2000; Meça *et al.*, 2006).

Histologicamente, a classificação da placenta, citada por Bjorkman (1982), propõe que exista uma variação, entre espécies, no número de camadas dos componentes teciduais maternos, enquanto na porção fetal os componentes teciduais são constantes. Por causa destas diferenças a placenta também é classificada com base no número de camadas dos componentes teciduais maternos, resultando que a placenta da vaca é classificada como epiteliocorial devido a persistência das três camadas do tecido materno (epitélio uterino, conjuntivo e endotélio vascular) e do tecido fetal (trofoblasto, conjuntivo e endotélio vascular).

Outra classificação para a placenta dos ruminantes foi proposta por Wooding (1992), e está baseada no fato de ocorrer migração de células do tecido fetal para o materno e a subsequente fusão destas células à placenta, o

que leva também à sua classificação como sinepiteliocorial.

A área de interdigitação entre o córion e a mucosa uterina está restrita a estruturas convexas conhecidas como carúnculas, que são proeminências aglandulares de forma oval da mucosa uterina (Perry, 1981; Bjorkman, 1982). A união dos vilos coriônicos com as carúnculas forma o placentomo (Steven, 1975).

As carúnculas, na maioria das espécies de ruminantes, organizam-se em fileiras que variam em número de duas (em algumas espécies de veados) e quatro (ruminantes domésticos, girafa e maioria dos antílopes) (Hradecky *et al.*, 1988).

O epitélio da cripta caruncular é cúbico ou achatado e suas células possuem núcleos esféricos com nucléolos evidentes (Bjorkman, 1982). O epitélio uterino, além destas células cubóides, apresenta células gigantes multinucleadas (Derivaux *et al.*, 1988).

Podem ser observadas carúnculas livres de placentação nas extremidades dos cornos uterinos. A redução no número de carúnculas disponíveis para a placentação é compensada pelo aumento de tamanho dos placentomos existentes (Hradecky *et al.*, 1988).

Nos ruminantes os primeiros placentomos desenvolvem-se na curvatura dorsal, no terço médio do corno gestante, onde também apresentam maior tamanho durante toda gestação. Durante a gestação da vaca de 70 a 120 placentomos se desenvolvem e aumentam diversas vezes seu tamanho original, com estabilização do crescimento ocorrendo entre 180 a 210 dias da gestação (Hradecky *et al.*, 1988; Marques Júnior *et al.*, 1993; Hafez, 2004). Segundo King *et al.* (1982) os placentomos crescem aproximadamente cinco mil vezes, ocorrendo pequena involução próxima ao parto. Com o avançar da gestação, à medida que as necessidades do feto aumentam novos placentomos são formados nas extremidades proximal e distal do útero, apresentando-se no estágio precoce de penetração dos vilos, mesmo na gestação avançada (Hradecky, *et al.*, 1988).

Segundo Bjorkman (1969), os vilos coriônicos consistem em mesênquima vascular revestido por uma camada simples de trofoblasto, este último composto de células cilíndricas mononucleadas e células binucleadas.

A origem das células binucleadas do trofoblasto se dá através de mitoses dos núcleos das células uninucleadas, sem citocinese, o que mantém seu número estável através de constante transformação de células uninucleadas em células binucleadas, porém as mesmas são incapazes de se proliferar (Derivaux *et al.*, 1988).

No trofoblasto da placenta de ruminantes as células binucleadas são encontradas desde a implantação até o parto. As células binucleadas correspondem de 15 a 20% das células do trofoblasto, com aproximadamente um quinto delas em migração através da interface materno-fetal (Wooding, 1983). Na interface materno-fetal as células binucleadas se fundem às células do epitélio endometrial, liberando seus grânulos citoplasmáticos, e desta fusão ocorre temporariamente a formação das células híbridas com três núcleos (Wooding *et al.*, 1986; Wooding & Beckers, 1987).

As células binucleadas dos ruminantes quando completamente funcionais apresentam-se granuladas e com volume citoplasmático aumentado e encontram-se próximas à superfície do epitélio trofoblástico uninuclear, embora não façam parte desta junção compacta, que é a primeira barreira de migração para as células binucleadas. A segunda barreira é composta pelo tecido de interdigitação com o epitélio trofoectodérmico, que forma a junção microvilar. Inicialmente este tecido é o epitélio uterino materno, mas consideravelmente modificado, inclui a transformação para sincício durante a implantação e desenvolvimento da placenta (Wooding, 1992). As células binucleadas secretam lactogênio placentário, estrógeno, progesterona e prostanóides, como prostaciclina e prostaglandinas, produtos de secreção que são liberados nos capilares maternos (Reimers *et al.*, 1985; Gross & Williams, 1988; Landim Júnior, 2006). Ainda, as células binucleadas secretam fatores de crescimento e de maturação fetal ao longo da gestação (Schalafer *et al.*, 2000).

Os mecanismos de controle da migração e da quantidade de células binucleadas ainda não estão bem estabelecidos, mas aparentemente o feto exerce influência sobre esses processos (Wooding *et al.*, 1986).

A maturação placentária na proximidade do parto inicia-se com o achatamento do epitélio nas carúnculas maternas, que se intensifica entre três a cinco dias antes do parto, e com a diminuição das

células binucleadas e das células epiteliais das carúnculas (Santos, 1996). Aparentemente o feto participa na manutenção do número de células binucleadas e as alterações hormonais que ocorrem antes do parto parecem favorecer

### 2.1.3 Fisiologia da placenta bovina

A função da placenta como barreira seletiva e via de transporte está relacionada com o número de camadas de tecido a serem atravessadas. O tecido conjuntivo materno e o mesênquima fetal não oferecem obstáculos à difusão de nutrientes e metabólitos. O número de membranas citoplasmáticas da barreira placentária dá uma indicação da sua permeabilidade; entretanto, estudos morfológicos não fornecem informações suficientes sobre as funções de transporte e de barreira (Bjorkman, 1982).

O mecanismo de transporte de gases respiratórios é o de difusão simples sob o gradiente de pressão (Bjorkman, 1982). O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) passa livremente da circulação materna para fetal, sendo isso facilitado por mecanismos fisiológicos. O sangue fetal tem menos afinidade pelo CO<sub>2</sub>, o que favorece a difusão do CO<sub>2</sub> do sangue fetal para o materno (Hafez, 2004).

O transporte placentário de nutrientes baseia-se no fluxo da mãe para o feto, ou ocorre devido à diferença de concentração dos nutrientes ou por mecanismos de transporte ativo. Muitos nutrientes como glicose, aminoácidos, eletrólitos e vitaminas, são levados por transportadores localizados no trofoblasto (Hafez, 2004). A membrana placentária é permeável à água e a eletrólitos, enquanto a passagem de imunoglobulinas é escassa ou nula (Bjorkman, 1982). Segundo Murai & Yamauchi (1986), a principal rota de transferência de ferro da mãe para o feto se dá através do extravasamento de sangue materno e a subsequente fagocitose dos eritrócitos pelas células do trofoblasto.

Dentre os aspectos fisiológicos da placenta, sua função endócrina tem sido largamente estudada. A placenta está relacionada à produção e metabolismo de gonadotropinas, esteróides e prostaglandinas, hormônios envolvidos na manutenção da gestação, na maturação placentária e no mecanismo do parto (Steven, 1975; Marques Júnior, 1988).

essa diminuição. O decréscimo do número de células das criptas carunculares inicia-se a partir dos 270 dias de gestação (Barreto Filho, 1992).

A placenta da vaca tem a capacidade de sintetizar pequena quantidade de progesterona, a partir dos 80º dia de gestação (Izhar *et al.*, 1992), mas a vaca é corpo lúteo dependente para a gestação (Hafez, 2004). A concentração plasmática de estrógenos aumenta no final da gestação, sendo a principal fonte deste hormônio os tecidos fetais da placenta (Hoffmann, 1983). Por ocasião do parto os placentomas apresentam concentração baixa de receptores para o estrógeno (Sauerwein *et al.*, 1989).

Ao longo da gestação, a produção de esteróides pela placenta modifica-se e, com a proximidade do parto, a razão estrógeno/progesterona circulante é alterada, com diminuição significativa na concentração de progesterona dois a três dias antes do parto. Concomitantemente o estrógeno começa a elevar-se cerca de três semanas antes do parto, atingindo altas concentrações na semana que antecede o mesmo (Marques Júnior, 1988).

Foram isoladas dos cotilédones substâncias com atividade de hormônio luteinizante (LH), direcionando para a possível existência de uma gonadotropina coriônica bovina (Ailemberg & Shemesh, 1983; Beckers *et al.*, 1988).

Beckers *et al.* (1980) isolaram e caracterizaram o lactogênio placentário bovino (bPL). O bPL ou somatotropina coriônica é o hormônio peptídeo da gestação, atuando tanto na mãe quanto no feto (Hafez, 2004). Ele apresenta ação semelhante à dos hormônios hipofisários prolactina e hormônio do crescimento, porém com diferenças estruturais. Sua presença esclarece sobre o crescimento praticamente normal de bezerras anencéfalos, exemplificando a não dependência exclusiva do hormônio do crescimento autógeno de origem hipofisária para o crescimento fetal na espécie bovina (Derivaux *et al.*, 1988).

O bPL é encontrado tanto nos cotilédones quanto nas carúnculas, sendo a concentração no cotilédone de três a quatro vezes maior que na carúncula. A concentração plasmática do bPL no feto é maior entre a 8ª e a

12<sup>a</sup> semana de gestação (20 a 30ng/ml), diminuindo progressivamente até atingir concentrações em torno de 5ng/ml imediatamente antes do parto. Já no soro materno o bPL é detectável a partir de 26 dias após a fertilização, com aumento progressivo de sua concentração chegando a atingir de 1 a 2 ng/ml por ocasião do parto (Derivaux *et al.*, 1988).

Wooding (1987) e Wooding & Beckers (1987), empregando técnicas imunocitoquímicas e microscopia eletrônica, mostraram que o bPL foi encontrado somente em grânulos no aparelho de Golgi das células binucleadas do trofoblasto, sugerindo que a

## 2.2 Desenvolvimento e maturação da placenta

A placenta sofre mudanças estruturais durante a gestação, que estão relacionadas com o momento do parto e expulsão da mesma (Bjorkman, 1954).

Os placentomas adquirem sua forma exterior definitiva em torno de 80 e 90 dias de gestação, quando se formam pedículos no endométrio, na base do placentomo e o tecido conjuntivo uterino apresenta-se edemaciado. Na seqüência, dos 95 aos 170 dias de gestação a periferia dos placentomas se altera, ocorrendo diminuição da conexão entre as partes fetal e materna. Pequenos hematomas são formados pelo extravasamento de sangue materno e áreas de erosão no epitélio. A reabsorção e digestão destes hematomas são um meio de suprimento de ferro para o feto (Bjorkman, 1954; Murai & Yamauchi, 1986; Hradecky *et al.*, 1988; Santos, 1995).

O trofoblasto e o epitélio materno no placentomo também sofrem alterações durante a gestação, sendo que a diminuição do número de células do epitélio nas criptas das carúnculas parece estar relacionada com a maturação placentária (Marques Júnior, 1988).

O número de células epiteliais maternas nas criptas diminui, em vacas taurinas (Marques Júnior, 1988) e zebuínas (Barreto Filho, 1992). Progressivamente o epitélio materno torna-se achatado e eventualmente desaparece em algumas áreas. O número de células binucleadas também diminui (Williams *et al.*, 1987).

A partir dos 270 dias de gestação acentua-se o decréscimo no número de células nas criptas carunculares (Woicke *et al.*, 1986;

exocitose desses grânulos seja a via normal de secreção do bPL na circulação materna e fetal.

A principal fonte de produção de prostaglandinas na placenta são as células uninucleadas das vilosidades coriônicas, a partir do ácido araquidônico. As células binucleadas atuam como moduladoras da síntese de prostaglandinas pelas células uninucleadas, por serem capazes de converter prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) em prostaglandina E (PGE) (Gross & Williams, 1986). As células carunculares maternas realizam o catabolismo da PGF<sub>2α</sub>, sendo essa atividade catabólica mais intensa no bovino que em outras espécies (Erwich *et al.*, 1989).

Barreto Filho & Marques Júnior, 1993). À medida que o parto se aproxima, os tecidos conjuntivo materno e fetal dos placentomas apresentam maior quantidade de colágeno, sinalizando a importância dessa transformação para liberação normal da placenta (Grunert, 1980).

Estudando os aspectos morfológicos e funcionais da maturação placentária, Woicke *et al.* (1986) observaram que distúrbios na maturação estão relacionados com a retenção de placenta. Segundo esses autores, vacas com parto normal apresentam epitélio materno descontínuo, com intenso achatamento e diminuição do número de células maternas, enquanto que em vacas com retenção de placenta o epitélio apresenta-se contínuo com células cubóides nas criptas das carúnculas, indicando imaturidade placentária.

Diversos trabalhos têm mostrado que animais com parto normal apresentam o número de células epiteliais maternas significativamente menor do que aqueles que retêm a placenta (Grunert *et al.*, 1976; Grunert, 1980; Marques Júnior, 1988; Barreto Filho, 1992; Barreto Filho & Marques Júnior, 1993; Santos, 1995).

Aparentemente, a maturação e liberação da placenta estão relacionadas também com o decréscimo das células binucleadas (Margolis *et al.*, 1983; Williams *et al.*, 1987). As células binucleadas têm papel importante no mecanismo de separação das membranas fetais durante o parto (Gross *et al.*, 1991; Woding, 1992). No final da gestação e no periparto imediato o número de células binucleadas está reduzido (Wooding, 1983; Williams *et al.*, 1987).

As células binucleadas são capazes de uma produção considerável de progesterona e pregnenolona (Reimers *et al.*, 1985; Ullman & Reimers, 1989). Evans & Wagner (1981) observaram que o tecido dos vilos fetais é capaz de converter os precursores pregnenolona e androstenediona em estrogênios. No final da gestação e imediatamente antes do parto as

### 2.3 Anexos extra-embrionários

O embrião bovino atinge o estágio de blastocisto sete a oito dias após a fertilização. Sua parede, até este estágio, é constituída por um epitélio uni-laminar, o trofoblasto, que constituirá a camada externa da placenta. O trofoblasto, juntamente com o mesoderma do embrião forma o cório. O alantóide se desenvolve a partir da parte terminal do intestino do embrião e funde-se com o cório formando a membrana corioalantóide. O âmnio, que deriva do ectoderma embrionário, circunda o feto e tem a função de proteção e sustentação (Steven, 1975).

Nos animais domésticos, o estágio inicial do desenvolvimento placentário e o crescimento do embrião se devem ao histotrofo, secretado pelas glândulas endometriais (Schlafler *et al.*, 2000). Embora a contribuição nutricional do histotrofo diminua relativamente com o desenvolvimento dos placentomas, este pode ter importância durante toda a gestação (Hradecky *et al.* 1988a). O suprimento adequado de oxigênio e nutrientes para o desenvolvimento fetal se dá devido ao estabelecimento do contato entre as membranas embrionárias e o endométrio, caracterizando a implantação que se dá por aposição e rica vascularização (Dantzer, 1993).

### 2.4 Líquidos extra-embrionários

A origem dos líquidos extra-embrionários é complexa, podendo ter pelo menos quatro locais onde a absorção e a secreção podem ocorrer: nos sistemas respiratório, urinário e digestivo e na epiderme do feto. O líquido amniótico também pode ser influenciado pelas secreções salivares, da mucosa bucal, da traquéia e do intercâmbio dinâmico entre os compartimentos materno, fetal e do líquido amniótico entre mãe e feto (Hafez, 2004).

células binucleadas sintetizam progesterona a partir da pregnenolona. Imediatamente antes do parto há uma diminuição na síntese de progesterona e aumento na síntese de estrogênios (Gross & Williams, 1988b). Esses achados confirmam o papel endócrino das células binucleadas no processo do parto e separação das membranas fetais (Lee *et al.*, 1986; Wooding, 1992; Wango *et al.*, 1992).

Na vaca, o âmnio é formado por volta de 13 a 16 dias após a concepção. É uma vesícula ectodérmica, derivada do folheto externo do cório ou das células internas do blastocisto. Assemelha-se a um saco duplo que envolve o feto, exceto no anel umbilical, e contém o líquido amniótico que envolve o feto, proporcionando uma proteção mecânica ao mesmo, além de prevenir a aderência entre o feto e a placenta, evitando más formações fetais. A parede interna do saco duplo é denominada o verdadeiro âmnio, enquanto a parede externa é o falso âmnio. No estágio final do desenvolvimento fetal o âmnio é uma membrana transparente, resistente e flexível (Roberts, 1986).

O alantóide é formado entre a segunda e terceira semana de gestação. Sua camada externa é ricamente vascularizada, conectada à aorta do feto pelas artérias umbilicais e ao fígado e veia cava superior pela veia umbilical. O alantóide cresce entre o verdadeiro e o falso âmnio, e sua camada externa se funde com o falso âmnio, formando o córioalantóide. A camada interna, desprovida de vascularização, encontra-se ao longo do âmnio e forma a parte alantoidiana do cordão umbilical. O alantóide está completamente formado por volta de 24 a 28 dias após a concepção (Roberts, 1986; Arthur *et al.*, 1996).

O líquido amniótico pode ser caracterizado fisicamente como claro, incolor e mucóide. A quantidade encontrada no final da gestação da vaca varia, em média, de 5000 a 6000 ml. O líquido amniótico origina-se do epitélio amniótico inicialmente e, também, da urina fetal no terço final da gestação. Com o avançar da gestação o volume do líquido amniótico se mantém quase que constante, porém mais viscoso, sendo regulado parcialmente pela deglutição fetal. Além de proteger o feto ao longo da gestação, o líquido amniótico também tem a função de auxiliar no

momento do parto, lubrificando o canal de parto, o que facilita a passagem do feto pelo mesmo com mínimo de traumatismo tecidual, além de manter a patência das vias aéreas do feto (Arthur, *et al.*, 1996).

O líquido alantoidiano é formado de secreções e metabólitos provenientes dos rins do feto, urina hipotônica, e mantém a pressão osmótica do plasma fetal, evitando a perda de líquidos pela circulação materna. Ele se caracteriza por ser aquoso e de cor âmbar, com composição citológica e bioquímica complexa, contendo, por exemplo, albumina, frutose e uréia. Ao longo da gestação o líquido alantoidiano aumenta, chegando a um volume médio de 9500 ml ao final da mesma. O volume do líquido alantóide é relativamente maior que o do amniótico durante toda a gestação da vaca (Roberts, 1986; Arthur *et al.*, 1996; Hafez, 2004).

A análise hormonal do líquido amniótico tem sido utilizada para identificação do sexo fetal, juntamente com o cariótipo. No terço médio da gestação os hormônios testosterona e hormônio folículo estimulante foram utilizados para diagnóstico do sexo fetal por Donival & Duvive (1980). A concentração de progesterona, dosada nos líquidos amniótico e alantoidiano, mostrou aumento progressivo durante a gestação até o parto, o mesmo não ocorrendo com a concentração da mesma na circulação materna e no cordão umbilical, quando a concentração diminuiu a partir de duas semanas antes do parto, sugerindo que ela pode ter origem em diferentes fontes. Estudos *in vitro* com as membranas corioalantoide e âmnio de ovelhas sugerem que estas têm a capacidade de converter 3H-pregnenolona em progesterona (Power *et al.*, 1982). No terço final da gestação a composição dos líquidos amniótico e alantoidiano difere substancialmente um do outro, da urina fetal e do plasma materno e fetal. A concentração hormonal pode afetar sua composição ou volume, sendo o hidroalantóide mais comum que o hidroâmnio (Wintour *et al.*, 1986).

Os esteróides progesterona, 17-alfa-hidroxiprogesterona, 17-beta-estradiol, testosterona, androstenediona, cortisol e sulfato de dihidroepiandrosterona foram dosados no celoma, líquido amniótico e no soro materno de doze mulheres entre oito e doze semanas de gestação. No líquido celomático encontrou-se maior concentração relativa de progesterona, 17-beta-estradiol e 17-alfa-hidroxiprogesterona sugerindo a síntese desses esteróides no local. Já o líquido amniótico possui baixas concentrações

de esteróides, exceto a progesterona, comparado com o celoma e o soro materno. A difusão de esteróides através do âmnio parece ser limitada, sugerindo ser um mecanismo de proteção fetal de atividades biológicas da mãe (Atkinson, *et al.*, 1996).

O acúmulo excessivo de líquido na cavidade amniótica e na alantoidiana é uma patologia pouco freqüente na gestação do bovino. O hidroâmnio é normalmente associado com malformação fetal, enquanto o hidroalantóide é associado com patologias uterinas (Nascimento & Santos, 1997).

Com o advento de novas tecnologias, como transferência de embriões (TE), fertilização *in vitro* (FIV) e clonagem, as patologias como acumulação anormal de líquidos fetais têm sua ocorrência aumentada. Vacas gestantes de fetos provenientes de transferência nuclear para células somáticas (TN) mostram incidência de acumulação anormal de líquidos fetais, principalmente hidroalantóide, com aumento da mortalidade fetal no terço médio da gestação (Li *et al.*, 2005). Fetos provenientes de vacas gestantes por TN apresentam alta incidência da síndrome do feto grande, hidroalantóide e placentomegalia no terço final da gestação. A síndrome do feto grande parece estar relacionada com alterações na expressão de fatores placentários essenciais no desenvolvimento normal do feto. Achados macroscópicos sugerem que o crescimento anormal placentário precede o crescimento anormal fetal. Vários exemplos de deficiência placentária foram observados, sugerindo que algumas anormalidades fetais observadas em fetos TN, como coração grande, cordão umbilical aumentado e ascite, são consequência de disfunção placentária (Constant *et al.*, 2006).

Falhas nas gestações TN poderiam estar associadas a um desenvolvimento insuficiente ou anormal da placenta, um retardo na placentação e ou um atraso no desenvolvimento do trofoblasto nos estádios iniciais da placentação, sugerindo que proteínas específicas, incluindo bPL, glicoproteína associada à gestação e a heparinase, são importantes para se encontrar explicações para as aberrações na placentação e gestações TN (Hashizume *et al.*, 2002).

Evidências da expressão de aquaporina nas membranas fetais humanas foram encontradas em estudos realizados com cultura *in vitro* de células amnióticas, sendo a aquaporina permeável à água, uréia e glicerol,



podendo estar envolvida no processo de homeostase do líquido amniótico (Wang *et al.*, 2006). Nas gestações com polihidroânio a expressão de aquaporina 1 está aumentada, sugerindo que alterações na expressão da mesma podem estar associadas a esta patologia (Mann *et al.*, 2006).

Através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa com

#### 2.4.1 Citologia dos líquidos extra-embriônicos

Os líquidos amniótico e alantoidiano têm constituintes metabólicos, eletrólitos, enzimas, hormônios, células e outras estruturas. Nos ruminantes a parede interna do âmnio, principalmente as próximas ao umbigo, apresentam elevações circulares ricas em glicogênio, que são as placas amnióticas que desaparecem no final da gestação (Hafez, 2004).

As células do líquido amniótico e alantoidiano foram estudadas com o objetivo de diagnosticar o sexo fetal, com a avaliação dos mesmos revelando que a maioria de suas células é de origem fetal (Bongso & Basrur, 1977).

A determinação da maturidade fetal através da citologia do líquido amniótico se dá pela variação morfológica ou pela sua característica tintorial (Cunha *et al.*, 1978).

Moya *et al.* (2006) usaram o método de coloração Hematoxilina-Shorr para avaliar a citologia do líquido amniótico e determinaram o grau de maturidade das células epidérmicas fetais a partir da classificação de quatro tipos celulares: Células intermediárias pequenas e grandes, e células superficiais nucleadas e anucleadas.

Na mulher, a presença das células basófilas malpighianas, em maior concentração no período de 20 a 44 semanas de gestação, sugerem ser o feto do sexo feminino (Toulouse *et al.*, 1975). A contagem de células escamosas cianofílicas no líquido amniótico, no terço final da gestação de 48 mulheres, foi utilizada para diagnóstico do sexo fetal (Hudson, 1975). No bovino, pelo método Papanicolaou, a contagem de células cianofílicas no líquido amniótico e alantoidiano foi utilizada para diferenciação sexual do feto, em vários estágios gestacionais. Outras células, eosinofílicas e oranginofílicas, também foram identificadas, porém sem aparente importância na identificação sexual (Bongso *et al.*, 1978).

dissorção/ionização induzida por laser, foram identificadas 35 proteínas no líquido amniótico humano, sendo as proteínas calgranulin A e B encontradas nas gestantes infectadas por *Ureaplasma urealyticum*, o mesmo não ocorrendo nas gestantes sem infecção, indicando que possam existir marcadores em potencial para detectar infecções intra-uterinas (Park *et al.*, 2006).

Bongso & Basrur (1975) descreveram que a característica morfológica das células do líquido amniótico não está correlacionada com o estágio gestacional, porém o número de células do líquido amniótico tem correlação direta com a fase da gestação.

Através de esfregaços da membrana corioalantóide foram encontradas células cianofílicas similares às do líquido alantoidiano. Células de origem fetal, como da pele e mucosa bucal, têm similaridade com as células eosinofílicas grandes, cianofílicas e orangeofílicas nucleadas e anucleadas. Os esfregaços do cordão umbilical consistem em sua maioria de células orangeofílicas retangulares nucleadas similares as encontradas no líquido amniótico (Bongso & Basrur, 1977) (Anexo IX).

O líquido alantoidiano possui apenas células originadas da membrana corioalantóide. As células presentes no líquido alantóide têm pouca atividade mitótica comparada com as células do líquido amniótico, sendo as células cianofílicas menores, que se originam na membrana amniótica, as que têm maior atividade. Estas células e a maioria das células nucleadas encontradas no líquido amniótico podem ser utilizadas para identificação do sexo fetal e para estudos citogenéticos do feto bovino, devido a sua origem fetal (Bongso & Basrur, 1977).

Elevadas concentrações de eritropoetina no líquido amniótico, segundo Busher *et al.* (1996), indicam uma hipoxianemia prolongada. Foi avaliada, pelo método de Dokumov, a presença de cromatina nas células para determinação do sexo fetal, sendo que a presença das mesmas indicou ser o feto do sexo feminino em 92,31% dos casos (Marinov *et al.*, 1991).

Quantidade significativa de célula livre de DNA foi detectada no líquido amniótico

(Zhong *et al.*, 2006). Miura *et al.* (2006) sugere que o DNA livre no líquido amniótico pode ser

usado para diagnosticar anormalidades fetais, tais como trissomias e monossomias.

## 2.5 Histologia do placentomo

O desenvolvimento dos placentomos da vaca é dependente da idade gestacional e da sua posição no corno uterino gestante. Os placentomos da região medial do útero apresentam maior desenvolvimento em relação aos proximais e distais, a partir de 150 dias da gestação (Barreto Filho, 1992).

Na vaca, a fusão da serosa do ectoderma com o epitélio uterino inicia-se aproximadamente aos dezoito dias de gestação. As células epiteliais tornam-se vacuoladas e são progressivamente destruídas nas áreas caruncular e intercaruncular, até que a serosa esteja em contato com o estrato exterior de células da camada compacta que forma um estrato cuboidal de células de conexão. Essas células persistem no placentomo, enquanto nas áreas intercarunculares um novo epitélio se origina a partir das glândulas uterinas e o contato fetal é perdido. Erosão secundária pode ocorrer durante a formação de placentomos acessórios (Marion & Gier, 1959).

A formação das criptas e penetração dos vilos são processos quase simultâneos. Em algumas carúnculas a penetração dos vilos é retardada em certas áreas, indicando que ambos os processos podem apresentar mecanismos regulatórios comuns, mas não necessariamente dependentes (Hradecky *et al.*, 1988).

O número de células maternas do placentomo, nas três regiões do corno uterino gestante, apresenta tendência a diminuir ao longo da gestação. Entre as idades de 90-120 e 120-150 dias, e entre as idades de 180-210 e 210-240 dias de gestação, o número de células dos placentomos proximais e mediais decresceu. Nos placentomos da região distal, o número médio de células diminuiu às idades de 90-120 e 120-150 dias. Novos decréscimos significativos são observados entre as idades de 150-180 e 210-240 dias, assim como entre 210-240 e 240-270 dias de gestação (Barreto Filho, 1992).

A atividade angiogênica da placenta bovina, no terço médio da gestação, está associada primeiro à área materna do placentomo, a carúncula, que aparentemente direciona o crescimento da micro vascularização placentária (Reynolds *et al.*, 1987).

O trofoblasto e o epitélio materno, no placentomo da vaca, parecem sofrer alterações ao longo da gestação. Uma importante alteração morfológica do placentomo, aparentemente relacionada com a maturação placentária, é a diminuição das células do epitélio nas criptas das carúnculas (Marques Júnior, 1988).

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Animais

Neste experimento foram utilizados trinta úteros gestantes, obtidos em matadouros, de vacas mestiças abatidas com idades gestacionais diferentes e classificadas em três grupos de acordo com o terço gestacional, sendo

dez animais em cada grupo, constituindo o Grupo 1 (G1) no terço inicial (0 a 90 dias), o Grupo 2 (G2) no terço médio (90 a 180 dias) e o Grupo 3 (G3) no terço final (180 a 280 dias) de gestação.

### 3.2 Local e data

A realização da coleta foi em frigorífico da Região Metropolitana de Belo

Horizonte, Estado de Minas Gerais, no período de maio a julho de 2007.

### 3.3 Coleta do material

As genitálias eram retiradas dos animais imediatamente após o abate e mantidas refrigeradas em caixa térmica e levadas no menor tempo possível para o Setor de Reprodução do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG, onde eram avaliadas e realizadas as coletas das amostras.

De cada espécime foram coletados 20 ml de líquido alantoidiano, com seringa e agulha, dos quais foram retiradas três alíquotas colocados em tubos eppendorf esterilizados e identificados, com o cuidado de manter a placenta e anexos embrionários intactos. Em seguida, depois de identificado o âmnio, também foram coletados 20 ml do líquido amniótico, com seringa e agulha, dos quais foram retiradas três alíquotas colocados em tubos eppendorf estéreis e identificados. O

líquido coletado era mantido nas seringas em caixa de isopor com gelo reciclável até o final da coleta do restante do material, quando então se fazia a preparação das alíquotas e dos esfregaços para avaliação da celularidade dos mesmos (Anexo I).

O placentomo era retirado da região medial da curvatura maior do útero e colocado íntegro em recipiente contendo formol a 10%. Após todo o processamento inicial do material, num tempo aproximado de duas horas, o placentomo era seccionado transversalmente em três partes (Fig. 1) e trocado o formol. Os placentomos do terço inicial da gestação não foram seccionados devido ao seu menor tamanho e fragilidade, tendo somente o formol trocado. Os placentomos ficaram estocados em formol a 10% até o início do seu processamento histológico (Anexo II).

### 3.4 Cálculo Gestacional

Para a exposição total do feto era realizada uma incisão longitudinal na curvatura maior do corno uterino gestante até a secção do cordão umbilical. O feto era colocado em decúbito lateral com sua linha dorsal em posição retilínea para o registro do comprimento ápico-caudal (cabeça-base da cauda) e determinação da idade gestacional (Fig. 2), segundo

Richardson (1989), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$X = 2,5 (Y + 21)$$

Onde:

*X é a variável idade gestacional (dias)*

*Y é o comprimento ápico-caudal (cm)*

### 3.5 Citologia dos líquidos extra-embriônicos

Em tempo máximo de 30 minutos após a coleta, 10 ml dos líquidos amniótico e alantoidiano, sem coagulante, eram centrifugados (Centrífuga Excelsa Baby modelo 206/1) por 10 minutos com Força Centrifuga Relativa (FCR) de 200g. Dos sedimentos de cada alíquota eram realizados os esfregaços (três réplicas de cada líquido, de cada animal) que eram corados pelo método Panótico Rápido,

para contagem e avaliação da citologia. Foram contados 40 campos aleatórios por lâmina.

Na avaliação citológica foram consideradas as seguintes características celulares: células Eosinofílicas nucleadas e anucleadas, células Cianofílicas nucleadas e anucleadas e células Orangeofílicas.

### 3.6 Histologia do Placentomo

O processamento do material para histologia foi realizado no laboratório de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB).

Os fragmentos obtidos de cada placentomo foram desidratados através de passagens

sucessivas em soluções de álcool etílico em e concentrações crescentes, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Luna, 1968). Três cortes de cada fragmento, com 5µm de espessura, foram montados em lâmina de vidro e corados pela Hematoxilina-Eosina para avaliação em microscopia óptica (Anexo II).

#### 3.6.1 Quantificação das células maternas do placentomo nos terços Inicial, Médio e Final da gestação da vaca

A quantificação das células maternas do placentomo foi realizada em nove animais no terço inicial, oito animais no terço médio e nove animais no terço final da gestação em lâminas coradas pela Hematoxilina-Eosina.

A contagem das células maternas foi realizada através da microscopia óptica com aumento de 400x, utilizando-se uma ocular micrométrica de 100 divisões. Foram utilizadas 30 divisões do micrômetro que, alinhadas paralelamente às células maternas, delimitaram a extensão do campo em que foram contadas as células, segundo a metodologia empregada por Marques Júnior (1988). Foram contadas as células maternas na extensão delimitada pelas

30 divisões do micrômetro, em 20 campos microscópicos aleatórios (Anexo IV).

O número de campos microscópicos a serem examinados foi determinado para se obter o intervalo de confiança de 95%, segundo a seguinte fórmula (Snedecor & Cochran, 1994):

$$n = \frac{4s^2}{l^2}$$

Onde:

*n = número de repetições*

*s = desvio padrão*

*l = limite (intervalo de confiança a 95% de probabilidade)*

### 3.6.2 Determinação da proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo nos terços inicial, médio e final da gestação da vaca

Foram utilizadas oito lâminas de cada terço gestacional, coradas pela Hematoxilina-Eosina, para determinação da proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo.

Os componentes estruturais do placentomo quantificados foram: *Células maternas, fetais, binucleadas, gigantes (multinucleadas), vasos, tecido conjuntivo fetal e tecido conjuntivo materno.*

Utilizou-se microscópio óptico (aumento 400x) com uma ocular integradora tendo um retículo de cinco linhas horizontais e 25 pontos equidistantes (ocular integradora Zeiss KLP 10x). Aleatoriamente a grade da ocular integradora contendo 25 pontos (Fig. 3, Anexo IV) foi sobreposta a 80 campos microscópicos totalizando 2000 pontos por lâmina. O número de vezes que determinada estrutura atingiu os pontos foi utilizado para calcular a proporção volumétrica desta estrutura, segundo a seguinte fórmula (Sharpe *et al.* 1989):

$$\text{Proporção Volumétrica} = \frac{\text{Pontos por parâmetro}}{\text{Total de pontos contados}} \times 100$$

Para obtenção de um intervalo de confiança de 95%, o número de campos a ser analisado em cada lâmina foi determinado com variação de  $\pm 10\%$  do valor médio da proporção

de um componente estrutural cuja proporção correspondesse a aproximadamente 0,15. Esta estimativa foi feita através da seguinte fórmula (Snedecor & Cochran, 1994):

$$L = 2 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Onde:  $p$  = proporção

$n$  = número de pontos

$L$  = limite (intervalo de confiança a 95% de probabilidade)

Quando algum ponto da ocular integradora incidia sobre artefato de técnica e sobre as áreas de retração entre o tecido materno

e o fetal, este foi computado para avaliação da qualidade das lâminas, porém descartados para o cálculo das proporções volumétricas.

### 3.7 Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As diferenças entre as médias foram analisadas estatisticamente utilizando-se o teste t-Student com análise de variância simples.

O nível de significância utilizado nos testes estatísticos foi de 5% (0,05) (Sampaio, 2002).

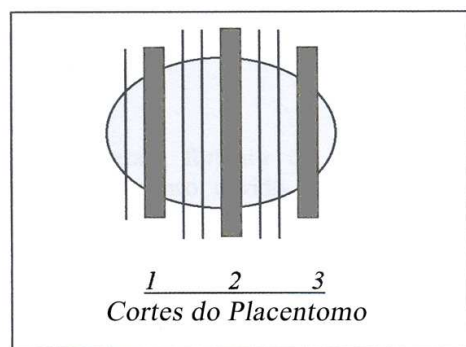


Figura 1: Esquema representativo dos cortes do placentomo da vaca para processamento histológico.

Terço Gestacional	Idade Gestacional (dias)	Comprimento ápico-caudal (cm)
Inicial - G1	52,5 - 93	0 - 16,2
Médio - G2	93 - 186	16,2 - 53,4
Final - G3	186 - 280	53,4 - 91,0

Figura 2: Representação do cálculo gestacional pelo comprimento ápico-caudal, em cm, e os dias de gestação, separados pelos terços inicial, médio e final da gestação da vaca.

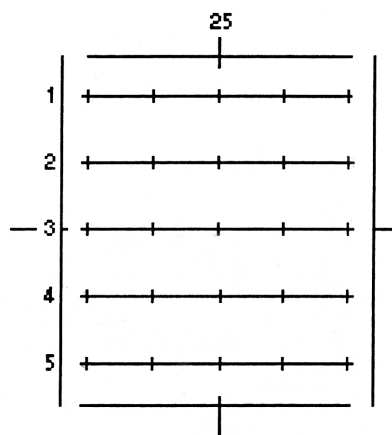


Figura 3: Representação da disposição dos pontos na ocular integradora. Estes pontos são sobrepostos ao corte histológico para determinação da proporção volumétrica dos componentes estruturais.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação macroscópica dos líquidos extra-embriônicos

No terço inicial da gestação (G1) a média do tamanho dos conceptos foi de 13,5cm de comprimento ápico-caudal, o que corresponde a aproximadamente 86,25 dias de gestação. No terço médio (G2) a média do tamanho dos conceptos foi de 29,25cm de comprimento ápico-caudal, o que corresponde a aproximadamente 125,62 dias de gestação. No terço final (G3) a média do tamanho dos conceptos foi de 63,77cm de comprimento ápico-caudal, correspondendo a aproximadamente 211,92 dias de gestação.

O líquido amniótico apresentou-se claro e incolor no G1, G2 e G3, com consistência mucóide, com sua viscosidade aumentando proporcionalmente ao aumento dos dias de gestação.

O líquido alantoidiano apresentou coloração âmbar no G1, G2 e G3, tornando-se mais escura no G3, com consistência aquosa nos três terços da gestação.

### 4.2 Citologia dos líquidos extra-embriônicos

O líquido alantoidiano mostrou-se praticamente ausente de células ou com a celularidade muito baixa e presença de raras hemácias. Todas as lâminas foram analisadas, porém, em função da baixa celularidade, não foi feita contagem celular nas mesmas.

No líquido amniótico a média do número de células totais (Cel Totais) no G1 foi 16,38±4,17, no G2 94,13±55,15 e no G3 125,1±52,45 (Tab. 1, Gráficos 1, 2 e 3). Houve diferença significativa entre G1 e G2 e entre G1 e G3 ( $P < 0,05$ ), porém não houve diferença entre G2 e G3 ( $P > 0,05$ ).

A média do número de células eosinofílicas nucleadas (Eosin CN) do líquido amniótico no G1 foi 7,25±5,47, no G2 25,63±11,20 e G3 48,78±23,71 (Tab. 1, Gráficos 1, 2 e 3). Houve diferença entre G1 e G2, entre G1 e G3 e entre G2 e G3 ( $P < 0,05$ ).

A média do número de células eosinofílicas anucleadas (Eosin SN) do líquido amniótico no G1 foi 3,13±4,09, no G2 8,25±8,66 e no G3 8,67±8,69 (Tab. 1, Gráficos

1, 2 e 3). Não houve diferença entre os grupos ( $P > 0,05$ ).

A média do número de células Cianofílicas nucleadas (Cianof CN) do líquido amniótico no G1 foi 1,13±1,55, no G2 43,50±0,57 e no G3 32,11±16,06 (Tab. 1, Gráficos 1, 2 e 3). Houve diferença significativa entre G1 e G2 e entre G1 e G3 ( $P < 0,05$ ), mas não houve diferença entre G2 e G3 ( $P > 0,05$ ).

A média do número de células Cianofílicas anucleadas (Cianof SN) do líquido amniótico no G1 foi 1,00±1,07, no G2 11,38±10,23 e no G3 31,78±22,48 (Tab. 1, Gráficos 1, 2 e 3). Houve diferença significativa entre G1 e G2, entre G1 e G3 e entre G2 e G3 ( $P < 0,05$ ).

A média do número de células Orangeofílicas (Orangeof) do líquido amniótico no G1 foi 4,25±3,49, no G2 5,38±4,27 e no G3 2,22±6,67 (Tab. 1, Gráficos 1, 2 e 3). Não houve diferença entre os grupos ( $P > 0,05$ ).

Tabela 1: Média do número de células totais, eosinofílicas com e sem núcleo, cianofílicas com e sem núcleo e orangeofílicas, do líquido amniótico dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação da vaca.

G	Cel Totais	EosinCN	EosinSN	CianofCN	CianofSN	Orangeof
1	16,38 ± 4,17a	7,25 ± 5,47a	3,13 ± 4,09a	1,13 ± 1,55a	1,00 ± 1,07a	4,25 ± 3,49a
2	94,13 ± 55,15b	25,63 ± 11,20b	8,25 ± 8,66a	43,50 ± 57,14b	11,38 ± 10,23b	5,38 ± 4,27a
3	125,1 ± 52,45b	48,78 ± 23,71c	8,67 ± 8,69a	32,11 ± 16,06b	31,78 ± 22,48c	2,22 ± 6,67a

<sup>abc</sup> Letras desiguais, na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

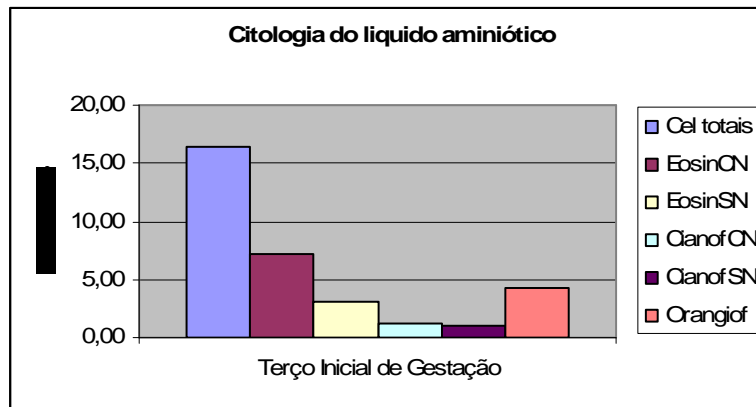


Gráfico 1: Número de células totais, eosinofílicas com e sem núcleo, cionofílicas com e sem núcleo e orangeofílicas, presentes no líquido amniótico no terço inicial da gestação da vaca.

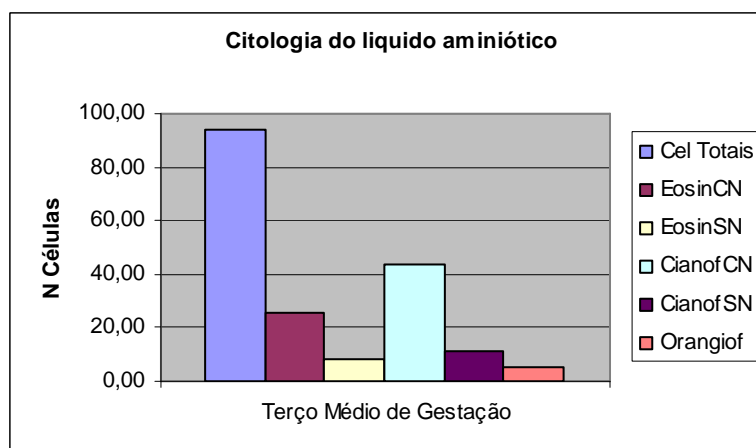


Gráfico 2: Número de células totais, eosinofílicas com e sem núcleo, cionofílicas com e sem núcleo e orangeofílicas, presentes no líquido amniótico no terço médio da gestação da vaca.

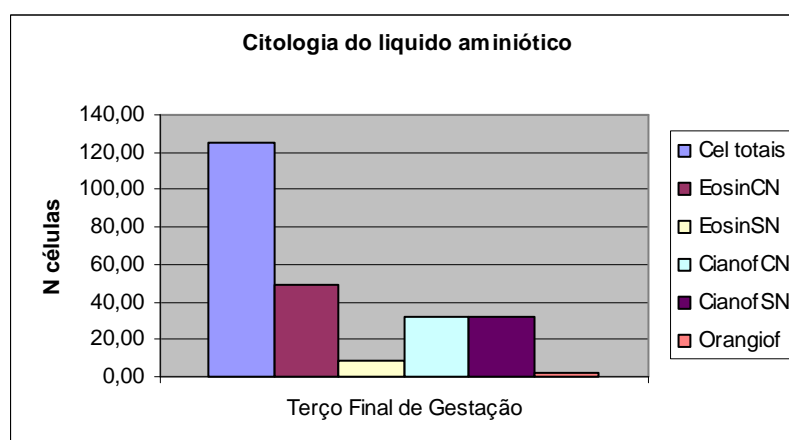


Gráfico 3: Número de células totais, eosinofílicas com e sem núcleo, cionofílicas com e sem núcleo e orangeofílicas, presentes no líquido amniótico no terço final da gestação da vaca.



### 4.3 Quantificação de células maternas nos placentomo

A média do número de células maternas do placentomo no G1 foi de  $230,56 \pm 12,82$ , no G2  $204,63 \pm 17,66$  e no G3  $179,11 \pm 18,28$  (Tab. 2, Graf. 4). Não houve

diferença estatisticamente significativa entre o G1 e G2 ( $P > 0,05$ ). Porém, houve diferença estatisticamente significativa entre o G1 e G3 e entre G2 e G3 ( $P < 0,05$ ).

Tabela 2: Quantificação das células maternas do placentomo da vaca nos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.

G	Células Maternas
1	$230,56 \pm 12,82^a$
2	$204,63 \pm 17,66^a$
3	$179,11 \pm 18,28^b$

<sup>ab</sup> Letras desiguais indicam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

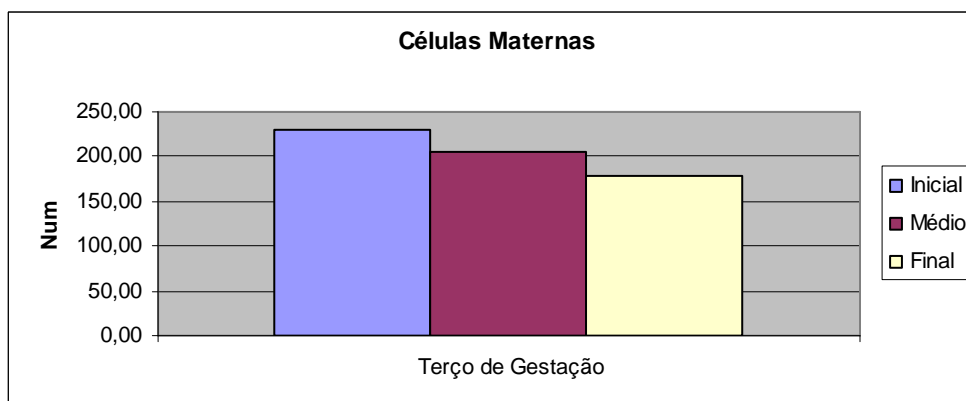


Gráfico 4: Número de células maternas do placentomo da vaca nos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.

### 4.4 Proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo

#### 4.4.1 Proporção volumétrica das células maternas do placentomo

A proporção volumétrica das células maternas do placentomo no G1 foi  $0,28 \pm 0,03$ , no G2  $0,27 \pm 0,03$  e no G3  $0,16 \pm 0,07$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre G1 e G2 ( $P > 0,05$ ), porém houve diferença

significativa quando comparados G1 com G3 e G2 com G3 ( $P < 0,05$ ) (Tab. 3 Gráficos: 5, 6 e 7).

Tabela 3: Proporções volumétricas das células maternas do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.

G	Células Maternas
1	0,28 ± 0,03 <sup>a</sup>
2	0,27 ± 0,03 <sup>a</sup>
3	0,16 ± 0,07 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4.2 Proporção volumétrica das células fetais do placentomo

A proporção volumétrica das células fetais do G1 foi 0,28±0,04, no G2 0,24±0,04 e no G3 0,29±0,07. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três terços gestacionais (G1, G2 e G3) ( $P > 0,05$ ) (Tab. 4, Gráficos: 5, 6 e 7).

Tabela 4: Proporções volumétricas das células fetais do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.

G	Células Fetais
1	0,27 ± 0,04 <sup>a</sup>
2	0,24 ± 0,04 <sup>a</sup>
3	0,29 ± 0,07 <sup>a</sup>

<sup>aa</sup> ( $P > 0,05$ ).

#### 4.4.3 Proporção volumétrica das células binucleadas do placentomo

A proporção volumétrica das células binucleadas no G1 foi 0,06±0,02, no G2 0,04±0,01 e no G3 0,05±0,02. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três terços gestacionais (G1, G2 e G3) ( $P > 0,05$ ) (Tab. 5, Gráficos: 5, 6 e 7).

Tabela 5: Proporções volumétricas das células binucleadas do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.

G	Células Binucleadas
1	0,06 ± 0,02 <sup>a</sup>
2	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>
3	0,05 ± 0,02 <sup>a</sup>

<sup>aa</sup> ( $P > 0,05$ ).

#### 4.4.4 Proporção volumétrica das células gigantes do placentomo

A proporção volumétrica das células gigantes do G1 foi 0,03±0,01, no G2 foi 0,06±0,07 e no G3 foi 0,03±0,01. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três terços gestacionais (G1, G2 e G3) ( $P > 0,05$ ) (Tab. 6, Gráficos: 5, 6 e 7).

*Tabela 6: Proporções volumétricas das células gigantes do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.*

<b>G</b>	<b>Células Gigantes</b>
1	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>
2	0,06 ± 0,07 <sup>a</sup>
3	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>

<sup>aa</sup> ( $P > 0,05$ ).

#### **4.4.5 Proporção volumétrica dos vasos do placentomo**

A proporção volumétrica dos vasos do G1 foi 0,02±0,01, no G2 foi 0,02±0,01 e no G3 foi 0,01±0,01. Não houve diferença

estatisticamente significativa entre os três terços gestacionais (G1, G2 e G3) ( $P > 0,05$ ) (Tab. 7, Gráficos: 5, 6 e 7).

*Tabela 7: Proporções volumétricas dos vasos do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.*

<b>G</b>	<b>Vasos</b>
1	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>
2	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>
3	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>

<sup>aa</sup> ( $P > 0,05$ ).

#### **4.4.6 Proporção volumétrica do tecido conjuntivo fetal do placentomo**

A proporção volumétrica do tecido conjuntivo fetal (Conj Fetal) do placentomo no G1 foi de 0,02 ± 0,01, no G2 foi de 0,04 ± 0,01 e no G3 foi de 0,05 ± 0,02. Houve diferença

significativa entre G1 e G2 e entre G1 e G3 ( $P < 0,05$ ). Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre G2 e G3 ( $P > 0,05$ ) (Tab. 8 Graf. 5, 6 e 7).

Tabela 8: Proporção volumétrica do tecido conjuntivo fetal do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.

G	Conjuntivo Fetal
1	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>
2	0,04 ± 0,01 <sup>b</sup>
3	0,05 ± 0,02 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Letras desiguais indicam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4.7 Proporção volumétrica do tecido conjuntivo materno do placentomo

A proporção volumétrica do tecido conjuntivo materno do placentomo no G1 foi 0,19±0,03, no G2 0,21±0,04 e no G3 0,28±0,05. Houve diferença significativa entre G1 e G3 e

entre G2 e G3 ( $P < 0,05$ ). Porém, não houve diferença significativa entre G1 e G2 ( $P > 0,05$ ) (Tab. 9 Gráficos: 5, 6 e 7).

Tabela 9: Proporção volumétrica do tecido conjuntivo materno do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.

G	Conjuntivo Materno
1	0,19 ± 0,03 <sup>a</sup>
2	0,21 ± 0,04 <sup>a</sup>
3	0,28 ± 0,05 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Letras desiguais indicam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4.8 Artefatos das lâminas da proporção volumétrica do placentomo

No G2 houve o maior número de

artefatos comparado com o G3, sendo igual ao G1.

Tabela 10: Artefatos das lâminas da proporção volumétrica do placentomo da vaca dos terços inicial (G1), médio (G2) e final (G3) da gestação.

G	Artefato
1	0,15±0,03 <sup>ab</sup>
2	0,16±0,04 <sup>a</sup>
3	0,11±0,03 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Letras desiguais indicam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

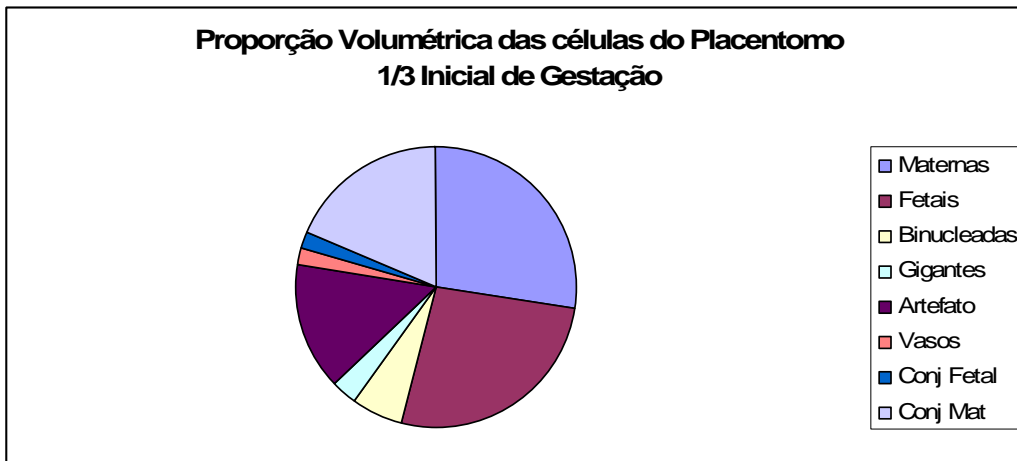


Gráfico 5: Proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo: células maternas, células fetais, células binucleadas, células gigantes, vasos, tecido conjuntivo fetal e materno e artefatos no terço inicial da gestação da vaca.

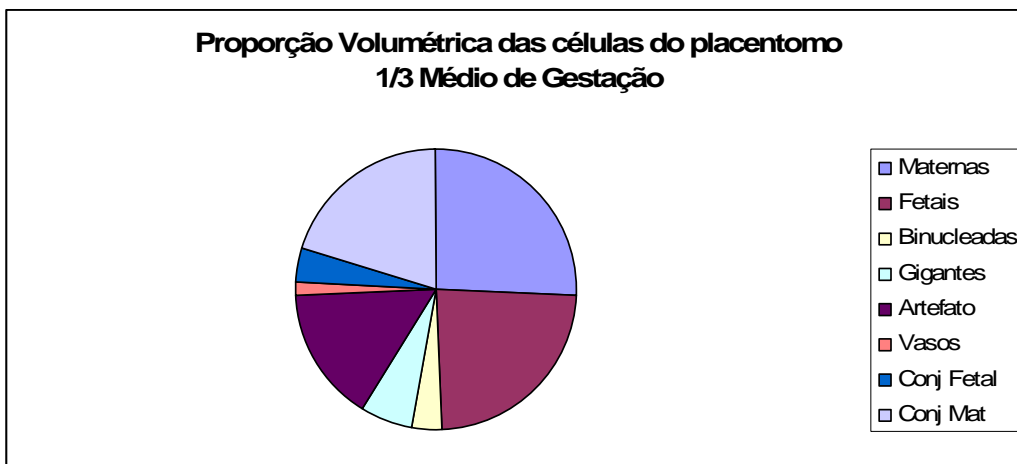


Gráfico 6: Proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo: células maternas, células fetais, células binucleadas, células gigantes, vasos, tecido conjuntivo fetal e materno e artefatos no terço médio da gestação da vaca.

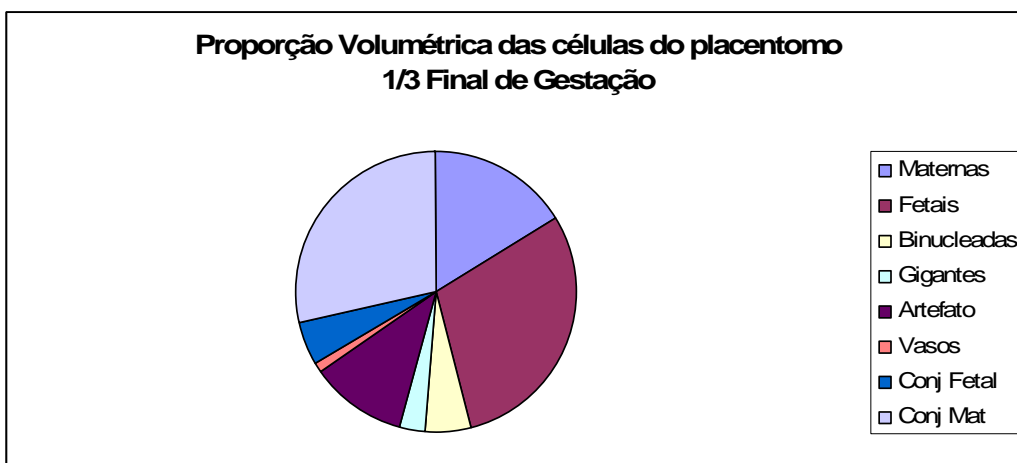


Gráfico 7: Proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo: células maternas, células fetais, células binucleadas, células gigantes, vasos, tecido conjuntivo fetal e materno e artefatos no terço final da gestação da vaca.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação macroscópica dos líquidos extra-embrionários

Os fluidos amniótico e alantoidiano são componentes importantes para a gestação normal da vaca. Sua produção e absorção dependem de uma série de fatores entre mãe, feto, placenta e fatores ambientais. Seu volume e composição variam de acordo com a idade gestacional e suas principais funções são: crescimento do feto, barreira contra infecções, proteção contra traumatismos, auxílio no controle da temperatura fetal, além de permitir a livre movimentação do feto, de evitar aderência entre o feto e o âmnio e de auxiliar no momento do parto (Senger, 2003).

### 5.2 Citologia dos líquidos extra-embrionários

Entre os elementos presentes no fluido amniótico destacam-se células do âmnio e do feto. Os resultados obtidos mostram, para células eosinofílicas nucleadas e cianofílicas anucleadas, variações significativas entre os terços inicial, médio e final da gestação, enquanto para as células eosinofílicas anucleadas e orangeofílicas não houve diferença significativa.

O número de células totais do líquido amniótico foi menor no terço inicial da gestação, similar ao que descreveram Bongso & Basrur (1975), quando verificaram que a característica morfológica das células do líquido amniótico não está correlacionada com o estágio gestacional, mas que número de células presentes no líquido amniótico tem correlação direta com a fase da gestação. Ao contrário do descrito por Bongso & Basrur (1975), não houve diferença significativa entre o terço médio e final. No presente trabalho foi possível avaliar o terço final da gestação só até 212 dias, o que impossibilita a obtenção de observações que possam refletir mudanças significativas nas características dos líquidos extra-embrionários a partir deste tempo.

### 5.3 Quantificação de células maternas no placentomo

Analisando os resultados deste trabalho, o número médio de células maternas do placentomo apresentou diferença entre os terços inicial e final, e entre os terços médio e final da gestação da vaca, semelhante aos resultados encontrados por Grunert *et al.*

Os achados macroscópicos do líquido amniótico caracterizado fisicamente como claro, incolor e mucóide, porém, mais viscoso com o adiantamento da gestação foi semelhante ao relatado por Arthur *et al.* (1996) e Hafez (2004).

O líquido alantoidiano, neste trabalho, foi caracterizado fisicamente como aquoso e de cor âmbar. O volume do líquido alantóide, embora não tenha sido quantificado, foi aparentemente maior do que amniótico nos três terços gestacionais, semelhante aos achados de Roberts (1986); Arthur *et al.* (1996) e Hafez (2004).

O fluido amniótico pode fornecer informações de relevância sobre a saúde fetal e materna utilizando diferentes técnicas laboratoriais. O exame das células amnióticas evidencia a cromatina sexual, origem das células, maturidade fetal, anormalidades fetais e células tronco, definida através da sua classificação quanto ao aspecto morfológico, e propriedade tintorial das células (Bongso & Basrur, 1977; Bongso *et al.* 1978; Hafez, 2004). A coloração utilizando o Panótico Rápido mostrou-se uma importante ferramenta para se identificar as células do líquido amniótico com base nas suas características morfológicas, exceto as células orangeofílicas, de origem do cordão umbilical, que não responderam à coloração com Panótico Rápido de forma eficiente para sua identificação Bongso & Basrur (1977), utilizando a coloração Papanicolaou, descreveram com detalhes as células eosinofílicas nucleadas e anucleadas, cianofílicas nucleadas e anucleadas e as células orangeofílicas. Já Moya *et al.* (2006) utilizaram a coloração Hematoxilina-Shor para determinar a maturidade das células epiteliais do feto no líquido amniótico de vacas. Essas células foram classificadas em quatro tipos: Células intermediárias pequenas e grandes, e células superficiais nucleadas e anucleadas.

(1976); Grunert (1980) Woicke *et al.* (1986); Williams *et al.* (1987); Marques Júnior (1988); Barreto Filho (1992) e Santos (1995). O número de células epiteliais maternas nas criptas diminui, em vacas taurinas e zebuínas. Progressivamente, o epitélio materno torna-se

achatado e eventualmente desaparece em algumas áreas. A maioria dos trabalhos consultados mostra acentuadas alterações nas células maternas no final da gestação da vaca.

Grunert *et al.* (1976), Grunert (1980), Woicke *et al.* (1986) e Marques Júnior (1988) observaram diminuição do número de células

maternas a partir do sétimo mês de gestação, semelhante ao encontrado neste trabalho, já que a média de tempo de gestação do terço final foi de 211,92 dias ou 7 meses, com diminuição significativa da quantidade de células maternas do placentomo. Por outro lado, Bjorkman (1954; 1969) verificou que o epitélio materno sofre alterações somente no final da gestação.

## 5.4 Proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo

### *Células maternas*

A proporção volumétrica das células maternas do placentomo da vaca apresentou diferença significativa apenas no terço final da gestação, semelhante ao relatado por Grunert *et al.* (1976), Grunert (1980), Marques Júnior

(1988), Barreto Filho (1992) e Santos (1995), que demonstraram que animais com parto normal apresentam o número de células epiteliais maternas significativamente menor do que aqueles que retêm placenta.

### *Células fetais, células binucleadas, células gigantes e vasos*

Os componentes estruturais do placentomo, tais como células fetais, células binucleadas, células gigantes e vasos, não apresentaram diferença em sua proporção volumétrica entre os três terços gestacionais. Estes resultados diferem dos obtidos por Williams *et al.* (1987), que observaram diminuição no número de células binucleadas durante o período final da gestação da vaca. Entretanto, segundo Wooding (1983), o número destas células se mantém estável até o 260º dia da gestação. A média de tempo de gestação avaliado no terço final da gestação foi de 212 dias, o que impossibilitou avaliar a ocorrência ou não de alteração no número de células e na proporção volumétrica em gestações acima de 260 dias. As células binucleadas têm papel

importante no mecanismo de separação das membranas fetais durante o parto (Gross *et al.*, 1991 e Wooding, 1992). No final da gestação e no periparto imediato o número de células binucleadas está muito reduzido (Wooding, 1983; Williams *et al.*, 1987). Assim, a diminuição significativa das células binucleadas deve ocorrer a partir de 7 meses de gestação.

Foram observadas neste trabalho algumas células trinucleadas (Anexo VI) e, eventualmente células multinucleadas (Anexo V) junto ao epitélio de revestimento das criptas carunculares. O processo de migração das células binucleadas através da interface materno-fetal e sua fusão com a célula epitelial ainda não está totalmente elucidado.

### *Tecido conjuntivo materno e fetal*

A proporção volumétrica do tecido conjuntivo materno teve aumento estatisticamente significativo somente no terço final da gestação da vaca, semelhante ao relatado por Grunert (1980).

Neste trabalho foi encontrada variação significativa da proporção volumétrica do tecido conjuntivo fetal (Tabelas 8 e 9), que foi menor somente no terço inicial da gestação, mantendo-se constante nos terços médio e final da mesma, diferindo do relato de Grunert (1980), que verificou que o tecido conjuntivo fetal e

materno torna-se progressivamente mais rico em colágeno à medida que o parto se aproxima, mencionando que essa transformação parece ser importante pré-requisito para liberação normal da placenta. Devido ao alto índice de artefatos verificados neste trabalho (Anexo VIII) e pelo fato do tecido fetal ser mais frágil no terço inicial da gestação que nos demais, os resultados podem ter sido influenciados pela técnica utilizada na coleta e processamento das amostras, aparentemente não sendo a técnica mais recomendada para esse tipo de avaliação do placentomo.

### *Artefatos*

Os artefatos foram computados e realizada a estatística para avaliação dos

mesmos. No grupo G2 ocorreram mais artefatos que no G3 (Tabela 10, Gráfico 5, 6 e 7).

## **6. CONCLUSÕES**

- O número de células do líquido amniótico foi menor no terço inicial da gestação, mantendo-se constante nos terços médio e final da mesma;

- O número de células maternas do placentomo diminuiu no terço final da gestação;

- A proporção volumétrica das células fetais, binucleadas, gigantes e vasos do placentomo não variou ao longo da gestação, enquanto a das células maternas diminuiu no terço final da mesma;

- A proporção volumétrica do tecido conjuntivo fetal do placentomo foi menor no terço inicial da gestação, enquanto a do tecido conjuntivo materno aumentou no terço final da mesma.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AILENBERG, M.; SHEMESH, M. Partial purification of a chorionic gonadotropin-like protein from bovine cotyledons. *Biology of Reproduction*, v.28, n.3, p.517-22, 1983.
- AMOROSO, E.C. Placentation. In: PARKES, A. S. (Ed.) *Marshall's physiology of reproduction*. 3 ed. London: Longmans Green, 1952, p.127-311.
- ARTHUR, G.H.; NOAKES, D.E.; PEARSON, H.; PARKINSON, T.J. (Ed.). *Veterinary reproduction obstetrics*. 7<sup>th</sup>ed. London: SAUNDERS, 1996. 726p.
- ATKINSON, G.; CAMPBELL, D.J.; CAWOOD, M.L.; *et al.* Steroids in human intrauterine fluids of early pregnancy. *Clin. Endocrinol.*, v.44, n.4, p.435-40, 1996.
- BANKS, W.J. Sistema reprodutor feminino. In: BANKS, W.J., (Ed.) *Histologia veterinária aplicada*. 2 ed., São Paulo: Manole, 1991, p. 565-88.
- BARRETO FILHO, J.B. Aspectos morfológicos da placentação do Zebu (*Bos taurus indicus*). Belo horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 1992. 106p. Dissertação (Mestrado).
- BECKERS, J. F.; FROMONT-LIENARD, C.; VAN DER ZWALMEN, P.; *et al.* Isolement d'une hormone placentaire bovine presentant une activité analogue à la prolactine et à l'hormone de croissance. *Annales de médecine vétérinaire*. v.124, n.8, p.585-601, 1980.
- BECKERS, J.F.; DEWULF, M.; VERSTEGEN, J.; *et al.* Isolation of bovine chorionic gonadotropin (bCG). *Theriogenology*, v.29, n.1, p.218, 1988.
- BJORKMAN, N. Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. *Acta Anat.* v.22, n.2, p.1-91, 1954.
- BJORKMAN, N. Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. *Anat. Rec.*, v.163, n.1, p.17-29, 1969.
- BJORKMAN, N. Placentação. In: DELLMANN, H. D.; BROWN. E. M. *Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982. p.279-294.
- BONGSO, T.A.; BASRUR, P.K. Prenatal diagnosis of sex in cattle by amniocentesis. *Vet. Rec.*, v.96, p.124-26, 1975.
- BONGSO, T.A.; BASRUR, P.K. Cytology of bovine fetal fluids. *Can. J. Comp. Med.*, v.41, n.3, p.287-293, 1977.
- BONGSO, T.A.; WETTIMUNY, S.G.; EDIRISINGHE, R.; *et al.* Determination of fetal sex in cattle by cytological examination of amniotic fluid. *AM J. Vet. Res.*, v.39, n.9, p.1545-6, 1978.
- BRETZLAFF, K. Rationale for treatment of endometritis in dairy cow. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.3, n.3, p.593-607, 1987.
- BUSCHER, U.; HERTWIG, K.; DUDENHAUSEN, J.W. Detection of erythropoietin in amniotic fluid. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, v.56, n.5, p.243-7, 1996.
- CONSTANT, F.; GUILLOMOT, M.; HEYMAN, Y.; *et al.* Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hidrallantois. *Biol. Reprod.*, v.75, n.1, p.122-30, 2006.
- CUNHA, S.P.; Valeri, F.V.; Ferraz, S.T.A. *et al.* Citologia do líquido amniótico corado pelo método de Harris-Shorr na gravidez acima da 40<sup>a</sup> semana. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, v.24, p.243-45, 1978.
- DANTZER, V. Initial placentation in farm animals morphological events where growth factors must be implicated. *Reproduction in Domestic Animals*, v.28, n.4, p.199-201, 1993.
- DERIVAUX, J.; ECTORS, F.; BECKERS, J.F. *The ruminant placenta: structure and endocrine function*. Brussels: State university of Liege. 1988. 81p
- DONIVAL, P. DUVIVIER, J. Prenatal diagnosis of sex by determination of amniotic testosterone e FSH. *Genet. Human J.*, v.28, n.3, p.207-12, 1980.
- EVANS, G.; WAGNER, W.C. *In vitro* Placental estrogen synthesis by bovine placenta during pregnancy and induced parturition. *Acta Endocrinol. Copenh.*, v.98, p.119-25, 1981.

- ERWICH, J.J.H.M.; JOOSTEN, I.; HOVIUS, J.; *et al.* Prostaglandin catabolism in the bovine placenta. *Placenta*, v.9, n.3, p.297-302, 1988. Apud: *Veterinary Bulletin*, v.59, n.3, p.256, 1989.
- GROSS, T.S.; WILLIAMS, W.F. The fetal placental binucleate cell as a regulator of placental prostaglandin synthesis. *Biology of Reproduction*. Suppl., v.34, n.1, p.77, 1986.
- GROSS, T.S.; WILLIAMS, W.F. Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulate by the binucleate cell. *Biology and Reproduction*, v.38, n.5, p.1027-34, 1988a.
- GROSS, T.S.; WILLIAMS, W.F. *In vitro* steroid synthesis by the placenta of cows in late gestation and at parturition. *Journal of Reproduction and fertility*, v.83, n.2, p.65-73, 1988b.
- GROSS, T.S.; WILLIAMS, W.F.; RUSSEK-COHEN, E. Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. *Placenta*, v.12, p.27-35, 1991.
- GRUNERT, E.; SCHULZ, C.; AHLERS, D. Retained placenta problems induced labor in cattle. *An. Rch. Veter.*, v.7, n.2, p. 135-38, 1976.
- GRUNERT, E. Etiology of retained bovine placenta. In: MORROW, D.A. (Ed.) *Current Therapy in Theriogenology*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1980, p. 180-86.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7<sup>a</sup> ed. Barueri: Manole, 2004. 513p.
- HASHIZUME, K.; ISHIWATA, H.; KISAKI, K.; *et al.* Implantation and placental development somatic cell clone recipient cows. *Cloning stem cells*, v.4, n.3, p.197-209, 2002.
- HOFFMANN, B. Investigations on bovine placental steroid hormone biosynthesis. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, v.70, n.6/7, p.288, 1983. (Abstr.).
- HUDSON, E.A. The cytological difference between amniotic fluids of male and female fetuses. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, v.82, n.7, p.523-8, 1975.
- HRADECKY, P.; MOSSMAN, H.W.; STOTT, G.G. Comparative development of ruminant placentomes. *Theriogenology*, v.29, n.3, p.715-29, 1988.
- HRADECKY, P.; STOVER, J.; STOTT, G.G. Histology of a heifer placentome after interspecies transfer of a gaur embryo. *Theriogenology*, v.30, n.3, p.593-604, 1988a.
- IZHAR, M.; PASMNIK, M.; SHEMESH, M. Bovine placental progesterone synthesis: comparison of first and second trimesters of gestation. *Biology of Reproduction*, v.46, n.5, p.846-52, 1992.
- KING, G.J.; ATKINSON, B.A.; ROBERTSON, H.A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl.31, p.17-30, 1982.
- LANDIM JÚNIOR., L.P. Células binucleadas trofoblásticas: efeito dos seus produtos de secreção na produção de prostaglandina F2 $\alpha$  e avaliação da expressão gênica relativa de lactogênio placentário e fator de crescimento endotélio vascular em placentas bovinas. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias, 2006. 80p. Dissertação (Doutorado).
- LEE, C.S.; GOGOLIN-EWENS, K.; BRANDON, M.R. Comparative studies on the distribution of binucleate cells in the placenta of the deer and cow using the monoclonal antibody, SBU-3. *J. Anat.*, v.147, n.22, p.163-79, 1986.
- LI, N.; WELLS, D.N.; PETERSON, A.J.; *et al.* Perturbations in the biochemical composition of fetal fluids are apparent in surviving bovine somatic cell nuclear transfer pregnancies in the first half of gestation. *Biology of Reproduction*, v.73, n.1, p.139-48, 2005.
- LUNA, L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3 ed. New York: McGraw Hill, 1968.
- MANN, S.E.; DVORAK, N.; GILBERT, H.; *et al.* Steady-state levels of aquaporin 1 mRNA expression are increase in idiopathic polyhydramnio. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.194, n.3, p.884-7, 2006.
- MARGOLIS, M.J.; WILLIAMS, W.F.; DAVIDSON, J.P.; *et al.* Placental necrosis and giant cell number in relation to placental retention in cows. *Journal of Animal Science*, v.57, Suppl.1, p.355, 1983.
- MARION, G.B.; GIER, H.T. Histological and cytological changes in bovine uterine

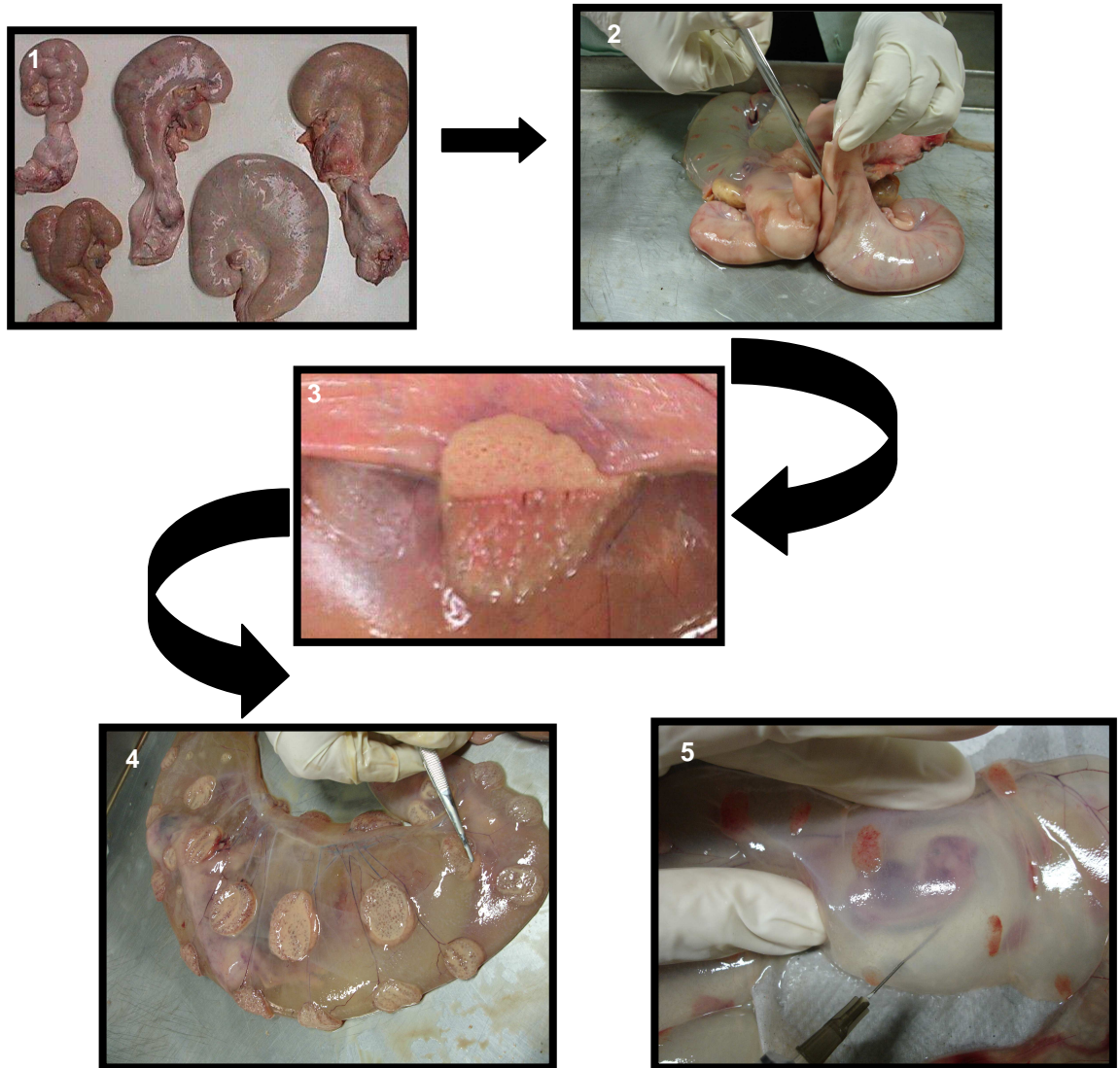
- epithelium. *Journal of Animal science*. v.18, n.4, p.1552-53, 1959.
- MARINOV, B.; ZAMFIROVA, K.; RUSEVA, R.; *et al.* The antenatal diagnosis of the sex of the fetus by the cytological determination of sex chromatin. *Akush Ginekal.*, v.30, n.1, p.5-7, 1991.
- MARQUES JÚNIOR, A.P. *Leucocyte chemotaxis activity by cotiledons of dairy cows with normal delivery and retained placenta*. Urbana: University of Illinois. 1988. 182p. Tese (Doutorado).
- MARQUES JÚNIOR, A.P.; BARRETO FILHO, J.B.; SATURNINO, H.M. Aspectos morfológicos da placenta da vaca Zebu (*Bos taurus indicus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.45, n.2, p.213-219, 1993.
- MEÇA, K.K.O.L.; VASCONCELOS, A.C.; MORO, L. Inibição de apoptose e retardo da maturação placentária: um provável mecanismo da retenção placentária na brucelose bovina (revisão de literatura). *Bioscience Journal*, Uberlândia, v.22, n.1, p.163-174, 2006.
- MIURA, S.; MIURA, K.; MASUZAKI, H.; *et al.* Micro array comparative genomic hybridization (CGH) based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid. *J. Hum. Genet.*, v.51, n.5, p.412-7, 2006.
- MOSSMAN, H.W. Comparative morphogenesis of foetal membranes and accessory uterine structures. *Contr. Embryol. Carneg. Inst.*, v.26, p.129-246, 1937.
- MURAI, T.; YAMAUCHI, S. Erythrophagocytosis by the trophoblast in a bovine placentalome. *Japanese Journal of Veterinary Science*, v.48, n.1, p.75-88, 1986.
- NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. (Ed.). *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 108p.
- SENGER, P.L. *Pathways to pregnancy and Parturition*. 2<sup>nd</sup> ed. Pullman, WA, USA. Current Conceptions, Inc., 2003. 368 p.
- NODEN, D.M. & DE LAHUNTA, A. Extra embryonic membranes and placentation. In: *The Embryology of Domestic Animals, Developmental Mechanisms and Malformations*. Cap.3, (Ed.) Williams & Wilkins, Baltimore, p.47-69, 1985.
- PARK, S.J.; Yoon, W.G.; SONG, J.S.; *et al.* Proteome analysis of human amino and amniotic fluid by two dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proteomics*, v.6, n.1, p.349-63, 2006.
- PERRY, J.S. The mammalian fetal membranes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.62, n.2, p.321-35, 1981.
- POWER, S.G.; PATRICK, J.E.; CARSON, G.D.; *et al.* The fetal membranes as a possible source of progesterone in the amniotic and allantoic fluids of pregnant sheep. *Endocrinology*, v.10, n.2, p.481-61, 1982.
- RAMSEY, E.M. *The placenta – human and animal*. New York: Praeger Publisher, 1982. 187p.
- REIMERS, T.J.; ULLMAN, M.B.; HANSEL, W. Progesterone and prostanoid production by bovine nucleate trophoblastic cells. *Biology and Reproduction*, v.33, n.5, p.1227-36, 1985.
- REYNOLDS, L.P.; MILLAWAY, D.S.; KIRSCH, J.D.; *et al.* Angiogenic activity of placental tissues of cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.81, n.1, p.233-40, 1987.
- RICHARDSON, C. Personal communication In: ARTHUR, G.H.; NOAKES, D.E.; PEARSON, H. *Veterinary reproduction and obstetrics*. 6.ed. Londres: Baillière Tindall, 1989. p.49-59.
- ROBERTS, S.J. (Ed.). *Veterinary obstetrics and genital diseases (theriogenology)*. 3<sup>rd</sup>ed. Woodstock, Vermont, 1986. 981p.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- SANTOS, R.L. *Estudo morfológico da placenta de vacas leiteiras com liberação normal e com retenção*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária UFMG, 1995. 102p. Dissertação (Mestrado).
- SANTOS, R.L.; MARQUES JÚNIOR, A.P.; BARRETO FILHO, J.B. Proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentalome de vacas leiteiras com liberação normal e com retenção de placenta. *Arquivo Brasileiro de*

- Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.48, n.3, p.317-24, 1996.
- SAUERWEIN, H.; MEYER, H.H.D.; MOSTL, E. Low sensitive to oestrogens in bovine placenta at Term. *Journal of Veterinary Medicine*, v.36, n.3, p.236-40, 1989.
- SCHLAFER, D.H.; FISHER, P.J.; DAVIES, C.J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.145-160, 2000.
- SHARPE, K.L.; EILER, H.; CULLEN, W.C.; HOPKINS, F.M. Morphometric analysis of collagen in gestacional and retained bovine placentomes. *Theriogenology*, v.32, p.485-491, 1989.
- SILVA, D.F.P.; MORAES-PINTO, L.; SANTOS, T.C.; *et al.* Aspectos macroscópicos e vascularização da placenta e do cordão umbilical de bovinos da raça Nelore. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.28, n.5, p.259-267, 2004.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. *Statistical Methods*. 8 ed. Ames Iowa State University Press, 1994. 503p.
- STEVEN, D.H. Comparative placentation. Anatomy of the placental barrier. London: Academic Press, 1975. p.25-57:
- TOULOUSE, R.; MENTION, J.E.; LEBARS, S. Citologic study of amniotic fluid. A simple method of sex determination of the fetus in utero. *Nov. Presse. Med.*, v.4, n.16, p.207, 1975.
- ULLMAN, M.B.; REIMERS, T.J. Progesterone production by binucleate trophoblastic cells of cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, supl.37, p.173-79, 1989.
- WANG, S.; ANIDI, F.; BEALL, M.; *et al.* Aquaporin 3 expression in human fetal membranes and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in amnio epithelial cell culture. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, v.13, n.3, p.181-5, 2006.
- WANGO, E.O.; HEAP, R.B.; WOODING, F.B.P. Regulation of steroid synthesis and metabolism in isolated binucleate cells of placenta in sheep and goats. *J. Reprod. Fert.*, v.94, n.1, p.203-11, 1992.
- WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D.P.; NOAKES, G.C.W.; *et al.* The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, v.68, p.549-59, 2007.
- WILLIAMS, W.F.; MARGOLIS, M.J.; MANSPEAKER, J.; *et al.* Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention. *Theriogenology*, v.28, n.2, p.213-23, 1987.
- WINTOUR, E.M.; LARENCE, B.M.; LINGWOOD, B.E. Anatomy, physiology and pathology of the amniotic and allantoic compartments in sheep and cow. *Aust. Vet. J.*, v.63, n.7, p.216-21, 1986.
- WOICKE, J.; SCHOON, H.A.; HEUWIESER, W.; *et al.* Morphological and function aspects of placental maturation mechanisms in the cow. I. Light microscopy. *J. Vet. Med. Assoc.*, v.33, n.9, p.660-67, 1986.
- WOODING, F.B.P. Frequency and localization of binucleate cells in the placentomes of ruminants. *Placenta*, London, v.4, p.527-540, 1983.
- WOODING, F.B.P.; FLINT, A.P.F.; HEAP, R.B.; *et al.* Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goats. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.76, n.2, p.499-512, 1986.
- WOODING, F.B.P.; BECKERS, J.F. Trinucleate cells and ultrastructural localization of bovine placental lactogen. *Cell and Tissue Research*, v.247, n.3, p.667-673, 1987.
- WOODING, F.B.P. Current topic: the sin epitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, London, v.13, p.101-13, 1992.
- ZHONG, X.Y.; HOLZGREVE, W.; TERCANLI, S.; *et al.* Cell free foetal DNA in maternal plasma does not appear to be derived from the rich pool of cell-free foetal DNA in amniotic fluid. *Arch. Gynecol. Obstet.*, v.273, n.3, p.221-6, 2006.

## 8. ANEXO

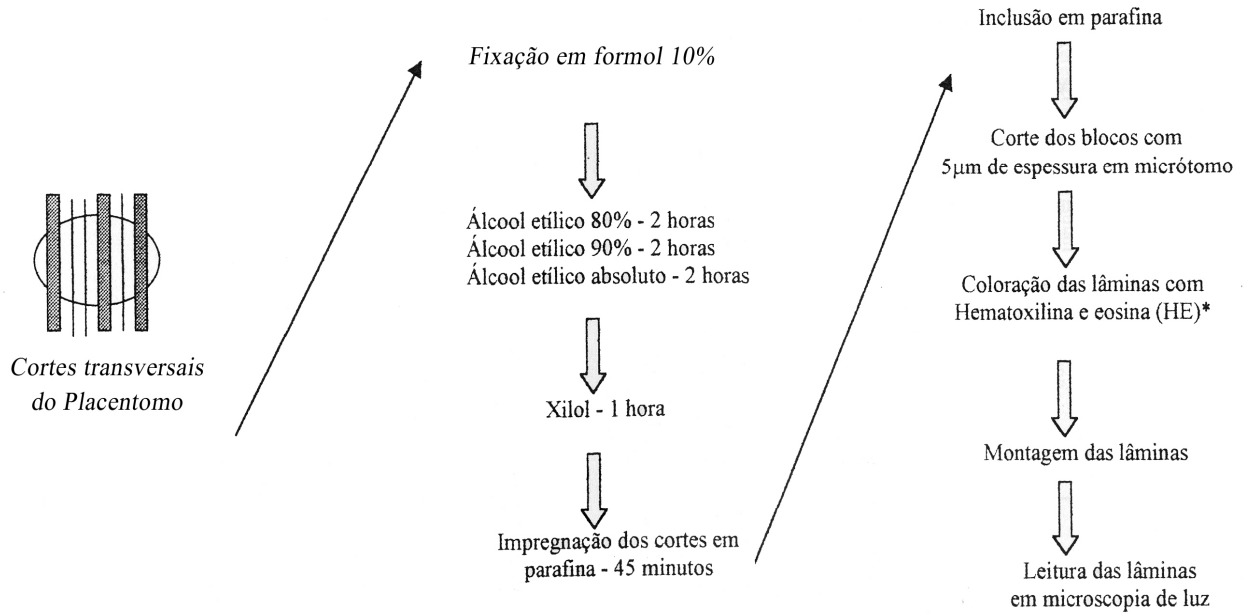
### Anexo I

Seqüência de fotos dos procedimentos da coleta do material: Líquidos extra-embriônicos e placentomos da vaca:



*Figura 4: Peças de úteros gestantes coletados em frigorífico próximo a Belo Horizonte e coleta do material (líquidos extra-embriônicos e placentomos) realizada no Setor de Reprodução do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG. 1 – Úteros de vacas gestantes em diferentes estádios gestacionais; 2 - Secção da curvatura maior do corno uterino gestante para identificação do alantóide; 3 – Placentomo, terço médio da gestação; 4 - Cotilédones e identificação do alantóide, terço médio da gestação; 5 - Coleta do líquido amniótico, terço inicial da gestação.*

*Processamento histológico do Placentomo*

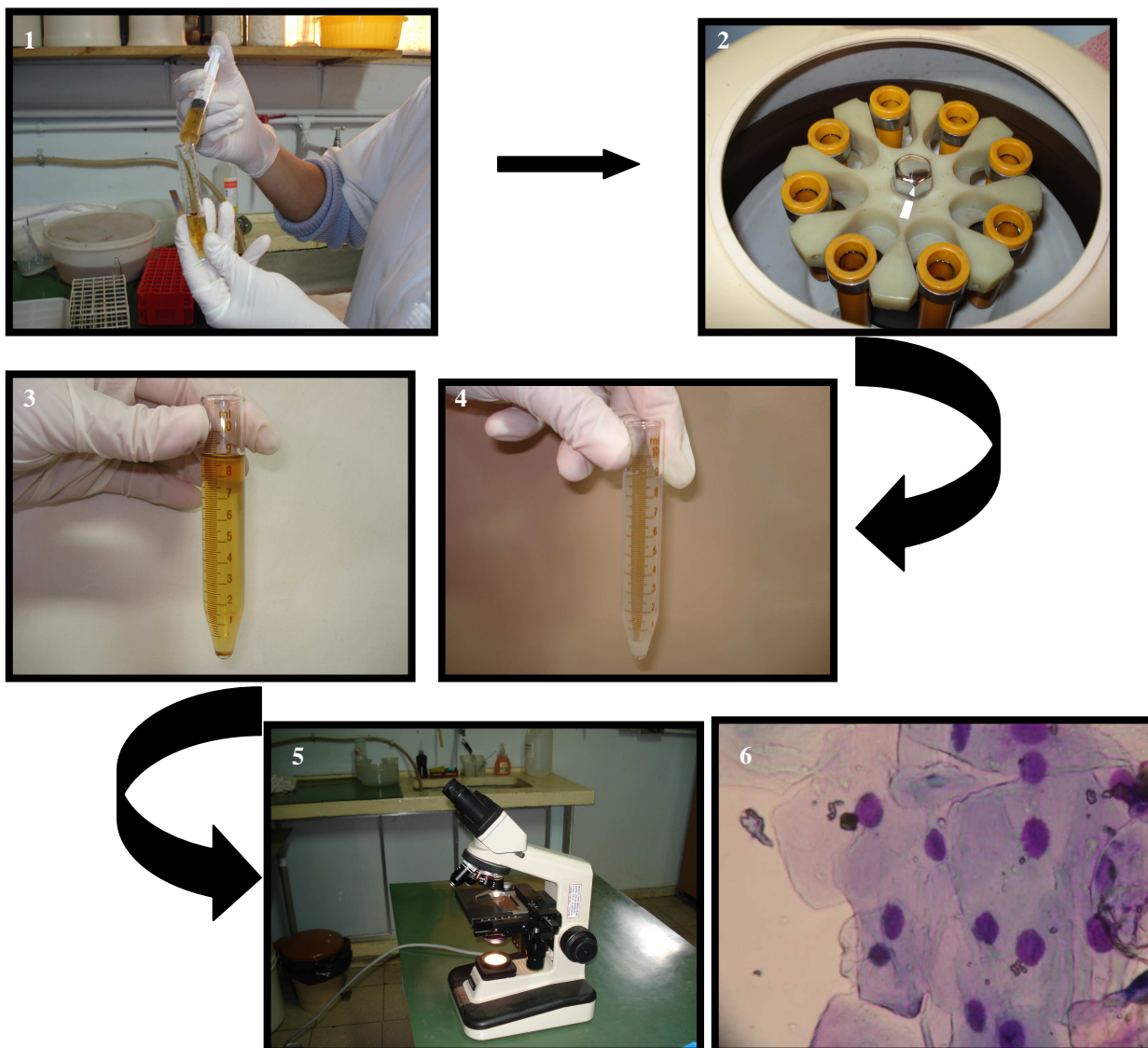


*Técnica de rotina do Laboratório de Morfologia do ICB / UFMG*

*Figura 5: Descrição da técnica de rotina das lâminas para coloração por Hematoxilina-eosina (HE).*

Anexo III

Seqüência de fotos dos procedimentos dos líquidos extra-embriônicos da vaca para citologia no laboratório

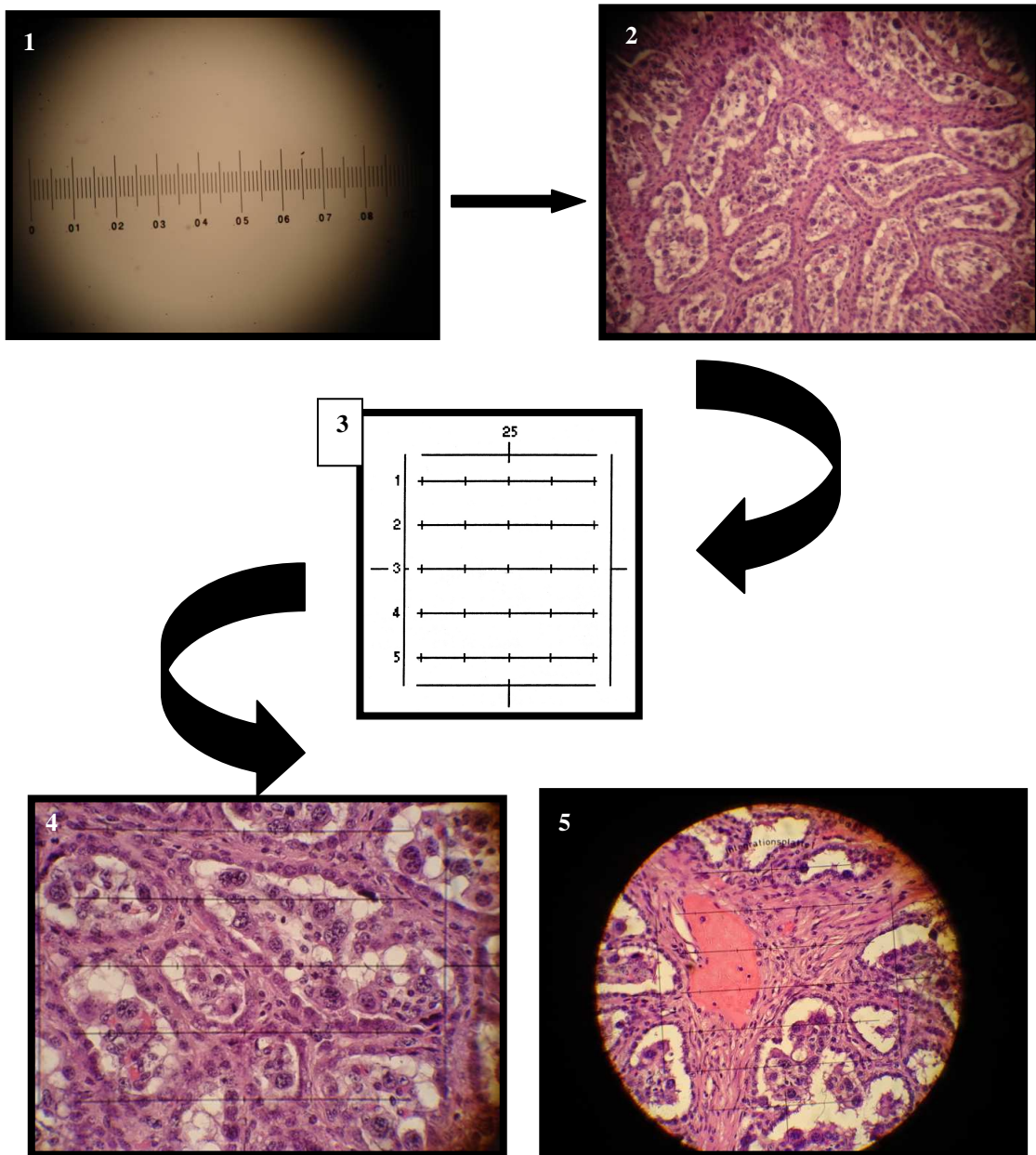


*Figuras 6: Processamento dos líquidos extra-embriônicos para citologia, realizada no Setor de Reprodução do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG. 1 - Preparo do líquido alantoidiano para centrifugação. 2- Centrifugação, 10 minutos FCR 200g, dos líquidos extra-embriônicos da vaca; 3 - Líquido alantoidiano logo após a centrifugação; 4- Líquido amniótico logo após a centrifugação, presença de sedimento no líquido amniótico; 5 - Avaliação microscópica da citologia dos líquidos amniótico e alantoidiano; 6- Cluster de células cianofílicas nucleadas presentes no líquido amniótico da vaca no terço final da gestação.*



Anexo IV

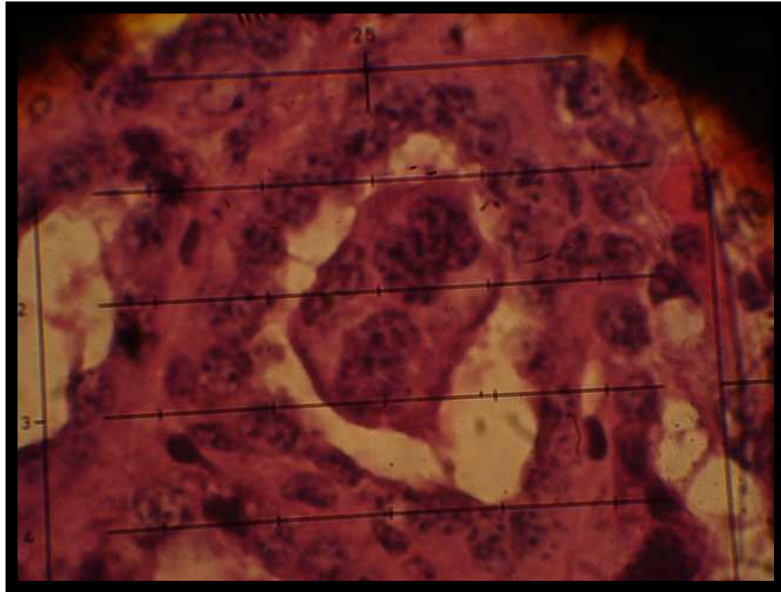
Seqüência da avaliação histológica do placentomo da vaca, quantificação das células maternas e proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo da vaca:



*Figuras 7: Avaliação histológica do placentomo da vaca realizada no Setor de Reprodução do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG. 1 – Micrômetro; 2 – Quantificações das células maternas do placentomo (terço médio de gestação da vaca); 3 – Desenho da ocular integradora; 4 – Avaliação da proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo da vaca, lâmina terço final da gestação, com aumento 10x; 5 – Avaliação da proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo da vaca, lâmina do terço inicial de gestação, aumento 10x.*

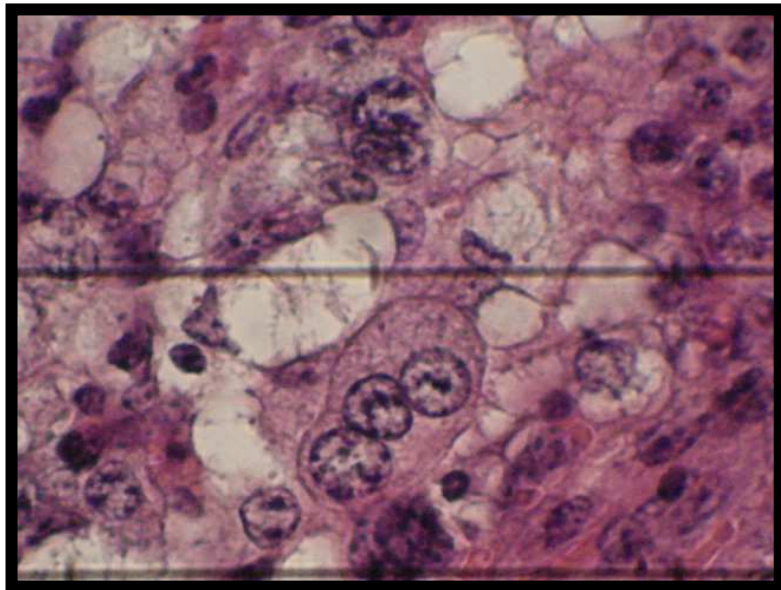


Anexo V



*Figura 8: Célula multinucleada do placentomo da vaca corte histológico corado por Hematoxilina-eosina no terço médio da gestação aumento de 40x .*

Anexo VI



*Figura 9: célula trinucleada do placentomo da vaca corte histológico corado por Hematoxilina-eosina no terço final da gestação, aumento de 40x.*

Anexo VII

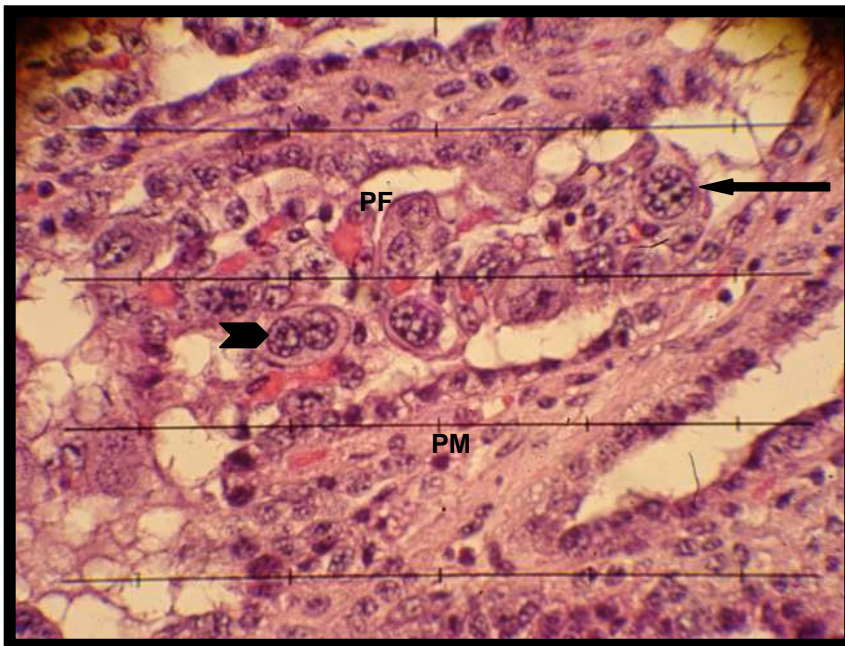


Figura 10: Corte histológico do placentomo da vaca corado por Hematoxilina-eosina no terço médio da gestação. Cripta materna (PM), epitélio cuboidal com núcleos vesiculosos. Placenta parte fetal (PF), célula binucleada (seta grossa), célula gigante (seta fina), aumento de 40x.

Anexo VIII

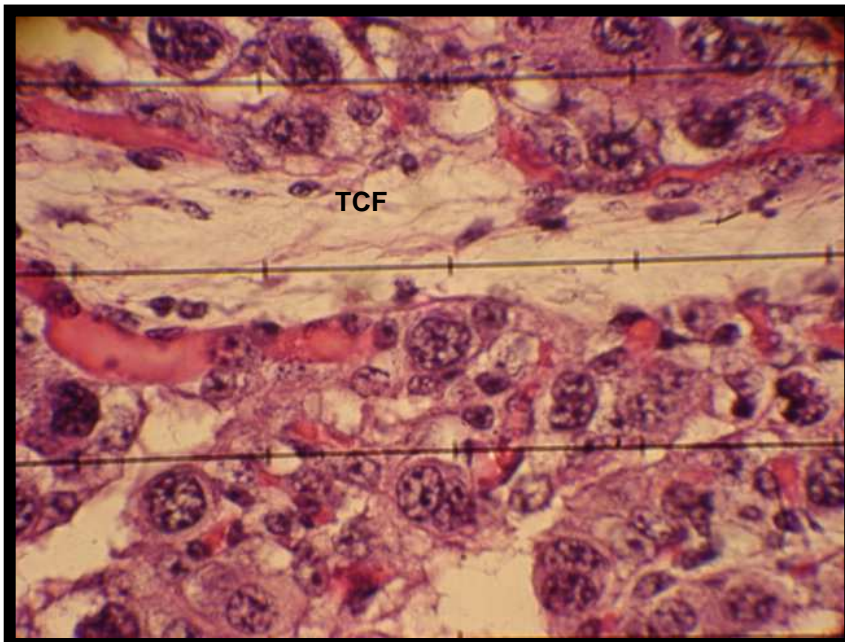


Figura 11: Corte histológico do placentomo da vaca corado por Hematoxilina-eosina no terço final da gestação. Tecido conjuntivo fetal (TCF), aumento de 40x.

**Anexo IX**

Origem das células do fluido Amniótico

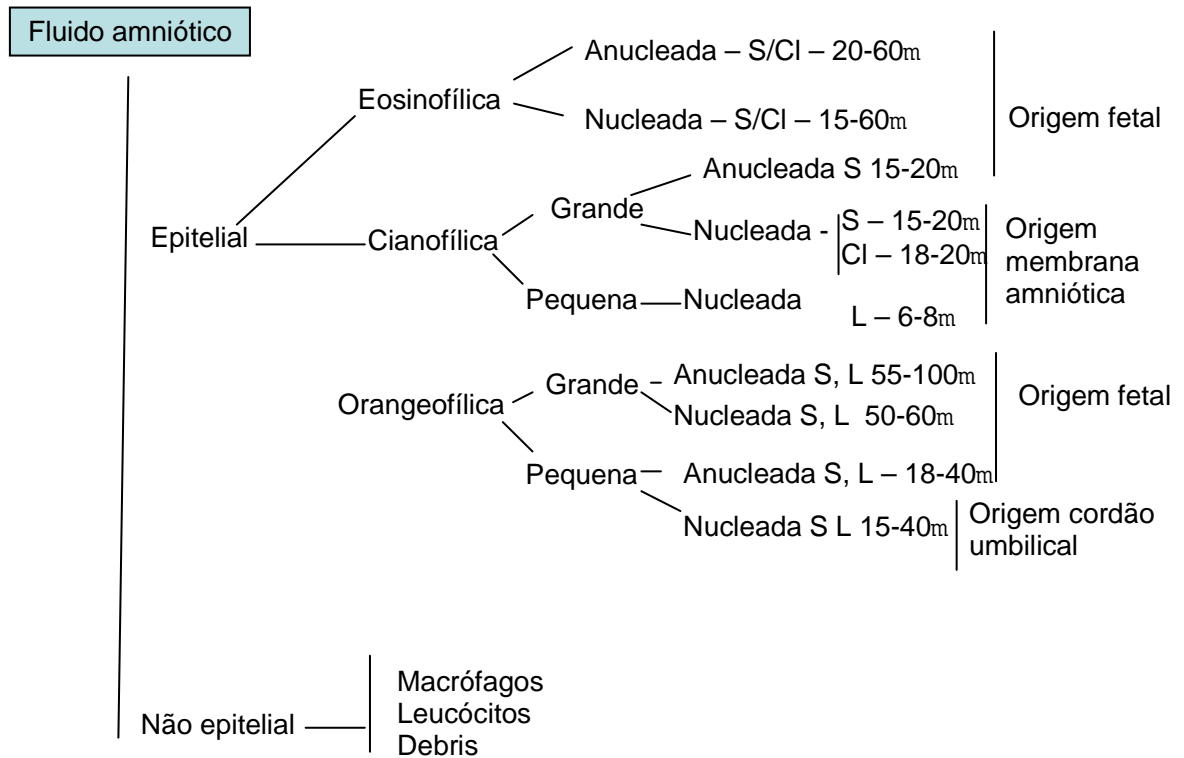


Figura 12: Células do fluido amniótico da vaca agrupadas conforme morfologia, coloração e origem. S single, CL cluster, L lençol, S/ Cl single of cluster.

Segundo Bongso & Basrur (1977).