

Evandro dos Reis Machado

AVALIAÇÃO DE COMPONENTES ESTRUTURAIS
DO PLACENTOMO DA VACA NELORE

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: Antônio de Pinho Marques Júnior

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2009

Machado, Evandro dos Reis, 1981-

Avaliação de componentes estruturais do placentomo da vaca Nelore /
Evandro dos Reis Machado-2009

Orientador: Antônio de Pinho Marques Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária

Bibliografia: p.

1. Nelore (Zebu) – Reprodução – Dissertação. 2. Vaca – Reprodução –
Dissertação. 3. Gestação – Reprodução – Dissertação. 4. Placentomo – Reprodução
– Dissertação. I. Marques Júnior, Antônio de Pinho. II Universidade Federal de
Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

Dedicatória

“Aos meu pais: Almir Cosme Machado e Edite Maria dos Reis Machado e ao meu irmão Eduardo dos Reis Machado pelo amor, carinho, apoio e companheirismo...”

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Almir e Edite e meu irmão Eduardo, pelo incondicional apoio em todos os momentos e incentivo sempre. A certeza da nossa união constante e do amor que ampara meus passos.

Ao meu orientador Prof. Antônio de Pinho Marques Júnior que com sua paciência e seriedade acreditou que eu pudesse trabalhar ao seu lado, o que se constituiu numa tarefa muito agradável. Nos momentos difíceis, me apresentou soluções e oportunidades, acreditando no desenvolvimento de minhas capacidades.

À minha namorada Letícia Helena dos Santos Marques, pela dedicação, ajuda, paciência e companheirismo durante esse período.

Ao coordenador do LANAGRO-MG Ricardo Aurélio Pinto Nascimento e ao Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota, pela possibilidade da conclusão do mestrado.

Ao amigo e eterno mestre Prof. Marcelo Emílio Beletti, pela amizade e abertura das portas do laboratório para o processamento histológico de todo o material e demais integrantes do setor de Citologia, Histologia e Embriologia da UFU.

Aos Dr. Jean Felipe Celestino Gouhie e Dr. Fernando G. Santos, responsáveis pelo SIF do frigorífico Mataboi, assim como os técnicos, em especial ao Cláudio, pela receptividade e ajuda na coleta do material utilizado nesta pesquisa.

Ao colega Dâmaso Pacheco Ribeiro, que possibilitou a concretização deste trabalho.

À Ana Laura pelas correções na escrita da Dissertação.

À Petrina, pelo apoio e amizade.

Aos colegas do setor de Produção de Material de Referência (PMR) do LANAGRO-MG, Maurício Baltazar de Carvalho Filho, Rodrigo Mauro Ramos e Elizete Cristina, pela amizade e companheirismo.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), instituição para a qual trabalho.

Aos colegas do GruPinho: Pablo, Cláudia, Maria Raquel, Leonardo, Jackson e Fabrícia pelo carinho e amizade.

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de realização do Mestrado e em especial aos professores do setor de Reprodução Animal.

Ao Frigorífico MATABOI, por ter cedido suas instalações para a coleta das amostras.

À todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	RESUMO	12
	ABSTRACT	13
1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	O Nelore.....	16
2.2	Reconhecimento materno da gestação.....	17
2.3	Corpo lúteo.....	17
2.4	Placentação e desenvolvimento fetal.....	18
2.5	Células do trofoblasto.....	19
2.5.1	Células trofoblásticas mononucleadas.....	19
2.5.2	Células trofoblásticas binucleadas.....	20
2.6	Mecanismos de maturação e retenção placentária.....	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Animais e local.....	23
3.2	Determinação da idade gestacional e lado do corpo lúteo.....	23
3.3	Quantificação e medidas dos placentomos.....	23
3.4	Coleta e processamento dos placentomos.....	23
3.5	Quantificação das células epiteliais das criptas.....	24
3.6	Determinação da proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo.....	25
3.7	Delineamento experimental e análise estatística.....	25
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Localização do corpo lúteo.....	26
4.2	Número médio de placentomos.....	26
4.3	Morfometria dos placentomos.....	27
4.4	Avaliação das células epiteliais das carúnculas.....	29
4.5	Avaliação das células binucleadas do trofoblasto.....	31
4.6	Análise da vascularização materna e fetal.....	33
4.7	Proporções volumétricas dos componentes do tecido conjuntivo materno e fetal no placentomo.....	33
5.	CONCLUSÕES	35
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
7.	ANEXOS	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Freqüência dos corpos lúteos (CL) nos ovários esquerdo e direito de vacas Nelore gestantes, abatidas em frigorífico na região do Triângulo Mineiro-MG.....	26
Tabela 2	Diâmetro médio (cm) dos placentomos de vacas Nelore, da região distal do corno uterino pelo respectivo período gestacional, com seus desvios padrões correspondentes.....	27
Tabela 3	Diâmetro médio (cm) dos placentomos de vacas Nelore, da região proximal do corno uterino pelo respectivo período gestacional, com seus desvios padrões correspondentes.....	27
Tabela 4	Diâmetro médio (cm) dos placentomos de vacas Nelore, da região medial do corno uterino pelo respectivo período gestacional, com seus desvios padrões correspondentes.....	28
Tabela 5	Médias das células maternas do epitélio das criptas carunculares no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação), bem como seus respectivos desvios padrões.....	30
Tabela 6	Proporções volumétricas (%) das células binucleadas (CB) do trofoblasto no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação), bem como seus respectivos desvios padrões.....	31
Tabela 7	Proporções volumétricas (%) dos vasos no tecido fetal e materno no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação), bem como seus respectivos desvios padrões.....	33
Tabela 8	Proporções volumétricas (%) dos componentes do tecido conjuntivo fetal e materno no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação), bem como seus respectivos desvios padrões.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diâmetro médio (cm) dos placentomos de vacas Nelore, das regiões proximal, medial e distal do corno uterino pelo respectivo período gestacional.....	29
Figura 2	Médias das células maternas do epitélio das criptas carunculares no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação).....	30
Figura 3	Proporções volumétricas das células binucleadas (CB) do trofoblasto no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação).....	32
Figura 4	Proporções volumétricas (%) dos componentes do tecido conjuntivo fetal e materno no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação).....	34

RESUMO

Este trabalho foi realizado a fim de avaliar características morfológicas do placentomo na vaca da raça Nelore ao longo da gestação. O experimento foi realizado em laboratórios da Escola de Veterinária da UFMG e do Setor de Citologia, Histologia e Embriologia da UFU, utilizando-se 52 úteros de vacas da raça Nelore coletados em frigorífico localizado no município de Araguari – MG. Para a estimativa da idade gestacional foram utilizados aspectos do desenvolvimento fetal. Foi coletado um fragmento do placentomo localizado no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, bem como o ovário contendo o corpo lúteo, os quais foram imersos em solução de formol a 10%. Para a inclusão em parafina, foi utilizada a técnica histológica clássica. O estudo da proporção volumétrica foi feito utilizando microscópio de luz equipado com ocular integradora (Zeiss KPL 10x). Foi feita também a quantificação das células epiteliais nas criptas das carúnculas por meio da microscopia de luz e uma ocular micrométrica com 100 divisões. Para as avaliações macroscópicas o experimento foi delineado em sete períodos ao longo da gestação, enquanto que para as avaliações microscópicas os períodos gestacionais foram divididos em três: terço inicial, médio e final. O corpo lúteo no ovário direito foi encontrado em 61,54% dos casos. O número médio de placentomos encontrados no corno uterino gestante foi de $43,08 \pm 9,37$. Os placentomos localizados na região distal dos cornos uterinos gestantes desenvolveram-se até o período de 120-150 dias, ocorrendo em seguida, aparente estabilização no seu desenvolvimento, enquanto que os placentomos da região proximal apresentaram desenvolvimento menor e aparentemente mais lento, comparado com os da região distal e medial. Os placentomos da região medial começaram a apresentar crescimento mais evidente no período de 90-120 dias, com aparente estabilização por volta de 180-210 dias. Foi verificado decréscimo no número das células maternas do epitélio das criptas no final da gestação. Os números médios das células binucleadas do trofoblasto no terço inicial, médio e final da gestação mantiveram-se semelhantes, bem como a proporção volumétrica dos componentes do tecido conjuntivo materno e fetal e dos vasos no tecido materno, enquanto que no tecido fetal ocorreu aumento gradativo do mesmo.

Palavras-chave: *vaca, Nelore, placentomo, células binucleadas.*

ABSTRACT

This study was conducted to better understand the morphologic characteristics of the placentome of the Nelore cow throughout gestation. The experiment was conducted in labs of the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais and in the Cytology, Histology and Embryology lab of the Federal University of Uberlandia, using uteri of 52 Nelore cows collected in a slaughterhouse located in Araguari - MG. For the estimation of gestational age were used aspects of fetal development. It was collected a fragment of a placentome of the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum. The ovary containing the corpus luteum was also collected. All samples were immersed in a solution of formol 10% before reduced to small size and conservation until inclusion in paraffin using routine histological technique. The study of volumetric proportion was done using a light microscope equipped with an integrated ocular (10x Zeiss KPL). It was also made the quantification of epithelial cells in crypts of caruncles by light microscopy and the help of an ocular micrometric with a grid of 100 divisions. For the macroscopic evaluation the experiment was designed in seven periods during the pregnancy, while for the microscopic one the periods of pregnancy were divided into initial, middle and final thirds of pregnancy. The corpus luteum in the right ovary was found in 61.54% of cases. The average number of placentomes found in the pregnant uterine horn was 43.08 ± 9.37 . Placentomes located in the distal portion of the pregnant uterine horns developed by 120-150 days, with apparent stabilization, while those in the proximal region were smaller than the ones of the distal and medial regions. Placentomes of the medial region showed more evident growth by 90 to 120 days, with apparent stabilization around 180-210 days. It was found a decrease in the number of maternal cells of the epithelium in the crypts in advanced pregnancies. The average number of binucleate trophoblast cells remained similar throughout gestation, as well as the volumetric proportion of components of the maternal and fetal tissue and maternal blood vessels, whereas the fetal blood vessels showed a progressive increased.

Key-words: cow, Nelore, placentome, binucleate cell.

1. INTRODUÇÃO

Um dos setores da economia brasileira que, nos últimos anos, vem se destacando com sucessivas contribuições no aumento do Produto Interno Bruto (PIB) é o agronegócio. Neste cenário, a pecuária tem posição privilegiada, destacando-se a área da bovinocultura.

O Brasil é um país de grande extensão territorial, com população bovina estimada em 170 milhões de cabeças (IBGE, 2007). Entretanto, a produtividade do rebanho bovino brasileiro é baixa quando comparada a outros países. Os fatores ligados à reprodução colaboram para esse baixo desempenho, principalmente no puerpério, quando ocorrem eventos fisiológicos determinantes da eficiência reprodutiva. Anomalias como distocias, retenção de placenta e infecções uterinas podem ser responsáveis pelo aumento do período de serviço, intervalo de partos e baixa eficiência reprodutiva do rebanho (BARRETO FILHO, 1992).

Na vaca, o ciclo estral é de 21 dias e a gestação varia de 275 a 290 dias de acordo com as raças e cruzamentos envolvidos. O período gestacional em gado Zebu é relativamente mais longo, quando comparado ao gado europeu (HAFEZ, 2004).

Desde o momento da fecundação, são necessários alguns requisitos para a manutenção da gestação, entre os quais estão: competência da unidade uterina, competência da unidade embrionária e sincronia entre estas unidades. Sabe-se que grande perda embrionária ocorre entre os dias 8 e 16 da gestação, momento este em que está ocorrendo o alongamento do embrião, coincidente com o momento do reconhecimento materno da gestação, associado à manutenção do Corpo Lúteo (CL) (DISKIN e SREENAN, 1980; HAFEZ, 2004).

No mecanismo de interação materno-fetal as células trofoblásticas são a principal interação com o organismo materno (IGWEBUIKE, 2006). Logo após a implantação embrionária, são descritos dois tipos celulares distintos no trofoblasto da placenta de ruminantes, tanto em sua morfologia quanto na sua funcionalidade. Essas são as células trofoblásticas mononucleadas e as células trofoblásticas binucleadas. As primeiras compõem a maioria das células do trofoblasto e estão envolvidas primariamente na troca de nutrientes, enquanto as células binucleadas são responsáveis pela síntese de hormônios, tais como progesterona e lactogênio placentário, dentre outros (MYERS e REIMERS, 1988).

Com a necessidade de maiores esclarecimentos sobre o processo da separação placentária e entendimento dos fatores que o influenciam, torna-se relevante a consideração sobre seus efeitos econômicos e a ampliação de conhecimentos sobre a relação entre endocrinologia e mudanças estruturais na placenta. A retenção placentária, considerada um problema relevante na reprodução bovina, pode causar perdas na produção, redução na fertilidade, aumento no número de coberturas por concepção e aumento do intervalo de partos. Conhecer mais a respeito da fisiologia da placenta e de suas características teciduais, como sua quantificação volumétrica, implica, no presente trabalho, o desenvolvimento da seguinte hipótese:

Hipótese:

1. As características macroscópicas e a proporção volumétrica dos componentes estruturais microscópicos do placentomo da vaca Nelore variam ao longo da gestação.

Para isso, pretende-se alcançar os seguintes objetivos:

Objetivos:

1. Estudar aspectos macroscópicos do placentomo;
2. Quantificar a população de células epiteliais das criptas ao longo da gestação na vaca Nelore;
3. Determinar as proporções volumétricas das células trofoblásticas binucleadas e demais componentes estruturais do placentomo;
4. Avaliar a frequência de ocorrência do corpo lúteo nos ovários esquerdo e direito.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Nelore

Segundo a classificação taxonômica, os Bovinos são mamíferos pertencentes à grande família *Bovidae* e são divididos em duas principais subespécies. Uma delas é o *Bos taurus* variedade *taurus*, que são representados pelos bovinos europeus, disseminados pelas regiões de clima temperado e caracterizados por terem chifres geralmente curtos, pele clara e pêlos longos. A outra é o *Bos taurus* variedade *indicus*, que são os animais oriundos da Índia, Ásia e África e que vivem de forma majoritária em regiões de clima tropical. Estes também são conhecidos como gado Zebu ou indiano e têm por características mais importantes a pele pigmentada e bastante solta, barbeta ampla, os pêlos são unidos, curtos e finos, e chifres curtos ou longos. As duas subespécies são constituídas por animais de várias raças, que apresentam características para produção de carne (gado de corte), leite (gado de leite) ou de ambos (gado de dupla aptidão), sendo que a principal diferença morfológica entre os dois gêneros é a presença da giba ou cupim no dorso do gado Zebu (SANTIAGO, 1986).

Nas Américas os zebuínos, assim como todos os animais domésticos foram trazidos pelos colonizadores. Entretanto, a sua entrada em grande escala ocorreu no século XIX e XX. A denominação Zebu veio descrita da Índia juntamente com o gado importado no final do século XIX e significa terra ou berço sagrado, enfatizando assim o papel religioso dos bovinos naquele país (SANTOS, 1998). No Brasil, o maior representante dos zebuínos são os da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), correspondente ao gado Ongole oriundo da Índia (SANTOS, 1995). O rebanho brasileiro é composto por aproximadamente 170 milhões de bovinos, sendo o maior rebanho comercial do mundo

e superando a produção de países como Rússia e Austrália (IBGE, 2007).

Apesar desses números impressionantes, o Brasil possui um dos menores índices de produtividade do mundo no setor, considerando-se as baixas taxas de natalidade, altas taxas de mortalidade, longos intervalos de parto e idades elevadas ao primeiro parto e abate, resultando em uma taxa de desfrute (expressa em toneladas produzidas sobre o total de toneladas do rebanho) baixa. O que favorece na hora da competição internacional é o domínio tecnológico do processo, além do baixo custo de produção. O Brasil destaca-se, não somente pelo tamanho do rebanho, mas também pelo potencial de crescimento onde cerca de 80% destes animais são constituídos por Zebus. Desses, a grande maioria é da raça Nelore ou seus mestiços, com considerada maior fertilidade, rusticidade e adaptação ao ambiente, possibilitando assim um sistema de produção extensivo, que pode ser mantido a pasto com baixo custo de produção (SANTOS, 1998).

O Nelore apresenta bom índice econômico como produtor de carne e se constitui por excelência em grande e inestimável patrimônio genético para a bovinocultura. Entretanto, essa realidade nem sempre foi efetiva, uma vez que as primeiras raças que despertaram interesse econômico eram aquelas que possuíam características ezoognósticas peculiares, tais como as orelhas variando de médias a longas. Esse aspecto morfológico fez com que o mercado logo passasse a reconhecer como de sangue indiano aqueles animais de orelhas pendentes ou semi-pendentes, ao contrário dos taurinos. Isso explica também a áurea fase da raça Indubrasil, formada no país na década de 40, e que tem como marca notável orelhas longas e pendentes (ABCZ, 2009).

As principais características do gado Ongole, que deu origem à raça Nelore, são a pelagem branca ou cinza clara, a cara estreita em forma de ataúde, arcadas orbitárias não salientes e perfil ligeiramente convexo. Os chifres são normalmente curtos e por vezes grossos. Distingue-se também pelas orelhas curtas ou de tamanho médio, com um gado de modo geral grande (SANTIAGO, 1986).

As importações de exemplares da raça Nelore para o Brasil datam a partir da década de 1930, em especial na década de 60, coincidindo com a retomada do crescimento da fronteira Oeste formada por grandes extensões de cerrados e viabilizada pela introdução das brachiárias. A raça Nelore foi consolidada pelo novo cenário cerrado-brachiária, que formou um ambiente adequado para seu crescimento. As características de gado andejo, de alto instinto de defesa própria e de defesa da cria, parindo regular e naturalmente bezeros medianos a grandes, saudáveis e que se locomovem imediatamente após o parto junto com o rebanho determinaram o crescimento da raça de forma natural e em uma escala geométrica, até atingir os índices atuais que hoje ela apresenta (ABCZ, 2009).

2.2 Reconhecimento materno da gestação

Após uma bem sucedida cobertura e posterior fertilização o conceito deve sinalizar sua presença para o organismo materno e bloquear a regressão do Corpo Lúteo (CL), um processo denominado de luteólise, com a finalidade de manter a produção luteínica de progesterona. A manutenção do CL é essencial para o estabelecimento da gestação em todas as espécies de animais domésticos. O conceito sintetiza e secreta esteróides e proteínas para sinalizar sua presença no ambiente materno, modulando a síntese e a liberação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) a partir do útero

para prevenir a regressão do CL. O período crítico para que esta sinalização ocorra e bloqueie a regressão do CL, estabelecendo a gestação é denominado “reconhecimento materno da gestação” (GEISERT e MALAYER, 2004), que é realizado pela presença de um fator protéico secretado pelas células do trofoblasto no estágio de pré-implantação do conceito.

Tal fator foi inicialmente estudado em ovinos, sendo denominado trofoblastina, e posteriormente, proteína trofoblástica ovina (GODKIN et al., 1982). Atualmente este é classificado como pertencente à família das citocinas (Interferon), passando a ser denominado Interferon-tau ($IFN\tau$). Sua maior secreção pelas células trofoblásticas do embrião bovino está entre os dias 10 e 24 da gestação, conferindo efeito antiluteolítico (LEAMAN e ROBERTS, 1992). O $IFN\tau$ age nas células do epitélio endometrial promovendo inibição na expressão de receptores de ocitocina e com isso a ocitocina produzida pelo CL e pela hipófise posterior não consegue ligar-se ao endométrio, o que inibe a síntese e liberação normal de $PGF_{2\alpha}$, que levaria à luteólise (DEMERS et al., 2001).

2.3 Corpo lúteo

Logo após a ovulação, ocorre a saída do líquido folicular do antro e conseqüente colapamento da parede folicular. A membrana basal entre as camadas da teca interna e granulosa se rompe, assim como os capilares da teca interna, o que resulta em hemorragia dentro da cavidade folicular com formação de coágulo (corpo hemorrágico) que servirá de matriz para a migração e proliferação celular (SMITH et al., 1994; HAFEZ, 2004). Com essa remodelação tecidual, o corpo hemorrágico é substituído pelo corpo lúteo, que se forma pela rápida proliferação celular aumentando em tamanho e alterando sua forma e consistência, além de apresentar crescente

produção de progesterona (TOM et al., 1998).

O corpo lúteo é considerado uma glândula endócrina transitória (SMITH et al., 1994). Sua presença é obrigatória para a manutenção da gestação em bovinos. Os estudos têm demonstrado que o ovário bovino, localizado do lado direito é mais funcional quando comparado ao esquerdo. Isso sugere maior frequência de corpo lúteo neste ovário (REECE e TURNER, 1938; PERKINS et al., 1954; HASLER et al., 1987).

Estudo realizado por Hasler et al. (1987) sobre transferência de embriões revelou uma incidência de 57% dos corpos lúteos no lado direito. O lado da transferência do embrião, correspondendo ao ovário contendo o corpo lúteo, não revelou diferença no percentual de gestação considerando-se os lados direito e esquerdo.

Viana et al. (1999) encontraram maior incidência do corpo lúteo no ovário direito de animais da raça Gir (57,14%), enquanto Neves et al. (2002) encontraram em 86 animais zebu abatidos em frigoríficos maior incidência de corpo lúteo no ovário esquerdo de animais gestantes (51,2%) e não-gestantes (51,2%). Akinpelumi e Orji (1990), também analisaram ovários de vacas abatidas em frigoríficos e encontraram uma frequência de corpo lúteo no ovário esquerdo de 55,1%.

2.4 Placentação e desenvolvimento fetal

A placenta dos mamíferos da subclasse Eutéria possui estrutura e características funcionais comuns. Entretanto, existem variações na aparência tanto macro quanto microscópica entre as espécies. Nos ruminantes, a placenta é classificada como cotiledonária baseado em suas características anatômicas. Ela exhibe

áreas discretas de ligação, os placentomos, formados pela interação do corioalantóide com o endométrio. A parte fetal do placentomo é o cotilédone, enquanto que a parte materna de contato é a carúncula (IGWEBUIKE, 2006).

Durante seu desenvolvimento, o embrião passa a dividir-se até o estágio de mórula. As células que inicialmente compõem o embrião são chamadas blastômeros. O estágio de blastocisto é alcançado quando desenvolve uma cavidade central repleta de fluido, a blastocele que é circundada por uma camada de células denominadas de trofoblasto. Esse dará forma à camada de cobertura da superfície externa da placenta em todos os animais domésticos que juntamente com o mesoderma somático ou parietal, constitui o cório. O alantóide é uma estrutura membranosa que se desenvolve a partir da porção terminal do intestino do embrião, que se expande para finalmente se fundir com o cório, dando forma ao corioalantóide. O âmnio é uma camada epitelial derivada do ectoderma embrionário com função de suporte, o qual rodeia o embrião ou feto em desenvolvimento e permanece avascular (SCHLAFER et al., 2000).

O estágio inicial do desenvolvimento placentário nos animais domésticos é marcado pela formação de uma placenta coriônica inicialmente avascular. A nutrição do embrião nesta fase ocorre de maneira histotrófica. Devido ao aumento na demanda de substâncias necessárias ao desenvolvimento embrionário, surge a necessidade de um eficiente sistema de transporte vascular através do qual nutrientes hemotróficos possam atingir a circulação fetal. A conexão da membrana coriônica à circulação fetal é dada pela vascularização desta por capilares alantoideanos. Nos bovinos, o período inicial de gestação é caracterizado pela presença de uma placenta vitelina funcional. No entanto esta é rapidamente substituída

pela placenta corioalantoideana (BJÖRKMAN, 1976).

Os componentes fetais se constituem de endotélio, mesênquima e trofoblasto. Os maternos são o epitélio uterino, o tecido conjuntivo e o endotélio. Entre os cotilédones há áreas de tecido coriônico liso. Assim, a placenta bovina é classificada como cotiledonária; epiteliocorial ou sinepiteliocorial; vilosa, devido à presença dos vilos e não decídua, por que as partes materna e fetal podem ser separadas sem causar danos à mucosa uterina após o parto (BJÖRKMAN, 1976; WOODING, 1992; MEÇA et al., 2006).

Entre 70 a 120 placentomas são formados durante a gestação no bovino, os quais aumentam diversas vezes seu tamanho original, sendo maiores aqueles localizados no terço médio do corno gestante, com a estabilização do crescimento ocorrendo entre os dias 180 e 210 da gestação (MARQUES JÚNIOR et al., 1993).

O mecanismo da eritrofagocitose parece ser uma das principais fontes de ferro para o feto bovino, principalmente nas fases finais da gestação. Isso ocorre em áreas especializadas denominadas de hematoma placentário onde o sangue é extravasado para a interface materno-fetal e as hemácias maternas são fagocitadas e digeridas pelas células do trofoblasto. Os hematomas são observados exclusivamente na base das vilosidades coriônicas nos estágios finais da gestação, em que células trofoblásticas de áreas adjacentes dos hematomas exibem eritrofagossomas, sugerindo um processo de eritrofagocitose (SANTOS et al., 1996a; PEREIRA, 2004; CAZERTA, 2007).

2.5 Células do trofoblasto

A rica vascularização corioalantóidea é revestida em sua superfície externa por células do epitélio do

trofoectoderme. Essas células assumem funções especializadas e são conhecidas como células do trofoblasto.

Logo após a implantação embrionária são descritos dois tipos celulares distintos no trofoectoderma da placenta de ruminantes, tanto em sua morfologia quanto na funcionalidade: células trofoblásticas mononucleadas e células trofoblásticas binucleadas. As primeiras compõem a maioria das células do trofoblasto e estão envolvidas primariamente na troca de nutrientes, enquanto que as células binucleadas são responsáveis pela síntese de hormônios, tais como progesterona e lactogênio placentário (MYERS e REIMERS, 1988).

2.5.1 Células trofoblásticas mononucleadas

No mecanismo de diálogo materno-fetal, as células trofoblásticas representam a principal unidade de interação com o organismo materno. As células trofoblásticas mononucleadas variam de cuboidais a colunares baixas com características típicas de células epiteliais. Elas localizam-se na membrana basal e são conectadas umas às outras por complexos juncionais. Constituem 4/5 da população trofoblástica. Cada uma dessas possui um único núcleo de formato irregular bem como um nucléolo e cromatina ligeiramente dispersa (IGWEBUIKE, 2006). Há acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma e vesículas de diferentes tamanhos, algumas contendo material em degeneração (KING et al., 1980). A membrana da superfície apical destas células é modificada, apresentando microvilos que se interdigitam em processos similares das células epiteliais uterinas, formando a zona de contato materno-fetal (BJÖRKMAN, 1969).

2.5.2 Células trofoblásticas binucleadas

As células trofoblásticas binucleadas constituem em torno de 1/5 da população trofoblástica (20%) e possuem como precursores as células trofoblásticas mononucleadas que realizam um mecanismo de endoduplicação. Esse mecanismo é a cariocinese sem a ocorrência de citocinese, sendo que o acréscimo no número destas células provavelmente ocorre pelo contínuo recrutamento e transformação de células trofoblásticas mononucleadas (BJÖRKMAN, 1976) e pela divisão nuclear que ocorre sem a necessidade de divisão do citoplasma, determinando a condição binucleada (diplocariócito). A divisão citoplasmática nunca ocorre nas células gigantes, mostrando sua incapacidade de proliferação. Aos 17 dias de gestação elas surgem no epitélio coriônico e permanecem até o final, circundadas por células mononucleadas. Entretanto, não ocorre sua fusão à membrana basal e, com um número aparentemente estável ao longo da gestação, representam de 15 a 20% do total de células do epitélio coriônico (WOODING, 1992).

Flood (1991) verificou que as células binucleadas constituem, em bovinos, aproximadamente 10% das células trofoblásticas do 18º ao 20º dia de gestação e 20% no restante do período, sendo que somente 20% destas células possuem capacidade migratória. Após migração, estas células aparecem no epitélio uterino, onde se fundem às células epiteliais dando origem às células multinucleadas gigantes, que correspondem a 50% da área do epitélio materno aos 24 dias de gestação. Próximo ao parto, seu número cai para ¼ do total.

Wooding (1982), analisando a ultraestrutura de células trofoblásticas binucleadas de ruminantes, verificou que sua origem ocorre a partir de células mononucleadas. No início, estão presentes em número reduzido, porém apresentam um

volume citoplasmático denso, com pequeno número de mitocôndrias, muitos polirribossomos e um extenso sistema de cisternas de retículo endoplasmático, que às vezes apresentam grande número de aparelhos de Golgi. Essa organela é responsável pela grande quantidade de grânulos característicos com densidade variada quando observadas após fixação e coloração convencionais, onde cada um contém microvesículas.

Células binucleadas maduras apresentam-se completamente granuladas e com volume citoplasmático aumentado (30-50µm), encontrando-se próximas da superfície do epitélio trofoblástico mononuclear, embora não façam parte desta junção compacta do epitélio. Essa é a primeira barreira de migração para as células binucleadas. A segunda barreira é o tecido de interdigitação com o epitélio trofoectodérmico, que forma a junção microvilar, constituída com o epitélio uterino materno, consideravelmente modificado, incluindo a transformação para sincício durante a implantação e desenvolvimento placentário em todos os ruminantes. Seus produtos de secreção são liberados nos capilares maternos. Dentre eles estão o lactogênio placentário, estrógeno, progesterona e prostanoídes, como prostaciclina e prostaglandinas (REIMERS et al., 1985; GROSS e WILLIAMS, 1988).

Dentre os produtos das células binucleadas estão uma série de hormônios e fatores associados ao crescimento fetal, desenvolvimento e manutenção da gestação (SCHALAFER et al., 2000). Tais células também migram para o epitélio uterino, da camada coriônica dos vilos cotiledonários até a camada de células epiteliais que revestem as criptas carunculares (WOODING, 1982). Algo semelhante acontece nas áreas interplacentomais. Após migrarem, as células trofoblásticas binucleadas fundem-se às células epiteliais

endometriais, despejando seus grânulos citoplasmáticos. A fusão de uma célula fetal com uma célula materna forma temporariamente uma célula híbrida com três núcleos (DERIVAUX, 1988).

A formação e migração das células binucleadas foi descrita por Wooding e Wathes (1980) da seguinte maneira: a célula binucleada é formada no córion e sintetiza grânulos, em seguida move-se e entra em contato com a junção microvilar, alterando as junções laterais do epitélio uterino até alcançar a membrana basal desse tecido, onde seus grânulos são liberados no espaço intercelular, junto aos vasos maternos ou diretamente no interior de células uterinas adjacentes. Em uma fase posterior, ocorre a redução do citoplasma da célula binucleada, apresentação de núcleos densos e diminuição do número de grânulos. Em uma progressão, os núcleos tornam-se altamente densos ou picnóticos e a célula desprende-se, retornando novamente à junção microvilar.

2.6 Mecanismos de maturação e retenção placentária

A maturação da placenta tem início com o achatamento do epitélio nas carúnculas maternas, o qual é intensificado 3 a 5 dias antes do parto, e a diminuição do número de células trofoblásticas binucleadas e células epiteliais das carúnculas maternas (SANTOS et al., 1996b). O feto participa aparentemente da manutenção da população de células binucleadas e as alterações hormonais antes do parto parecem favorecer a diminuição dessas células. O número de células nas criptas carunculares declina a partir dos 270 dias de gestação (BARRETO FILHO e MARQUES JÚNIOR, 1993).

Gross et al. (1991) estudaram o envolvimento das células binucleadas na liberação placentária. Tais células decrescem em número e viabilidade no momento do

parto, o que pode estar relacionado à expulsão completa da placenta, mediada pela ação de prostaglandinas e glicocorticóides.

No que se refere ao estudo de retenção de placenta, Miyoshi et al. (2002), realizando reações imunohistoquímicas para demonstrar a atividade da enzima fosfatase ácida em vacas com retenção de placenta e com liberação normal observaram que na maioria dos macrófagos nas carúnculas com liberação normal havia forte atividade da fosfatase ácida. Essa é sintetizada por macrófagos e funciona como um marcador da ação de retirada dos resíduos indesejáveis do tecido caruncular no período pós-parto. Nas carúnculas com retenção de placenta, o número de macrófagos mostrou que a atividade e a intensidade da marcação da fosfatase ácida foi diminuída em comparação com a placenta com liberação normal.

Macroscopicamente, as carúnculas de placentas retidas são ovais e rígidas em comparação aos casos normais. Isto pode acontecer devido à falta da função renovadora dos macrófagos na atividade de fagocitose dos elementos celulares que constituem as estruturas carunculares. Então, as carúnculas permanecem intactas e com as membranas fetais conectadas firmemente ao lado materno da placenta. É possível que os macrófagos da placenta bovina controlem o término normal da gestação por atenuação do tecido e desconexão da membrana fetal (MIYOSHI et al., 2002; MEÇA et al., 2006).

Santos et al. (1996b) fizeram estudo da proporção volumétrica de componentes estruturais de placentomas bovinos com liberação normal e com retenção de placenta. Diversos componentes estruturais foram estudados, como tecido conjuntivo materno, epitélio das criptas carunculares, tecido conjuntivo fetal, epitélio trofoblástico e células binucleadas. Apenas a proporção destas últimas em fêmeas com retenção foi

maior e significativa estatisticamente, sugerindo sua participação no processo de liberação fisiológico da placenta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e local

Para este experimento, os espécimes de genitais foram obtidos de vacas da raça Nelore, gestantes e saudáveis, abatidas no Frigorífico Mata Boi, localizado na cidade de Araguari-MG, no Triângulo Mineiro. Foram utilizadas 52 vacas da raça Nelore, com tempo de gestação variando de 77 a 261 dias.

O processamento de todo o material foi realizado no Instituto de Ciências Biomédicas (ICBim) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), setor de Citologia, Histologia e Embriologia, enquanto que a leitura das lâminas ocorreu no setor de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG)

3.2 Determinação da idade gestacional e lado do corpo lúteo

Instantes após o abate dos animais, foram iniciados os procedimentos de coleta do material. Primeiramente, foi realizada, de modo mais asséptico possível, uma incisão no corno uterino gestante, com posterior secção do cordão umbilical e exteriorização do feto. Este foi colocado em decúbito lateral com sua linha dorsal em posição retilínea, sendo a idade gestacional anotada.

Para a estimativa da idade gestacional foram utilizados aspectos do desenvolvimento fetal (EVANS e SACK, 1973) e o comprimento da crista nugal (osso occipital) até a primeira vértebra coccígea (CR= "Crow-Rump") do feto e utilizada a fórmula proposta por Richardson (1996):

$$x = 2,5 (y + 21)$$

onde,

x é a variável tempo de gestação em dias e,

y representa o comprimento CR em centímetro.

3.3 Quantificação e medidas dos placentomos

Após a mensuração fetal o interior do corno uterino gestante era exposto e o número de placentomos quantificado.

Para este experimento, o útero foi dividido topograficamente em três regiões, sendo: região proximal, a extremidade adjacente à cérvix, região medial e região distal, a extremidade mais afastada da cérvix.

Um placentomo de cada uma dessas regiões foi medido em seus diâmetros longitudinal e transversal, com o auxílio de um paquímetro, tendo sido anotado os dados correspondentes e convertidos em diâmetro médio. Com isso, foram obtidos os diâmetros médios para cada região estudada do útero.

3.4 Coleta e processamento dos placentomos

A coleta dos placentomos foi realizada na sala de coleta de Soro Fetal Bovino (SFB), que fica anexa à linha de abate. Um placentomo localizado no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, na região da sua curvatura maior, foi coletado, bem como seu respectivo ovário contendo o corpo lúteo e anotado o lado de ocorrência.

Em seguida, o placentomo e o ovário foram imersos em solução contendo formol a 10% (aldeído fórmico), por um período superior a 4 horas para prefixação.

Após este procedimento, foi feito corte de aproximadamente 0,5 cm de espessura, em plano sagital, do ápice até a base, para ser colocado em recipiente contendo formol a 10%, no qual foi mantido até o momento do processamento.

Todo material coletado foi levado ao setor de Citologia, Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBim) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), onde foi processado. Para este procedimento utilizou-se a técnica histológica clássica de inclusão em parafina (MICHALANY, 1980), composta pela seguinte seqüência, após realizada a fixação:

A - Desidratação - Os fragmentos permaneceram pelo menos 30 minutos, em cada frasco contendo álcool de concentrações crescentes: 75%, 85%, 95%, absoluto I, absoluto II e absoluto III.

B - Diafanização - Após a imersão no álcool absoluto III o material foi transferido para xilol I, II e III, permanecendo pelo menos por 30 minutos em cada banho, tratamento necessário para substituir o álcool e permitir a penetração de parafina fundida dentro da peça.

C - Impregnação e Inclusão - Os fragmentos passaram por 3 banhos de parafina (I, II e III), cada um com duração mínima de 30 minutos. Em seguida, foi feita a inclusão propriamente dita em moldes metálicos, colocados sobre uma folha de papel com parafina à 56°C.

D - Corte - Os cortes foram feitos com uma espessura de cinco micrômetros, com o auxílio de um micrótomo, os quais foram distendidos em banho-maria. O procedimento foi seguido pela pescagem, que consiste em mergulhar no banho-maria a lâmina e coletar o tecido. A secagem foi feita na estufa para fusão da parafina impregnada no tecido.

E - Coloração - Foi realizada a coloração por hematoxilina/eosina (MICHALANY, 1980), seguida de desidratações.

F - Montagem - Foi feita colocando-se uma gota de Entelan® sobre o corte, posteriormente colocou-se uma lamínula e essa foi comprimida sobre o corte de modo a espalhar a cola em fina camada entre a lâmina e lamínula. Repetiu-se esse mesmo procedimento na montagem de cada lâmina.

O esquema do procedimento está ilustrado no Anexo II.

3.5 Quantificação das células epiteliais das criptas

A quantificação das células epiteliais nas criptas das carúnculas foi realizada em todas as 52 amostras, em lâminas coradas pela Hematoxilina-Eosina (H&E).

A avaliação foi realizada por meio da microscopia de luz, com objetiva de 40X e auxílio de uma ocular micrométrica de 100 divisões. Dessas, utilizaram-se 30 divisões que foram alinhadas paralelamente às células maternas, que delimitaram a extensão do campo, no qual foram contadas as células, segundo a metodologia empregada por Marques Júnior (1988). As células maternas foram contadas em 20 campos microscópicos aleatórios (Anexo III).

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

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

Onde:

n = número de repetições
 s = desvio padrão
 l = limite (intervalo de confiança a 95% de probabilidade)

3.6 Determinação da proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo

Foram utilizadas 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: tecido fetal, tecido materno, células binucleadas e vasos (materno e fetal).

Para a avaliação dos cortes histológicos foi utilizada a microscopia de luz, com objetiva de 40X, a qual foi equipada com uma ocular integradora, contendo um retículo com cinco linhas horizontais e 25 pontos equidistantes (Zeiss KPL 10X) (Anexo III). Microscopicamente, a grade contendo 25 pontos equidistantes foi sobreposta a 80 campos microscópicos escolhidos aleatoriamente, totalizando 2.000 pontos por lâmina. O número de vezes que os pontos atingiram uma determinada estrutura foi utilizado para calcular a proporção volumétrica da mesma, segundo a fórmula de Sharpe et al. (1989).

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

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. Esta estimativa foi feita através da seguinte fórmula (SNEDECOR e COCHRAN, 1994):

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

Onde: p = proporção
 n = número de pontos
 L = limite (intervalo de confiança a 95% de probabilidade)

Quando algum ponto da ocular integradora incidia sobre o artefato de técnica e sobre as áreas de retração entre o tecido materno e o fetal, o mesmo foi computado para avaliação da qualidade das lâminas, porém descartados para o cálculo das proporções volumétricas.

As lâminas ainda foram utilizadas para a realização da fotodocumentação (Anexo IV).

3.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e todas as variáveis aferidas no estudo foram analisadas com o auxílio do software estatístico MINITAB® for Windows. A expressão dos valores é mostrada em média aritmética e desvio-padrão, submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias por meio do cálculo da diferença mínima significativa (DMS), pelo teste t-Student. O nível de significância estabelecido foi de 5 % (SAMPAIO, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as avaliações macroscópicas o experimento foi delineado em sete períodos ao longo da gestação, sendo que cada um, com número variável de animais. O período gestacional de 240 a 270 dias, época mais próxima ao parto, contou com apenas 4 animais e por não ser comum o abate de matrizes em estado de gestação tão avançado não foi possível um número maior de espécimes. Já para as avaliações microscópicas, a quantidade de períodos gestacionais foi dividida em três, sendo, terço inicial (0-100 dias de gestação), médio (100-180 dias de gestação) e final (180-270 dias de gestação). Considerando essa classificação, foi obtido um número variável de representantes por idade gestacional, do qual, 13 espécimes para o terço inicial, 19 espécimes para o terço médio e 20 espécimes para o terço final.

4.1 Localização do corpo lúteo

O corpo lúteo foi encontrado no ovário direito em 61,54% dos casos (Tabela 1), o que corresponde a 32 dos 52 ovários, e no ovário esquerdo em 38,46% dos casos, o que corresponde a 20 dos 52 ovários coletados.

Esta diferença numérica a favor da ovulação no ovário direito assemelhando-se aos achados de Perkins et al. (1954), Megale e Couto (1959), Hasler et al. (1987) e Viana et al. (1999), o que sugere a maior frequência de gestação no corno uterino direito e de corpo lúteo no ovário de mesma localização, o que sinalizam uma maior funcionalidade desse ovário. Entretanto, Akinpelumi e Oriji (1990) e Neves et al. (2002) encontraram resultado diferente.

Tabela 1: Frequência dos corpos lúteos (CL) nos ovários esquerdo e direito de vacas Nelore gestantes, abatidas em frigorífico na região do Triângulo Mineiro-MG

Frequência dos corpos lúteos	n	(%)
Ovário direito	32	61,54
Ovário esquerdo	20	38,46

Todas as gestações apresentaram-se localizadas no corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o corpo lúteo.

4.2 Número médio de placentomas

O número médio, com respectivo desvio padrão, de placentomas encontrados no corno uterino gestante foi de $43,08 \pm 9,37$, com um coeficiente de variação (cv) de 21,75%. Em trabalho realizado por Björkman (1954), foi relatada a ocorrência de uma média de 113 carúnculas no útero de vacas de raças européias, com algumas delas não formando placentomas. Em uma de suas

pesquisas ainda foi encontrado número médio de 63 placentomas no corno uterino gestante e 41 no corno não gestante. Em outra pesquisa esse mesmo autor encontrou 52 e 23, respectivamente. Estes dados indicam que o número de placentomas que se desenvolvem ao longo da gestação em vacas Bos taurus taurus é superior ao encontrado em vacas Nelore, o que corrobora com os achados de Barreto Filho (1992).

Marques Júnior et al. (1993) descrevem que durante a gestação ocorre a formação de 70 a 120 placentomas, os quais aumentam diversas vezes seu tamanho

original, sendo maiores aqueles localizados no terço médio do corno gestante, com a estabilização do seu crescimento se dando entre os dias 180 e 210 da gestação.

4.3 Morfometria dos placentomas

Os placentomas localizados na região distal do corno uterino gestante apresentaram diferença estatística significativa ($P < 0,05$) no período de 90-120 para 120-150 dias, ocorrendo, em seguida, aparente estabilização no seu

desenvolvimento. No período de 240-270 dias de gestação também houve diferença significativa ($P < 0,05$) em seu desenvolvimento, conforme mostra a Tabela 2. Esta diferença pode ter sofrido influência pelo baixo número de exemplares nessa faixa etária. Já os placentomas da região proximal apresentaram desenvolvimento menor e aparentemente mais lento, conforme mostra a Tabela 3, quando comparados àqueles da região distal e medial, assim como foi verificado em experimento similar realizado por Barreto Filho (1992).

Tabela 2: Diâmetro médio (cm) dos placentomas de vacas Nelore, da região distal do corno uterino pelo respectivo período gestacional, com seus desvios padrões correspondentes.

Períodos gestacionais	Diâmetros	Desvios padrões
0-90	3,07 ^a	0,92
90-120	3,00 ^a	1,06
120-150	4,66 ^b	0,91
150-180	4,59 ^{bc}	1,11
180-210	4,89 ^{bc}	1,12
210-240	5,40 ^{bc}	0,99
240-270	5,57 ^c	0,16

^{abc}Letras desiguais, na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Tabela 3: Diâmetro médio (cm) dos placentomas de vacas Nelore, da região proximal do corno uterino pelo respectivo período gestacional, com seus desvios padrões correspondentes.

Períodos gestacionais	Diâmetros	Desvios padrões
0-90	2,39 ^a	0,53
90-120	2,38 ^a	0,51
120-150	3,08 ^b	0,39
150-180	4,16 ^c	0,89
180-210	4,26 ^c	0,71
210-240	4,76 ^c	0,84
240-270	4,69 ^c	0,40

^{abc}Letras desiguais, na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Por outro lado, nos placentomas da região medial do corno uterino gestante, foram visíveis as evoluções em seu desenvolvimento. Contudo, começaram a apresentar um crescimento mais evidente no período de 90-120 para 120-150 dias de gestação ($P < 0,05$), período esse, que coincide com o início do segundo terço da

gestação, conforme mostra a Tabela 4. Barreto Filho (1992) também relata que os primeiros placentomas a se desenvolverem são os da região medial do corno uterino gestante, além de também apresentarem os maiores diâmetros, o que condiz com os achados na literatura (Björkman, 1954; Hradecky et al., 1988; Hafez e Hafez, 2004).

Tabela 4: Diâmetro médio (cm) dos placentomas de vacas Nelore, da região medial do corno uterino pelo respectivo período gestacional, com seus desvios padrões correspondentes.

Períodos gestacionais	Diâmetros	Desvios padrões
0-90	3,62 ^a	0,84
90-120	3,52 ^a	0,95
120-150	5,30 ^b	0,24
150-180	6,13 ^b	0,93
180-210	7,36 ^c	0,50
210-240	7,24 ^c	1,06
240-270	7,86 ^c	0,41

^{abc} Letras desiguais, na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Ao longo da gestação o tamanho dos placentomas foi influenciado pelas variáveis idade da gestação e região do corno uterino, apresentando desenvolvimento contínuo ao longo da mesma. Após a implantação embrionária os placentomas desenvolvem-se continuamente até próximo ao parto. Em ruminantes, os primeiros placentomas a se desenvolverem são os localizados na curvatura dorsal no corno uterino gestante, os quais permanecem os maiores por toda a gestação (Björkman, 1954; Hradecky et al., 1988).

No período de 150 até 270 dias de gestação, ou seja, da segunda metade da gestação até próximo ao parto, não foi observada diferença estatística significativa ($P > 0,05$) no desenvolvimento médio dos placentomas da região proximal do corno uterino, indicando, com isso, uma possível estabilização no crescimento dos placentomas desta região. Sendo assim, é possível inferir que ao analisar-se apenas o desenvolvimento, ocorre aparente estabilização do crescimento dos placentomas distais após 120-150 dias, dos proximais aos 150-180 dias e dos mediais aos 180-210 dias (Figura 1).

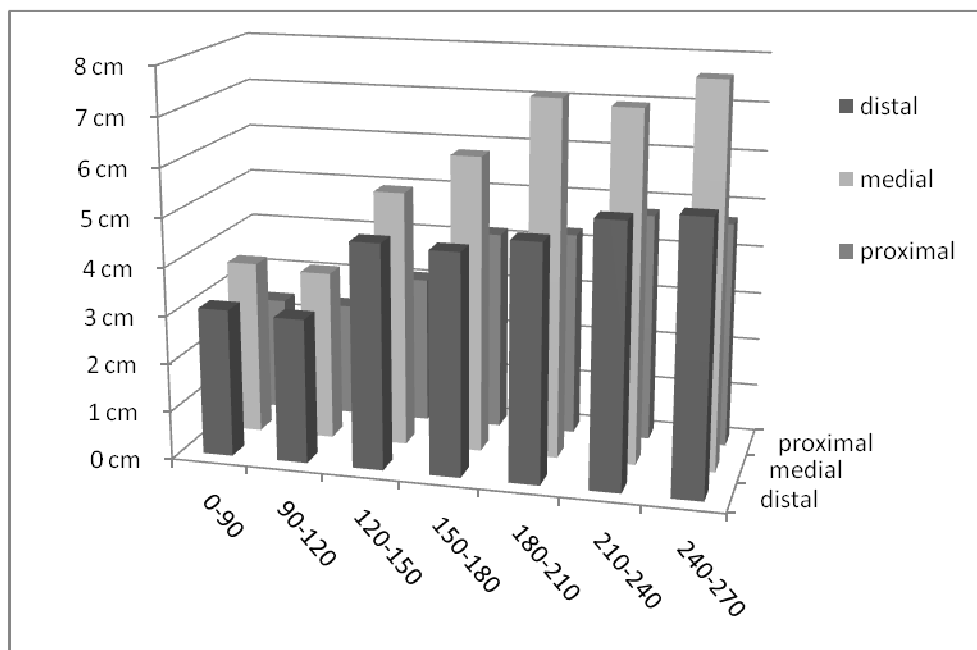


Figura 1: Diâmetro médio (cm) dos placentomos de vacas Nelore, das regiões proximal, medial e distal do corno uterino pelo respectivo período gestacional.

A estabilização no crescimento dos placentomos é mencionada por Björkman (1954), o qual verificou, na idade de 170-280 dias de gestação, que os placentomos alcançam seu desenvolvimento máximo, observando, entretanto, que nos últimos meses o crescimento é mínimo.

Novos placentomos são formados a partir do local de implantação em direção às extremidades dos cornos uterinos, conforme aumentam as necessidades nutricionais do embrião ou feto (Hradecky et al., 1988).

Ainda segundo Hradecky et al. (1988), os placentomos nas extremidades dos cornos uterinos são os menores mesmo em gestações avançadas. Esses autores afirmam também que em alguns animais, mesmo no final da gestação, ocorrem carúnculas livres de placenta nas extremidades dos mesmos, o que foi também evidenciado no presente trabalho.

Miglino (2004) em experimento realizado utilizando a técnica da clonagem

estudou a placentação em vacas, descrevendo as alterações macro e microscópicas observadas na placenta. Foi ressaltado o reduzido número de placentomos. Em contrapartida, tiveram o seu diâmetro aumentado, bem como a sua espessura. A autora especula que possivelmente seja esta uma forma de compensar a redução no número de placentomos, e, com isso, ocorrer uma transferência de nutrientes e metabólitos de forma ainda satisfatória entre mãe e feto.

4.4 Avaliação das células epiteliais das carúnculas

A média aritmética das células maternas do epitélio das criptas no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação), bem como seus respectivos desvios padrões estão expressos na Tabela 5 e Figura 2.

Tabela 5: Médias das células maternas do epitélio das criptas carunculares no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação), bem como seus respectivos desvios padrões.

Períodos gestacionais	Médias de células epiteliais
0-100	8,61 ± 0,48 ^a
100-180	7,86 ± 0,64 ^{a,b}
180-270	7,26 ± 0,51 ^b

^{ab}Letras desiguais, na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

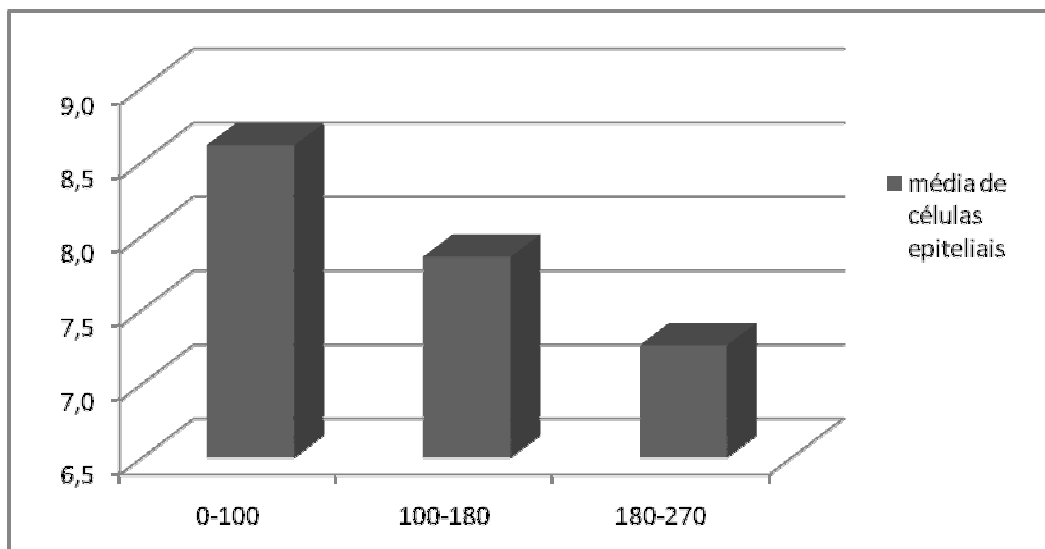


Figura 2: Médias das células maternas do epitélio das criptas carunculares no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação).

Ao analisar os dados contidos na Tabela 5, verificamos que houve um declínio no número médio de células das criptas à medida que avança o tempo de gestação, condizendo com o que foi encontrado na literatura (Grunert, 1986; Woicke et al., 1986; Williams et al., 1987; Marques Júnior, 1988; Barreto Filho, 1992; Martins, 1999; Moura, 2008).

O número de células do epitélio das criptas sofreu redução, apresentando diferença estatística significativa ($P < 0,05$) no terço final da gestação, o que corrobora com o achado por Grunert et. al. (1976), que

verificaram um rápido decréscimo a partir do sétimo mês de gestação até próximo ao parto. Woicke et al. (1986) também encontraram diminuição do número de células em torno do dia 270 de gestação, em vacas de origem européia. No presente experimento a vaca Nelore apresentou decréscimo das células maternas no final da gestação. Ainda segundo esses autores, foi mostrado, experimentalmente, que vacas com parto normal apresentam epitélio materno descontínuo com intenso achatamento e diminuição no número de células maternas. Entretanto, animais com retenção de placenta apresentam o epitélio

das criptas carunculares contínuo e com células cuboidais (Barreto Filho, 1992; Santos et al., 1996b).

Conforme sinalizado na literatura, o decréscimo no número de células do epitélio das criptas é importante para a liberação normal das membranas fetais, tanto na vaca Nelore, conforme sugerem os resultados encontrados neste experimento, como em vacas de origem européia, segundo Grunert (1986), Woicke et al. (1986), Marques Júnior (1988), Martins (1999) e Moura (2008).

A diminuição do número de células epiteliais ao final da gestação é um aspecto importante no processo de maturação da placenta e subsequente separação entre os tecidos materno e fetal (Grunert, 1986). Os mecanismos fisiológicos que determinam este processo não estão esclarecidos, porém, pode ocorrer um processo de degeneração gradativa dessas células ao longo da gestação (Wagner, 1989).

Ainda, foi observada no epitélio caruncular a presença de células multinucleadas formando um tecido feto-maternal híbrido, que segundo Wooding e Flint (1994), caracteriza a placenta do tipo sinepiteliocorial dos ruminantes. Essas células são formadas por células binucleadas do trofoblasto que migram para o epitélio materno e fundem-se com as células epiteliais carunculares (WOODING, 1992) liberando seus grânulos de secreção.

4.5 Avaliação das células binucleadas do trofoblasto

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os números médios das células binucleadas do trofoblasto, no terço inicial, médio e final da gestação, mantiveram-se estatisticamente semelhantes ($P > 0,05$), ocorrendo um ligeiro aumento em seu número médio no terço final, contudo, sem diferença estatística significativa ($P > 0,05$) de acordo com a Tabela 6 e Figura 3.

Tabela 6: Proporções volumétricas (%) das células binucleadas (CB) do trofoblasto no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação), bem como seus respectivos desvios padrões.

Proporções volumétricas %	
Períodos gestacionais	Células binucleadas do trofoblasto
0-100	2,17 ± 0,53 ^a
100-180	2,29 ± 0,73 ^a
180-270	2,89 ± 0,75 ^a

^a ($P > 0,05$).

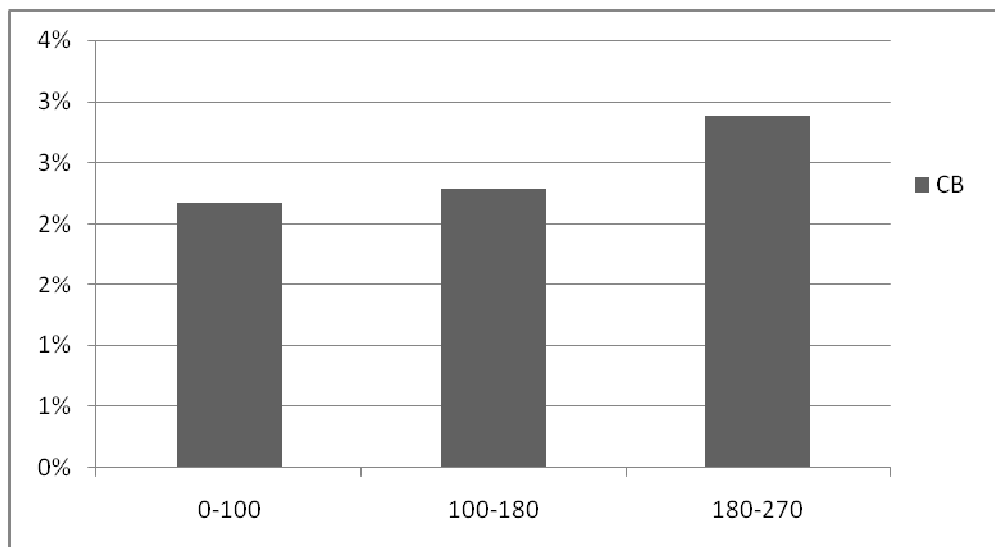


Figura 3: Proporções volumétricas das células binucleadas (CB) do trofoblasto no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação).

Esses resultados assemelham-se aos encontrados por Wooding (1983) e Moura (2008), que verificaram a manutenção da estabilidade do número médio das células binucleadas do trofoblasto até próximo ao dia 260 da gestação. Entretanto, esses dados são diferentes dos obtidos por Williams et al. (1987), que descreveram a ocorrência de um decréscimo neste número e a diminuição significativa das células binucleadas a partir de 7 meses de gestação.

No presente experimento, a idade mais avançada da gestação foi de 261 dias, com média de 213 dias no terço final da gestação, o que impossibilitou avaliar a ocorrência de alteração no número de células binucleadas do trofoblasto e na proporção volumétrica em gestações acima de 260 dias. Esse fato é explicado por não ter sido feita coleta de uma quantidade expressiva de placentomas de vacas em momentos que antecedem ao parto, por não ser comum o abate de matrizes em estado de gestação tão avançado.

A maturação e liberação normal da placenta parecem estar relacionadas com o decréscimo das células binucleadas do trofoblasto, embora este processo ainda não esteja completamente elucidado (GROSS et al. 1991). Esses mesmos autores mostraram que a porção fetal da placenta de vacas com retenção de placenta converte $\text{PGF}_{2\alpha}$ em PGE_2 e as células binucleadas do trofoblasto possivelmente são as responsáveis por essa conversão. Dessa maneira, um dos possíveis mecanismos pelos quais as células binucleadas do trofoblasto podem estar envolvidas na etiopatogenia da retenção da placenta seria por meio de sua interferência com o metabolismo das prostaglandinas. Ainda, segundo esses autores, a diminuição do número de células binucleadas do trofoblasto pode estar relacionada com o aumento na migração para o tecido materno, seguido de destruição pela retirada de estímulos para a sua formação. O feto aparentemente participa da maturação da população de células binucleadas (WOODING et al. 1986).

4.6 Análise da vascularização materna e fetal

A proporção volumétrica, dos vasos no tecido materno ao longo da gestação não sofreu alterações significativas ($P > 0,05$),

conforme apresentado na Tabela 7. Já no tecido fetal, a mesma proporção foi aumentando com o avançar do tempo de gestação, apresentando diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Tabela 7: Proporções volumétricas (%) dos vasos no tecido fetal e materno no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação), bem como seus respectivos desvios padrões.

Períodos gestacionais	Proporções volumétricas %	
	Vasos no tecido fetal (VTF)	Vasos no tecido materno (VTM)
0-100	$0,32 \pm 0,17^a$	$0,92 \pm 0,28^a$
100-180	$1,18 \pm 1,41^{a,b}$	$0,93 \pm 0,55^a$
180-270	$2,07 \pm 1,84^b$	$0,87 \pm 0,37^a$

^{ab}Letras desiguais, na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

O aumento gradativo na proporção volumétrica dos vasos no tecido fetal mostrado deve-se ao crescimento do feto e com isso, verifica-se um maior aporte de nutrientes e troca de metabólitos de forma satisfatória.

Moura (2008) não encontrou diferença nas proporções volumétricas dos vasos dos placentomos de vacas nos terços inicial, médio e final da gestação, aventando a explicação de que isto ocorreu pelo fato de não terem sido avaliadas as proporções volumétricas separadas de tecido materno e fetal.

Na análise das lâminas, foram observadas áreas em que havia a presença ocasional de acúmulo de sangue materno extravasado na interface materno-fetal, com eritrofagocitose pelo trofoblasto, o que é considerado como uma das principais fontes de ferro para o feto bovino, principalmente

nas fases finais da gestação. Isso ocorre em áreas especializadas, denominada de hematoma placentário. Os hematomas são observados exclusivamente na base das vilosidades coriônicas nos estágios finais da gestação, onde células trofoblásticas de áreas adjacentes dos hematomas exibem eritrofagossomas sugerindo um processo de eritrofagocitose (SANTOS et al., 1996a; PEREIRA, 2004; CAZERTA, 2007).

4.7 Proporções volumétricas dos componentes do tecido conjuntivo materno e fetal no placentomo

A proporção volumétrica dos componentes do tecido conjuntivo materno e fetal, no terço inicial, no médio e no final da gestação, bem como seus respectivos desvios padrões está expressa na Tabela 8 e Figura 4.

Tabela 8: Proporções volumétricas (%) dos componentes do tecido conjuntivo fetal e materno no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação), bem como seus respectivos desvios padrões.

Proporções volumétricas %		
Períodos gestacional	Tecido conjuntivo fetal	Tecido conjuntivo materno
0-100	35,34 ± 3,95 ^a	20,68 ± 3,09 ^a
100-180	36,75 ± 3,30 ^a	21,19 ± 2,98 ^a
180-270	37,57 ± 3,46 ^a	20,47 ± 3,62 ^a

^aLetras desiguais, na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

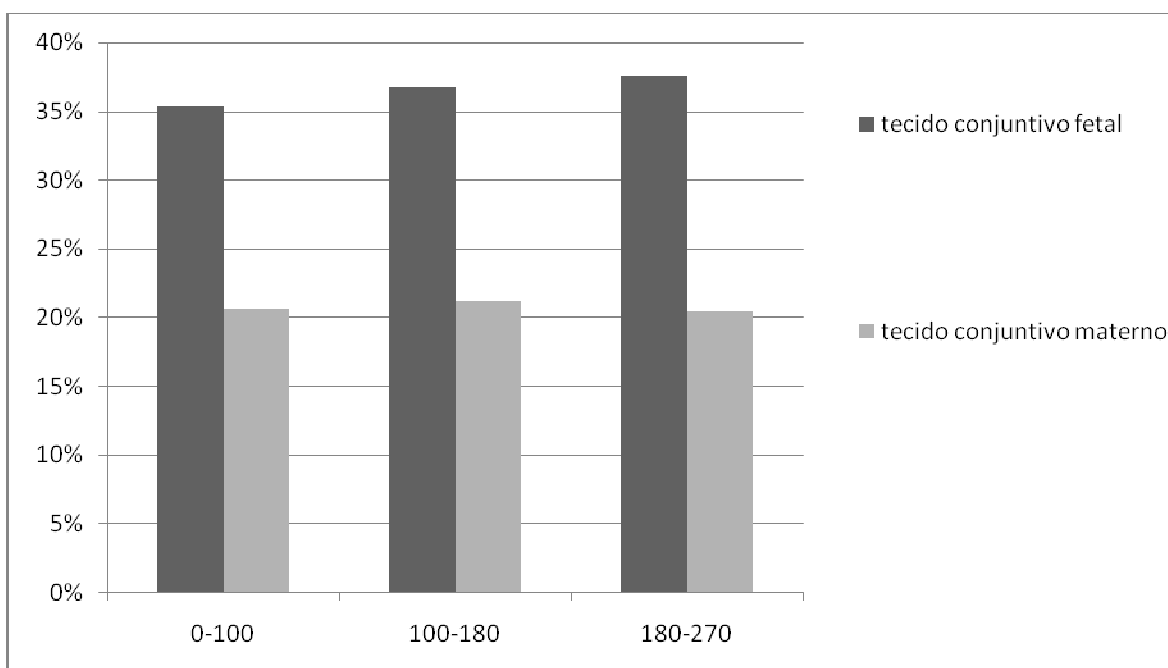


Figura 4: Proporções volumétricas (%) dos componentes do tecido conjuntivo fetal e materno no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação).

Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os períodos gestacionais na proporção volumétrica dos componentes do tecido conjuntivo materno e fetal ao longo da gestação, o que pode ser devido à técnica histológica utilizada, uma vez que os tecidos, aparentemente, sofreram relativo grau de retração. Esse fato pode ter influenciado a análise.

Ao analisar exclusivamente o tecido conjuntivo fetal, apesar de não haver diferença significativa, observa-se que houve uma tendência em aumentar a média da proporção volumétrica com o avançar da gestação semelhante ao que foi verificado por Sharpe et al. (1989). Eles mostraram por estudos morfométricos ao longo da gestação, em vacas da raça Holandesa, que o colágeno presente no cotilédone tende a aumentar

proporcionalmente, enquanto o colágeno do componente materno tende a diminuir. Os autores também verificaram que a proporção volumétrica do colágeno fetal sofre aumento contínuo entre 90 e 270 dias de gestação, constituindo aproximadamente 3% do placentomo aos 90 dias de gestação e correspondendo a aproximadamente 19% do mesmo aos 270 dias. Contudo, não verificaram diferença significativa da proporção volumétrica do colágeno fetal entre vacas com liberação normal ou com retenção de placenta. Foi demonstrado que vacas com retenção de placenta apresentam maior proporção de colágeno do tipo III no placentomo, em comparação às vacas que tiveram liberação normal da placenta (Sharpe et al., 1990).

5. CONCLUSÕES

- Na vaca Nelore o corpo lúteo apresentou-se com maior frequência no ovário direito;

- O número médio de placentomas ao longo da gestação na vaca Nelore (*Bos taurus indicus*) foi inferior ao citado na literatura para a vaca *Bos taurus taurus*;

- Os placentomas que apresentaram maior desenvolvimento foram os localizados na região medial do corno uterino gestante, quando comparados aos da região proximal e distal;

- Ao longo da gestação ocorreu decréscimo no número de células do epitélio caruncular;

- Não houve diferença na proporção volumétrica das células binucleadas, dos componentes do tecido conjuntivo materno e fetal e dos vasos no tecido materno, nos diferentes terços gestacionais;

- Ocorreu aumento gradativo na proporção volumétrica dos vasos no tecido fetal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE ZEBU (ABCZ). *O Nelore e o Nelore mocho*. Disponível em: <<http://www.abcz.org.br/site/tecnica/raças/nel.php>>. Acesso em: 15 jan. 2009.
- AKIMPELUMI, O. P.; ORJI, B. I. *Gross morphological and morphometric changes in ovaries of cycling Whit Fulani cows – Bos indicus*. Bulletin Animal Health. Production. African, v. 38, n. 4, p. 431-436, 1990.
- BARRETO FILHO, J. B. *Aspectos Morfofisiológicos da placentação do zebu (Bos taurus indicus)*. 1992. 106f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BARRETO FILHO, J. B.; MARQUES JÚNIOR, A. P. *Aspectos histológicos da placenta de vacas zebu*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 45, n. 4, p. 385-393, 1993.
- BJÖRKMAN, N. *Morphological and histochemical studies on the bovine placenta*. Acta Anatomica Supplementum., v.22, n.2, p.1-91, 1954.
- BJÖRKMAN, N. *Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome*. Anatomical record. v.163, p.17-30, 1969.
- BJÖRKMAN, N. *Placentation*. In: DELLMAN, H. D.; BROWN, E. M. Textbook of veterinary histology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p.351-369, 1976.
- CAZERTA, S. M. M; MIGLINO, M. A.; MARQUES, R. S.; VULCANO, M.; PEREIRA, F. T. V. *Caracterização das áreas hemófagas da placenta bovina*. Brazilian journal of veterinary research and animal science. v. 27, p. 229-235, 2007.
- DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. *Trophoblast interferon and pregnancy*. Reprod. v.121, p.41 – 49, 2001.
- DERIVAUX, J.; ECTORS, F.; BECKERS, J.F. *The ruminant placenta: structure and endocrine function*. Brussels: State university of Liege. 1988. 81p.
- DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. *Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination*. Journal of Reproduction and Fertility. v.59, Issue 2, p 463-468, 1980.
- EVANS, H. E.; SACK, W. O. *Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references*. Anatomy Histology and Embryology, v.2, n.1, p.11-45,1973.
- FLOOD, P. F. *The development of conceptus and its relationship to the uterus* In: CUPPS, P. T. (Ed.) Reproduction in domestic animals. New York: Academic Press, 1991, p. 315-56.
- GEISERT, R. D.;MALAYER, J. R. *Implantação*. in: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal. 7ª edição. São Paulo: Manole, 2004. 513p. capítulo 9, p.127-140.
- GODKIN, J. D.; BAZER, F. W.; MOFFATT, J. et al. *Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of the sheep blastocyst at day 13 – 21*. J. Reprod. Fertil. v.65, p.141 – 150, 1982.
- GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F. *Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by the binucleate*

- cell. Biology of Reproduction, Champaign, v. 38, p. 1027-34, 1988.
- 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*. 2ed. Philadelphia: Saunders, 1986, p. 237-42.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*. 7ª ed. Barueri: Manole, 2004. 513p.
- HASLER, J. F.; MCCAULEY, A. D.; LATHROP, W. F. et al. *Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program*. Theriogenology, v. 27, p. 139-168, 1987.
- HRADECKY, P., MOSSMAN, H. W., STOTT, G. G. *Comparative development of ruminant placentomes*. Theriogenology, v.29, n.3, p.715-29, 1988.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário. Rio de Janeiro, 2007. 146p.
- IGWEBUIKE, U. *Trophoblast cells of ruminant placentas—A minireview*. Animal Reproduction Science, v.93, Issues 3-4, p. 185-198, 2006.
- KING, G. J., ATKINSON, B. A., ROBERTSON, H. A. *Development of the bovine placentome during the second month of gestation*. Journal of Reproduction and Fertility. v.55, p.173-180, 1980.
- LEAMAN, D. W.; ROBERTS, R. M. *Genes for the trophoblast interferons in sheep, goat and musk ox, and distribution of related genes among mammals*. J. Interferon Res. v.12, p.1 – 11, 1992.
- MARQUES JÚNIOR, A. P. *Leucocite 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 de vacas zebu (Bos taurus indicus)*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 45, n. 2, p. 213-219, 1993.
- MARTINS, E. *Apoptose na maturação e eliminação placentária em Bos taurus taurus*. 1999. 106f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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.
- MEGALE, F.; COUTO, E. S. *Aspectos anatômicos do aparelho reprodutor de vacas azebuadas abatidas em matadouro*. Arquivo Escola Superior Veterinária Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, v. 12, n. 1, p. 529-535, 1959.
- MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico*. 1.ed. São Paulo: EPU, 277p. 1980.

- MIGLINO, M. A. *Clonagem Animal e placentação*. Acta Scientiae Veterinariae, 32, supl., p75-78, 2004.
- MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y.; IWANAGA, T. *Reduced phagocytotic activity of macrophages in the bovine retained placenta*. Reproduction of Domestic animals, v.37, p.53-56, 2002.
- MOURA, M. R. P. *Citologia dos líquidos embrionários e morfometria do placentomo da vaca em diferentes fases da gestação*. 2008. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MYERS, D. A.; REIMERS, T. J. *Purification and endocrine evaluation of bovine binucleate trophoblastic cells*. Methods in Cell Science, v.11, p.83-88, 1988.
- NEVES, M. M.; MARQUES JUNIOR, A. P.; SANTANA, C. V.; LIMA, F. P. C.; ZAMBRANO, W. J. *Características de ovários de fêmeas zebu (Bos taurus indicus), colhidos em abatedouros*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.54, n.6, p.651-654, 2002.
- PEREIRA, F. T. V. *Eritrofagocitose placentária em búfalas (Bubalus bubalis bubalis - Simpson, 1945)*. 2004.102f. Tese de Doutorado, Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, USP, São Paulo.
- PERKINS, J. R.; OLDS, D.; SHEATH, D. M.. *A study of 1000 bovine genitalia*. Journal of Dairy Science, v.37, n.10, p.1158-1163, 1954.
- REECE, R. P.; TURNER, C. W. *The functional activity of the right and left bovine ovary*. Journal of Dairy Science, v. 21, n. 1, p.37-39, 1938.
- REIMERS, T. J.; ULLMANN, M. B.; HANSEL, W. *Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells*. Biology of Reproduction, Champaign, v. 33, p. 1227-36, 1985.
- RICHARDSON, C. Personal communication. In: ARTHUR, G. H.; Parkinson, T. J. Eds. *The development of the conceptus*. Veterinary reproduction and obstetrics, 7 ed. London: WB Saunders Company Ltda. p.51-62, 1996.
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. *Statistical methods*. 8. ed. Ames: Iowa State University Press, 1989.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007, 264p.
- SANTIAGO, A. A. *O Zebu na Índia, no Brasil e no mundo*. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986, 744p.
- SANTOS, R. *Nelore: a vitória brasileira*. Uberaba: Editora Agropecuária Tropical, 1995. 391p.
- SANTOS, R. *O Zebu*. Uberaba: Agropecuária Tropical, 1998. 856p. (Edição comemorativa dos 60 anos de registro genealógico).
- SANTOS, R. L.; BARRETO FILHO, J. B.; MARQUES JÚNIOR, A. P. et al. *Erythrophagocytosis in the caprine trophoblast*. Theriogenology, v.46, p.1077-1083, 1996a.
- SANTOS, R. L.; MARQUES JÚNIOR, A. P.; BARRETO FILHO, J. B. *Proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo de vacas leiteiras com liberação normal e com retenção de placenta*. Arquivo

- Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.48, n.3, p.317-324, 1996b.
- SHARPE, K. L.; EILER, H.; CULLEN, W. C., et al. *Morphometric analysis of collagen in gestational and retained bovine placentomes*. Theriogenology, v.32, p.485-491, 1989.
- SHARPE, K. L.; EILER, H.; HOPKINS, F. M. *Changes in the proportion of type I and type III collagen in the developing and retained bovine placentome*. Biology of Reproduction, v.43, p.229-235, 1990.
- 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.
- SMITH, M. F.; McINTUSH, E. W.; SMITH, G. W. *Mechanisms associated with corpus luteum development*. Journal of Animal Science, v. 72, p. 1857-1872, 1994.
- TOM, J. W.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P. *Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea*. Theriogenology, v. 49, n. 7, p. 1345-1352, 1998.
- VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SA, W. F.; CAMARGO, L. S. A. *Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.51, n.3, p.251-256, 1999.
- WAGNER, W. C. *Endocrine physiology of the parturient cow and placental retention*. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Supl., n.1, p.61-74, 1989.
- 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.
- 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.; WATHES, D. C. *Binucleate cell migration in the bovine placentome*. Journal of Reproduction and Fertility, Cambridge, v. 59, p. 425-430, 1980.
- WOODING, F. B. P. *The role of the binucleate cell in ruminant placental structure*. Journal of Reproduction and Fertility, Cambridge, v.31, p.31-9, 1982.
- 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. *Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production*. Placenta, London, v. 13, p. 101-13, 1992.
- WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. *Placentation*. In: LAMMING, G. E. (ed.) *Marshall's Physiology of Reproduction*, 4 ed. London: Chapman e Hall, p. 233-460, 1994.

7. ANEXOS

Anexo I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 119/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo de vacas da raça Nelore ao longo da gestação**", que tem como responsável(is) **Antonio de Pinho Marques Junior**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/ 09/2008**.

Este certificado expira-se em **10/ 09/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 119/2008**, related to the project entitled "**Volumetric proportion of structural components of nelore cows placenta throughout gestation**", under the supervisors of **Antonio de Pinho Marques Junior**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 10, 2008**.

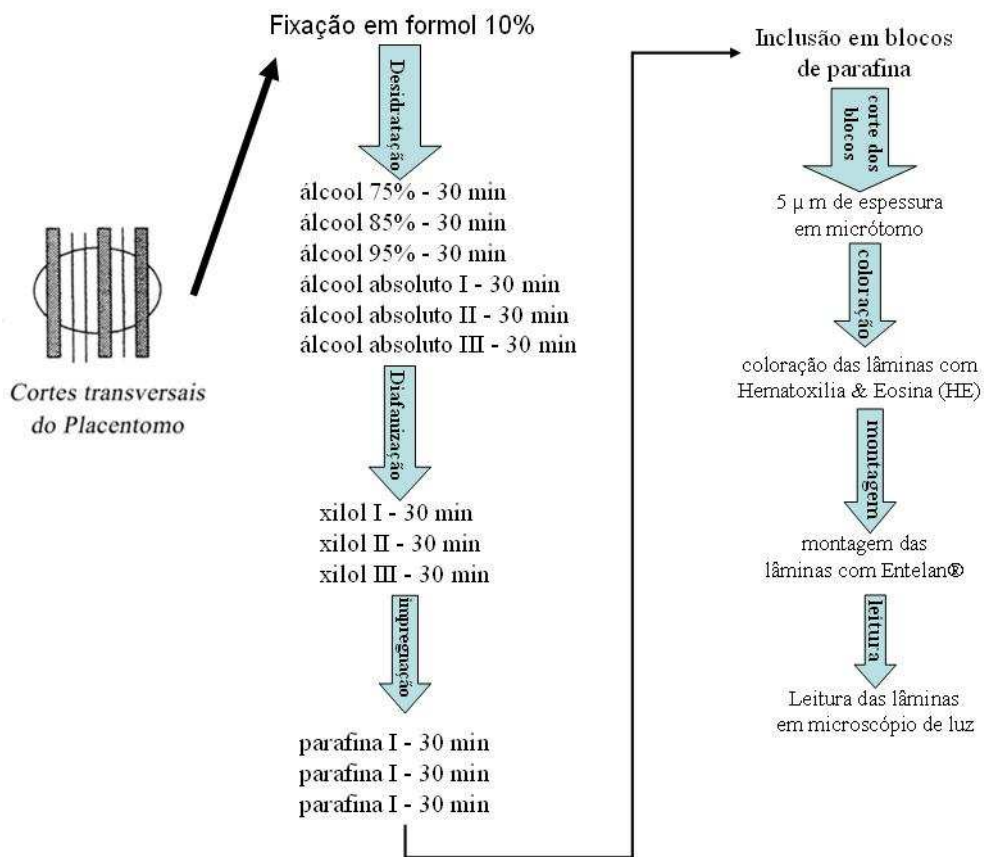
This certificate expires in **September 10, 2013**.

Belo Horizonte, 15 de Setembro de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Processamento histológico do placentomo



Técnica de rotina do setor de Citologia, Histologia e Embriologia (UFU).

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

Anexo III

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

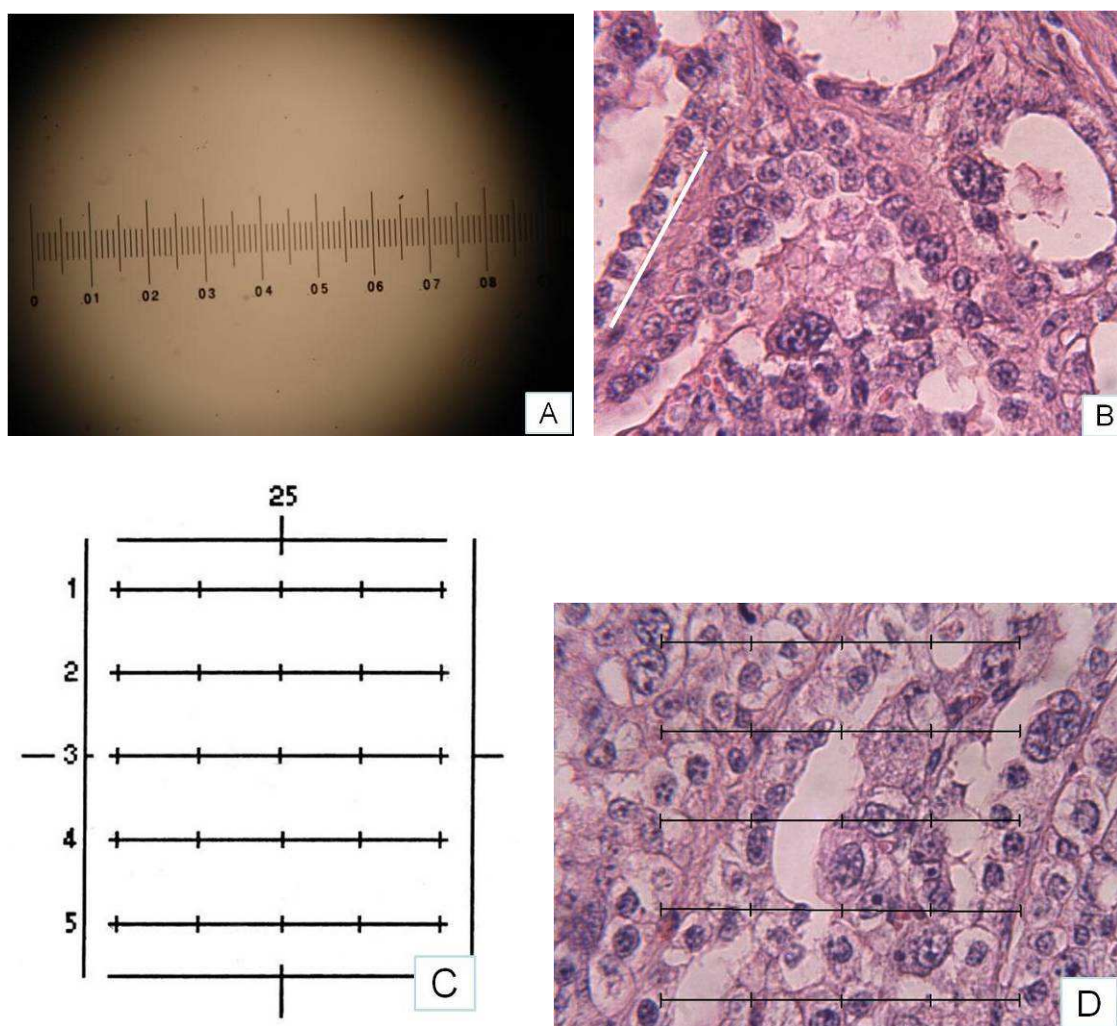


Figura 5 – Fotomicrografias: A) Esquema do micrômetro utilizado para a quantificação das células epiteliais da carúncula; 400x. B) Placentomo bovino no terço médio da gestação. A linha branca posicionada paralelamente ao epitélio da cripta caruncular indica o posicionamento do micrômetro para a quantificação de suas células. H&E; 400x. C) Representação esquemática da ocular integradora. D) Esquema utilizando a ocular integradora para a avaliação das proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo bovino, vaca no terço inicial de gestação; 400x.

Anexo IV

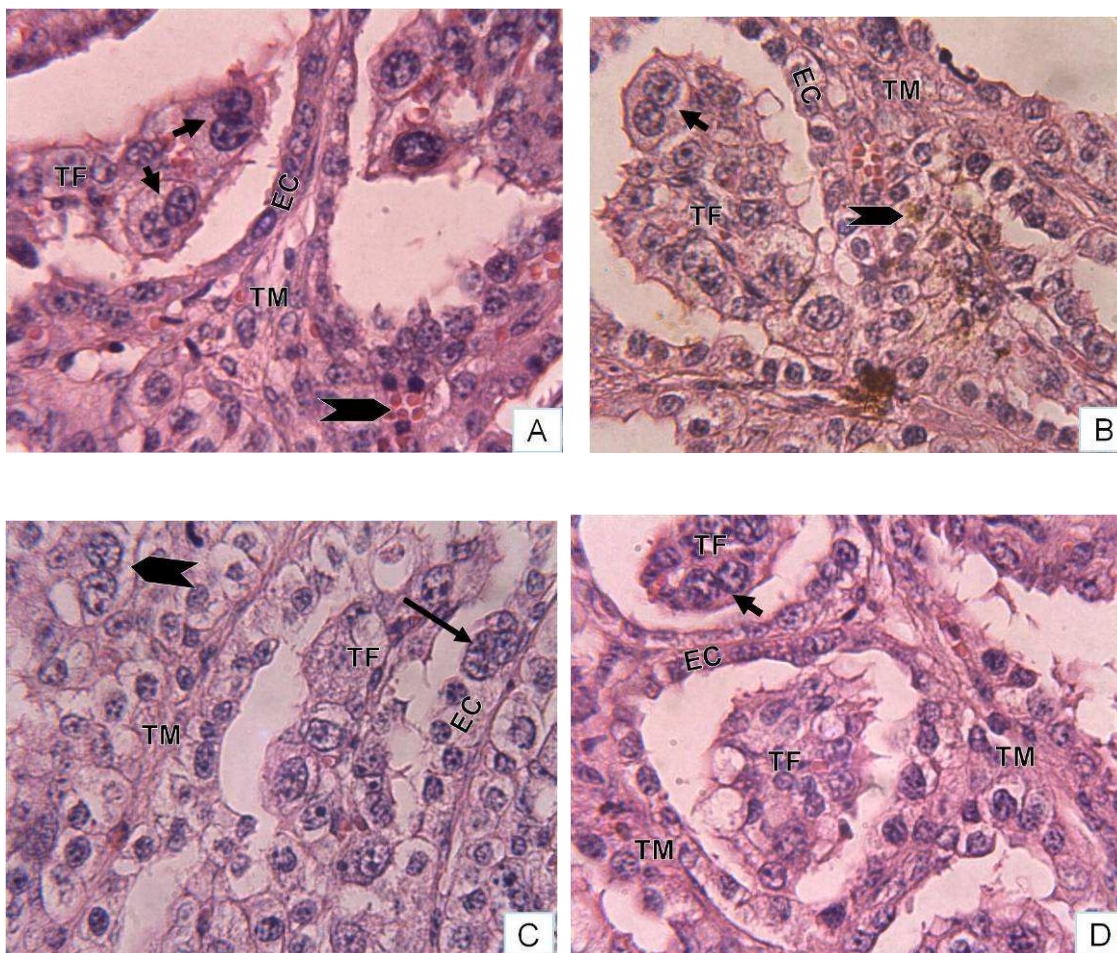


Figura 6 – Fotomicrografias de placentomas de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) ao longo da gestação: A) Placentomo no terço médio da gestação mostrando o tecido materno (TM), tecido fetal (TF) e as células do epitélio caruncular (EC). Presença de células binucleadas do trofoblasto (setas) e vaso no tecido materno (seta grossa). H&E; 400x. B) Placentomo no terço médio da gestação mostrando o tecido materno (TM), tecido fetal (TF) e as células do epitélio caruncular (EC). Presença de célula binucleada do trofoblasto (seta) e presença de pigmento sugestivo de hemossiderina (seta grossa). H&E; 400x. C) Placentomo no terço inicial da gestação mostrando o tecido materno (TM), tecido fetal (TF) e as células do epitélio caruncular (EC) com a presença de uma célula multinucleada gigante (seta). Presença de célula binucleada do trofoblasto (seta grossa). H&E; 400x. D) Placentomo no terço médio da gestação mostrando os tecidos maternos (TM), tecido fetal (TF) e as células do epitélio caruncular (EC). Presença de célula binucleada do trofoblasto (seta). H&E; 400x