



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Programa de Pós-Graduação

MORFOMETRIA DO PLACENTOMO DA VACA MISTIÇA
HOLANDÊS-ZEBU SEGUNDO A ORDEM DE PARTO

Clara de Almeida Mota

Belo Horizonte
Escola de Veterinária ó UFMG
2013



Clara de Almeida Mota

MORFOMETRIA DO PLACENTOMO DA VACA MISTIÇA HOLANDÊS-ZEBU
SEGUNDO A ORDEM DE PARTO

Dissertação apresentada na 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 ó UFMG
2013

M917m Mota, Clara de Almeida, 1984-
Morfometria do placentomo da vaca mestiça Holandês-Zebu segundo a
ordem de parto / Clara de Almeida Mota. ó 2014.

47p. : il.

Orientador: Antônio de Pinho Marques Júnior
Dissertação (mestrado) ó Universidade Federal de Minas Gerais, Escola
de Veterinária.

Inclui bibliografia

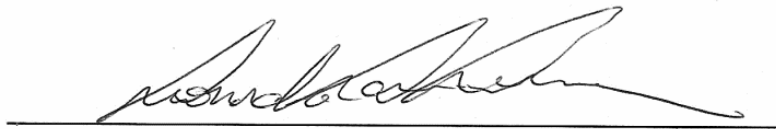
1. Vaca ó Reprodução ó Teses. 2. Placenta ó Morfologia ó Teses. 3.
Placenta ó Exame ó Teses. I. Marques Júnior, Antônio de Pinho. II.
Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD ó 636.208 26

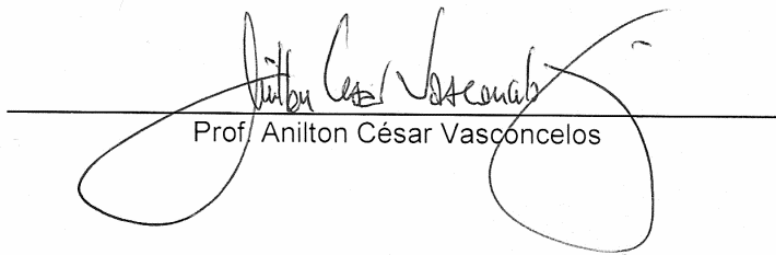
Dissertação defendida e aprovada em 25 de abril de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Antônio de Pinho Marques Junior
Presidente



Prof. Leonardo Lara e Lanna



Prof. Anilton César Vasconcelos



Prof. Elias Jorge Facury Filho



À minha mãe Olga, ao meu pai Carlos e a minha irmã Helga,
com AMOR, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar ao meu lado iluminando e guiando o meu caminho. Obrigada por colocar tantas oportunidades na minha vida.

À minha família, por sempre acreditar na minha competência. Pai, Mãe, Helga, Sérgio e Daniel, esta é mais uma vitória nossa! Amo vocês!

Ao professor Antônio de Pinho Marques Júnior, MEU MESTRE! Obrigada pela orientação rica em amadurecimento acadêmico e pessoal.

À toda equipe do laboratório do professor Luiz Renato França ó ICB/UFMG, em especial à Mara pelo norte sempre preciso.

À Fazenda Queima Ferro (FQF) ó Pitangui/MG e sua equipe por abrir as portas. Lá aprendi mais sobre a medicina veterinária que ensinam as universidades. Mais do que uma experiência acadêmica, uma experiência de vida!

Aos amigos da FQF, Rafael e Timburé, por serem a continuidade dos meus braços durante todo experimento. Amigos sinceros que levarei para a vida toda!

À querida Solange, proprietária da pousada Dr. Dito ó Pitangui/MG, pela acolhida sempre carinhosa.

À Patrícia Ramos Xavier, um anjo do céu, por sempre me apoiar, pelos conselhos maduros, pelo carinho e pela disponibilidade de um colinho amigo! Muito obrigada!

À minha amiga Carolina Andrade Resende. Sem você a caminhada teria sido muito mais difícil!

Ao Rafael Leão, por transformar coisas impossíveis em realidade, sem a sua ajuda eu não estaria concluindo esta caminhada. Obrigada de coração!

Aos queridos amigos da pós-graduação, pela amizade que tornou a caminhada mais feliz! Em especial Winnie, Pedro e Telma.

Ao meu namorado Daniel Ferraz Calonge, por sempre me tirar da zona de conforto e principalmente pelo Amor!

À CAPES e principalmente ao povo brasileiro pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq, pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa, via Grant do orientador.

A todos que de formas diretas ou indiretas contribuíram para a elaboração deste trabalho. Obrigada!



PDF
Complete

*Thank you for evaluating
PDF Complete.*

[Click Here to purchase
full featured PDF Complete products](#)

õPensamentos conduzem a sentimentos.
Sentimentos conduzem a ações.
Ações conduzem a resultados.ö
(T. Harv Eker, em Os segredos da mente milionária)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 10 |
| ABSTRACT | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 <i>Implantação e placentação</i> | 13 |
| 2.2 <i>Morfologia da placenta bovina</i> | 14 |
| 2.3 <i>O placentomo</i> | 14 |
| 2.4 <i>Atividade endócrina e metabólica da placenta bovina</i> | 15 |
| 2.5 <i>Maturação e expulsão placentária</i> | 16 |
| 2.6 <i>Retenção de placenta</i> | 17 |
| 2.6.1 <i>Etiopatogenia da retenção de placenta</i> | 18 |
| 2.7 <i>Importância clínica e prejuízos da retenção de placenta</i> | 20 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 3.1 <i>Local e animais</i> | 22 |
| 3.2 <i>Manejo reprodutivo</i> | 22 |
| 3.3 <i>Manejo maternidade</i> | 22 |
| 3.4 <i>Coleta do material</i> | 22 |
| 3.5 <i>Histologia do placentomo</i> | 23 |
| 3.5.1 <i>Células epiteliais carunculares</i> | 23 |
| 3.5.2 <i>Células binucleadas do trofoblasto</i> | 23 |
| 3.5.3 <i>Proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo</i> | 24 |
| 3.5.4 <i>Análise morfométrica do colágeno materno e fetal do placentomo</i> | 24 |
| 3.6 <i>Avaliação estatística</i> | 24 |
| 4 RESULTADOS | 28 |
| 4.1 <i>Células epiteliais carunculares</i> | 28 |
| 4.2 <i>Células binucleadas do trofoblasto</i> | 28 |
| 4.3 <i>Proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo</i> | 28 |
| 4.4 <i>Análise morfométrica do colágeno</i> | 29 |
| 4.5 <i>Correlações de Pearson</i> | 29 |
| 5 DISCUSSÃO | 30 |
| 5.1 <i>Células epiteliais carunculares</i> | 30 |
| 5.2 <i>Células binucleadas do trofoblasto</i> | 31 |
| 5.3 <i>Proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo</i> | 31 |
| 5.4 <i>Análise morfométrica do colágeno</i> | 32 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 32 |
| 7 CONCLUSÕES | 33 |
| 8 REFERÊNCIAS | 33 |
| 9 ANEXOS | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Porcentagens de retenção de placenta em diferentes tempos de liberação | 20 |
| Tabela 2 - Incidência de retenção de placenta, segundo a ordem de parto, na fazenda onde o experimento foi realizado | 20 |
| Tabela 3 - Número médio por campo das células epiteliais carunculares do placentomo de vacas mestiças Holandês-Zebu de primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro ou mais partos (G3)..... | 28 |
| Tabela 4 - Número médio de células binucleadas por campo microscópico do placentomo de vacas mestiças Holandês-Zebu de primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro ou mais partos (G3)..... | 28 |
| Tabela 5 - Porcentagem das proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo de vacas mestiças Holandês-Zebu de primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro ou mais partos (G3)..... | 28 |
| Tabela 6 - Proporções volumétricas do colágeno materno e fetal do placentomo de vacas mestiças Holandês-Zebu de primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro ou mais partos (G3)..... | 29 |
| Tabela 7 - Correlações de Pearson entre as médias dos componentes estruturais do placentomo de vacas mestiças Holandês-Zebu..... | 30 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Sequencia de fotos dos procedimentos da coleta do placentomo da vaca. 1) Antissepsia da região perineal. 2) Ovariótomo. 3) Colheita do placentomo do corpo uterino. 4) Placentomo da vaca coletado. 5) Placentomo colocado íntegro em recipiente contendo fixador. 6) Identificação da amostra.25
- Figura 2 -** Ocular micrométrica de 100 divisões.....25
- Figura 3 -** Placentomo Bovino imediatamente após expulsão do feto ó Liberação normal da Placenta. A linha posicionada paralelamente ao epitélio da cripta caruncular indica o posicionamento do micrômetro para quantificação das células epiteliais das criptas carunculares. Hematoxilina-eosina. 200x. Tecido Conjuntivo Materno (TCM); Tecido Conjuntivo Fetal (TCF); Células Binucleadas (CB); Vasos Maternos (VM); Vasos Fetais(VF)26
- Figura 4 -** Placentomo Bovino imediatamente após expulsão do feto ó Liberação normal da Placenta. Hematoxilina-eosina. 100x. Vasos Maternos (VM); Vasos Fetais (VF); Epitélio Fetal (EF); Epitélio Materno (EM).26
- Figura 5 -** Ocular integradora. Pontos da ocular integradora que são sobrepostos ao corte histológico para determinação da proporção volumétrica dos componentes estruturais.27
- Figura 6 -** Placentomo Bovino imediatamente após expulsão do feto ó Liberação normal da Placenta. Ocular integradora. Tricômio de Masson. 100x. Tecido Conjuntivo Materno (TCM); Tecido Conjuntivo Fetal (TCF); Células Binucleadas (CB); Vasos Maternos (VM); Vasos Fetais (VF); Artefato de Técnica (AT). Em azul Colágeno Materno e Colágeno Fetal.....28

RESUMO

Este trabalho foi realizado a fim de avaliar as características morfológicas do placentomo da vaca mestiça Holandês-Zebu com diferentes ordens de parto. Para tal, foram utilizadas 15 fêmeas gestantes, sem retenção de placenta e classificadas em três grupos de acordo com a ordem de parto, sendo o G1 formado por vacas primeira ordem de parto, o G2 por vacas de segunda e o G3 por vacas de terceira ou mais ordens de parto. Foram quantificados nos diferentes grupos: número de células epiteliais carunculares, população de células binucleadas do trofoblasto, a proporção volumétrica das células trofoblásticas binucleadas e outros componentes estruturais do placentomo. A proporção volumétrica dos componentes estruturais estudados não diferiu estatisticamente entre os três grupos, exceto nos casos do tecido conjuntivo materno (CM) e epitélio fetal (EF). As proporções volumétricas do tecido CM foram no G1 $31,36 \pm 6,97$, G2 $19,82 \pm 4,06$ e no G3 $19,38 \pm 0,88$ e observou-se diferença estatística significativa do G1 quando comparados aos grupos 2 e 3 ($P < 0,05$). Na proporção volumétrica do tecido EF, as médias do G1, G2 e G3 foram $12,52 \pm 2,57$, $18,46 \pm 3,11$ e $22,04 \pm 4,62$, respectivamente. Para esta análise houve diferença estatística entre o G1 e G3 ($P < 0,05$), entretanto o G2 não diferiu estatisticamente do G1 e G2 ($P > 0,05$). Os resultados obtidos indicam que há diminuição no número do CM do placentomo de novilhas, quando comparadas a vacas de 2° ou mais partos. Entretanto, ocorreu diminuição do EF do placentomo de novilhas, quando comparadas a vacas de 3° ou mais partos. Foram também observadas correlações negativas, fortes e muito significativas entre o CM, do placentomo de vacas, e o EF e seus vasos. Porém, mudanças na quantidade do CM estão ligadas a outros componentes do tecido conjuntivo que não o colágeno, pois este teve correlação positiva e moderada com o epitélio fetal.

Palavras-chave: placentomo, morfometria, bovino, vaca mestiça, ordem de parto.

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the morphological characteristics of mestiças cow's placentomes with different birth orders. To this end, 15 pregnant Holstein cows, without retained placenta, were used and classified into three groups according to birth order. In the different groups were quantified: number of caruncular epithelial cells, trophoblast binucleated cells population, volumetric proportion of trophoblast binucleated cells and other structural components of the placentome. The volumetric proportion of structural components studied did not differ significantly among the three groups, except in the cases of maternal connective tissue (CM) and fetal epithelium (EF). The volumetric proportion of the CM tissue were in G1 31.36 ± 6.97 , G2 19.82 ± 4.06 and in G3 19.38 ± 0.88 . A statistically significant difference was observed when comparing G1 with groups 2 and 3 ($P < 0.05$). In volumetric proportion of EF, the mean values of G1, G2 and G3 were 12.52 ± 2.57 , 18.46 ± 3.11 and 22.04 ± 4.62 , respectively. In this analysis there was a statistical difference between the G1 and G3 ($P < 0.05$), however the G2 did not differ statistically from G1 and G2 ($P > 0.05$). The results indicate that there is a decrease in the number of placentome CM in heifers compared to cows of 2° or more births. In the meantime, there was a increase of placentome EF in heifers compared to cows of 3° or more births. Negative, strong and very significant correlations were also observed between the placentome CM in cows, and the EF and their vessels. However, changes in the amount of CM are related to other connective tissue components than collagen, since it showed moderate positive correlations with fetal epithelium.

Key-words: Placentome, Morphometric, Bovine, Birth Order

1. Introdução

A disponibilidade de leite e produtos lácteos para qualquer população é fundamental para o seu bem estar nutricional. Neste contexto, o Brasil ocupa a quinta posição como maior produtor de leite de vaca do mundo. A cadeia agroindustrial do leite, sob a ótica social e econômica, tem um papel relevante no suprimento de alimentos, geração de empregos e de renda para a população brasileira. Em 2010, o Brasil produziu 32 bilhões de litros de leite com um rebanho de 22.925.000 vacas. Com o passar dos anos vem impulsionado o PIB brasileiro, apresentando desempenhos inferiores quando comparados ao PIB da agropecuária. Contudo, a pecuária leiteira nacional ainda é caracterizada pela baixa produtividade dos rebanhos, média de 3,7 litros/vaca/dia, visto que o aumento da produção de leite dos últimos anos deve-se ao aumento do número de animais e não da produtividade (Zoccal, 2010a ; Embrapa, 2012).

A baixa produtividade dos rebanhos leiteiros no Brasil, decorrente do mau desempenho reprodutivo e da qualidade genética inferior de grande parte dos animais explorados como leiteiros são fatores determinantes da baixa produtividade, pois influenciam negativamente a produção de litros/hectare/ano, litros/vaca/ano e litros por dia de intervalo de partos (PDIP). O PDIP atualmente é considerado o índice reprodutivo mais adequado para medir a eficiência da atividade leiteira, pois leva em consideração tanto a produção de leite por lactação quanto o intervalo de partos (IP) (Ferreira, 2012).

A precocidade ao primeiro parto, o rápido restabelecimento do aparelho reprodutivo no período puerperal e o retorno do animal a atividade reprodutiva normal possibilitam aumento da eficiência reprodutiva e maiores retornos financeiros (Martins, 1999; Ferreira, 2012). A literatura considera ideal que o IP seja de 12 meses, para assim

garantir o aumento da produção de leite e também maior número de bezerros nascidos por ano (Ferreira, 2012).

O período de serviço (PS), um dos parâmetros mais importantes para medir a eficiência reprodutiva de um rebanho, compreende o intervalo do parto ao primeiro estro fértil em que a fêmea torna-se gestante e influencia diretamente o IP. É desejado que o PS seja de até três meses porém a média nacional é de aproximadamente nove meses (Ferreira, 2012). A redução do período de serviço para três meses pode proporcionar, a um mesmo animal, um ganho de 50% na produção de leite, além de um maior número de crias durante sua vida reprodutiva (Ferreira, 1991; Santos, 1995).

Vários fatores interferem na duração do período de serviço, entre eles: anestro pós-parto, identificação do estro, patologias puerperais, nutrição, ordem de parto, fatores ambientais e genéticos (Horta, 1984; Grunert, 1986; Ferreira, 2010).

As patologias puerperais representam um entrave para a redução do período de serviço. A retenção de placenta, patologia muito frequente no pós-parto, diminui a eficiência reprodutiva do rebanho e, conseqüentemente, a lucratividade da atividade. A incidência de retenção de placenta, em rebanhos leiteiros, encontra-se em torno de 3 a 12%, com uma média de 8% (Martins, 1999; Ferreira, 2010; Ferreira, 2012).

Vários fatores de risco estão relacionados com o aumento da retenção de placenta, como estresse de qualquer natureza, fatores imunológicos, distocias, gestações gemelares, natimortos, ordem de parto, nutrição inadequada no pré-parto, gestações de curta duração, abortos, confinamento e estações mais quentes do ano (Horta, 1994; Laven e Peters, 1996; Martins, 2010).

Problemas decorrentes da retenção de placenta na bovinocultura de leite, que afetam os índices reprodutivos do rebanho, são de grande importância econômica para a agropecuária nacional. A busca por novos conhecimentos, que possibilitem melhor descrição dos componentes estruturais do placentomo da vaca mestiça, é necessária para novas estratégias de prevenção e terapêutica da retenção de placenta (Bretzlaff, 1987; Horta, 1994; Williams *et al.*, 2007; Moura, 2008), razão pela qual este trabalho foi proposto num contexto de realidade brasileira.

2. Revisão de Literatura

2.1 Implantação e placentação

Nos mamíferos o intervalo de tempo decorrido entre a fecundação e o parto é chamado de gestação, que na vaca tem duração média de 280 dias (Hafez, 2004). Durante a gestação o conceito passa por diferentes fases de desenvolvimento intrauterino que podem ser divididas em três períodos distintos descritos por González (2002) e Toniollo e Vicente (2003). O primeiro, que resulta da união dos gametas e formação do zigoto, ou ovo, que dura até a primeira clivagem; o segundo, período embrionário, caracterizado pela organogênese, desenvolvimento das membranas fetais e implantação uterina, com a duração de aproximadamente 45 dias, e o terceiro, período fetal, que dura até o parto.

O início da gestação é marcado por mecanismos que prolongam o período funcional do corpo lúteo (CL) e por uma complexa interação entre o embrião e o ambiente uterino, capaz de manter o CL e, conseqüentemente, a produção de progesterona. A progesterona, hormônio responsável pela secreção de histotrofos, possibilitará o desenvolvimento de um ambiente uterino favorável à manutenção da

gestação até que ocorra a implantação embrionária e placentação (Hafez, 2004; Ferreira, 2010).

Outro evento determinante na manutenção gestacional é o reconhecimento materno da gestação, que nos ruminantes ocorre ao redor do 15º dia quando o embrião, em fase de blastocisto, produz substâncias proteicas e esteroides com ação luteotrófica e antiluteolítica. Dentre estas substâncias destaca-se o interferon-tau (INF-), uma proteína sintetizada pelas células trofoblásticas fundamental no reconhecimento materno da gestação e posteriormente prepara o ambiente uterino para responder aos estímulos de esteroides ovarianos, que possibilitam a implantação do embrião no endométrio (Hafez, 2004; Thatcher *et al.*, 2005).

Com o estabelecimento da gestação ocorrem alterações hormonais que provocam mudanças morfológicas na superfície do endométrio, que, nos ruminantes apresenta áreas glandulares e áreas especializadas não glandulares, denominadas carúnculas. As carúnculas, com o estabelecimento da gestação, aumentam de tamanho e formam projeções que atingem até 10cm de diâmetro que interagem com o trofoblasto para as trocas materno-fetais (Marques Júnior, 1993; González, 2002).

Após o rompimento da zona pelúcida (ZP) entre o 17º e 20º dia de gestação inicia-se o processo de morfogênese placentária ou implantação, onde as membranas embrionárias do trofoblasto e o endométrio, por mecanismos bioquímicos e fisiológicos, interagem de forma coordenada para assegurar o suprimento adequado de oxigênio e nutrientes ao conceito, atendendo à demanda do seu rápido desenvolvimento (Dantzer e Bjorkman, 1993). Neste período, vilosidades do córion, denominadas cotilédones, interagem com as criptas carunculares formando a unidade

materno-fetal denominada placentomo. Este contato entre carúnculas e cotilédones possibilita a migração de células binucleadas do córion para as carúnculas formando um sincício. No 22º dia o trofoblasto ocupa igualmente o interior dos cornos uterinos e no 27º dia inicia a interdigitação dos microvilos que culmina com a formação completa da placenta por volta do 3º mês de gestação (Amoroso, 1952; Steven, 1975; Santos, 1995).

2.2 Morfometria da placenta bovina

A placenta, anexo embrionário existente apenas na subclasse Eutheria, é um órgão transitório pelo qual ocorrem as trocas metabólicas entre a mãe e o feto. É formada quando o tecido fetal composto pelas estruturas avasculares córion e âmnio e pelo alantoide (vascular), entram em contato com o endométrio. Esta composição é definitiva até o final da gestação e suas funções principais são de nutrição, proteção, respiração, endócrina e imunológica. Estruturalmente existe grande diversidade entre as placentas dos mamíferos e, na vaca a placenta é classificada como cotiledonária, adeciuada e epiteliocorial (Bjorkman, 1982; Santos, 1995).

A placenta cotiledonária, assim classificada pela presença dos cotilédones, caracteriza-se pela interação das áreas cotiledonárias com as áreas carunculares do endométrio, que juntas formam a unidade de troca materno-fetal, o placentomo. As demais áreas do córion são compostas por tecido coriônico liso, nos quais não há evidência de troca materno-fetal (Mc Laren, 1988; Marques Júnior *et al.*, 1993).

A intensidade da interação entre o endométrio e as membranas fetais determina a quantidade de tecido materno perdido por ocasião do parto. Uma vez que a perda de tecido uterino é mínima no momento do parto, em relação a este aspecto, a placenta

da vaca é considerada adeciuada (Bjorkman, 1982).

Histologicamente, o número de camadas dos componentes teciduais maternos que separam o sangue materno do sangue fetal é também utilizado para classificação placentária e varia entre as espécies. Na vaca, as camadas epitélio caruncular, tecido conjuntivo e endotélio permanecem intactas e, em combinação com as camadas endotélio, tecido conjuntivo e córion, constituem a placenta classificada como epiteliocorial. Por esse motivo, nos animais com este tipo de placenta, ocorre o bloqueio total da passagem transplacentária das moléculas de imunoglobulinas da mãe para o feto. Assim, os recém-nascidos dessas espécies são completamente dependentes dos anticorpos recebidos através do colostro (Tizard, 2002; Ferreira, 2010).

Wooding (1992) e Bazer *et al.* (2002) propõem que a denominação mais correta e específica da placenta bovina seria sinepiteliocorial, pois mesmo com a presença das três camadas de tecido materno há migração de células do córion que se fundem ao tecido materno para formar um conjunto de células binucleadas ou multinucleadas.

2.3 O placentomo

No processo da placentação as regiões carunculares (maternas) induzem a formação de vilosidades no tecido coriônico (fetal), os cotilédones, que interdigitam de forma a revestir as criptas carunculares para formar o placentomo, que na vaca tem característica convexa (Hradecky *et al.*, 1988).

Histologicamente, o epitélio da cripta caruncular é cúbico ou achatado e suas células possuem núcleos esféricos com nucléolos evidentes (Bjorkman, 1982). Além destas células cuboides, há também a

presença de células gigantes multinucleadas (Derivaux *et al.*, 1988).

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 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).

Na vaca, 70 a 120 placentomos desenvolvem-se e aumentam de tamanho durante a gestação (Marques Júnior *et al.*, 1993). 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 proximais e distais do útero (Hradecky *et al.*, 1988).

As células binucleadas (CBs) surgem pela divisão dos núcleos das células uninucleadas do trofoblasto. A manutenção do número estável dessas células dá-se através de constante transformação de células uninucleadas em células binucleadas, porém as mesmas são incapazes de se proliferar (Derivaux *et al.*, 1988). Elas correspondem de 15 a 20% das células do trofoblasto da placenta de ruminantes, com aproximadamente um quinto delas em migração através da interface materno-fetal, e são encontradas desde a implantação até o parto (Wooding, 1983). As CBs fundem-se 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 e Beckers, 1987). Com a proximidade do parto o número de CBs no cotilédone passa de 20 para 5% em partos normais, enquanto nos casos de retenção de placenta observa-se que esta taxa não diminui, em decorrência de sua não eliminação pelo sistema imune da vaca (Williams *et al.*, 1987).

O colágeno também é um componente estrutural importante da placenta e está presente tanto na parte fetal quanto na materna do placentomo, mantendo-as unidas em toda a extensão dos placentomos. Estudos morfométricos demonstraram que ao longo da gestação o colágeno presente no colitédone tende a aumentar enquanto o colágeno caruncular tende a diminuir proporcionalmente, sendo esta diminuição um fator importante na separação placentária (Sharpe *et al.*, 1989).

2.4 Atividade endócrina e metabólica da placenta bovina

A atividade endócrina 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, que favorecem o seu desenvolvimento (Bjorkman, 1982). Sua atividade endócrina 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).

Os dois tipos celulares presentes no tecido epitelial fetal, as células principais e CBs, desempenham papel fundamental na síntese dessas substâncias. As células principais sintetizam pequena quantidade de progesterona a partir do 80º dia de gestação (Izhar *et al.*, 1992). Mesmo assim, é a progesterona produzida pelo CL da vaca que

mantém a gestação até o parto (Hafez, 2004). O perfil de produção de esteroides pela placenta modifica-se ao longo da gestação. Três semanas antes do parto a razão estrógeno/progesterona circulante é alterada, o estrógeno produzido pelos tecidos fetais da placenta começa a elevar-se acompanhado de diminuição significativa na concentração de progesterona (Hoffmann, 1983; Marques Júnior, 1988). Além da capacidade de produção de hormônios esteroides as células uninucleadas também produzem prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (Frizzo, 2002).

As células binucleadas também têm função secretória e iniciam sua atividade secretória ainda na fase embrionária. Inicialmente, por serem capazes de mudar a rota de produção de prostaglandina, de prostaglandina F₂ (PGF₂) para prostaglandina E (PGE), atuam sinergicamente com o interferon- γ como agente antiluteolítico (Gross & Williams, 1986). Além disso, são a única fonte de lactogênio placentário, estrógeno, progesterona e prostanoides, como prostaciclina e prostaglandinas, que são liberados nos capilares maternos (Reimers *et al.*, 1985; Gross e Williams, 1988; Landim Júnior, 2006).

O lactogênio placentário bovino (bPL) ou somatotropina coriônica, principal hormônio produzido pelas CBs, auxilia a regulação do crescimento e maturação fetal, estimula o desenvolvimento da glândula mamária e do tecido ósseo fetal. Apesar das diferenças estruturais ele apresenta ação semelhante à dos hormônios hipofisários, como a prolactina e o hormônio do crescimento. Sua principal atuação é na priorização da utilização de lipídeos como fonte de glicose para o feto e suas concentrações são mensuráveis a partir dos seis meses de gestação, tanto na circulação materna quanto na fetal. Com o avanço da gestação e a intensificação da migração das CBs do tecido fetal para o tecido materno, a concentração do bPL na circulação fetal

diminui e conseqüentemente aumenta na circulação materna (Byatt *et al.*, 1992; Martins, 1999; Schalafer *et al.*, 2000). A concentração plasmática do bPL no feto é maior entre a 8^a e a 12^a semana de gestação (20 a 30ng/ml), diminuindo progressivamente até atingir concentrações em torno de 5ng/ml imediatamente antes do parto. Já no plasma 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 2ng/ml no momento do parto (Derivaux *et al.*, 1988). Wooding (1987) e Wooding e Beckers (1987), empregando técnicas de imunocitoquímica e microscopia eletrônica, mostraram que o bPL foi encontrado somente em grânulos no aparelho de Golgi das células binucleadas do trofoblasto, sugerindo que a exocitose desses grânulos seja a via normal de secreção do bPL na circulação materna e fetal. 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). Além da secreção do bPL as células binucleadas atuam como moduladoras da síntese de prostaglandinas pelas células uninucleadas. As células carunculares maternas realizam o catabolismo da PGF₂, sendo essa atividade catabólica mais intensa no bovino que em outras espécies (Erwich *et al.*, 1989).

2.5 Maturação e expulsão placentária

Durante a gestação mudanças estruturais ocorrem na placenta e estão relacionadas à sua expulsão após o parto. Com a proximidade do parto inicia-se o achatamento do epitélio caruncular, o qual se intensifica entre três a cinco dias antes do parto, acompanhado de diminuição das células binucleadas e das células epiteliais das carúnculas (Marques Júnior, 1988;

Santos, 1996). Aparentemente o feto participa na manutenção do número de células binucleadas e as alterações hormonais que ocorrem antes do parto parecem favorecer essa diminuição. O decréscimo do número de células das criptas carunculares inicia-se a partir dos 270 dias de gestação (Barreto Filho, 1992). Ward *et al.* (2002) relacionaram o aumento na concentração do cortisol fetal antes do parto como o responsável pela migração das CBs do lado fetal para o materno. À medida as CBs migram na interface materno-fetal, estas sofrem degranulação e expressam em sua superfície o MHC-I, essas proteínas são essenciais na rejeição imunológica da placenta e conseqüentemente na sua posterior expulsão. Já Kimura *et al.* (2002) demonstraram que são os neutrófilos os prováveis agentes envolvidos na rejeição imune da placenta e que vacas com RP apresentam redução na função neutrofílica.

Além do epitélio placentário, o tecido conjuntivo do placentomo também sofre alterações. As carúnculas tornam-se cada vez mais colagenizadas até o parto. A parede dos vasos também sofre alterações tornando-se hialinizada acompanhando a proliferação dos tecidos conjuntivos que facilitam o seu processo fisiológico de obliteração. Algum tempo antes do parto, verifica-se que as vilosidades fetais se encontram já separadas das criptas uterinas, formando um espaço livre que irá favorecer a separação posterior (Sharpe *et al.*, 1990; Horta, 1994).

Além das alterações estruturais a separação normal da placenta envolve fatores mecânicos. As contrações uterinas e a compressão do feto ajudam na separação das carúnculas dos cotilédones. As contrações que ocorrem durante o primeiro estágio do trabalho de parto submetem os placentomos a períodos alternados de isquemia e hiperemia. Posteriormente há também uma compressão destes causada pela insinuação do feto no canal do parto. Com a ruptura do cordão umbilical no pós-parto e a

interrupção do fluxo sanguíneo fetal, o sangue fetal é drenado da placenta ocasionando isquemia das vilosidades coriônicas com conseqüente obliteração de seus capilares que facilitam sua expulsão. As contrações uterinas após a expulsão fetal, ao inverterem o saco placentário, completam o processo de destacamento e expulsão das membranas fetais (Roberts, 1971; Horta, 1994 e Santos, 1995).

2.6 Retenção de placenta

Fisiologicamente a placenta da vaca é expulsa em média até 12 horas após o parto. A retenção de placenta (RP) também conhecida como retenção de secundinas, retenção das párias ou das últimas, ocorre quando parte ou toda a placenta permanece no lúmen uterino por um período superior a 12 horas (Horta, 1995; Toniollo e Vicente, 2003). Kelton *et al.* (1998) e Han e Kim (2005) definem RP como a não expulsão dos anexos fetais 24 horas pós-parto, mas no mesmo estudo citam que em 95% das vezes as placentas são eliminadas dentro de 12 horas. Já Van Werwen *et al.* (1992) observando 1010 vacas no pós-parto verificaram que 66% delas expulsaram a placenta em até 6 horas, com 85% em até 24 horas.

A vaca, quando comparada a outras espécies, apresenta uma incidência maior de RP, sendo as raças taurinas mais acometidas do que as zebuínas (Grunert, 1980). Em rebanhos livres de doenças a incidência pode variar de 3 e 12%, com média de 8% (Horta, 1994). Contudo, situações particulares como partos distócicos, prematuros ou múltiplos, abortos e em rebanhos com brucelose, a incidência de RP aumenta significativamente, variando de 25 a 61% (Erb *et al.*, 1958; Muller e Owens, 1974; Carson *et al.*, 1978; Sinha *et al.*, 1978; Sandals *et al.*, 1979; Arthur, 1979). Em regiões onde a dieta é deficiente em selênio, a incidência de RP tem sido observada como

elevada, atingindo índices próximos de 50% (Julien *et al.*, 1976a, 1976b).

2.6.1 Etiopatogenia da retenção de placenta

A etiopatogenia da retenção de placenta é complexa e multifatorial. Segundo Laven e Peters (1996), Wiltbank (2006) e Ferreira (2010), os fatores comumente relacionados são: aspectos morfológicos do placentomo, nutricionais, imunológicos, hormonais, uterinos, hereditários, infecciosos, stresse, aborto, natimorto, parto gemelares, distocia, indução do parto, gestações curtas e causas mecânicas.

Aspectos morfológicos do placentomo são os mais afetados por alterações patológicas que induzem a falência do mecanismo de descolamento da placenta. Nos últimos 5 dias de gestação as mudanças do perfil hormonal desencadeiam as alterações morfológicas de maturação placentária e sua consequente eliminação. Alterações que impeçam esta maturação inibem o processo normal em que as células do epitélio caruncular e das células binucleadas diminuem progressivamente, além de diminuir o metabolismo do colágeno tipo III (Barreto Filho e Marques Júnior, 1993; Santos, 1995).

Em 1990, Sharpe *et al.*, verificaram que vacas com RP não são capazes de metabolizar o colágeno tipo III. Posteriormente, em 1993, Eiler e Hopkins injetaram 240.000 UI de collagenase de origem bacteriana nas artérias umbilicais de vacas com RP, consequente de partos eutócicos, entre as 24 e 72 horas pós-parto e conseguiram provocar a expulsão da placenta em 85% dos animais tratados comprovando os achados de Sharpe *et al.* (1990).

Em rebanhos no último terço de gestação a razão cálcio:fósforo aumenta de 1,1 para

1,53, a incidência de RP diminui de 35% para 8% (Carson *et al.*, 1978). Por outro lado, razão acima de 2,5, no mesmo período, gera um efeito desfavorável sobre a contração do miométrio no momento do parto elevando a incidência da retenção (Carson *et al.*, 1978, Maas, 1982). Contudo, isoladamente, os teores plasmáticos em cálcio, sódio, potássio, cloro e magnésio não apresentaram qualquer relação com a incidência da afecção (Boitor *et al.*, 1972).

O selênio e a vitamina E atuam sinergicamente combatendo os radicais livres e a formação de peróxidos, estimulando a quimiotaxia e o número de leucócitos na junção materno fetal, consequentemente contribuindo para a expulsão normal da placenta (Zanetti *et al.*, 1998). Em vacas com baixas concentrações sanguíneas de Selênio e vitamina E, LeBlanc *et al.* (2008) observaram significativo aumento da RP, observaram também que em regiões cujo solo é deficiente em Selênio podem ocorrer altas taxas de RP. Porém, os resultados da suplementação destes componentes no pré-parto ainda são conflitantes. Rosa *et al.* (1985) e Hidiroglou *et al.* (1987) citados por Santos (1995), aplicaram diferentes de selênio e vitamina E por diferentes vias de administração e não observaram diminuição da incidência da RP. Já Inaba *et al.* (1986) demonstraram que o tratamento no pré-parto com doses baixas de selênio (2,3 - 4,6 mg) reduziu de 10,3% para 3,0% a incidência de RP no rebanho estudado. Em uma análise realizada por Bourne *et al.* (2007) avaliando 44 estudos, comparou-se a incidência de RP em vacas tratadas com vitamina E constatando-se que a suplementação com vitamina E diminuiu a incidência de RP nos rebanhos, embora os benefícios da suplementação possam depender do tempo em que o rebanho tenha sido exposto a quantidades inadequadas de vitamina E antes da suplementação.

Rebanhos submetidos a fatores estressantes antes do parto, como lotação excessiva,

transporte, desconforto ambiental e outras formas de stress, têm maior probabilidade de apresentar RP. Peters e Bosu (1987) associaram positivamente concentrações de cortisol elevado cinco dias antes do parto com incidência alta de RP. Em estudo conduzido no Brasil, Wischral *et al.* (2001) observaram concentrações de cortisol antes do parto duas vezes maiores em vacas que apresentaram RP, sugerindo que este perfil hormonal pode estar ligado à incidência da doença. As altas concentrações de cortisol inibem a migração das CBs na interface materno-fetal e a resposta imune de forma significativa, conseqüentemente também inibem a rejeição da placenta pelo sistema imune materno. Este modelo pode explicar a elevada incidência de RP em vacas que têm partos induzidos pela aplicação exógena de dexametasona. Assim como o stress, a indução do parto com glicocorticoides causa elevação significativa de cortisol antes do parto e inibe a rejeição da placenta aumentando a frequência de retenção (Wiltbank, 2004).

O parto normal é caracterizado por baixa concentração de progesterona e concentrações mais elevadas de estrógeno, PGF₂, ocitocina, relaxina e cortisol. Fatores hormonais relacionados à menor razão nas proporções estrógeno/progesterona no final da gestação e a diminuição da síntese de prostaglandinas pelos placentomas são considerados capazes de provocar RP (LeBlanc, 2008). Wischral *et al.* (2001) concluem que a RP foi relacionada com deficiência de estrógeno e PGF₂. No mesmo trabalho verificaram a importância de uma razão maior PGF₂/PGE₂ para a expulsão normal da placenta e que o pico de estrógeno, ao parto, foi menor em vacas com RP. Estes achados também foram confirmados em estudos de Slama *et al.* (1993) e Gross *et al.* (1987). Suspeita-se que distúrbios na atividade da enzima PGE₂ 9 ó ceteredutase, que converte PGE₂ em PGF₂, podem também contribuir para a RP (Kankofer, 2002).

Alguns autores sugeriram que a falta de contratilidade uterina poderia ser a causa primária da retenção de placenta. Entretanto, trabalhos recentes indicam que a contratilidade uterina é, em 98% dos casos de retenção, suficiente para realizar a expulsão das membranas fetais (Horta, 1994; Frazer, 2005; LeBlanc, 2008). Estes mesmos autores citam que a menor contratilidade uterina pode estar associada ao esgotamento físico causado pelo parto, deficiência de cálcio, caquexia e inércia uterina.

Segundo Novaes *et al.* (1989), a herdabilidade para RP é muito baixa (0,05) e, por isso, a seleção desta característica é pouco praticada atualmente. Endocruzamentos aumentam a chance de haver RP, pois há similaridade genética entre a vaca e o bezerro. Esta semelhança faz com que o sistema imune materno não reconheça as células fetais como estranhas, não havendo a perda celular característica da expulsão da placenta (Joosten *et al.*, 1991). A diminuição da atividade quimiotática dos linfócitos T e B e fagocíticas dos leucócitos, nas duas semanas que antecedem o parto, são citados por alguns autores como indicadores de risco para RP (Chassagne *et al.* 1998; Kimura *et al.* 2002).

Os abortamentos infecciosos e traumatismos também são causas relevantes de RP, pois nestes casos há o encurtamento do período gestacional com conseqüente falta de amadurecimento dos placentomas (Ferreira, 2010). Se o abortamento ocorrer com menos de 120 dias de gestação, a liberação da placenta ocorre normalmente, de 121 a 150 dias a incidência de RP é de 15% e entre 240 a 265 dias a taxa de RP é maior que 50%. No caso das infecções genitais elas podem ser causadas por agentes inespecíficos como *E. coli*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Arcanobacterium pyogenes*, mas podem também ser causadas por agentes específicos como *Brucella sp.*, *Leptospira sp.*, IBR, BVD, *Campylobacter*,

Trichomonas, *Listeria* entre outros. (Ferreira, 2012).

Quanto a ordem de parto, a incidência da afecção varia de 3,5% em vacas primíparas a 24,4% ao 9º parto, com cerca de 72% dos casos de retenção se verificando em animais com 5-7 anos de idade (Erb *et al.*, 1958; Muller e Owens, 1974; Dyrendahl *et al.*, 1977). Van Werwen *et al.* (1992), analisando dados de 1010 partos eutócicos de 21 propriedades nos EUA, consideraram

diferentes intervalos de tempo para expulsão da placenta e observaram que a incidência de RP aumenta com a ordem de partos (Tab. 1). Nobre *et al.* (2012) avaliaram o banco de dados da mesma fazenda onde este experimento foi realizado, contendo informação de partos ocorridos de janeiro de 2008 a março de 2010 e verificaram também que a frequência da retenção de placenta aumenta à medida que se aumenta a ordem de parto (Tab. 2).

Tabela 1. Porcentagens de retenção de placenta em diferentes tempos de liberação.

| Tempo de liberação da placenta | Vacas de 1º partos | Vacas de 2º e 3º partos | Vacas com mais de 3 partos |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|----------------------------|
| > 6horas | 27,1% | 32,9% | 41,3% |
| > 12horas | 10,1% | 19,5% | 28,1% |
| > 23horas | 7,6% | 17,0% | 18,3% |

Adaptado: Van Werwen *et al.* (1992)

Tabela 2. Incidência de retenção de placenta, segundo a ordem de parto, na fazenda onde o experimento foi realizado.

| Ordem de parto | % de animais com RP | Total de animais |
|-------------------|---------------------|------------------|
| 1ª | 62 (9,1%) | 684 |
| 2ª | 76 (14,4%) | 528 |
| 3ª ou mais partos | 115 (15,1%) | 770 |

Adaptado: Nobre *et al.* (2012)

2.7 Importância clínica e prejuízos da retenção de placenta

A RP afeta a saúde, a produção de leite e a eficiência reprodutiva do rebanho. Apenas 1 a 5% dos animais acometidos morrem da doença, no entanto seus maiores prejuízos são insidiosos, diretamente relacionados às suas complicações clínicas (Takagi *et al.*, 2001). Os sintomas clínicos dos animais acometidos pela RP podem ser caracterizados pela presença de restos placentários exteriorizados na vulva, muitas vezes acompanhados por esforços expulsivos visíveis, odor fétido (em casos de maior duração) e em 80% dos casos os animais apresentam hipertermia. Em casos mais graves, sintomas como inapetência,

diminuição dos movimentos ruminais, apatia, menor produção de leite e endometrite, também podem aparecer (Paisley *et al.*, 1986; Ferreira, 2010). Segundo Laven e Peters (1996) a ocorrência da doença aumenta em 19 vezes o aparecimento de patologias puerperais, como cisto folicular, mastite, metrite, cetose e deslocamento de abomaso para esquerda (LeBlanc, 2008). No entanto, Han e Kim (2005) não observaram diferenças na incidência de cistos foliculares entre vacas com e sem RP. Neste estudo, a ocorrência de cisto folicular foi relacionada à produção de leite, número de parições e época do ano. A RP também pode predispor ao aparecimento de mastite clínica, tendo

como hipótese que tanto a mastite quanto a RP podem estar relacionadas com a queda de imunidade do animal (Wiltbank, 2006; Ferreira, 2010).

A principal patologia puerperal relacionada com a RP é a infecção uterina, que pode afetar até 54% dos animais, comprometendo a involução uterina e o retorno à atividade ovariana cíclica (Laven e Peters, 1996). Em vacas com liberação normal da placenta, em torno de 10% desenvolvem infecção uterina. As consequências da infecção uterina diferem consideravelmente entre os animais. A intensidade do seu efeito pode variar segundo a gravidade da infecção, do tempo de ocorrência após o parto e da saúde geral do animal (Lewis, 1997). Os principais efeitos da infecção uterina estão associados aos gastos com tratamento, à diminuição da ingestão de alimentos, à redução na produção de leite e aos quadros secundários de subfertilidade ou infertilidade, que podem levar ao descarte involuntário dos animais (Lewis, 1997; Sheldon *et al.*, 2008).

Quando acometidas pela RP, algumas vacas não alcançam o pico de produção de leite esperado e alguns autores sugerem que um total de 250 litros de leite/vaca são perdidos devido a RP. Além da menor produtividade pode-se somar ao prejuízo do proprietário o descarte do leite de vacas tratadas com antibiótico e o leite não produzido devido ao estado clínico do animal acometido. Em 75% dos casos de RP os animais são tratados com antibioticoterapia sistêmica e, além dos custos com o antibiótico, o leite é descartado geralmente por sete dias, dependendo da base terapêutica da droga utilizada. O somatório destas perdas torna o animal acometido pela doença um forte candidato ao descarte. A taxa de descarte em animais acometidos por RP é de 6% (Dias, 2001). Percentualmente os prejuízos da RP podem ser divididos em 40% em perdas na produção de leite, 32% com

honorários veterinários, 19% com descarte e 9% com perdas reprodutivas (Joosten *et al.*, 1988). Dias (2001) citou ainda que a mão-de-obra utilizada para avaliação diária dos animais e aplicação dos medicamentos também devem ser computadas nos custos da RP, e que um funcionário gasta cerca de 10 minutos diários durante quatro dias em cada caso da doença. Joosten *et al.* (1988) afirmaram que em um rebanho com 6,6% de RP há um gasto anual de 725 dólares, ou seja, uma perda de 110 dólares por animal. Já Kimura *et al.* em 2002 estimaram o custo de 285 dólares para cada caso de retenção.

Considerando a literatura revisada, no seu contexto amplo, observa-se que tem ocorrido avanços no entendimento e tratamento da retenção de placenta. Entretanto, dada a sua complexidade e característica multifatorial, muito há ainda que se conhecer sobre aspectos da fisiologia, da imunologia, da patologia, da terapêutica, da ambiência e do manejo de rebanhos para minimizar, em benefício do animal e do produtor, os efeitos ou influências negativas da RP, no bem estar do animal e no resultado financeiro do empreendimento.

Hipótese

Características histológicas do placentomo da vaca mestiça Holandês-Zebu diferem no 1º parto em comparação a vacas de 2º, 3º ou mais partos.

Objetivos

Estudar as características histopatológicas do placentomo em vacas de primeira, segunda e terceira ou mais ordens de parto, avaliando:

a) O número de células epiteliais carunculares e células binucleadas do trofoblasto nos diferentes grupos;

- b) A proporção volumétrica das células trofoblásticas binucleadas e outros componentes estruturais do placentomo;
- c) A morfometria do colágeno materno e fetal.

3. Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido após o projeto ter sido aprovado pelo CEUA-UFMG, sob o número 67/2012 (Anexo I).

3.1 Local e animais

Foram utilizados animais de uma propriedade particular, localizada no município de Pitangui-MG. No período do experimento (Abril a Maio de 2012), a propriedade contava com um rebanho de aproximadamente 2000 animais, semiconfinados, dos quais 700 vacas estavam em lactação.

Foram utilizadas 15 fêmeas mestiças gestantes, composição genética de 3/4 a 31/32 Holandês/Zebu, sem retenção de placenta e classificadas em três grupos de acordo com a ordem de parto, sendo o Grupo 1 (G1) formado por cinco vacas de primeiro parto; Grupo 2 (G2) formado por cinco vacas de segundo parto e Grupo 3 (G3) formado por cinco vacas com três ou mais partos.

3.2 Manejo reprodutivo

O experimento foi realizado respeitando o manejo de rotina da propriedade. O estro foi detectado com auxílio de rufião e as vacas inseminadas artificialmente (IA). Aproximadamente 70 dias pós-parto, as vacas sem estro identificado foram submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), visando um pico de partos de abril a junho. As novilhas foram inseminadas com sêmen sexado, em estação de monta, nos meses de

agosto a novembro. No rebanho, o período médio de intervalo de partos (IP) foi de 13 meses e de idade ao primeiro parto foi de 28 meses. A incidência média de RP na propriedade de 2008 a 2011 foi de 11,9%.

3.3 Manejo maternidade

Os animais foram levados para a maternidade 30 dias antes do parto e separados em dois lotes, um de novilhas e outro de vaca (Anexo II). Os animais da maternidade foram mantidos em sistema de semiconfinamento. Durante a noite, permaneceram em pastejo rotacionado de capim Brachiário (*Brachiária brizanta* CV. *Marandú*) e durante o dia, foram suplementadas no cocho, com dieta única, composta de 8,3kg de silagem de milho misturados a 18kg de cana e 2,4kg de concentrado para cada animal, além de sal mineral fornecido à vontade. Ambos os lotes, durante o dia, foram sempre acompanhados por um funcionário treinado que observava e, se necessário, auxiliava no parto. Logo após o parto, as bezerras receberam quatro litros de colostro, tiveram o umbigo curado e posteriormente eram levadas ao bezerreiro. As vacas permaneceram na maternidade por 24h após o parto e ficaram de dois a três dias na ordenha acessória até se juntarem aos lotes de vacas em lactação na ordenha principal.

3.4 Coleta do material

Imediatamente após a expulsão do feto (Anexo III), os animais foram contidos em tronco de contenção e submetidos a antissepsia da região perineal, segundo metodologia empregada por Marques Júnior (1988). Em seguida, foi realizada a colheita de um placentomo da região do corpo do útero, utilizando um ovariótomo por via transvaginal. O placentomo coletado foi colocado inteiro em recipiente contendo glutaraldeído a 4% tamponado com tampão fosfato 0,05M (Fig. 1). Após aproximadamente duas horas, o placentomo

foi seccionado transversalmente em três fragmentos e renovou-se o glutaraldeído, ficando imersos neste fixador até serem destinados ao processamento histológico (Anexo IV). Concomitantemente, a partir da expulsão fetal, foi observado para cada uma das vacas e novilhas o tempo decorrido entre a expulsão fetal e a expulsão da placenta, sendo utilizado apenas os placentomos de vacas que expulsaram a placenta em até 12 horas após a expulsão fetal.

3.5 Histologia do placentomo

O processamento do material para histologia foi realizado no Laboratório de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e a avaliação microscópica das lâminas ocorreu no Setor de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

Os fragmentos obtidos de cada placentomo foram desidratados por passagens sucessivas em soluções de álcool etílico, em concentrações crescentes, diafanizados em xilol e incluídos em paraplast® (Luna, 1968). Cortes de cada placentomo, com 5 µm de espessura, foram montados em lâmina de vidro e corados pela Hematoxilina e Eosina (HE) e pelo Tricrômico de Masson para avaliação por microscopia óptica (Anexo IV).

3.5.1. Células epiteliais carunculares

A contagem das células maternas foi realizada por microscopia óptica, em 40 campos aleatórios, com aumento de 400x, utilizando-se ocular micrométrica de 100 divisões (Fig. 2) alinhada paralelamente ao epitélio caruncular. Foram contadas as células maternas em uma extensão do tecido delimitada por 30 divisões do micrômetro, em 40 campos microscópicos aleatórios, na mesma lâmina, segundo a metodologia empregada por Marques Júnior (1988) e Martins (1999) (Fig. 3).

O número amostral ideal de campos microscópicos contados por placentomo, necessários para a caracterização da quantidade média de células epiteliais, foi determinado conforme metodologia empregada por Martins (1999) em que o tamanho amostral ideal foi obtido, quando o incremento de campos estudados não resultou em redução considerável do valor do desvio (Sampaio, 1998; Martins, 1999).

3.5.2. Células binucleadas do trofoblasto

A contagem das células binucleadas do trofoblasto foi realizada utilizando microscopia óptica com aumento de 400x. Estas foram contadas aleatoriamente em 40 campos por lâmina e foi determinado pelo mesmo método descrito acima para quantificação das células epiteliais carunculares, proposto por Sampaio (1998) e Martins (1999) (Fig. 3).

3.5.3. Proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo

As proporções volumétricas de componentes estruturais do placentomo foram quantificadas em lâminas coradas com HE analisadas em microscopia óptica, sob aumento de 400x. Foram analisadas as seguintes estruturas (Fig. 4):

- Tecido conjuntivo materno (CM)
- Tecido conjuntivo fetal (CF)
- Tecido epitelial materno (EM)
- Tecido epitelial fetal (EF)
- Vasos maternos (VM)
- Vasos fetais (VF)
- Células binucleadas (CB)

Aleatoriamente, uma grade da ocular integradora contendo 25 pontos equidistantes (ocular integradora Zeiss KLP 10x) (Fig. 5) foi sobreposta a 40 campos microscópicos de uma mesma lâmina e o número de vezes que determinada estrutura atingiu os pontos foi utilizado para calcular

a proporção volumétrica desta estrutura, segundo a fórmula de Sharpe *et al.* (1989), totalizando 1000 pontos por lâmina:

$$PV = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{A_i}{A} \cdot 100}{n}$$

3.5.4. Análise do colágeno materno e fetal do placentomo

Para esta análise, foram utilizadas lâminas coradas pelo Tricrômico de Masson. Esta coloração possibilita evidenciar o colágeno, em azul, dos demais tecidos que se coram em vermelho. Numa mesma lâmina, acoplada à ocular de um microscópio de luz, sob aumento de 400x, foram analisados 40 campos sobrepostos por uma ocular integradora de 25 pontos equidistantes. Quando o ponto incidiu sobre a área corada em azul ele foi computado para cálculo da proporção volumétrica do colágeno nos tecidos materno ou fetal (Fig. 6).

O somatório do número de pontos incidentes em determinada estrutura foi utilizado para calcular sua proporção volumétrica (PV), segundo a fórmula de Sharpe *et al.* (1989):

$$PV = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{A_i}{A} \cdot 100}{n}$$

3.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (Cochran e Cox, 1957). As diferenças entre as médias foram analisadas estatisticamente utilizando-se o teste de Tukey com análise de variância simples (SAS Institute Inc., 1999). O nível de significância utilizado nos testes estatísticos foi de 5% (Sampaio, 2002).

Para avaliar o grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas analisadas utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson. Dado pela seguinte fórmula:

$$r = \frac{1}{n-1} \sum \left(\frac{x_i - \bar{X}}{s_x} \right) \left(\frac{y_i - \bar{Y}}{s_y} \right)$$

Este coeficiente, que varia entre -1 e 1, mede o grau da relação entre as variáveis e quanto mais próximo os valores estiverem dos extremos, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis. Quando o valor for igual a zero não há relação linear, valor igual a 1 indica uma relação linear perfeita, ou seja, quando uma das variáveis aumenta a outra também aumenta e valor igual a -1 indica uma relação linear perfeita, porém inversa, ou seja, quando uma das variáveis aumenta a outra diminui.



Figura 1. Sequencia de fotos dos procedimentos da coleta do placentomo da vaca. 1) Antissepsia da região perineal. 2) Ovariótomo. 3) Colheita do placentomo, por via transvaginal, do corpo uterino. 4) Placentomo da vaca coletado. 5) Placentomo colocado inteiro em recipiente contendo fixador. 6) Identificação da amostra.

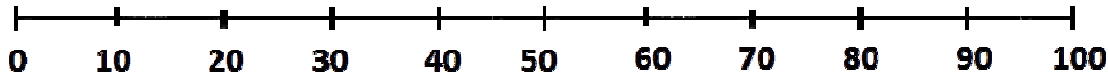


Figura 2. Ocular micrométrica de 100 divisões.

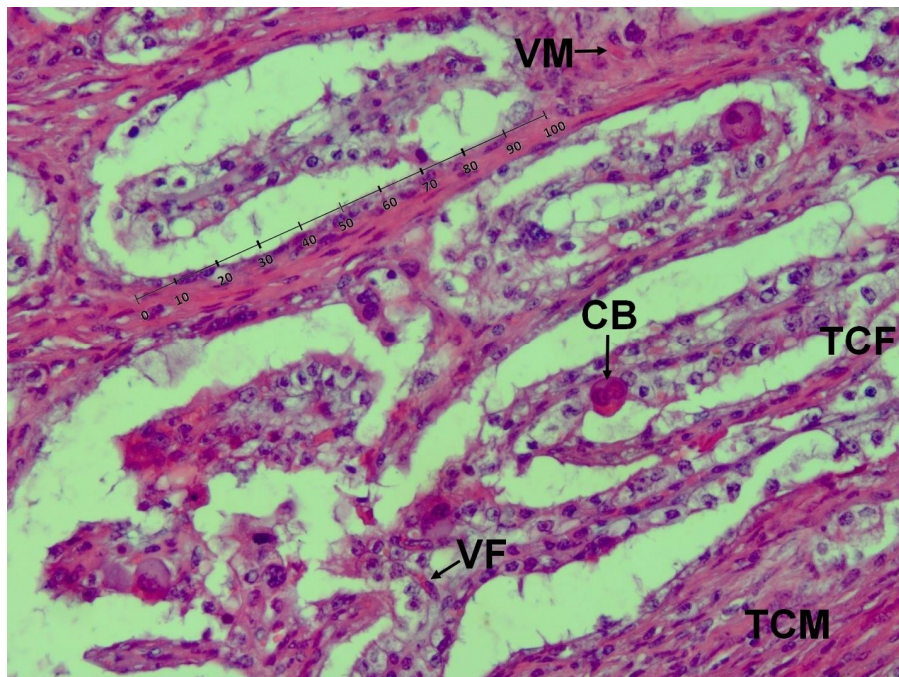


Figura 3: Placentoma bovino imediatamente após expulsão do feto ó liberação normal da placenta. A linha posicionada paralelamente ao epitélio da cripta caruncular indica o posicionamento do micrômetro para quantificação das células epiteliais das criptas carunculares. Hematoxilina-eosina. 200x. Tecido Conjuntivo Materno (TCM); Tecido Conjuntivo Fetal (TCF); Células Binucleadas (CB); Vasos Maternos (VM); Vasos Fetais (VF).

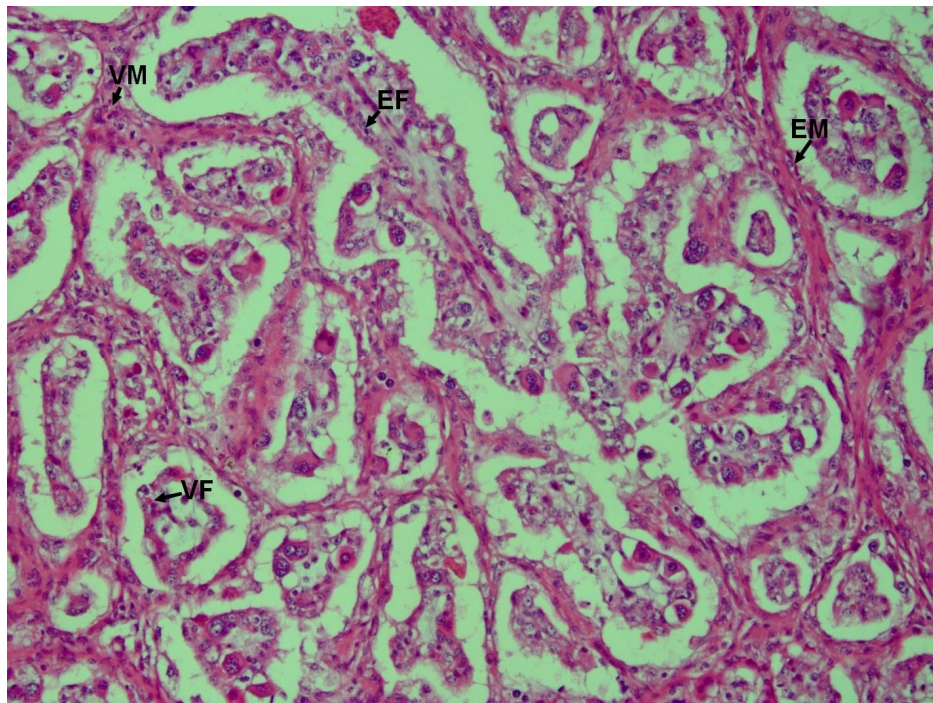


Figura 4: Placentoma bovino imediatamente após expulsão do feto ó liberação normal da placenta. Hematoxilina-eosina. 100x. Vasos Maternos (VM); Vasos Fetais (VF); Epitélio Fetal (EF); Epitélio Materno (EM).

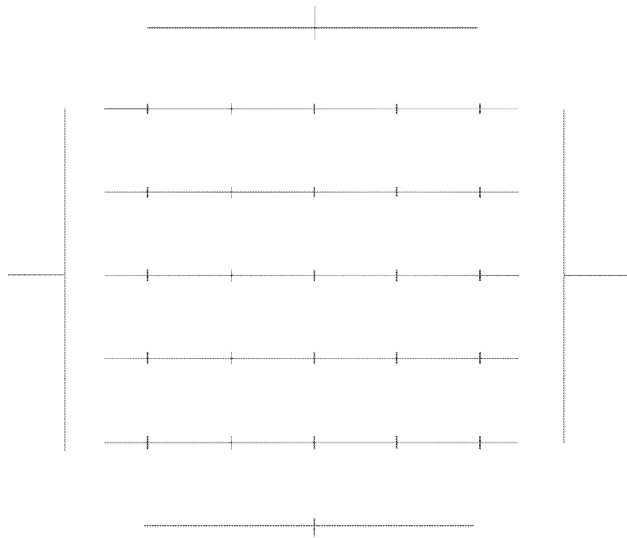


Figura 5. Ocular integradora Zeiss KLP 10x contendo pontos que são sobrepostos ao corte histológico para determinação da proporção volumétrica dos componentes estruturais.

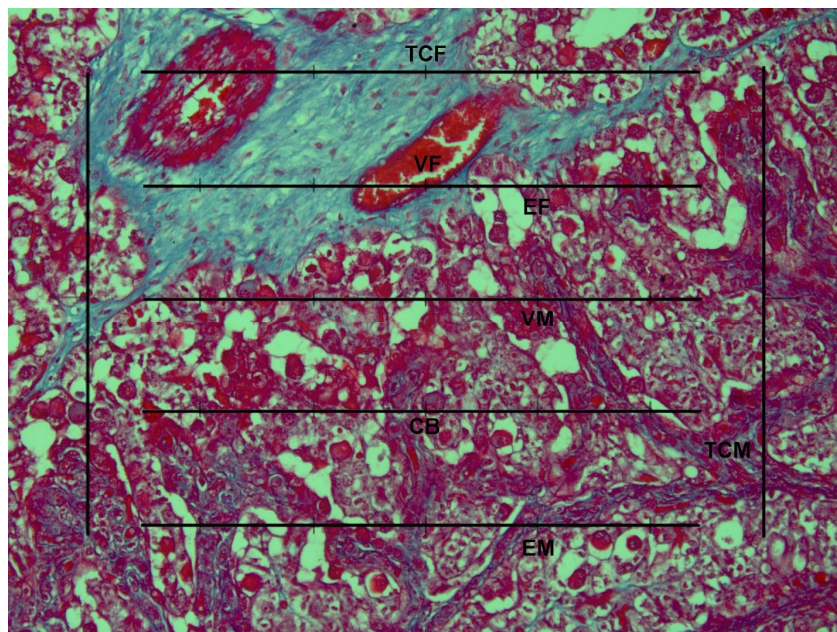


Figura 6: Placentomo bovino imediatamente após expulsão do feto ó liberação normal da placenta. Ocular integradora. Tricrômico de Masson. 100x. Tecido Conjuntivo Materno (TCM); Tecido Conjuntivo Fetal (TCF); Células Binucleadas (CB); Vasos Maternos (VM); Vasos Fetais (VF); Artefato de Técnica (AT). Em azul Colágeno Materno e Colágeno Fetal

4. RESULTADOS

4.1 Células epiteliais carunculares

O número médio de células epiteliais carunculares por campo e seus desvios-padrões, por segmento de 30 divisões do micrômetro foi: no G1 $3,4 \pm 0,43$, no G2 $3,13 \pm 0,22$ e no G3 $3,32 \pm 0,40$ (Tab. 3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos ($P > 0,05$). As contagens obtidas em cada um dos campos microscópicos estudados encontram-se no Anexo V.

4.2 Células binucleadas do trofoblasto

Tabela 3. Número médio por campo das células epiteliais carunculares do placentomo de vacas mestiças Holandês-Zebu de primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro ou mais partos (G3).

| Grupo | Número médio de células por campo |
|-------|-----------------------------------|
| 1 | $3,4 \pm 0,43^a$ |
| 2 | $3,13 \pm 0,22^a$ |
| 3 | $3,32 \pm 0,40^a$ |

Média±desvio-padrão. Médias e desvios seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P&O,05).

O número médio de células binucleadas do trofoblasto e seus desvios-padrão por campo foi $1,83 \pm 1,03$, $1,74 \pm 0,72$ e $1,89 \pm 0,31$ nos

grupos 1, 2 e 3, respectivamente (Tab. 4) Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($P > 0,05$). As contagens obtidas em cada um dos campos microscópicos estudados encontram-se no Anexo VI.

Tabela 4. Número médio de células binucleadas por campo microscópico do placentomo de vacas mestiças Holandês-Zebu de primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro ou mais partos (G3).

| Grupo | Número médio de células por campo |
|-------|-----------------------------------|
| 1 | $1,83 \pm 1,03^a$ |
| 2 | $1,74 \pm 0,72^a$ |
| 3 | $1,89 \pm 0,316^a$ |

Média±desvio-padrão. Médias e desvios seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P&O,05).

4.3 Proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo

A proporção volumétrica dos componentes estruturais estudados não diferiu estatisticamente entre os três grupos, exceto nos casos do tecido conjuntivo materno (CM) e epitélio fetal (EF) (Tab. 5).

Tabela 5. Porcentagem das proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo de vacas mestiças Holandês-Zebu de primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro ou mais partos (G3).

| Grupo | CM (%) | EM (%) | VM (%) | CF (%) | EF (%) | VF (%) | CB (%) |
|-------|-------------------|--------------------|------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| 1 | $31,36 \pm 6,97a$ | $13,7 \pm 2,09^a$ | $5,16 \pm 1,13a$ | $19,10 \pm 4,34^a$ | $12,52 \pm 2,57a$ | $5,38 \pm 2,86a$ | $3,34 \pm 1,15^a$ |
| 2 | $19,82 \pm 4,06b$ | $17,44 \pm 3,92^a$ | $5,80 \pm 1,60a$ | $20,10 \pm 3,97^a$ | $18,46 \pm 3,11ab$ | $8,00 \pm 2,92a$ | $2,82 \pm 0,83^a$ |
| 3 | $19,38 \pm 0,88b$ | $18,52 \pm 2,85^a$ | $6,28 \pm 0,86a$ | $16,76 \pm 1,83^a$ | $22,04 \pm 4,62b$ | $8,56 \pm 1,97a$ | $1,86 \pm 0,96^a$ |

Conjuntivo materno (CM). Epitélio materno (EM). Vasos maternos (VM). Conjuntivo fetal (CF). Epitélio fetal (EF). Vasos fetais (VF). Células binucleadas (CB). Média±desvio-padrão. Médias e desvios seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P&O,05).

A proporção volumétrica do tecido epitelial materno (EM) foi de $13,70 \pm 2,09$, $17,44 \pm 3,92$ e $18,52 \pm 2,85$ nos grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Já os valores de vasos maternos (VM) nos grupos 1, 2 e 3 foram $5,16 \pm 1,13$, $5,80 \pm 1,60$ e $6,28 \pm 0,86$, respectivamente. A proporção volumétrica do tecido conjuntivo fetal (CF) no G1 $19,10 \pm 4,34$, G2 $20,10 \pm 3,97$ e no G3 $16,76 \pm 1,83$. Os valores referentes aos vasos fetais (VF) foram $5,38 \pm 2,86$, $8,00 \pm 2,92$ e $8,56 \pm 1,97$ nos grupos 1, 2 e 3, respectivamente. As células binucleadas (CB) do trofoblasto apresentaram a seguinte proporção volumétrica: $3,34 \pm 1,15$, $2,8 \pm 0,83$ e $1,86 \pm 0,96$, nos grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Nenhum destes componentes estruturais apresentou diferença de proporção volumétrica entre os grupos 1, 2 e 3 ($P > 0,05$).

A proporção volumétrica do CM foi maior no G1 ($31,36 \pm 6,97$), quando comparadas com as vacas do G2 ($19,82 \pm 4,06$) e do G3 ($19,38 \pm 0,88$) ($P < 0,05$). As vacas de terceiro parto G3 apresentaram maior proporção volumétrica do EF em relação as de primeiro parto G1, entretanto as vacas do G2 apresentaram valores semelhantes às de primeiro e de três ou mais partos ($P > 0,05$) (Tab.5).

4.4 Análise morfométrica do colágeno

A proporção volumétrica do colágeno materno foi maior que a do fetal ($P < 0,05$) dos placentomas avaliados, independente da ordem de parto (Tab. 6). Não foi encontrada influência da ordem de parto sobre esta característica. As contagens obtidas em cada um dos campos microscópicos estudados encontram-se no Anexo VII.

Tabela 6. Proporções volumétricas do colágeno materno e fetal do placentomo de vacas mestiças Holandês-Zebu de primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro ou mais partos (G3).

| | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Colágeno fetal (%) | $6,46 \pm 2,01^a$ | $7,36 \pm 1,28^a$ | $7,72 \pm 1,94^a$ |
| Colágeno materno (%) | $15,52 \pm 1,87^b$ | $15,22 \pm 1,99^b$ | $15,84 \pm 2,85^b$ |

Média±desvio-padrão. Médias e desvios seguidos de letras diferentes nas mesmas linhas e colunas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

4.5 Correlações de Pearson

Para medir o grau de correlação entre as médias dos componentes estruturais do placentomo, foi realizado o teste de correlação Pearson. Foram encontradas correlações positivas, moderadas e significativas entre o CM e EF; e entre o

VF e CF. Correlação positiva, significativa, porém forte foi encontrada entre o EF e VF. Correlação negativa, moderada e significativa foi encontrada entre o CF e EM. Outras correlações negativas, moderadas, porém muito significativas, foram encontradas entre o CM e as médias dos VF e EF (Tab.7)

Tabela 7. Correlações de Pearson entre as médias dos componentes estruturais do placentomo de vacas mestiças Holandês-Zebu.

| | CM | EM | VM | CF | EF | VF | CB |
|----------------|--|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| CF | n= 15 r= - 0,36 ns | n= 15 r= -0,58 ^M * | n= 15 r= 0,14 ns | n= 15 r= 1 ns | n= 15 r= 0,01 ns | n= 15 r= 0,59 ^M ** | n= 15 r= -0,04 ns |
| EF | n= 15 r= - 0,78 ^F *** | n= 15 r= 0,23 ns | n= 15 r= 0,32 ns | n= 15 r= 0,1 ns | n= 15 r= 1 ns | n= 15 r= 0,76 ^F *** | n= 15 r= 0,49 ns |
| VF | n= 15 r= -0,87 ^F **** | n= 15 r= - 0,08 ns | n= 15 r= 0,46 ns | n= 15 r= 0,59 ^M ** | n= 15 r= 0,76 ^F *** | n= 15 r= 1 ns | n= 15 r= -0,44 ns |
| CB | n= 15 r= 0,49 ns | n= 15 r= -0,27 ns | n= 15 r= -0,08 ns | n= 15 r= -0,04 ns | n= 15 r= -0,49 ns | n= 15 r= -0,44 ns | n= 15 r= 1 ns |
| COLAG_M | n= 15 r= -0,03 ns | n= 15 r= -0,32 ns | n= 15 r= 0,07 ns | n= 15 r= 0,25 ns | n= 15 r= 0,5 ^M * | n= 15 r= 0,40 ns | n= 15 r= -0,006 ns |
| COLAG_F | n= 15 r= -0,21 ns | n= 15 r= 0,11 ns | n= 15 r= 0,17 ns | n= 15 r= -0,44 ns | n= 15 r= -0,15 ns | n= 15 r= -0,11 ns | n= 15 r= 0,16 ns |

Conjuntivo materno (CM). Epitélio materno (EM). Vasos maternos (VM). Conjuntivo fetal (CF). Epitélio fetal (EF). Vasos fetais (VF). Células binucleadas (CB). Colágeno materno (COLAG_M). Colágeno fetal (COLAG_F). Número de repetições (n). Coeficiente de correlação (r). Letras sobrescritas indicam correlação leve (L), moderada (M) ou forte (F). Asteriscos indicam que a correlação é significativa e representam o nível de significância P<0,05(*), P<0,01 (**), P<0,001 (***) e P<0,0001 (****).

5. DISCUSSÃO

5.1 Células epiteliais carunculares

Ao analisar os resultados contidos na Tab. 3, verifica-se que não houve diferença estatística entre as médias do número de células carunculares nos diferentes grupos, o que não pode ser comparado com resultados na literatura, pois não foram encontrados trabalhos sobre o efeito da ordem de parto influenciando o número de

células epiteliais carunculares. Entretanto, a literatura cita que este grupo celular sofre rápido decréscimo a partir do sétimo mês de gestação até próximo ao parto, e que vacas com parto normal apresentam o número de células epiteliais carunculares significativamente menores que aquelas que retêm a placenta (Grunert, 1986; Woicke et al., 1986; Williams et al., 1987; Marques Júnior, 1988; Barreto Filho, 1992; Martins, 1999; Moura, 2008).

A metodologia utilizada no presente experimento e os resultados obtidos possibilitam inferir que a ordem de parto não influenciou a quantidade de células epiteliais carunculares. Dessa forma, se vacas com retenção de placenta apresentam número de células epiteliais carunculares maiores, podemos inferir que a ordem de parto, por este aspecto, não deve ser considerada fator de risco para RP.

5. 2 Células binucleadas do trofoblasto

Os resultados obtidos (Tab. 4) mostram que os valores médios das células binucleadas do trofoblasto, de novilhas, vacas de 2º parto e vacas de 3º ou mais partos, mantiveram-se estatisticamente semelhantes ($P > 0,05$), sinalizando que a ordem de parto não exerce influência na dinâmica das células binucleadas. Os valores encontrados no presente experimento assemelham-se aos citados na literatura por Santos (1995) e Martins (1999).

Willians et al, (1987) e Gross et al. (1991) observaram que vacas leiteiras que liberam a placenta normalmente apresentam menor número de células binucleadas quando comparadas a vacas com retenção, o que não pode ser verificado no presente trabalho em função da metodologia utilizada, pois não foram avaliados animais com RP. Entretanto, os resultados sinalizam para o que foi descrito por Gross et al. (1991), ao considerarem que a maturação e liberação normal da placenta parecem estar relacionadas com o decréscimo das células binucleadas do trofoblasto. Ainda, segundo esses autores, a diminuição do número de células binucleadas do trofoblasto pode estar relacionada com a diminuição de estímulos para a sua formação e o aumento na migração para o tecido materno, com posterior destruição. Além disso, o feto aparentemente participa da maturação desta população celular (Wooding et al. 1986).

5.3 Proporções volumétricas dos componentes estruturais do placentomo

A proporção volumétrica dos componentes estruturais estudados não diferiu estatisticamente entre os três grupos, exceto nos casos do tecido e epitélio fetal (Tab. 5). Houve diminuição significativa na proporção volumétrica do tecido conjuntivo materno entre o G1 e os grupos 2 e 3, entretanto a metodologia utilizada não foi suficiente para esclarecer esta diferença. Como não houve diferença estatística significativa na avaliação das proporções volumétricas do colágeno materno, a explicação para a diferença entre o G1 e os demais grupos deve ser buscada na alteração de outros componentes do tecido conjuntivo. Não há na literatura estudos que comparem as proporções volumétricas dos componentes do placentomo de vacas com diferentes ordens de parto. O emprego de outras técnicas histológicas que evidenciem os diferentes tipos celulares do tecido conjuntivo materno é necessário para se avaliar qual ou quais componentes deste tecido apresentam-se em menor quantidade no placentomo da vaca de 2º ou mais partos. Serviria ainda para avaliar se esta diminuição pode contribuir de forma significativa para que ocorra a separação entre os tecidos materno e fetal com consequente aumento da incidência de RP.

O teste de correlações de Pearson-Spearman (Tab. 7) demonstrou que existe correlação negativa, forte e significativa entre o tecido conjuntivo materno e o epitélio fetal, ou seja, quanto menos tecido conjuntivo materno maior a quantidade de tecido epitelial fetal. Uma especulação poderia ser que a maior quantidade do epitélio fetal possibilitasse uma maximização de trocas metabólicas entre a mãe e feto, uma vez que assegurar o aporte nutricional e a troca metabólica entre os dois é vital para o bem estar e desenvolvimento satisfatório do feto. Pelos resultados da correlação especula-se,

também, que mudanças na quantidade de tecido conjuntivo materno estão ligadas a outros componentes do tecido conjuntivo que não o colágeno materno, pois este teve correlação positiva e moderada com o epitélio fetal. Moura (2008), avaliando placentomas de diferentes terços gestacionais de vacas, observou aumento progressivo nos tecidos conjuntivo materno e fetal, resultado semelhante ao relatado por 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. O autor mencionou ainda que essa transformação parece ser importante pré-requisito para liberação normal da placenta. No caso do presente experimento, a metodologia utilizada possibilitou a mensuração dos componentes do placentomas em apenas um momento, ou seja, imediatamente após a expulsão fetal e segundo a ordem de parto, sem possibilidade de aferir se a ordem do parto alterou ou não proporção do tecido conjuntivo do placentomo.

Um achado interessante expresso na Tab. 5 foi o aumento progressivo do epitélio fetal segundo a ordem de parto, inclusive com diferença significativa entre a novilha e a vaca de terceiro parto, entretanto a vaca de segundo parto não diferiu estatisticamente dos demais grupos. Na literatura não foi encontrada uma explicação para tal achado, ou seja, o que ocorre no útero gestante que favoreça o desenvolvimento do tecido fetal de forma mais intensa na medida em que o útero acompanha o amadurecimento cronológico do animal. Uma especulação poderia ser a de que a completeza do amadurecimento dos eventos fisiológicos no útero gestante só ocorre a partir do terceiro parto. Associando tal achado a resultados na literatura sobre RP (Van Werwen *et al.* 1992 e Nobre *et al.* 2002), poder-se-ia também especular que o aumento progressivo do tecido epitelial fetal com a ordem de parto pode estar relacionado ao aumento na incidência da

RP em animais com maior número de partos, pois a maior quantidade do tecido epitelial fetal, possivelmente, poderia fortalecer a ligação dos tecidos na interface materno-fetal e assim favorecer a ocorrência de mais casos de retenção.

5.4 Análise morfométrica do colágeno

Neste estudo não foram observadas diferenças nas proporções volumétricas do colágeno materno e fetal entre os três grupos (Tab. 6), ressaltando-se que não foram avaliados animais com RP. Sharpe *et al.* (1989) e Santos (1995), analisando placentomas de vacas Holandesas com e sem RP, também não encontraram, para o colágeno, diferença entre os grupos. Sharpe *et al.* (1989) demonstraram que ao longo da gestação o colágeno fetal tende a aumentar proporcionalmente com a proximidade do parto, enquanto o colágeno materno tende a diminuir. Estes 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, posteriormente, aos 270 dias corresponde a aproximadamente 19% do mesmo. Ainda, Sharpe *et al.*, (1990) demonstraram 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.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do conjunto da análise dos resultados encontrados no presente experimento, de *per se* e também em comparação com o encontrado na literatura, verifica-se que a fisiologia da expulsão da placenta é complexa na sua essência, sendo possível adicionar novos conhecimentos sobre o assunto de forma limitada, considerando a impossibilidade de tratar do tema de forma objetiva e abrangente e um único

experimento. O presente experimento e a literatura consultada mostram a característica mosaica na construção do conhecimento sobre a fisiologia da expulsão da placenta e sobre a patologia da sua retenção, o que deve ser um encorajamento para aqueles que se aventuram a estudar um assunto tão complexo e fascinante nas suas esferas micro e macro, envolvendo a vaca, a ambiência e o manejo de ambas.

7. CONCLUSÕES

Nas condições em que este experimento foi conduzido e avaliando-se características histológicas do placentomo de vacas mestiças holandês-zebu de primeiro, segundo e terceiro ou mais partos pode-se concluir que:

- O placentomo de vacas de primeira ordem de parto exibe maior proporção do tecido conjuntivo materno em relação às vacas de segundo ou mais partos;
- Ocorre aumento progressivo da proporção do tecido epitelial fetal no placentomo com o aumento do número de partos;
- As células epiteliais carunculares e as CBs do trofoblasto, segundo a ordem de parto, não constituíram como fator de risco para a RP;
- Há correlações negativas, fortes e muito significativas entre o tecido conjuntivo materno, do placentomo de vacas, e o tecido epitelial fetal e seus vasos. Porém, mudanças na quantidade do CM estão ligadas a outros componentes do tecido conjuntivo que não o colágeno, pois este teve correlação positiva e moderada com o epitélio fetal;

- Há correlação negativa, moderada e significativa entre o tecido conjuntivo fetal e epitélio materno do placentomo de vacas mestiças holandês-Zebu.

8. Referências

- 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. *Retention of the afterbirth in cattle: a review and commentary*. Vet. Annu., n.19, p. 26-36, 1979.
- CHASSAGNE, M.; BARNOUIN, J.; CHACORNAC, J. P. *Predictive markers in de late gestation period for retained placenta in black-pied dairy cows under field conditions in France*. Theriogenology, v.49, n.3, p.645-656, 1998.
- BADINAND, F., E SENSENBRENNER, A. *Non-délivrance chez la vache. Données nouvelles à propos d'une enquête épidémiologique*. Le Point Vétérinaire, 16: 13-26, 1984.
- BARRETO FILHO, J.B. *Aspectos morfológicos da placentação do Zebu (Bos taurus indicus)*. 1992. 106p. Dissertação (Mestrado em 1992) - 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*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.45, n.4, p.385-393, 1993.
- BAZER, F.W.; OTT, T.L.; SPENCER, T. E. *Pregnancy recognition in ruminants, pig and horses signals from the trophoblast*. Theriogenology, n.48, p.79694, 2002.

- BJORKMAN, N. Placentação. In: DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. *Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982. p.279-294.
- BOITOR, L.; MUNTEAN, M.; MATES, N.; KADAR, L.; BOITOR, M. *Relationship between blood vitamin content and frequency of placental retention in cows*. Vet. Bull. n.50, p. 902-903, 1980.
- BOURNE, N.; LAVEN, R.; WATHES, D.C. *A meta-analysis of the effects of vitamin E supplementation on the incidence of retained foetal membranes in dairy cows*. Theriogenology, n.67, p.494-500, 2007.
- 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.
- BYATT, J. C. EPPARD, P. J., MUNYAKAZI, R. H., SORBET, J. J., VEENHUIZEN, D. F., CURRAN, D. S., COLLIER, R. J. *Stimulation of milk yield and feed intake by bovine placental lactogen in dairy cow*. Journal Dairy Science, v.75, n. 5, p. 1216-1225, 1992.
- CARSON, R.L., CANDLE, A.B., RIDDLE, H.E. *The relationship between narrow calciumphosphorus ratio and reproductive problems in a dairy herd*. Theriogenology, v.9, 505-507, 1978.
- DANTZER, V. *Initial placentation in farm animals morphological events where growth factors must be implicated*. Reprod. Dom. Anim., v.28, n.4, p.199-201, 1993.
- DERIVAUX, J. *Retention of placenta and uterine disorders of the post-partum*. Universite de Liege; Tieraerztliche Hochschule Hannover. Monograph, 1981.
- DERIVAUX, J.; ECTORS, F.; BECKERS, J.F. *The ruminant placenta: structure and endocrine function*. Brussels: State university of Liege. 1988. 81p
- DIAS, R. O. S. *Retenção de placenta-índices e custos*. Milkpoint, São Paulo, 30 de março 2001. Acessado em Dezembro de 2012.
- DYRENDAHL, I.; MATTSON, J.; PEHRSON, B. *Retained placenta in cattle ó incidence, clinical data and effects on fertility*. Veterinarmed., n.24, p.529-541, 1977.
- EILIER, H., HOPKINS, F. M. *Successful treatment of retained placenta with umbilical cord injections of collagenase in cow*. J. Am. Vet. Med. Assoc., v. 203, n. 3, p. 436-443, 1993.
- EMBRAPA GADO DE LEITE, <http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>, 2012. Acesso em Dezembro de 2012.
- ERB, R.E.; HINZE, P.M.; GILDOW, E.M. *et al. Retained fetal membranes the effect on prolificacy of dairy cattle*. J. Am. Vet. Med. Assoc., v.133, p.489-496, 1958.
- 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.
- FERREIRA, A.M. *Redução do período de serviço em taurinos*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991.
- FERREIRA, A.M. *Manejo Reprodutivo de Bovinos Leiteiros: Práticas corretas e incorretas, casos reais, perguntas e respostas*. 1 ed. Juiz de Fora: editor Editar, , 2012, p. 41-49, 190-192.

FERREIRA, A.M. *Reprodução da fêmea bovina: Fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos)*. 1 ed. Juiz de Fora: editor Editar, 2010, p. 219-235.

FRAZER, G. S. A. *A rational basis for therapy in the risk postpartum cow*. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. v.49, n.1, p. 17-19, 2005.

GONZÁLEZ, F.H.D. *Introdução à Endocrinologia Reprodutiva Veterinária*, Porto Alegre: UFRGS, p.83, 2003.

FRIZZO, A. *As prostaglandinas na reprodução*. Porto Alegre: UFRGS, p.26, 2002.

GROSS, T.S., WILLIAMS, W.F., MANSPEACKER, J. E., LEWIS, G. S., RUSSEK-COEHEM, E. *Bovine placental synthetesis in vitro as it relates to placental separation*. Biol. Reprod. v.34, n.6, p.903-917, 1987.

GROSS, T.S.; WILLIAMS, W.F. *In vitro steroid synthesis by the placenta of cows in late gestation and at parturition*. J. Reprod. Fertil., v.83, n.2, p.65-73, 1988b.

GRUNERT, E. Etiology of retained bovine placenta. In: Morrow, D. A. *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1980. p. 180-186.

GRUNERT, E. Etiology of retained bovine placenta. In: MORROW, D.A (Ed). *Current therapy in theriogenology*. 2ed. Philadelphia saunders, 1996.p237-242.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7a ed. Barueri: Manole, 2004. 513p.

HAN, Y. K.; KIM, I.H. *Risk factors for retained placenta and the effect of retained placenta on the occurrence of postpartum diseases and subsequent reproductive performance in dairy cows*. J. Vet. Sci., v. 6, p. 53-59, 2005.

HIDIROGLOU, M., McALLISTER, A. J., WILLIAMS, C. J. *Prepartum supplementation of selenium and vitamin E to dairy cows: assessment of selenium and status and reproductive performance*. Journal of Dairy Science, v.70, n.6, p. 1281-1288. 1987.

HOFFMANN, B., WAGNER, WC., HIXON, J. G. BAHR, J. *Observations concerning the functional status of the corpus luteum and the placenta aroud parturition in the cow*. Animal Reproduction Science, v.72, n.1, p. 253-266, 1979.

HORTA, A.E.M. *Etiopatogenia e terapêutica da retenção placentária nos bovinos*. In:jornadas internacionais de reproducción animal, 7, 1994, Murcia. Anais... Murcia: Editora, p.181-192. 1994.

HORTA, A.E.M. *Fisiologia do puerpério na vaca*. In:jornadas internacionais de reproducción animal, 8, 1995, Santander. Anais... Santander: AERA, 1995. p. 73-84.

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, 1988.

INABA, T., INOUE, A., SHIMIZU, R., NAKANO, Y., MORI, J. *Plasma concentration of progesterone, estrogens, vitamin A and -carotene in cows retaining fetal membranes*. Journal Veterinary Science, v.48, n.3, p.505-508, 1986.

IZHAR, M., PASMANINKI, M., SHEMESH, M. *Bovine placental progesterone synthesis: comparison of first*

and second trimesters of gestation. *Biology of Reproduction*, v.46, n.5, p.846-852, 1992.

JOOSTEN, I., ELDIK, P., MEY, G. J. W. *Factors affecting occurrence of retained placenta in cattle. Effect of sire on incidence.* *Anim. Reprod. Sci.*, v.25, n. 1, p. 11-12, 1991.

JULIEN, W. E., CONRAD, H. R., MOXON, A. L. *Selenium and vitamin E and the incidence of retained placenta in parturiente cows.* *Journal of Dairy Science*, v.59, n.2, p. 1960-1962, 1976.

KANKOFER, M.; WIERCINSKI, J.; ZERBE, H. *Prostaglandine 9-keto reductase activity in bovine retained and not retained placenta.* *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, v.66, n.4, p. 413-417, 2002.

KING, G.J.; ATKINSON, B.A.; ROBERTSON, H.A. *Implantation and early placentalation in domestic ungulates.* *J. Reprod. Fertil.*, Supl.31, p.17-30, 1982.

KELTON, D.F.; LISSEMORE, K.D.; MARTIN, R.E. *Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle.* *J. Dairy Sci.*, v.81, p.2502-2509, 1998.

KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI, JR. M. E.; REINHARDT, T. A. *Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle.* *Journal Dairy science* n. 85 p. 5444-550, 2002.

LANDIM JÚNIOR., L.P. *Células binucleadas trofoblásticas: efeito dos seus produtos de secreção na produção de prostaglandina F2 e avaliação da expressão gênica relativa de lactogênio placentário e fator de crescimento endotélio vascular em placentas bovinas.* 2006. 80p. Dissertação (Doutorado em?) - Universidade Estadual Paulista Faculdade

de ciências Agrárias e Veterinárias: Jaboticabal.

LAVEN, R.A.; PETERS, A.R. *Bovine retained placenta: etiology, pathogenesis and economic loss.* *Vet. Rec.*, v.9, p.465-471, 1996.

LeBLANC, S. J. *Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review.* *Vet. J.* v. 176, p. 102-114, 2008.

LEWIS, G. S. *Uterine health and disorders.* *J. Dairy Sci.*, v. 80, p. 984-994, 1997.

LUNA, L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* 3 ed. New York: McGraw Hill. 1968.

MAAS, J.P. *Prevention of retained placenta in dairy cattle.* *The Compendium on Continuing Education*, v.4, 519-526, 1982.

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.

MARTINS, E. *Apoptose na maturação e eliminação placentária em Bos taurus taurus.* 1999. 106f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) ó Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.

MARTINS, T. M. *Aspectos reprodutivos e produtivos de vacas da raça holandesa e expressão gênica endometrial de receptores tipo toll e -defensina 5 após o parto.* 2010. 26p. Dissertação (Mestrado em 2010) ó Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.

MOURA, M.R.P. *Citologia dos Líquidos Extra-Embrionários e Morfometria do Placentomo da Vaca nos Terços Inicial, Médio e Final da Gestação.* 2008. 27p.

Dissertação (Mestrado em 2008) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.

MARQUES JÚNIOR, A.P. *Leucocyte chemotaxis activity by cotiledons of dairy cows with normal delivery and retained placenta*. 1988. 182p. Tese (Doutorado) - University of Illinois, Urbana.

MARQUES JÚNIOR, A.P. *Fisiologia do puerpério na vaca*. *Rev. Bras. Reprod. Anim. Supl.*, p. 58-69, 1993.

MARQUES JÚNIOR, A.P.; BARRETO FILHO, J.B.; SATURNINO, H.M. *Aspectos morfológicos da placenta da vaca Zebu (Bos taurus indicus)*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.45, n.2, p.213-219, 1993.

McLAREN, A. Fertilização, clivagem e implantação. In HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*, 4 ed São Paulo: Manole, 1988 p.254- 279.

NOBRE, M.M.; COELHO, S.G.; HADDAD, J.P.A.; CAMPOS, E.F.; LANA, A.M.Q.; REIS, R.B.; SATURNINO, H.M. *Avaliação da incidência e fatores de risco da retenção de placenta em vacas mestiças leiteiras*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.1, p.101-107, 2012

NOVAES, A. P., ALENCAR, M. M., PARANHOS, N. E., RUZZA, F. J. *Retenção de placenta em vacas Canchim*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v.24, n.10, p. 1277-1289. 1989.

PAISLEY, L. G.; MICKELSEN, W. D.; ANDERSON, P. B. *Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infection of cows*. *Theriogenology*, v. 25, p.353-381, 1986.

PETER, A. T., BOSU, W. T. K. *Periparturient endocrine changes associated with retained placenta in dairy cows*. *Theriogenology*, v.28, n.3, p.383-394. 1987

REIMERS, T.J.; ULLMAN, M.B.; HANSEL, W. *Progesterone and prostanoid production by bovine nucleate trophoblastic cells*. *Biol. Reprod.*, v.33, n.5, p.1227-36, 1985.

ROBERTS, S.J. *Veterinary obstetrics and genital diseases*. 3ed. Ithaca: S.J Roberts, 1971.

ROSA, L. C. A., ANDRADE, P., SAMPAIO, A. A. M., SIQUEIRA, M. M., OLIVEIRA, M. D. S. *Efeito do selênio e vitamina E sobre a retenção de placenta do gado leiteiro*. *Ars. Vet.*, v. 1, n.1, p. 117-122, 1985.

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.

SANDALS, W.C.D.; CURTIS, R. A.; COTE, J. F.; MARTIN, S. W. *The effect of retained placenta and metritis complex on reproductive performance in dairy cattle: a case control study*. *Can. Vet. J.* n.20, p.131-135.

SANTOS, R.L. *Estudo morfológico da placenta de vacas leiteiras com liberação normal e com retenção*. 1995. 102p. Dissertação (Mestrado em 1995) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.

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*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.48, n.3, p.317-24, 1996.

SAS INSTITUTE INC. *SAS/STAT User's guide. Version 8*, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

SCHLAFFER, D.H.; FISHER, P.J.; DAVIES, C.J. *The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.145-160, 2000.

SINHA, A. K., DHANDA, O. P., RAZDAN, M. N. *Some possible factors associate with the incidence of retained placenta in cows, Indian. Vet. J.*, v. 55, n. 7, p. 521-525, 1978.

SHARPE, K.L.; EILER, H.; CULLEN, W.C.; HOPKINS, F.M. *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 placenta. Biology of Reproduction* v.43, p.229-235.1990.

SHELDON, I. M.; WILLIAMS, E. J.; MILLER, A. N. A. et al. *Uterine diseases in cattle after parturition. Vet. J.*, v. 176, p. 115-121, 2008.

SLAMA, H., VAILLANCOURT, D., GOFF, A. K. *Effect of bacterial cell wall and lipopolysaccharide on arachidonic acid metabolism by caruncular and allantochorionic tissues from cows that calved normally and those that retained fetal membranes. Theriogenology*, v. 41, n. 4, p. 923-924.

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.

TAKAGI, M.; FUJIMOTO, S.; OHTANI, M. *Bovine retained placenta: hormonal*

concentrations in fetal and maternal placenta. Placenta, v.23, p. 429-437, 2002.

TIZARD, I. *Imunologia Veterinária*. 6ed. São Paulo, Roca, 2002. 532p

THATCHER, W.W.; BILBYA, T.R.; BARTOLOMEA, J.A.; SILVESTREA, F.; STAPLES, C.R. ; SANTOS, J.E.P. *Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. Theriogenology*, v. 65, Issue 1, 7 Jan. 2006, p. 30644.

TONIOLLO, G. H.; VICENTE, W. R. R. *Manual de obstetrícia veterinária*. 2. Ed. São Paulo. Editora Varela, p.124, 2003.

WILLIAMS, W.F.; MARGOLIS, M.J.; MANSPEAKER, J. *Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention. Theriogenology*, v.28, n.2, p.213-23, 1987.

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.

WILTBANK, M.C.; LOPEZ, H.; SATTER, L.D. *Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. Animal Reproduction Science*, v. 81, Issues 364, p. 2096223, 2004.

WILTBANK, M. W. *Prevenção e tratamento da retenção de placenta*. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 11, 2008, Uberlândia. *Anais...*Uberlândia: 2008. p. 61-70.

WARD, J. W.; WOODING, F. B. P.; FOWDEN, A. L. *The effects of cortisol on binucleate cell population in the ovine placenta during late gestation. Placenta* n. 23, p.451-458, 2002.

WISCHRAL, A.; VERRESCHI I. T.N.; LIMA, S. B.; HAYASHI, L. F.; BARNABE, R. C. *Per-parturition profile of steroids and prostaglandin in cows with or without foetal membrane retention.* Animal Reproduction Science n. 67, p. 181-188, 2001.

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.

VAN WERVEN, T.; SCHUKKEN, Y. H.; LLOYD, J. *et al.* *The effects of duration of retained placenta on reproduction, milk production, postpartum disease and culling rate.* Theriogenology, v. 37, 1191-1203, 1992.

ZANETTI, M.A.; NEUNHAUS, L.E.D.; SCHALCH, E.; MARTINS, J.H. *Efeitos da Suplementação de Selênio e Vitamina E em Bovinos Leiteiros.* R. Bras. Zootec., v.27, n.2, p.405-408, 1998.

ZOCCAL, R. *Produção de leite, número de vacas e produtividade no mundo.* Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, 2010a.

9. Anexos

Anexo I. Certificado Cetea

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 67 / 2012, relativo ao projeto intitulado "Características morfológicas da placenta de vacas holandesas (*Bos taurus taurus*) e vacas mestiças (*Bos taurus indicus*), com e sem retenção+, que tem como responsável Antônio de Pinho Marques Jr., está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/05/2012. Este certificado espira-se em 11/05/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 67 / 2012, related to the Project entitled "Morphological characteristics of the placenta of Holstein cows (*Bos taurus taurus*) and crossbred cows (*Bos taurus indicus*) with and without +, under the supervision of Antônio de Pinho Marques Jr., is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/05/2012. This certificate expires in 11/05/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 11/05/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

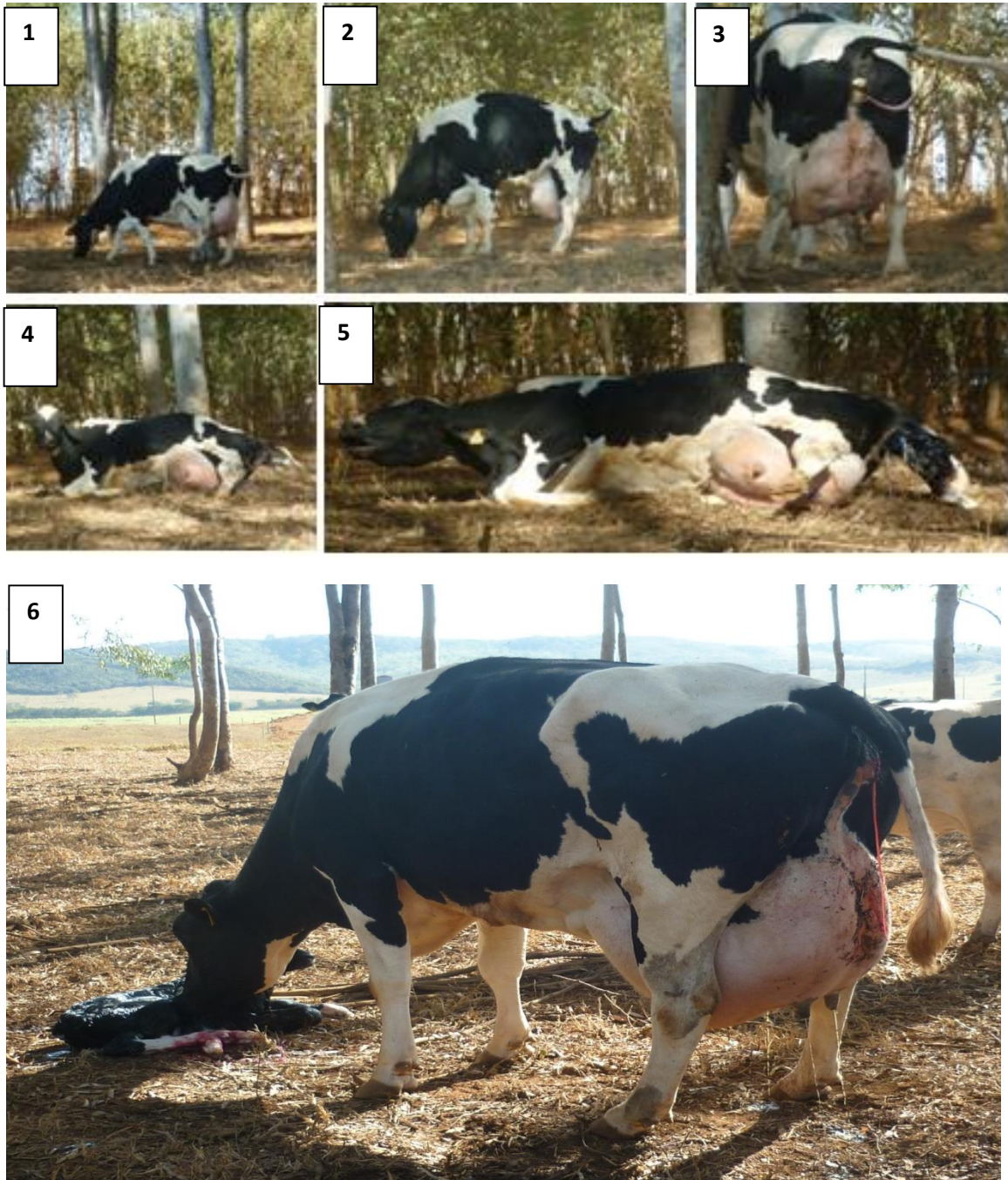
<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

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

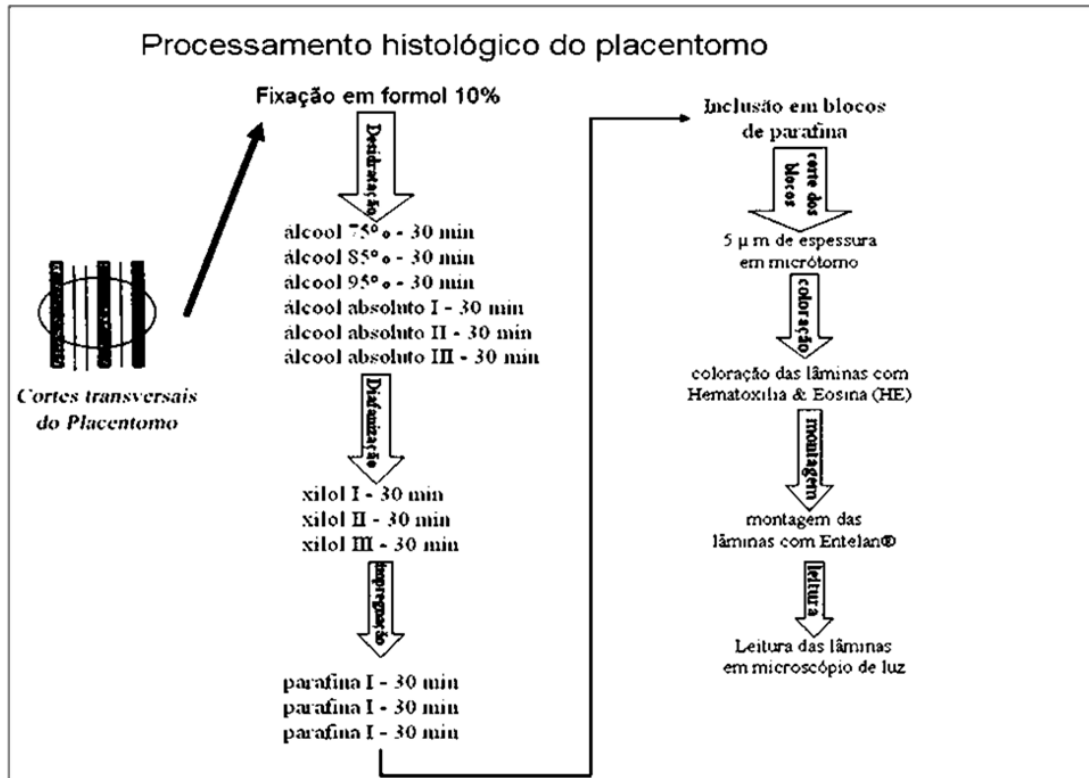
Anexo II. Lote de vacas no piquete maternidade.



Anexo III. Sequencia de fotos. Acompanhamento do parto. 1) Início do trabalho de parto 2) Contrações uterinas 3) Ruptura da bolsa amniótica 4) Insinuação fetal 5) Término da expulsão fetal 6) Reconhecimento da cria.



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



Anexo V. Contagens das células do epitélio caruncular em cada lâmina nos grupos 1, 2 e 3.

| Modelo de Tabela - Células do epitélio caruncular | | | |
|---|------------------|--------|---|
| Novilhas | | | |
| Categoria | Dias de Gestação | Lâmina | Epitélio Caruncular - 30 divisões - 40 campos |
| Novilhas | | L4 | 149 |
| | | L6 | 139 |
| | | L9 | 150 |
| | | L13 | 108 |
| | | L19 | 134 |
| Total | | | 680 |

| Modelo de Tabela - Células do epitélio caruncular | | | |
|---|------------------|--------|---|
| Vacas 2P | | | |
| Categoria | Dias de Gestação | Lâmina | Epitélio Caruncular - 30 divisões - 40 campos |
| Vacas 2P | | L2 | 132 |
| | | L3 | 122 |
| | | L8 | 117 |
| | | L11 | 118 |
| | | L18 | 137 |
| Total | | | 626 |

| Modelo de Tabela - Células do epitélio caruncular | | | |
|---|------------------|--------|---|
| Vacas 3p | | | |
| Categoria | Dias de Gestação | Lâmina | Epitélio Caruncular - 30 divisões - 40 campos |
| Vacas 3p | | L10 | 138 |
| | | L12 | 111 |
| | | L17 | 149 |
| | | L21 | 145 |
| | | L23 | 121 |
| Total | | | 664 |

Anexo VI. *Contagens das células binucleadas do trofoblasto em cada lâmina nos grupos 1, 2 e 3.*

| Modelo de Tabela - Células Binucleadas | | | |
|--|------------------|--------|---------------------------------|
| Novilhas | | | |
| Categoria | Dias de Gestação | Lâmina | Células Binucleadas / 40 campos |
| Novilhas | | L4 | 78 |
| | | L6 | 73 |
| | | L9 | 43 |
| | | L13 | 33 |
| | | L19 | 139 |
| Total | | | 366 |

| Modelo de Tabela - Células Binucleadas | | | |
|--|------------------|--------|---------------------------------|
| Vacas 2P | | | |
| Categoria | Dias de Gestação | Lâmina | Células Binucleadas / 40 campos |
| Vacas 2P | | L2 | 73 |
| | | L3 | 118 |
| | | L8 | 56 |
| | | L11 | 42 |
| | | L18 | 60 |
| Total | | | 349 |

| Modelo de Tabela - Células Binucleadas | | | |
|--|------------------|--------|---------------------------------|
| Vacas 3P | | | |
| Categoria | Dias de Gestação | Lâmina | Células Binucleadas / 40 campos |
| Vacas 3P | | L10 | 73 |
| | | L12 | 79 |
| | | L17 | 70 |
| | | L21 | 95 |
| | | L23 | 61 |
| Total | | | 378 |

Anexo VII. Contagens dos pontos que incidiram sobre o colágeno materno e fetal, em cada lâmina, nos grupos 1, 2 e 3.

| Modelo de Tabela - Colágeno | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------|-------------------------|-------|
| Novilhas | | | | |
| Categoria | Dias de Gestação | Lâmina | Pontos sobre o colágeno | |
| | | | Materno | Fetal |
| Novilhas | | L4 | 144 | 96 |
| | | L6 | 187 | 43 |
| | | L9 | 157 | 70 |
| | | L13 | 146 | 61 |
| | | L19 | 142 | 53 |
| Total | | | 776 | 323 |

| Modelo de Tabela - Colágeno | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------|-------------------------|-------|
| Vacas 2P | | | | |
| Categoria | Dias de Gestação | Lâmina | Pontos sobre o colágeno | |
| | | | Materno | Fetal |
| Vacas 2P | | L2 | 119 | 76 |
| | | L3 | 169 | 88 |
| | | L8 | 156 | 83 |
| | | L11 | 151 | 63 |
| | | L18 | 166 | 58 |
| Total | | | 761 | 368 |

| Modelo de Tabela - Colágeno | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------|-------------------------|-------|
| Vacas 3P | | | | |
| Categoria | Dias de Gestação | Lâmina | Pontos sobre o colágeno | |
| | | | Materno | Fetal |
| Vacas 3P | | L10 | 194 | 69 |
| | | L12 | 175 | 91 |
| | | L17 | 156 | 58 |
| | | L21 | 149 | 64 |
| | | L23 | 118 | 104 |
| Total | | | 792 | 386 |

Anexo VIII. Modelo de tabela. Avaliação da proporção volumétrica de alguns componentes do placentomo da vaca

| Modelo de tabela Avaliação da proporção volumétrica do placentomo da vaca | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------------|------|-------|--|-------------------------|-----------|--------------|----------------------|------------------|------------|-------|---|
| Unidade/Animal | Tempo de Gestação | Fase | Corte | Mensuras do produto que serão avaliadas: | | | | | | | | |
| | | | | Volume conjuntivo anterior | Volume conjuntivo fetal | Membranas | Mucosa fetal | Placenta desidratada | Epitélio Materno | Substância | Total | |
| x | vulva | C | 1º | | | | | | | | 0 | |
| | | | 2º | | | | | | | | 0 | |
| | | | 3º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 4º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 5º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 6º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 7º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 8º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 9º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 10º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 11º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 12º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 13º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 14º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 15º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 16º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 17º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 18º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 19º | | | | | | | | | 0 |
| | | | 20º | | | | | | | | | 0 |
| | B | B | B | 21º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 22º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 23º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 24º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 25º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 26º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 27º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 28º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 29º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 30º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 31º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 32º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 33º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 34º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 35º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 36º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 37º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 38º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 39º | | | | | | | | 0 |
| | | | | 40º | | | | | | | | 0 |
| Total | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |