FLÁVIA THOMAZ VERECHIA PEREIRA

DESENVOLVIMENTO DO PLACENTÔNIO EM BÚFALOS

(Bubalus bubalis bubalis Linnaeus, 1758)

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre, junto à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo

Departamento: Cirurgia

Área de Concentração: Anatomia dos
Animais Domésticos

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica
Miglino

São Paulo

2000

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Pereira, Flávia Thomaz Verechia

Desenvolvimento do placentônio em búfalos (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) / Flávia Thomaz Verechia Pereira.

76 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2000.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

Unitermos: 1.Anatomia. 2.Placenta. 3.Búfalos.
4.Ruminantes. 5.Microscopia.

DEDICATÓRIA

"A DEUS,

*...que, a tudo criou, sempre nos dá força e coragem para enfrentarmos
as lutas, nos abre o entendimento e nos dá sabedoria para
prosseguirmos..."*

*"Ao meu amado e querido esposo **GILBERTO PEREIRA** (in
memorian) pelo seu amor, força e apoio, por ter estado ao meu lado nos
momentos mais felizes e nos mais difíceis da minha vida..."*

À minha querida orientadora, Profa. Dr.a.

Maria Angélica Miglino, pela sua força,

seu exemplo, orientação, constante apoio,

incentivo, confiança e amizade.

*À Profa. Estela Bevilacqua, pelos seus
ensinamentos, dedicação, amizade e apoio.*

*Aos meus pais, Nélcio Augusto Verechia e Marília
Mondin Thomaz Verechia e ao meu irmão César
Thomaz Verechia, por acreditarem em minha
capacidade, por dedicarem-se à mim com paciência
e amor...*

*Aos meus familiares pelo apoio, incentivo e
consideração nos momentos onde sempre
necessitei...*

AGRADECIMENTOS

- ◆ Aos docentes do departamento de Anatomia dos Animais Domésticos da FMVZ-USP, pela sabedoria e amizade;
- ◆ Ao Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato pelos ensinamentos e pela alegria que tanto nos contagia;
- ◆ Aos Profs. Wilson e Nair Machado de Souza pela sabedoria e carinho;
- ◆ Aos meus grandes amigos e colegas de pós-graduação, Ana Flávia, Adriana, Tatiana, Rosa Helena, Rosângela, Alan, Andréia, Luciano, Carlos Eduardo (Cajú), Waleska, Marina, Regina, Marleine, Adelmar, Márcia, Ana Elise, Luciana e Malcon, pela amizade, apoio e paciência e aluno e colega Daniel;
- ◆ À minha querida amiga Eliane Harumi Yorinori que mesmo estando longe, continua muito presente em minha vida;
- ◆ Aos amigos do laboratório de Histologia e Embriologia do ICB-USP, Sônia, Eloísa, Mara, Luís, Cláudia, Andréia, Andrea, Guilherme, Helory e Rosângela, pelos ensinamentos e amizade;
- ◆ Aos funcionários do laboratório de Anatomia da FMVZ-USP, Ronaldo, Edinaldo e Wilson pela amizade;
- ◆ À Kazue e Aline pelo auxílio em diversos momentos;

- ◆ Aos funcionários do ICB-USP, Sr. Gaspar, D. Emília, Sr. Gerson, Edson, Sabrina, Marina e Renata pelo auxílio;
- ◆ Às funcionárias da biblioteca da FMVZ – USP;
- ◆ À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

PEREIRA, F.T.V. **Desenvolvimento do placentônio em búfalos (*Bubalus bubalis bubalis* Linnaeus, 1758).** São Paulo, 2000. 76p. [Development of the placenton in water buffalo (*Bubalus bubalis bubalis* Linnaeus, 1758)]. Dissertação. (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

A placenta de ruminantes possui uma estrutura macroscópica uniforme, baseada em áreas especializadas de aposição e proliferação das membranas materno-fetais: os placentônios. Mostrando um papel fundamental para o desenvolvimento da prenhez, estas estruturas tem sido muito estudadas em várias espécies domésticas de interesse comercial. Particularmente no búfalo, entretanto, não há dados consistentes quanto à sua capacidade funcional desta estrutura, ou até mesmo, a arquitetura dos vilos em um placentônio individual e sua troca eficaz de metabólitos que caracteriza o processo de placentação. Um estudo macroscópico prévio da placenta do búfalo (*Bubalus bubalis bubalis*) mostrou que o número de placentônios é de 92 aproximadamente durante a prenhez, mas a morfologia microscópica e o desenvolvimento de tais estruturas não foram estudadas em todas as fases da prenhez. Neste trabalho, estudou-se os placentônios de búfalos prenhez nos meses 4-5, 7-8, 9-10, os quais foram morfológicamente caracterizados. Os espécimes foram seccionados e fixados por imersão em paraformaldeído à 4% ou em glutaraldeído à 2,5% em tampão fosfato tamponado 0,1M para microscopia de luz e eletrônica, respectivamente. Após 24 horas, os placentônios foram recortados e processados para inclusão em paraplast, historesina ou em resina Spurr. As secções foram coradas por HE, Azul de Toluidina, Tricrômicos de Gomori e Mallory, Azul de Metileno com Fucsina Básica e submetidos à reação de PAS. Em todos períodos da prenhez encontrou-se placentônios de diferentes tipos e tamanhos, com uma estrutura macroscópica similar à do placentônio bovino, porém mais achatado. Aparentemente, durante o progresso da prenhez, os placentônios mantiveram a mesma morfologia macroscópica mas com dimensões aumentadas. À microscopia de luz, a interface entre o trofoblasto e o epitélio uterino é extremamente irregular, formando uma árvore fetal vilosa que se conecta com o epitélio materno. O trofoblasto consiste em uma camada simples de células individuais onde células binucleadas estão interpostas com as células trofoblásticas. O eixo da árvore vilosa é formado fundamentalmente por tecido conjuntivo frouxo, considerando que o eixo interno das pregas epiteliais apresentam um tecido conjuntivo rico em fibras colágenas. Quando comparadas às fases precoces de prenhez, as árvores vilosas dos meses 9-10, são mais ramificadas e a aposição da interface materno-fetal é mais próxima. Ainda, na junção materno-fetal no final da prenhez, encontrou-se regiões de hematomas e eritrofagocitose o que sugere transferência de ferro para o feto. À microscopia eletrônica de transmissão pudemos observar uma intensa vascularização do vilos fetal, as células binucleadas apresentaram REG (retículo endoplasmático granular) e Complexo de Golgi bem desenvolvidos, indicando comprometimento com síntese proteica e vesículas eram abundantes. As células epiteliais trofoblásticas mostraram-se unidas por complexos juncionais, principalmente desmossomas, núcleos de contorno esférico e até dois nucléolos bastante evidentes. Superfícies celulares com microvilos também foram observadas.

Unitermos: 1. Anatomia 2. Placenta 3. Búfalos 4. Ruminantes 5. Microscopia

SUMMARY

PEREIRA, F.T.V. **Development of the placenton in water buffalo (*Bubalus bubalis bubalis* Linnaeus 1758).** [Desenvolvimento do placentônio em búfalos (*Bubalus bubalis bubalis* Linnaeus, 1758)] São Paulo, 2000. 76p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

The ruminant placenta has an uniform gross structure based on specialized areas of feto-maternal membrane apposition and proliferation: the placentons. By exerting a fundamental role for the development of the pregnancy, these structures have been very well studied in several domestic species of commercial interest. Particularly in the buffalo, however, there is no consistent data with relationship the functional capabilities of this structure or even, the villus architecture in the individual placenton and their metabolic exchange efficacy that characterize the placentation process. One previous macroscopy study on the placenta of buffalo (*Bubalus bubalis bubalis*) has shown that the number of the placentons is 92 approximately during pregnancy, but the fine morphology and development of such structures were not studied in all phases of pregnancy. So, in this work, the placentons of pregnant buffaloes on months 4-5, 7-8 and 9-10 were morphologically characterized. The specimens were sectioned and fixed by immersion in either a 4 % paraformaldehyde or in 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer for light and electron microscopy, respectively. After 24 h, the placentons were cut and processed for embedding in paraplast, historesin or Spurr's resin. Sections were stained by HE, Toluidine Blue, Gomori's and Mallory's trichromes, Methylene Blue and Basic Fuchsin and submitted to PAS reaction. In all periods of the pregnancy, we found placentons of different shapes and sizes, with a gross structure similar to the bovine placenton, but more flattened. Apparently, during the progress of the pregnancy, the placentons maintained the same gross morphology but with increased dimensions. At light microscopy, the interface between the trophoblast and the uterine epithelium is extremely irregular forming a fetal villous tree that indents the endometrium. The trophoblast consists of a simple layer of individual cells where binucleated cells are interposed into the remaining trophoblast cells. The axis of the villous tree is fundamentally formed by loose connective tissue, whereas the internal axis of the epithelial folds presented a connective tissue rich in collagen fibers. When compared to early phases of the pregnancy, the villus tree on months 9-10 is much more branched and the materno-fetal interface closely appositioned. Still, in the feto-maternal junction in late pregnancy were found regions of hematomas and erythrophagocytosis. Ultrastructurally, we also observed: the intense vascularization of the fetal villous, binucleated cells presenting a much developed GER (granular endoplasmic reticulum) and Golgi complex, indicating intense secretory activity. The trophoblastic cells showed junctions (desmosomes), euchromatic nuclei and 2 evident nucleoli. The trophoblast and the uterine epithelium were close associated by interdigitated microvilli.

Uniterms: 1. Anatomy 2. Placenta 3. Buffaloes 4. Ruminants 5. Microscopy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3 MATERIAL E MÉTODO.....	28
3.1 Fixação e processamento do material para observação ao microscópio de luz....	30
3.1.1 Processamento em paraplast.....	30
3.1.2 Processamento em historesina.....	30
3.1.3 Fixação e processamento do material para observação ao microscópio eletrônico.....	31
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Resultados macroscópicos.....	33
4.2 Resultados microscópicos.....	40
4.2.1 Constituição histológica do placentônio bufalino.....	40
4.2.2 Período de 4 – 5 meses de prenhez.....	48
4.2.3 Período de 7 – 8 meses de prenhez.....	54
4.2.4 Período de 9 – 10 meses de prenhez.....	57
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÃO.....	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

A placenta de ruminantes possui uma estrutura macroscópica muito uniforme, baseada em áreas especializadas de aposição e proliferação das membranas materno-fetais: os placentônios. Mostrando um papel fundamental para o sucesso da prenhez, estas estruturas tem sido muito estudadas em várias espécies domésticas de interesse comercial.

Relativamente a bufalinocultura, verifica-se que todo o território brasileiro enseja condições satisfatórias para a criação de búfalos. A inigualável resistência que a espécie possui e a sua grande capacidade de transformar alimentos pobres em proteína animal (leite, carne) e trabalho justificam o seu aproveitamento no povoamento das regiões onde os bovinos não se adaptam com facilidade.

Os bufalinos são muito utilizados na produção zootécnica e apresentam ótimos resultados. Pertencem à ordem dos Artiodáctilos Ungulados, subordem *Ruminantia*, família Bovídea, sub-família Bovínea, gênero *Bubalus* e espécie *Bubalus bubalis bubalis*. Atualmente os índices de produtividade para carne, leite e trabalho são altos nas condições brasileiras. As raças mais importantes no Brasil são: Mediterrânea, Jafarabadi, Murrah, e Carabao. As três primeiras são chamadas de “Búfalos Pretos” e a última de “Búfalo Rosilho”.

A morfologia dos órgãos reprodutores dos búfalos assemelha-se àquela dos demais bovídeos. O primeiro estro ocorre aos 24-26 meses de idade e a puberdade aos 20 meses de idade. A média de idade da primeira parição ocorre entre 3-4 anos. O comportamento do búfalo no estro é de menor intensidade que nas vacas e é muito mais difícil de detectar. A média de duração do estro é de 12 a 28 horas. A

ovulação ocorre ao redor de 10 horas após o término do estro. A média de duração do ciclo estral é de 21-22 dias e da prenhez é de 310 a 330 dias. O intervalo entre partos está entre 400 a 600 dias.

Com vistas a contribuir com o estudo a respeito da morfologia dos bufalinos procurou-se elucidar algumas características morfológicas da placenta dos búfalos pretos (Fig. 1). Estes animais apresentam cariótipo $2n$ (50), exceto os Carabao, que possuem diferente número de cromossomos, cariótipo $2n$ (48). Para este estudo utilizou-se três grupos de animais em diferentes fases de prenhez; grupo 1 (animais de 4-5 meses de prenhez), grupo 2 (animais de 7-8 meses de prenhez) e grupo 3 (animais de 9-10 meses de prenhez).

A meta desse trabalho é caracterizar o desenvolvimento morfológico do placentônio dos búfalos, através de observações macroscópicas e de métodos histológicos de microscopia de luz e eletrônica e histoquímicos, ao longo de toda a prenhez.

FIGURA 1 – Búfalo (*Bubalus bubalis bubalis*).

2 REVISÃO DA LITERATURA

JENKINSON (1925) descreve que a placenta de ungulados é indecídua. Na superfície do saco coriônico há a produção de processos em forma de dedos ou vilos, formados por uma única camada de trofoblasto. O epitélio endodérmico do alantóide não se continua para dentro dos vilos. Esses vilos se adaptam dentro de depressões na parede do útero, conhecidas como criptas. As criptas são revestidas por um epitélio o qual é perfeitamente contínuo com o epitélio do útero e persistem através da gestação. A persistência do epitélio uterino é a marca real pela qual a indecídua é distinguida de outras placentas. Abaixo do epitélio das criptas há capilares maternos e tecido conjuntivo. Os vilos não se aderem próximo às paredes das criptas, e ao nascimento são facilmente removidos sem danificar o tecido materno. Na placenta cotiledonária, os vilos estão reunidos em cotilédones e regiões interferidas de cório liso. Os vilos, os quais são muito ramificados, se adaptam em criptas de correspondente tamanho, e a total agregação de criptas para recepção dos vilos de um único cotilédone, terminam no cotilédone materno. Os pontos na parede do útero onde esses cotilédones maternos serão formados, são predeterminados e reconhecidos como áreas elevadas - as carúnculas cotiledonárias antes da gestação, podem ser vistas de fato no útero da vaca. Os cotilédones fetais são espalhados em toda a superfície do cório, exceto nas terminações extremas, os então chamados "divertículos alantoidianos". A placenta cotiledonária é característica dos ruminantes e como exemplos de placentação indecídua temos a vaca e a ovelha.

McEWEN (1931) relata que em ruminantes os vilos coriônicos estão arrançados em ramos chamados de cotilédones, sendo então denominada a placenta

de cotiledonária e nos locais onde a maioria dos cotilédones maternos aparecem durante a prenhez existem áreas elevadas (carúnculas) no útero da vaca prenhe. Assim, a localização dos cotilédones embrionários são secundárias e determinadas pelas posições das carúnculas maternas.

LORDY (1940) cita que uma primeira tentativa de divisão dos vários tipos de placenta nas várias ordens de mamíferos é a que se reporta ao modo de reagir da mucosa uterina e ao comportamento desta durante o parto: decídua, as placentas cuja parte materna sofre a reação decidual; indecídua as de menor desenvolvimento. De acordo com sua forma e seu grau de complexidade, as placentas indecíduas e mais simples (semi-placentas) podem ser de aspecto difuso em torno do córioalantóide (placentas difusas), ou então o órgão placentário pode oferecer falhas, desenvolvendo formações múltiplas, separadas por intervalos (placentas múltiplas). No caso do órgão limitar-se a determinada região sob forma de cinta ou disco, formaria-se placentas zonárias e discoidais. Chama-se semi-placenta a forma mais simples do primeiro grupo e placenta verdadeira a dos demais grupos. Posteriormente foi descrita uma nova classificação dos tecidos placentários através de métodos histológicos, onde existem 4 formas, de acordo com as relações mantidas entre o cório e o sangue materno; 1) epiteliocorial, onde o trofoblasto entra em contato com o epitélio uterino conservado e é observada em Equídeos, Suídeos, Lemurídeos, 2) sindesmocorial, onde são incluídas as placentas incompletas e indecíduas e são observadas em ruminantes, 3) endoteliocorial, onde só se forma uma zona limitada ao cório, sendo chamada de zonária e ocorre nos *Carnívora*, nos *Chiroptera* e excepcionalmente em certos *Rodentia* e 4) hemocorial, onde o trofoblasto é altamente penetrante, proteolítico e se fixa profundamente após ter

ferido a mucosa decidual em sua zona compacta. Existe a placenta hemocorial discóide e a labiríntica.

Baseada na classificação de *Grosser* em 1909 (AMOROSO, 1952) as placentas foram agrupadas de acordo com as camadas de tecido materno que foram removidas pelo cório persistente durante o desenvolvimento. O número de camadas entre o sangue materno e o fetal estabilizam-se após a implantação e diferenciação precoce dos sistemas orgânicos e poderia afetar diretamente a troca fisiológica entre as circulações. *Grosser* classificou as placentas primeiro definindo as camadas maternas que estavam em justaposição ao cório na placenta definitiva, produzindo quatro categorias e incluiu os ruminantes na categoria sindesmocorial e definiu a placenta sindesmocorial madura como tendo perdido o epitélio uterino materno, sendo assim, o cório está em contato com um sincício materno-fetal e não com tecido conjuntivo. Um usual termo descritivo para esta situação, que retém uma referência para o termo mais antigo, seria “sinepiteliocorial”.

HAFEZ (1954) observou que durante a prenhez aumenta a vascularização dos cotilédones maternos e fetais e nas áreas intercotiledonárias. Nos estágios precoces de prenhez, não há contato próximo entre as membranas e os cotilédones maternos. Com o avanço da prenhez, os vilos aparecem na superfície da membrana coriônica e posteriormente os cotilédones fetais estão visivelmente arranjados em fileiras. Possuem superfícies livres, as quais adaptam-se em concavidades de cotilédones maternos.

De acordo com HARRISON *et al.* (1954), o placentoma do cervídeo *Dama dama* é formado pela conexão do componente fetal dos vilos (cotiledonário)

no interior das criptas maternas, as quais desenvolvem-se no componente materno (caruncular). O processo inicia-se com o aparecimento dos vilos fetais nas placas cotiledonárias. Isto ocorre antes, ou ao mesmo tempo, do desenvolvimento das criptas na carúncula materna. A formação das criptas nas carúnculas maternas parece iniciar-se nas carúnculas próximas ao feto no corno uterino prenhe e naquelas próximas à metade do corno uterino oposto. O epitélio invaginado inicialmente forma um sólido botão de células, com evidências de densa camada de tecido conjuntivo ao seu redor.

HAFEZ (1955) estudando a placenta de búfalos e camelos constatou que o período de prenhez é de 314 dias e que o tipo de placentação dos búfalos é cotiledonária e sindesmocorial. Vilos coriônicos foram observados nos cotilédones maternos, e o número de cotilédones variou de 42 a 147. O número bem como o diâmetro e a altura dos cotilédones variam com o estágio de prenhez e posição no útero. A placentação do camelo é do tipo difusa e epiteliocorial. Os vilos coriônicos são distribuídos uniformemente no cório em ambos os cornos uterinos. O número e altura dos vilos não variaram muito de acordo com o avanço da prenhez.

GREENSTEIN *et al.* (1958) afirmam que o desenvolvimento placentário nos bovinos é mais avançado adjacente ao embrião e menos avançado nas extremidades das vesículas coriônicas. A proliferação do trofoblasto é distintamente celular e é composto originalmente por “células de origem” indiferenciadas as quais dão origem, independentemente, a dois tipos celulares distintos característicos de estágios avançados de prenhez, as células colunares trofoblásticas ordinárias e as células gigantes. A origem fetal da célula gigante bovina está confirmada.

BJÖRKMAN e SOLLÉN (1960) observaram o placentoma bovino e concluíram que é composto por uma parte materna e uma fetal, as quais estão fundidas para constituir um órgão de troca fisiológica entre a mãe e a prole. Vilos coriônicos ramificados adaptam-se em criptas das carúnculas uterinas. Os vilos consistem de mesênquima vascularizado provido por uma simples camada de ectoderma trofoblástico celular. O trofoblasto consiste de células trofoblásticas e células gigantes binucleadas. As criptas carunculares estão acompanhadas por um epitélio cuboidal simples de origem materna. Ao nível celular, a aposição das membranas fetais na mucosa uterina está representada pela aderência do trofoblasto no epitélio criptal. As células criptais e trofoblásticas são providas por microvilos, os quais interdigitam-se, criando um considerável aumento na superfície de contato entre os tecidos materno e fetal.

ABDEL-RAOULF e BADAWI (1966) relatam que as carúnculas do placentoma de búfalas apresentam diferentes formas, sendo mais comumente alongadas e ovais. Elas diferem das encontradas nas vacas por serem relativamente menores e sem pedúnculo. A média do número de carúnculas é 126, variando de 71 a 229. As carúnculas mostraram um aumento progressivo em tamanho com o avanço da prenhez.

DAVIES e WINSATT (1966) descrevem que os vilos coriônicos da placenta da ovelha consistem de uma região central de mesênquima corioalantóide vascular e uma camada externa de trofoblasto colunar. Os componentes celulares da cobertura coriônica dos vilos são células trofoblásticas colunares e células gigantes binucleadas. O epitélio da cripta forma uma camada contínua a qual possui vários

núcleos e com citoplasma de aspecto similar àquele das células gigantes. O septo materno entre as criptas contém os vasos maternos fetais. Uma importante característica dos vilos coriônicos do placentoma em estágios avançados de prenhez, é a invasão do trofoblasto colunar pelos capilares corioalantóides. Neste processo, o qual não foi observado em nenhum estágio na zona intercotiledonária, os capilares começam a invaginar-se profundamente dentro do epitélio coriônico cujas células estão intimamente moldadas à eles. Nas micrografias eletrônicas percebe-se a continuidade da membrana basal com os pontos ao redor dos capilares intraepiteliais. O septo materno consiste de uma rede de fibras colágenas as quais estão embebidas nos vasos sanguíneos maternos. Na área intercotiledonária, o epitélio coriônico é simples ou pseudoestratificado colunar, apoiando-se em uma delicada membrana basal e o epitélio uterino é simples cuboidal ou colunar.

LAWN *et al.* (1969) relatam que a placenta da ovelha e cabra possui o epitélio trofoblástico constituído predominantemente de células colunares simples com células binucleadas interpostas à estas. O primeiro passo para o estabelecimento do placentoma é a aquisição de um contato mais íntimo entre o trofoblasto e o útero e microvilos maternos estão inseridos nas microcriptas fetais. Foram encontrados na superfície basal do epitélio, microvilos alongados irregularmente distribuídos. Estes microvilos penetram na membrana basal estendendo-se por muitos micrômetros dentro do tecido conjuntivo materno, onde eles se interpõe com os processos das células semelhantes ao trofoblasto.

BJÖRKMAN (1973) define a placenta como uma aposição ou fusão de tecidos da mãe e do feto para trocas fisiológicas. No tipo de placentação alantóide,

trocas materno-fetais são mediadas pela aposição da membrana corioalantóide na mucosa uterina, sendo que o componente fetal forma vilos coriônicos ramificados, adaptando-se em criptas endometriais correspondentes e formam microvilos entre si.

PELAGALLI *et al.* (1973) descrevem que a rede vascular das placentas de ovelhas, vacas e búfalas são diferenciadas ao nível dos cotilédones. As ramificações cotiledonares arteriais e venosas podem perfundir um ou mais cotilédones juntos. A vascularização dos vilos coriônicos é representada, em geral, por um calibre uniforme e fino dos vasos menores. Estes aspectos diferenciam-se nas três espécies, pelo tamanho diferente dos vilos, maiores no búfalo, menores nos bovinos e ovinos.

ENRIQUEZ-YAP (1975) descreveu o placentoma de búfalos Carabao como sendo uma estrutura em forma de cogumelo com uma superfície livre convexa e um pequeno pedúnculo. A membrana ou barreira placentária é composta por 6 camadas, nomeadas: no lado materno, 1. camada endotelial dos vasos sangüíneos endoteliais, 2. tecido conjuntivo endometrial, e 3. camada do epitélio endometrial da cripta; e do lado fetal, 4. camada epitelial dos vilos coriônicos, 5. centro do tecido conjuntivo dos vilos coriônicos e 6. endotélio dos vasos sangüíneos e centro dos vilos coriônicos. Nas criptas, as células gigantes binucleadas no placentoma bovino são células que migram dos vilos de origem. Sua função é mais provavelmente fagocítica, a partir do momento que foram observadas em áreas de contato entre trofoblasto fetal e epitélio criptal.

Segundo STEVEN (1975), em ovinos, o saco cório alantóide que encerra o concepto possui de 80 a 100 tufo de vilos, arranjados em quatro fileiras paralelas

aproximadamente e os tufos de vilos não se desenvolvem ao acaso, suas localizações são determinadas pela distribuição de estruturas complementares no endométrio uterino, conhecidas como carúnculas e estas já são presentes no útero não prenhe. A carúncula materna e o cotilédone fetal juntos formam uma unidade funcional chamada placentoma. Os placentomas são ricamente vascularizados por ambos vasos materno e fetal e constituem as principais áreas de trocas placentárias. Cada placentoma tem uma depressão central na sua superfície interna portanto, visto em secção vertical, é aproximadamente em forma hemisférica. Os principais vasos maternos e fetais são arranjados como raios destes hemisférios. Os vasos maternos originam-se na perifeira da placentoma e estendem-se para a depressão central, enquanto os vasos fetais buscam o curso oposto. A placenta da ovelha é epiteliocorial e os placentomas contém ambos vasos capilares fetais e maternos. Em estágios mais avançados de prenhez, estrias alongadas aparecem nas áreas cotiledonárias do trofoblasto. Estes crescimentos são vilos que começam a se interdigitar com as depressões ou criptas na superfície das carúnculas uterinas. Os vilos adquirem um centro mesodérmico que inclui os vasos sangüíneos alantóides. Eles aumentam em comprimento e se ramificam em várias direções, aparentemente crescendo para dentro do tecido materno, sendo que na placenta de ruminantes há duas circulações placentárias que se encontram paralelamente às circulações gerais da mãe e do feto respectivamente. Cada uma separada da outra por uma ou mais camadas do tecido placentário. A princípio, seria possível restringir a nomenclatura a dois termos, circulação placentária fetal e circulação placentária materna. Os vasos maternos na placenta são desenvolvidos da vasculatura uterina, e os vasos que suprem e drenam a placenta não podem ser prontamente isolados daqueles que vascularizam o que resta

do útero prenhe. A angiografia demonstra a circulação placentária uterina e materna juntas. Neste contexto é correto falar em uma circulação uteroplacentária. A taxa de sangue fetal que passa para a placenta alantocoriônica é freqüentemente medida na artéria ou veia umbilical e expressada ao fluxo sangüíneo umbilical. A estrutura placentária é extremamente diversa do ponto de vista fisiológico, entretanto, é aparente que muitas adaptações hemodinâmicas são comuns a placentas de estruturas macroscópicas bem diferentes.

De acordo com BJÖRKMAN (1976), a placenta de bovinos é cotiledonária, indecídua, vilosa e epiteliocorial. O placentoma bovino é uma estrutura convexa que possui um pedúnculo contendo vasos sangüíneos maternos. Os vilos coriônicos consistem de um eixo principal que ramifica-se progressivamente em vilos de ordens maiores. Os vilos coriônicos consistem de mesênquima vascular recoberto por uma única camada de trofoblasto e os vilos geralmente adaptam-se em criptas carunculares correspondentes, onde o septo principal dá origem à septos de ordens secundárias e ordens maiores para formar o componente materno. O epitélio criptal é cuboidal ou achatado. As células tem núcleos esféricos com núcleolos distintos.

MYAGKAYA *et al.* (1976) descrevem que uma das características morfológicas mais impressionantes no placentoma da placenta ovelha é a presença de hematomas na base dos vilos coriônicos, sendo esta região chamada de zona arcada. Estes hematomas aparecem nos 70-80 dias de prenhez e são desenvolvidos em estágios avançados da prenhez. Supõe-se que estes hematomas sejam resultado da erosão direta dos capilares fetais nos topos dos septos intervilosos pela junção

trofoblástica, mas algumas observações histológicas, sugerem que o escape de sangue é somente esporádico e pode ser induzido, por outro lado, pela erosão direta dos vasos maternos. Em áreas onde ocorrem hematomas, sangue materno se acumula em grandes quantidades opostas ao trofoblasto e eritrócitos são ingeridos pelas células trofoblásticas. Várias investigações têm mostrado que os processos de eritrofagocitose em mamíferos têm características comuns sob várias condições e envolvem alterações sub-celulares típicas da membrana dos eritrócitos e hemoglobina sob ataque das enzimas lisossomais.

KING *et al.* (1979) relatam que os placentomas de bovinos ao 30º dia de prenhez são visíveis na superfície interna do útero fixado, como estruturas ovais, discretas com aspecto mais claro que os tecidos ao seu redor. A interface materno-fetal estende-se quase completamente achatada e com ondulações delgadas, mas vilos e criptas não são evidentes. Os microvilos estão presentes em ambas células epiteliais uterinas e trofoblásticas, as quais estão apostas muito próximas e uma tênue conexão desenvolveu-se entre as duas camadas. Vilos e criptas os quais foram formados no 33º dia subsequente estenderam-se e formaram ramos secundários. O epitélio uterino estava composto principalmente de células cuboidais claras as quais se interpunham com várias células alongadas, particularmente em estágios precoces de prenhez, e por algumas células gigantes multinucleadas com citoplasma pequeno. O tipo de célula maior no trofoblasto foi colunar baixo, célula epitelial interposta com células gigantes. Material lipídico estava presente nas células uterinas e trofoblásticas examinadas nos estágios precoces de prenhez. Uma extensa rede de vacúolos desenvolveu-se em muitas células epiteliais uterinas entre os dias 33º e 42º, mas sua vacuolização foi subsequente reduzida.

KING *et al.* (1980) estudaram o desenvolvimento do placentoma bovino dos dias 20º ao 29º de prenhez e observaram que do dia 20-21, o trofoblasto estava em aposição próxima ao epitélio caruncular com microvilos de células maternas interdigitando a borda apical das células embrionárias. Interdigitações mútuas de microvilos estavam presentes no 24º dia e isto progrediu para a íntima conexão no 27º dia. Em estágios precoces, tipos celulares maternos variaram de colunar alto a muito fino, células alongadas com algumas células multinucleadas excessivamente grandes, mas começando uniformemente cuboidais no dia 29. Células trofoblásticas gigantes, sem microvilos, foram observadas em contato com o epitélio materno nos estágios observados.

LEISER e ENDERS (1980) descrevem hematomas na região central da placenta zonária a termo do gato doméstico, que inclui áreas juncionais paraplacentárias e hematomas marginais. O epitélio uterino se torna altamente proliferativo, especialmente nas pregas ou protusões. Esta superfície hiperplásica e o tecido conjuntivo tornam-se simplásmicos e degenerados, eventualmente resultando em uma queda vascular materna. O lúmen uterino, portanto, contém sangue materno somando-se às células uterinas. O citotrofoblasto aparentemente fagocita e ingere este material. Vários estágios de fagolisossomos contendo eritrócitos de variáveis densidades, são vistos nestas células, como estruturas mielínicas, ferritina, glicogênio e gotas lipídicas. Depósitos de ferro cristalóide são observados na lâmina basal e tecido conjuntivo subjacente ao citotrofoblasto hemofágico.

HAFEZ (1982) relata que em ruminantes, os cotilédones fetais fundem-se com as carúnculas ou projeções especializadas da mucosa uterina, formando os

placentomas ou unidades funcionais. As carúnculas são convexas na vaca e côncavas na ovelha e na cabra. Na ovelha, o número de placentomas varia de 90 a 100 e são igualmente distribuídos entre os cornos gestante e vazio. Na vaca 70 a 120 placentomas desenvolvem-se ao redor do feto e progridem em direção ao limite distal da membrana corioalantóide no corno vazio. Durante a prenhez, os placentomas aumentam diversas vezes o seu diâmetro original. Aqueles situados mais ou menos no centro do corno gestante desenvolvem-se em tamanho maior do aquele das extremidades. Durante este crescimento, eles alteram-se na forma, de órgãos achatados em forma de placas, para estruturas arredondadas, pedunculadas em forma de cogumelo, as quais, com exceção de uma área ao redor do pedúnculo, são absorvidas completamente pela membrana corioalantóide. As carúnculas hipertrofiam-se, porém o grau de desenvolvimento é usualmente menor do que aquele do corno gestante. A vascularização da placenta é realizada pelas artérias e veias uterinas, porém devido à dificuldade de separação do suprimento placentário daquele da parede uterina, geralmente é referida como circulação útero-placentária.

SHARMA *et al.* (1983) observaram, nos búfalos, que as carúnculas maternas e os cotilédones fetais aproximavam-se um com o outro, constituindo uma unidade funcional. O cotilédone é constituído por numerosos vilos coriônicos finos ramificados e intensamente vascularizados, os quais adaptam-se em criptas da carúncula materna. Cada vilo consiste de um centro de mesênquima vascular acompanhado por células trofoblásticas. O trofoblasto é constituído por epitélio simples cuboidal ou colunar o qual freqüentemente mostrou células gigantes simples e binucleadas com raras células gigantes multinucleadas PAS positivas. A aparência sincicial da camada trofoblástica foi comumente observada no placentoma ao

microscópio de luz. Na base do vilo coriônico principal, o trofoblasto parece ser pseudoestratificado, especialmente onde ele contacta com o septo materno. Extensos capilares são observados em ambas células da camada trofoblástica e na mesênquima. A carúncula materna é semelhante a um arranjo de favo-de-mel. As criptas que rodeiam os vilos, variam em comprimento e correspondem ao número de vilos coriônicos.

STEVEN (1983) descreve que em ruminantes o epitélio coriônico é uma única camada e celular, mas nos estágios precoces de desenvolvimento embrionário, as células trofoblásticas são de dois tipos diferentes. As células principais ou uninucleadas são colunares ou cuboidais em forma e estão conectadas ao epitélio margeando o útero com uma interdigitação próxima aos microvilos maternos e fetais. Células binucleadas estão interpostas entre as células principais do trofoblasto, mas estão usualmente separadas da interface materno – fetal e da membrana basal do epitélio por uma fina lâmina de citoplasma derivada das células uninucleadas. Surpreendentemente, a junção microvilosa permanece intacta no momento do parto: a linha da separação placentária está entre a base do epitélio coriônico e está abaixo da membrana basal.

Estudando os placentomas da placenta da búfala, RAM e CHANDRA (1984) descrevem que o número de placentomas aumentam de 89 para 173 durante o começo e o meio da prenhez. Com o avanço da prenhez, há aumento gradual do número de placentomas na vaca e búfala. Durante prenhez avançada a medida cefalococcígea, pela qual estima-se o período de prenhez (CR) aumentou de 36 para 72 cm, entretanto, o número de placentomas diminuiu de 162 para 77. Esta

diminuição era particularmente marcada durante o estágio de CR 37 para 45 cm. O número de placentomas era geralmente maior no corno prenhe, comparado ao corno não prenhe. O formato dos placentomas variou de esférico, forma de ferradura, feijão ou rim, durante o início da prenhez. Na metade da prenhez, estes começaram como forma de cogumelo, forma de "S" ou elíptico e na prenhez avançada era elíptico, forma de contas, ou irregular. O pedúnculo do placentoma do búfalo era menor que o do bovino. Descrevem também que a área intercotiledonária é pregueada e com o avanço da gestação a distância intercotiledonária aumenta. O cório aparece altamente vascularizado e mostra desenvolvimento de numerosos vilos na prenhez avançada.

De acordo com MURAI e YAMAUCHI (1986) sangue extravasado, apareceu no espaço entre a base dos vilos coriônicos e septos carunculares no 76º dia de prenhez da ovelha. Esta estrutura aumentou em número e tamanho com o progresso da prenhez, e houve desenvolvimento do hematoma após 150 dias de prenhez. A camada epitelial do tecido septal caruncular materno, voltado para a zona arcada continha uma grande quantidade de gotas lipídicas e mostrava sinais de degeneração. Admite-se que os produtos degenerativos sejam absorvidos pelo trofoblasto como um histiotrófo.

KING e ATKINSON (1987) observaram que a placentação nos ruminantes envolve uma adesão generalizada do cório com o epitélio uterino e, mais adiante, modificações nas interfaces carunculares e cotiledonárias para formar os placentomas. Um tênue contato entre a aposição das camadas embrionária e materna é mantido por interdigitações de microvilos e subsequente consolidação dos placentomas pela formação dos vilos fetais, os quais penetram nas criptas maternas,

ancorando as membranas à sua superfície. Células binucleadas coriônicas migram através da interface e são incorporadas no epitélio materno mas nunca penetram além da membrana basal. Esta última característica está em contraste com o processo de implantação em muitos outros animais eutérios onde a conexão é demonstrada em seguida pela penetração e invasão do tecido coriônico dentro do estroma endometrial com subsequente formação do labirinto placentário.

LATSHAW (1987) descreveu a placenta dos ruminantes como cotiledonária e mencionou que tradicionalmente tem sido mencionada histologicamente, como sindesmocorial; estudada através de microscopia eletrônica, ela deveria ser considerada epiteliocorial. No lado materno, as áreas de contato ou carúnculas são permanentes, especificamente localizadas e de número constante no indivíduo (70 a 140 na vaca). As carúnculas estão dispostas em fileiras e acham-se determinadas em fase precoce do desenvolvimento pré-natal do útero. No lado fetal, as áreas de contato são designadas cotilédones e não são predeterminadas. Embora os maiores sítios para a formação dos placentomas sejam as carúnculas, é possível ocorrerem placentomas acessórios nas áreas intercarunculares. O epitélio materno da área intecotiledonária aparece ciclicamente renovado por novo epitélio. Células degeneradas são absorvidas pelo trofoblasto por fagocitose ou pinocitose. Nos bovinos, o trofoblasto da base de cada vilo é colunar e começa progressivamente cuboidal próximo ao topo do vilo. O epitélio das criptas é irregular e tende à cuboidal, mas na ovelha e cabra é sincicial. O sincício origina-se das células trofoblásticas binucleadas nestas espécies. Interdigitações entre os microvilos do trofoblasto e do epitélio criptal, estão presentes. Os centros de tecido conjuntivo dos vilos fetais e o tecido conjuntivo dos septos que margeiam os placentomas, são

ricamente vascularizados. Durante a segunda metade da prenhez, extravasamento de sangue materno pode ser visto em áreas na base dos vilos e na ovelha, na área interdigitada do placentoma. O trofoblasto fagocita este sangue extravasado e isto é provavelmente um suprimento de ferro para a hemopoiese fetal.

MOSSMAN (1987) afirma que pequenas áreas absortivas e fagocíticas do córioalantóide de ungulados (aréola, sistemas arcados, pregas marginais, etc.), são as maiores características através desta ordem, embora há vários subgrupos em quais eles não têm sido reportados. As formas mais comuns são: glândula areolar oposta a desembocadura, um sistema arcado entre a base dos vilos, e pregas marginais. Os placentomas das placentas cotiledonárias tem pregas marginais do corioalantóide cobertas com citotrofoblasto que absorve obviamente as secreções das glândulas endometriais grandes, abrindo-se ao redor da base dos pedúnculos carunculares, uma configuração relatada para a forma de carúnculas côncavas.

DANTZER *et al.* (1988) descrevem que a placenta dos caprinos e ovinos é cotiledonária ou múltipla, vilosa e epiteliocorial. As 80-100 unidades placentárias materno-fetais, então chamadas placentomas, são compostas por uma parte fetal, o cório frondoso ou cotilédone, o qual é uma agregação de vilos fetais vascularizados e ramificados, e a parte materna, a carúncula. Durante a prenhez as carúnculas crescem e desenvolvem-se dentro de profundas criptas ramificadas, desse modo sendo complementar para os vilos cotiledonários opostos. Os placentônios são muito vascularizados pelos vasos maternos e fetais e constituem as principais áreas de troca placentária. A artéria fetal entra no placentônio pela depressão central do lado fetal e ramifica-se em artérias menores, as quais estão localizadas no centro dos vilos fetais.

Neste curso, para o topo dos vilos, ela envia arteríolas menores para dentro do lado ramificado dos vilos. Próximo às terminações ramificadas dos vilos, a arteríola continua-se na rede capilar. Na base dos vilos, a rede capilar continua-se com as vênulas fetais. A arteríola materna mostra um curso através dos septos que margeiam as criptas carunculares em direção aos topos dos septos. Há no lado fetal da carúncula, os ramos da rede capilar mostrando contornos irregulares nas ramificações das criptas maternas para o lado materno, onde a rede converge em direção às veias maternas do pedúnculo caruncular.

VALE (1988) relata que existe similaridade entre o sistema genital da búfala com o da vaca taurina e zebuína, e que na búfala a puberdade e a maturidade sexual ocorrem mais tardiamente que nos bovinos, com uma variação de 24 a 30 meses, para o tipo leiteiro, e para o Carabao, de 36 meses. O período de prenhez excede os 300 dias, podendo haver variação nesta característica, influenciada pela estação do ano, clima, alimentação e posição geográfica.

BARONE (1990) descreve o tipo estrutural da placenta de ruminantes como sendo sindesmocorial e cotiledonária, constituindo um tipo intermediário entre as placentas decíduas e indecíduas. Cita ainda que o placentoma comporta uma carúncula uterina com um cotilédone fetal.

Segundo LEISER e EGLOFF (1990), a troca transplacentária difusional de substâncias entre a mãe e o conceito, em parte depende da espessura e da estratificação da membrana interhemática placentária ou barreira placentária. A fusão do trofoblasto e o epitélio uterino pode ser observada na placentação epiteliocorial dos ruminantes como um processo principalmente não degenerativo. As chamadas

células binucleadas trofoblásticas migram entre a zona de contato materno-fetal ou dentro do epitélio uterino. A transferência de substâncias pelos grânulos trofoblásticos é facilitada por direta penetração dentro das células epiteliais uterinas. As lâminas basais do endotélio e trofoblasto especialmente trabalham como um filtro de macromoléculas.

MIGLINO (1991) relata em placenta de bovinos que os formatos dos cotilédones podem ser: circular, elíptico ou quadrangular, sendo a maioria ovóide e alguns reniformes. Em alguns casos havia fusão de cotilédones vizinhos em diversos graus. O número máximo de cotilédones encontrados foi de 147, o mínimo de 54, sendo o número médio de 88 por placenta nas fêmeas Holstein, e nas fêmeas Hereford, o máximo foi de 114, o mínimo de 68, sendo então, o número médio de 88 cotilédones por placenta. A paraplacenta é a porção intercotiledonária, o órgão placentário desprovido de cotilédones e sua vascularização é realizada por artérias e veias umbilicais.

KATHIRESAN *et al.* (1992) observando a placenta de búfalas com prenhez entre 39 e 75 dias, descreve o placentoma como sendo constituído de fibroblastos da lâmina própria para o lume uterino. Eles formam ramos primários, secundários e terciários que resultam em canais e dilatações. Estes canais e dilatações eram invadidos e preenchidos por trofoblasto coriônico PAS positivo fortemente corado, formando o placentoma. As glândulas uterinas eram pregueadas e cobertas com epitélio caruncular característico. Correspondentemente pregas espessas do trofoblasto enfileiravam-se com epitélio coriônico. Em relação à membrana placentária, em todas as fases de gestação os vilos coriônicos das placentas

continham mesênquima vascularizado e eram completamente recobertos através de epitélio trofoblástico. O epitélio trofoblástico em geral, era composto de uma única camada de células cuboidais fortemente coradas e em vários locais formou duas ou mais camadas espessas. Especialmente havia muitas células binucleadas e multinucleadas nesta camada na porção aposta ao epitélio caruncular mas uma verdadeira estrutura sincicial não foi notada. Em muitos locais, células sofriam divisões mitóticas claramente observáveis. O epitélio da área intercotiledonária mostrou células colunares altas entremeadas com muitas células arredondadas e a porção caruncular com células colunares e lâmina própria voltada para o lume. Havia menor número de células binucleadas. A área supranuclear e a margem livre irregular das células trofoblásticas que rodeavam a membrana, mostraram grânulos PAS intensamente positivos. Muitas das células binucleadas como também outras células gigantes que acompanhavam o epitélio coriônico, mostraram citoplasma intensamente PAS positivo.

WOODING (1992) cita que na placenta de ovinos, as células binucleadas aumentam em tamanho e desenvolvem um extenso retículo endoplasmático granular e um grande complexo de Golgi. Posteriormente há a produção de considerável número de grânulos característicos, os quais contêm numerosas proteínas e glicoproteínas, incluindo hormônios lactogênicos placentários.

LAMMING (1994) relata que os placentomas diferem em sua estrutura macroscópica, tornando-se côncavo no lado fetal na ovelha e cabra, mas convexo na vaca e achatados em antílopes. As diferenças são, provavelmente, sem significado funcional, desde que a ovelha (normalmente côncavo), tenha suas carúnculas

removidas cirurgicamente do útero não-prenhe, então a placenta resultante teria cotilédones pequenos, grandes, e convexos.

LEISER & KAUFMANN (1994) afirmam que em todos os tipos de placenta conhecidos há aumento da área de contato entre as superfícies materna e fetal, formado por interdigitações mais ou menos intensas em ambos tecidos, maternos e fetais. Entretanto, em muitos animais, semelhantes interdigitações são encontradas em áreas discretas. A placenta cotiledonária, típica dos ruminantes, é caracterizada por muitas regiões placentárias marcadas (placentomas), as quais estão separadas por áreas intercotiledonárias de cório liso, o qual possui a estrutura membranosa fina. Na maioria dos ruminantes, o cório forma árvores vilosas, as quais adaptam – se aos correspondentes tecidos maternos. Isto ocorre na placentação do tipo vilosa. Na vaca e em outros ruminantes, estes vilos aprofundam – se em correspondentes criptas, formadas por endométrio amplamente intacto. No caso da placenta sinepiteliocorial dos ruminantes há células trofoblásticas binucleadas que se fundem com as células uterinas epiteliais, formando um sincício.

WOODING *et al.* (1997) citam que a placenta de ruminantes mostra uma uniformidade considerável da sua estrutura macroscópica através dos gêneros, uma aposição achatada do trofoblasto (epitélio coriônico) no epitélio uterino com um número variável de placentomas. Há uma enorme variação no número e tamanho entre várias espécies, de quatro a seis grandes no cervídeo para 100 – 150 menores na vaca e em alguns antílopes. O tamanho do placentoma é determinado pelo comprimento e complexidade dos vilos, mas parece não haver ótimo arranjo desta estrutura. O número máximo de placentomas é espécie específico e determinado pelo

número de carúnculas pré-formadas presentes no útero neonatal. As carúnculas são áreas de endométrio das quais glândulas estão ausentes e que possuem uma organização vascular completamente diferente das áreas glandulares.

FEITOSA-JÚNIOR (1997) descreve o formato dos cotilédones na placenta de búfalos variando de circular, elíptico ou quadrangular e ainda de formato ovóide e reniforme. Em alguns casos havia fusão de cotilédones vizinhos em diversos graus. O número máximo de cotilédones encontrados foi de 134, o mínimo de 64, sendo então, o número médio de 92 cotilédones por placenta. A área intercotiledonária ou paraplacenta é a parte da membrana corioalantóide desprovida de placentônios. A vascularização dessa região é realizada pelas artérias e veias funiculares.

LEISER *et al.* (1997a) relatam que a placenta bovina é classificada como cotiledonária por haver múltiplos cotilédones separados os quais mantêm interdigitações vilosas dos vilos coriônicos com criptas maternas nas carúnculas uterinas. A barreira interhemática é epiteliocorial ou sinepiteliocorial devido à células binucleadas do trofoblasto sincicial fundirem – se com o sincício do epitélio uterino. A interrelação do fluxo sanguíneo entre os sistemas sanguíneos maternos e fetais, é uma mistura de corrente-cruzada com contra-corrente na vaca o qual é considerado como um eficiente tipo de troca difusional transplacentária, como por exemplo de oxigênio, quando comparado com outras espécies. O tipo do placentoma bovino que encontraram era geralmente em forma de cogumelo e constituído de dois componentes: o tecido materno do pedúnculo caruncular sustentando os septos e lâminas basais do placentoma, o tecido fetal o qual forma cotilédones orientados para

o lado fetal com as lâminas coriônicas do placentoma recobrimdo o tecido materno como uma capa. Devido à esta convexidade, o tipo de árvore vilosa única era cônica, com uma base grande estreitando-se ao topo como árvore de natal. Essas árvores exatamente radiadas das lâminas coriônicas na direção materna, eventualmente ramificam-se para formar vários topos livres.

LEISER *et al.* (1997b) descrevem que uma extraordinária variabilidade de estruturas placentárias têm sido desenvolvidas através das espécies de mamíferos. As placentas de ruminantes e humanas são estruturalmente similares do tipo viloso. Em ambas, as árvores vilosas corioalantóides desenvolvem-se acima dos cotilédones placentários fetais. Em ruminantes, um cotilédone penetra no sistema septal materno da carúncula endometrial, ambos juntos formam numerosos placentomas. Nos humanos, os cotilédones protuem-se dentro de extensos espaços sangüíneos intervilosos maternos de um único disco placentário policotiledonar.

ENDERS *et al.* (1998) demonstram que em vários artiodáctilos, células trofoblásticas binucleadas se fundem com células epiteliais uterinas, formando um sincício heterocariótico situado no estroma materno. Esta modificação do tipo epiteliocorial tem sido adequadamente nomeada sinepiteliocorial. As vantagens dos tipos epiteliocoriais de placentação incluem a manutenção da integridade normal dos tecidos materno e fetal, resultando em barreiras epiteliais para troca antigênica.

LEISER *et al.* (1998) relatam que a placenta cotiledonária múltipla dos ruminantes como a ovelha e a vaca, é epiteliocorial, e o sub-tipo sinepiteliocorial, desde que o trofoblasto produza células binucleadas, as quais migram em direção a células epiteliais uterinas e se fusionam com elas, criando células híbridas

“sinepiteliocoriais”. Há por volta de 100 unidades placentárias materno-fetais, chamadas placentomas, que são compostas de uma parte fetal, o cotilédone e uma parte materna, a carúncula, representando um sistema extenso de criptas alinhadas por septos com paredes irregulares, devido às invaginações. A forma do placentoma é como a de um cogumelo no bovino, expondo árvores vilosas em cones ou em forma de árvores de natal, enquanto que os placentomas são como taças na ovelha, exibindo árvores vilosas como o álamo, cilíndricas e longas. O padrão de ramificação das árvores vilosas fetais do bovino na metade da prenhez é similar àquele do ovino próximo ao termo, por exemplo, o ângulo da ramificação dos vilos intermediários dos vilos de origem é geralmente agudo. Entretanto na placenta bovina à termo, este é um ângulo reto, permitindo um arranjo muito denso da árvore vilosa. Esta estrutura especial na árvore vilosa bovina pode somente ser demonstrada por comparação dos resultados da histologia e moldes de vasos sanguíneos. A maneira da impressão complementar materna-fetal das árvores vilosas cotiledonárias e os septos carunculares, atribuem aos ruminantes um tipo viloso complexo, preferível, de placenta. Este padrão é mais pronunciado na placenta bovina próxima ao termo, e pode ser compensada na ovelha pelo aspecto de taça estreita dos placentomas, comparados à forma de cogumelo na vaca.

Segundo DANTZER (1999) a placenta bovina é um sub-tipo da placenta epiteliocorial devido à que as formações celulares ocorrem por fusão das células binucleadas migrando com as células epiteliais, sendo então denominada portanto, placenta sinepiteliocorial. Em ovinos e caprinos a forma do placentoma é côncavo comparado ao convexo dos bovinos. O saco vitelínico é muito similar ao do suíno e regride muito precocemente na gestação. O blastocisto alonga-se e começa a

imobilizar-se pelo desenvolvimento de uma longa papila trofoblástica celular, a qual estende-se dentro da abertura da glândula uterina ao redor do dia 18 pós-coito. Isto é demonstrado pela migração das células trofoblásticas binucleadas para o epitélio uterino, onde elas fundem-se com as células epiteliais as quais então começam trinucleadas. Essas ocorrem nas proeminências endometriais glandulares livres, as carúnculas e as regiões intercarunculares onde as glândulas uterinas estão localizadas. Durante a gestação, os vilos do septo criptal começam enlongar-se, aprofundar-se e ramificar-se. Isto leva à uma sucessiva diminuição no mesênquima nos vilos e no tecido conjuntivo no septo criptal. Seus respectivos centros são compostos principalmente pelos vasos e rede de capilares. A membrana interhemática contém elementos celulares característicos com desenvolvimento apropriado por transporte e metabolismo epitelial. Inclusões lipídicas basais nas células criptais maternas são características.

3 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização desse trabalho utilizou-se placentas de 11 animais em diferentes fases da prenhez, provenientes do *campus* de Ilha Solteira (SP)-UNESP e de abatedouros-frigoríficos em São João da Boa Vista-SP e Feira de Santana-BA.

Considerando que a prenhez da búfala é em média de 315 dias (10 meses) (FONSECA, 1986), o material foi dividido em 3 Grupos : Grupo 1-2 fêmeas bubalinas com 150 dias de prenhez (4-5 meses), Grupo 2-2 fêmeas com 230 dias de prenhez (7-8 meses) e mais o Grupo 3-2 fêmeas com até 318 dias de prenhez (10 meses).

Em cada animal procedeu-se à abertura da cavidade abdominal, determinação do corno uterino prenhe e retirada do útero com o seu conteúdo.

A seguir, realizou-se uma incisão no sentido craniocaudal do cérvix uterino em direção ao corno gestante. As membranas fetais foram abertas e o feto e os líquidos fetais removidos. As medidas cefalococcígeas dos fetos (CR="Crown-Rump") foram tomadas para determinar a idade de prenhez, conforme as fórmulas estabelecidas por ABDEL-RAOULF e EL-NAGGAR (1968) *apud* RIBEIRO (1998), onde $Y=74+(9/2)X$ (para fetos com menos de 20 cm) e $Y=74+(9/4)X$ (para fetos com mais de 20 cm), sendo que X é o comprimento ápice-sacro (A-S), equivalente à distância do ponto mais alto da cabeça (fronte) até a base da cauda, acompanhando a curvatura do corpo, e Y é a idade da prenhez a ser calculada inicialmente em dias. Após a determinação da idade procedeu-se à identificação dos fetos. Estes resultados encontram-se resumidos no quadro 1.

QUADRO 1 – Relação entre o tamanho do feto, idade fetal (em dias e meses), sexo do feto e corno uterino prenhe de búfalos. São Paulo, 2000.

<i>Obs</i>	<i>Comp A-S (cm)</i>	<i>Idade fetal (dias)</i>	<i>Idade fetal (meses)</i>	<i>Sexo do feto</i>	<i>Corno uterino prenhe</i>
01	95	300	10	M	E
02	90	270	09	F	D
03	37	135	04-05	F	D
04	64	225	07-08	M	E
05	71	210	07	F	D
06	73	225	07-08	F	E
07	68	225	07-08	F	E
08	91	255	08-09	M	E
09	78	255	08-09	M	E
10	89	270	09	M	D
11	76	240	08	M	E

F: Fêmea; M: Macho; D: Direito; E: Esquerdo

Após inversão do útero, as áreas de interesse foram analisadas macroscopicamente, isoladas e fixadas com solução de paraformaldeído 4% (Paraformaldehyde, Sigma chemical Co., USA) em tampão fosfato 0,1M pH 7.4, para microscopia de luz ou glutaraldeído 2,5 % (Glutaraldehyde grade I:70% aqueous solution, Sigma Co., USA) preparado no mesmo tampão, para microscopia eletrônica de transmissão. Ainda imersos no fixador, os placentônios próximos ao feto foram coletados, fragmentos menores destes foram então recortados e imersos novamente nos fixadores.

Concluído este procedimento, as amostras mantidas em fixador, foram transferidas para o laboratório, onde o experimento teve continuidade.

3.1 Fixação e processamento do material para observação ao microscópio de luz

3.1.1 Processamento em paraplast (Paraplast Embedding Media-Paraplast Plus, Oxford Lab., USA)

Os placentônios foram recortados em cubos com lados medindo aproximadamente 0,5 cm e colocados em solução fixadora de paraformaldeído 4 % em PBS (Dulbecco's phosphate buffer saline-DPBS, Gibco Co., USA). Após a fixação, o material foi desidratado em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em paraplast.

3.1.2 Processamento em historesina (hydroxyethyl methacrylate, Historesin, LKB 2218-500, Sweden)

Para inclusão em metacrilato, as amostras também foram fixadas em paraformaldeído 4 % em PBS. Após a fixação, o material foi lavado em PBS, desidratado em etanol (concentrações crescentes de 50 a 100 %) e finalmente infiltrado na proporção de 1:1 em solução infiltradora (50 ml de resina básica [glicol-metacrilato] e 0,5 ml de ativador [peróxido de benzoila] /álcool 95^o durante 2 horas e deixado para polimerizar em uma mistura de resina (15 ml de solução infiltradora e 1 ml de endurecedor, derivado do ácido barbitúrico-DMSO) à temperatura ambiente, de 4 a 6 horas ou em estufa a 37 °C, por 1 hora.

Foram então obtidos os cortes, com espessura de 4 a 6 µm para o material embebido em paraplast e de 3 µm para os incluídos em historesina, que por sua vez foram rotineiramente corados pela hematoxilina de Harris e eosina, azul de

Toluidina, tricrômicos de Gomori e Mallory, azul de metileno e fucsina básica, e reação histoquímica de PAS contracorada com hematoxilina de Harris.

3.1.3 Fixação e processamento do material para observação ao microscópio eletrônico

Para observação ao microscópio eletrônico as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.2. Uma vez fixados, os fragmentos foram lavados em tampão fosfato 0,1M, pH 7.2 e pós fixados em tetróxido de ósmio 1 % (Osmium tetroxide 4% w/w solution in water, Polysciences, Inc., USA) por 1 hora. Após novas lavagens em tampão fosfato, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (de 70 % a 100 %) terminando em óxido de propileno.

Durante 12-16 horas, as amostras ficaram mantidas sob agitação em uma mistura 1:1 de óxido de propileno (Propylene oxide EM Grade, Polysciences, Inc., USA) e resina Spurr (Spurr's kit-Electron Microscopy Sciences, Co. USA). Em seguida, esta mistura foi substituída por resina pura, onde os materiais permaneceram por mais 4 a 5 horas.

Após esse período as amostras foram colocadas em moldes com resina pura e orientadas convencionalmente, de modo que a face de corte do bloco contivesse sempre a interface materno-fetal para observação. Uma vez incluídas, as amostras permaneceram em estufa a 60 °C por 72 horas para permitir a polimerização da resina.

Para a localização de áreas adequadas contendo ou não a interface materno-fetal, os blocos contendo as amostras foram cortados em um micrótomo

Sorvall, modelo "Porter-Blum" MT-I. Cortes semifinos de 1 μ m de espessura foram então obtidos e corados a quente com uma solução aquosa de borato de sódio 1% em água destilada, contendo 0,25 % de azul de Toluidina para observação ao microscópio de luz.

Localizadas as regiões para o estudo sub-celular, no mesmo micrótomo foram obtidos cortes ultrafinos, prateados, de cerca de 60 nm de espessura.

Estes cortes foram colhidos em telas de cobre e contrastados pelo acetato de uranila 2 % em água destilada, durante 5 minutos, e pelo citrato de chumbo 0,5 % em água destilada, durante 10 minutos.

A observação sub-celular e a documentação fotográfica foram realizadas no microscópio "Jeol" CX-II-100.

A terminologia utilizada segue as determinações do "International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature". *Nomina Anatomica Veterinaria Nomina Histologica, Nomina Embriologica*, 1994 com as sugestões de MIGLINO *et al.*(1992).

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS MACROSCÓPICOS

Os órgãos reprodutores da búfala assemelham-se de modo geral aos da vaca. Dados obtidos em vários países indicam que a puberdade e a maturidade sexual dos bufalinos ocorre mais tarde que a dos bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*). Geralmente o período de prenhez da búfala é maior que o da vaca, variando entre 278 a 290 dias, podendo, entretanto, exceder 300 dias.

Quanto ao tipo, a placenta da búfala é classificada como múltipla ou cotiledonária e apresenta em média 92 cotilédones, conectados às carúnculas uterinas de maneira a formar os placentônios dos cornos uterinos prenhe (62) e não prenhe (30). Existe uma correlação positiva entre o número de cotilédones e o peso do feto ao nascer.

São consideradas duas áreas compondo sua estrutura, ou seja, uma área materna, de sustentação do placentônio, e uma fetal. O tecido fetal é convexo e formado por uma série de árvores cônicas cujas bases estão dispostas radialmente no limite da transição materno-fetal (Fig. 02 a e b).

O formato do placentônio bufalino varia de acordo com o período de prenhez (contorno circular, reniforme, elíptico ou quadrangular), mas geralmente, possui formato de cogumelo, com um pedúnculo pequeno, menor do que o encontrado nos bovinos; também foi observada a fusão de cotilédones, formando um placentônio maior. A carúncula materna é semelhante a um arranjo de “favo-de-mel” (Figs. 03 a e b, 04 e 05).

A área intercotiledonária é a parte da membrana cório-alantóide desprovida de placentônios. Esta área é suprida pelos mesmos ramos das artérias e veias funiculares que suprem os cotilédones (Fig. 06).

FIGURAS 02 (a e b) – Fotografia de um placentônio de búfalo no final da prenhez, seccionado longitudinalmente (a) e o esquema em (b) demonstra suas estruturas.

FIGURAS 03 (a e b) – Fotografias da placenta de búfalo, aos 9 meses de prenhez, onde se observa que o formato dos placentônios variou de ovóide (O), contorno circular (C), elíptico (E) e reniforme (R). Esses placentônios se apresentam em média, em número de 62 no corno uterino prenhe e 30 no corno uterino não prenhe.

FIGURA 04 - Fotografia de uma região da placenta de búfalo, aos 10 meses de prenhez em que se visualiza a fusão de cotilédones (FC), formando um placentônio maior.

FIGURA 05 - Fotografia de uma porção do útero prenhe de búfalo, aos 10 meses de prenhez, demonstrando o aspecto de “favo-de-mel” da carúncula uterina (C). Em cada depressão insere-se uma árvore vilosa da porção fetal da placenta.

FIGURA 06 - Fotografia da placenta de búfala, aos 9 meses de prenhez, onde se observa a área intercotiledonária (IC) entre 2 placentônios (P), suprida por artérias e veias oriundas e afluentes dos vasos umbilicais.

4.2 RESULTADOS MICROSCÓPICOS

4.2.1 Constituição histológica do placentônio bufalino

O placentônio constitui a união entre carúncula materna e cotilédone fetal, formando assim a unidade funcional da placenta. Uma íntima relação materna-fetal pode ser observada nesta região onde, ocorrem as trocas metabólicas que permitem o desenvolvimento fetal.

O cotilédone do búfalo é constituído por numerosos vilos coriônicos delgados e ramificados. Esta ramificação aumenta com o avanço da prenhez, formando os vilos secundários e terciários, que são intensamente vascularizados e que se entremeiam nas criptas carunculares maternas, da mesma forma que em bovinos. Cada vilo é formado por um eixo de mesênquima vascularizado recoberto por células trofoblásticas.

Quanto à forma da interdigitação materno-fetal, a placenta da búfala é classificada como vilosa (Fig. 07).

As camadas da membrana inter-hemática são: endotélio do vaso fetal, mesênquima, camada de células trofoblásticas, epitélio uterino, estroma endometrial e endotélio do vaso materno.

A definição entre os termos epiteliocorial e sinepiteliocorial necessita ainda de estudos mais aprofundados sobre a migração das células binucleadas para o epitélio uterino, uma vez que este fato caracteriza a placenta sinepiteliocorial.

O epitélio endometrial permanece intacto por não ser invadido pelo trofoblasto.

Muitas células em processo de morte celular, muito possivelmente por apoptose foram encontradas no epitélio uterino destes animais; nenhum indício de formação de sincício foi observado.

Na camada das células trofoblásticas, células binucleadas eram muito freqüentes; os núcleos destas células eram arredondados com uma cromatina finamente dispersa, podendo apresentar dois nucléolos. Fusões entre estas células e as células epiteliais uterinas não foram observadas até o momento (Figs. 08).

Grande quantidade de vasos foi observada na região materna muito próxima do epitélio uterino, assim como na região fetal em contato com o trofoblasto (Fig. 08).

Epitélio uterino

O epitélio de revestimento uterino em contato com o trofoblasto é do tipo cúbico. Uma nítida membrana basal, evidenciada pela reação de PAS, delimita o epitélio do tecido conjuntivo (Fig. 07 e 08). Aparentemente a camada de células epiteliais é regular e uniforme.

Em algumas regiões da interface materno-fetal, estas células tornam-se mais baixas, podendo até mesmo se apresentarem pavimentosas.

Estroma endometrial

O estroma endometrial se distingue pela considerável abundância de fibroblastos e presença de espessos feixes de fibras colágenas. Nos preparados submetidos à reação de PAS, o limite com o epitélio uterino (devido à coloração da membrana basal, PAS+, facilita sobremaneira a identificação das duas partes (Fig. 12).

Grande quantidade de vasos também é observada no estroma, onde células leucocitárias também estão ocasionalmente presentes, nas regiões mais próximas ao epitélio uterino.

Trofoblasto

O trofoblasto é constituído por uma camada de células individualizadas de aspecto cúbico, podendo porém, também, apresentar células de diferentes dimensões e alturas, com núcleos próximos à membrana basal, lembrando muitas vezes um epitélio pseudoestratificado, onde ainda estão contidas células binucleadas e multinucleadas. Grande quantidade de capilares são observados tanto no mesênquima como no estroma materno, constituindo um importante fator para as trocas materno-fetais (Fig. 09).

De um modo geral as células trofoblásticas apresentam núcleos de contorno circular, cromatina frouxa onde nucléolos são proeminentes.

Ao microscópio de luz, as células trofoblásticas binucleadas ainda podem ser caracterizadas facilmente, as quais mostraram núcleos geralmente frouxos com nucléolos evidentes e citoplasma de aspecto granular. No presente trabalho pudemos inferir a presença de carboidratos no citoplasma destas células graças à reatividade presente após a reação histoquímica de PAS (Fig. 10).

Ao microscópio eletrônico de transmissão, as células trofoblásticas mostram-se unidas por complexos juncionais, principalmente desmossomas; os núcleos apresentam contorno circular e são basicamente eucromáticos, onde até dois nucléolos podem ser evidenciados. O citoplasma destas células apresenta um flagrante predomínio de ribossomos livres sobre as demais organelas. Mitocôndrias pequenas, cilíndricas e com cristas em prateleiras estão distribuídas por todo o citoplasma. Cisternas do retículo endoplasmático granular e do Golgi estão discretamente presentes. Feixes de filamentos intermediários podem ser ocasionalmente observados. Na superfície celular microvilosidades são comumente encontradas e variam em número e extensão de acordo com a região observada.

Ao contrário das demais células trofoblásticas, as células binucleadas apresentam retículo endoplasmático granular e complexo de Golgi bem desenvolvidos e mostram um grande arsenal de vesículas espalhadas por todo o citoplasma. Estas características indicam que estas células estão comprometidas com processos de síntese e secreção celular.

Mesênquima

Durante todo o período estudado, o mesênquima apresentou um aspecto frouxo devido a abundância de matriz extracelular entre as células mesenquimais presentes. A intensa vascularização deste tecido chama a atenção. Com o progredir da prenhez, observa-se uma contínua invasão dos vasos na camada trofoblástica, que muitas vezes fica reduzida à uma área citoplasmática bastante estreita. Não se observam macrófagos ou outros tipos celulares (Fig. 10 e 13).

FIGURA 07 - A figura mostra um preparado histológico onde se observa uma porção de uma árvore vilosa, corada pelo Azul de toluidina. (E) estroma endometrial; (F) vilo coriônico; (EU) epitélio uterino; (T) trofoblasto. Histoiresina, 440X, 9-10 meses de prenhez.

FIGURA 08 – Interface materno-fetal mostrando a intensa vascularização no vilo fetal (*) e na região materna (setas). (VF) Vilo fetal; (EU) epitélio uterino. Célula trofoblástica binucleada (BI). Fotomicrografia, azul de metileno e fucsina básica, 440X, 9-10 meses de prenhez.

FIGURA 09 – Interface materno-fetal. Notar: (e) estroma endometrial; (vm) vasos maternos; (vf) vasos fetais; (→) células em apoptose. Fotomicrografia, historesina, HE, 220X, 7-8 meses de prenhez.

4.2.2 Período de 4 – 5 meses de prenhez

O desenvolvimento do placentônio se dá em forma de “pinheiro natalino” (*pinus*) e a árvore vilosa estabelece-se com a penetração dos vilos coriônicos nas criptas endometriais. Nesta fase da prenhez, os vilos são relativamente curtos e pouco ramificados, assim como os eixos maternos provenientes do endométrio, e que se relacionam com estes vilos (Fig. 13). Como consequência deste arranjo, caracteristicamente, se forma uma elaborada trama de interdigitações, que aumenta a superfície de contato entre mãe e feto.

As árvores vilosas começam cônicas com ramos pouco mais longos do que os observados na região apical; estas estruturas não são regulares, apresentando pequenas variações no comprimento. Os ramos dos vilos principais ramificam-se em ângulos retos em relação ao maior eixo da árvore vilosa.

Histologicamente, nesta fase da prenhez observa-se que o trofoblasto é formado por uma monocamada, onde células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas estão presentes. As células mononucleadas são maioria, embora células binucleadas sejam facilmente identificadas e presentes em toda a extensão da camada de células trofoblásticas. Células multinucleadas foram raras.

De modo geral, as células mononucleadas apresentaram citoplasma homogêneo enquanto que as binucleadas podiam ou não apresentar grânulos PAS+, evidentes. De acordo com estas características estas células foram identificadas como células binucleadas jovens (sem grânulos evidentes) ou maduras (com grânulos evidentes), em diferentes níveis espaciais na camada da células trofoblásticas. Não se observou predominância de nenhuma das formas jovem ou madura na camada trofoblástica, nesta etapa da prenhez.

Embora os núcleos das células binucleadas, aparentassem freqüentemente, diferentes localizações espaciais dentro do citoplasma, levando-nos a sugerir diferenças de tamanho entre eles, muito possivelmente isto foi uma consequência do ângulo de corte e da posição dos núcleos.

As características estruturais e ultra-estruturais das células envolvidas na interação materno fetal, ou seja: trofoblasto, epitélio uterino, mesênquima e estroma endometrial foram já descritas anteriormente.

Particularmente nesta etapa da prenhez, observa-se a proximidade entre as células trofoblásticas e os vasos sangüíneos fetais, no entanto, esta aproximação não é contínua e regular ao longo da interface.

FIGURA 10 – Fotomicrografia mostrando o citoplasma PAS+ das células trofoblásticas binucleadas (→) e o mesênquima (m). Histoiresina, reação de PAS, 220X, 4-5 meses de prenhez.

FIGURA 11 – Fotomicrografia de uma região da interface materno-fetal, mostrando a membrana basal PAS + (setas). (e) estroma endometrial; (m) mesênquima; (t) trofoblasto. Histoiresina, reação de PAS contracorado com hematoxilina, 220X, 4-5 meses de prenhez.

FIGURA 12 - Fotomicrografia mostrando grande quantidade de células trofoblásticas binucleadas (→). Histoiresina, reação de PAS contracorado com hematoxilina, 220X, 4-5 meses de prenhez.

FIGURA 13 – Fotomicrografia de uma árvore vilosa. (e) estroma endometrial; (m) mesênquima; (t) trofoblasto. Paraplast, Azul de toluidina, 110X, 4-5 meses de prenhez.

4.2.3 Período de 7 - 8 meses de prenhez

As características gerais, estruturais e subcelulares observadas nesta fase de prenhez foram extremamente semelhantes às encontradas nas células que compõem a interface placentária aos 4-5 meses de prenhez; exceto pelas seguintes características: a) uma aparente maior quantidade de células uterinas em apoptose; b) maior quantidade de vasos maternos sub-epiteliais e uma maior proximidade destas estruturas com a região basal do epitélio uterino (Fig.14); c) maior quantidade de vasos fetais, logo abaixo das células trofoblásticas, e em estreito contato com a região basal destas células; d) as células epiteliais uterinas, se apresentam em grande parte, na forma de um epitélio achatado ao invés de cúbico como nas etapas anteriores da prenhez; e) as células binucleadas se coram mais intensamente pelo PAS; f) as ramificações da árvore vilosa coriônica e dos vilos maternos são mais numerosas e elaboradas.

Ao contrário da etapa anteriormente estudada, observou-se ocasionalmente nesta fase, a presença de hematomas, que se caracterizaram pelo acúmulo de sangue materno extravasado no interstício entre os epitélios uterino e trofoblástico. Quando presente, estes hematomas estavam localizados principalmente no ápice dos vilos maternos, o que corresponde à base dos vilos coriônicos (Fig. 15).

FIGURA 14 – Fotomicrografia mostrando características de 7-8 meses de prenhez. (*) vilo fetal; (e) estroma endometrial; (Vm) vaso sanguíneo materno; (estrela) mesênquima; (→) células em apoptose. Histoiresina, HE, 220X.

FIGURA 15 - Fotomicrografia de uma área de hematoma do placentônio de búfalo.

Observar: (*) hematoma; (→) eritrofagocitose; (•) células binucleadas; (M) mesênquima; (e) estroma endometrial. Histoiresina, HE, 440X, 7-8 meses de prenhez.

4.2.4 Período de 9 - 10 meses de prenhez

As características morfológicas das células placentárias sob microscopia de luz e eletrônica de transmissão foram semelhantes às observadas nas fases de prenhez já estudadas.

O que chama a atenção nesta fase da prenhez é a intensa elaboração da árvore vilosa e dos vilos maternos, muito mais intensa do que nas fases anteriores; os ramos principais destas estruturas são extremamente ramificados e imbricados entre si.

Assim como nos períodos anteriores, células binucleadas são evidentes na camada de células trofoblásticas, e aparentemente não estão numericamente diminuídas. Este achado sugere que estas células devem manter suas funções mesmo no final da prenhez (Fig. 16).

Nesta fase final de prenhez, também chamou bastante a atenção a presença de áreas contendo hematomas, mais freqüentes do que no período de 7-8 meses de prenhez, que assim como nesta fase, estavam localizados na base dos vilos coriônicos (Fig. 17 a e b).

Células epiteliais uterinas predominantemente achatadas foram freqüentes, assim como foi comum a presença de células em processo de morte nesta etapa da prenhez.

Durante o progresso da prenhez os vasos maternos e fetais se apresentam em maior quantidade e mais próximos das estruturas epiteliais com quem fazem contato, diminuindo certamente, a barreira de trocas metabólicas e gasosas entre o sangue materno e fetal (Fig. 18 a e b).

FIGURA 16 – Fotomicrografia de uma região da árvore vilosa do búfalo. Grande quantidade de células trofoblásticas binucleadas puderam ser observadas (●) em diferentes camadas do trofoblasto (T) o mesênquima (M), e uma região de hematoma (seta maior). Histoiresina, Azul de toluidina, 220X, 9-10 meses de prenhez.

FIGURAS 17 (a e b) – Fotomicrografias de regiões de hematomas. Figuras 17a mostra em maior magnificação a área de eritrofagocitose (seta), hematoma (H) e trofoblasto (t) e figura 7b detalha o sangue extravasado (SE) e o trofoblasto (t). Azul de toluidina; a 440X e b 880X (9-10 meses de prenhez).

FIGURA 18 (a e b) – Eletromicrografias de transmissão da vascularização da junção materno-fetal, onde capilares puderam ser observados em diferentes níveis da camada trofoblástica. (M) microvilos; (F) vasos fetais; (H) hemácias; (E) endotélio. a 4950X; b 6600X, 9-10 meses de prenhez.

5 DISCUSSÃO

Segundo VALE (1988) o sistema genital da búfala assemelha-se morfológicamente com o da vaca taurina e zebuína, porém a puberdade e a maturidade sexual da búfala é mais tardia e o período de prenhez maior, variando entre 278-290 dias.

A placenta dos ruminantes, quanto ao tipo, é descrita na literatura como sendo múltipla ou cotiledonária (LORDY, 1940; HAFEZ, 1955; BJÖRKMAN, 1976; LATSHAW, 1987; DANTZER *et al.*, 1988; BARONE, 1990; LEISER e KAUFMANN 1994, LEISER *et al.*, 1997a; LEISER *et al.*, 1998) caracterizada pela presença de áreas especializadas de trocas metabólicas, os placentônios, os quais estão separados por áreas intercotiledonárias de cório liso.

Nos bovinos, de um modo geral, a forma do placentônio é descrita por BJÖRKMAN (1976), KING *et al.* (1979), HAFEZ (1982), LAMMING (1994), Leiser *et al.* (1997a) e por DANTZER (1999), como sendo formado estruturas ovais ou arredondadas, lembrando a forma de um cogumelo, com uma superfície livre convexa e um pedúnculo. MIGLINO (1991), descreve os cotilédones com contorno circular, elíptico ou quadrangular, sendo a maioria ovóide e alguns reniformes. Na ovelha, LEISER *et al.*, (1998) descrevem o placentônio como tendo aspecto de taça estreita enquanto que LAMMING (1994) descreve o placentônio da cabra e da ovelha, como sendo côncavo no lado fetal e achatado em antílopes. STEVEN (1975) descreve o placentônio de ovinos como sendo de forma hemisférica, quando visto em secção vertical e DANTZER (1999) o descreve como sendo côncavo, na ovelha e cabra.

Em bufalinos RAM e CHANDRA (1984) citam que o formato do placentoma é esférico, com uma chanfradura, o que o torna semelhante a uma ferradura, feijão ou rim durante o início da prenhez. Na metade da prenhez, estas estruturas assumem a forma de cogumelo, de contorno elíptico e na prenhez avançada ainda de contorno elíptico, mas em forma de contas. O pedúnculo do placentoma do búfalo é menor que o do bovino. ENRIQUEZ-YAP (1975) utilizando como referência as descrições para bovinos, descreveu os placentônios em búfalos Carabao, como estruturas em forma de cogumelo, com uma superfície livre convexa, mas com um pedúnculo pequeno. FEITOSA-JÚNIOR (1997), utilizando a mesma classificação de MIGLINO (1991) para bovinos, descreve o formato dos cotilédones na placenta de búfalos variando de contorno circular, elíptico ou quadrangular e de formato ovóide ou reniforme.

Neste trabalho pudemos constatar que o formato do placentônio bufalino varia de acordo com o período de prenhez (contorno circular, reniforme, elíptico ou quadrangular), mas geralmente possui formato de cogumelo, com um pedúnculo pequeno, menor do que o encontrado nos bovinos; são consideradas duas áreas compondo sua estrutura, uma área materna de sustentação do placentônio e uma fetal.

A área intercotiledonária é a parte do cório desprovida de placentônios. Esta área é suprida pelos mesmos ramos das artérias e veias funiculares que suprem os cotilédones, da mesma forma que o observado em bovinos por MIGLINO (1991) e em búfalos por FEITOSA-JÚNIOR (1997).

JENKINSON (1925), Mc EWEN (1931), BJÖRKMAN (1973), KING *et al.* (1979), LATSHAW (1987), LEISER e KAUFMANN (1994), LEISER *et al.*

(1997a e b; 1998) e DANTZER (1999), descrevem os vilos coriônicos da placenta de ruminantes como arranjos em ramos chamados de cotilédones, adaptados em criptas endometriais, presentes nas carúnculas uterinas, como descrito por HAFEZ (1955), SHARMA *et al.* (1983), RAM e CHANDRA (1984) e no presente estudo da placenta de búfalos.

Os cotilédones fetais e as carúnculas maternas, que possuem aspecto de favo-de-mel, são componentes do placentônio, sendo que este é a unidade morfofuncional da placenta do búfalo. Estas mesmas observações foram realizadas por SHARMA *et al.* (1983) e ABDEL-RAOULF e BADAWI (1966) em búfalos, e nos ruminantes por HARRISON e HYETT (1954); BJÖRKMAN e SOLLÉN (1960); STEVEN (1975); HAFEZ (1982); SHARMA *et al.* (1983); KING e ATIKINSON (1987); LATSHAW (1987); MOSSMAN (1987); DANTZER *et al.* (1988); BARONE (1990); MIGLINO (1991); WOODING *et al.* (1997); FEITOSA-JÚNIOR (1997); LEISER *et al.* (1997a); LEISER *et al.* (1997b), LEISER *et al.* (1998) e DANTZER (1999). Apenas JENKINSON (1925), Mc EWEN (1931) e HAFEZ (1955) se reportam ao cotilédone como sendo de origem materna e nomeiam as carúnculas de cotiledonárias.

Examinando os cortes histológicos de diferentes segmentos do útero de búfalos, mais precisamente das carúnculas uterinas, o epitélio encontrado foi do tipo cúbico, à semelhança do que foi anteriormente descrito por KING *et al.* (1979) e KING *et al.* (1980).

Com relação às camadas da membrana inter-hemática, LORDY (1940), AMOROSO (1952) e LATSHAW (1987) classificam a placenta como sindesmocorial enquanto que AMOROSO (1952), LATSHAW (1987), LEISER e

KAUFMANN (1994) e ENDERS *et al.* (1998), como sinepiteliocorial. Em ovinos, a placenta foi classificada por STEVEN (1975), DANTZER *et al.* (1988) e LEISER *et al.* (1998) como epiteliocorial e sinepiteliocorial por LEISER *et al.* (1998). Para os caprinos e bovinos, DANTZER (1988), BJÖRKMAN (1976) e LEISER *et al.* (1997a) classificam a placenta como epiteliocorial. Finalmente, LEISER *et al.* (1997a), LEISER *et al.* (1998) e DANTZER (1999) descrevem-na nos bovinos como sinepiteliocorial, sendo esta um sub-tipo da placenta epiteliocorial devido ao fato das células binucleadas migrarem para o epitélio uterino.

Nos búfalos, os resultados obtidos não nos permitem diferenciar se esta classificação é epiteliocorial ou sinepiteliocorial, por necessitar de estudos mais aprofundados sobre a migração das células trofoblásticas binucleadas para o epitélio uterino.

O epitélio caruncular da placenta de ruminantes foi descrito como sendo formado por células cuboidais ou colunares em bovinos (KING *et al.*, 1979; KING *et al.*, 1980; BJÖRKMAN e SOLLÉN, 1960; BJÖRKMAN 1976), em ovinos (DAVIES e WINSATT, 1966) e nos búfalos (KATHIRESAN *et al.*, 1992), o que é sustentado pelos resultados dessa pesquisa durante as fases de prenhez estudadas.

Nossas observações histológicas também sugerem um aumento na quantidade de células em processo de morte durante o progresso da prenhez. O significado funcional deste achado não foi elucidado neste trabalho, necessitando de estudos mais detalhados a este respeito.

Na placenta dos búfalos, o trofoblasto é celular, constituído de uma única camada de células, variando de cuboidal a colunar alto, com um arranjo tal que lembra um epitélio pseudoestratificado. Observações semelhantes também foram

descritas por SHARMA *et al.* (1983), em seu trabalho com búfalos e por GREENSTEIN *et al.* (1958), KING *et al.* (1979) e KING *et al.* (1980), em bovinos. Autores também observaram que no topo do vilo este epitélio se torna cuboidal (LATSHAW, 1987). Em ovinos a camada trofoblástica também é do tipo colunar simples (DAVIES e WINSATT, 1966 e LAWN *et al.*, 1969).

Entremeadas às células colunares do trofoblasto, em diferentes alturas desta camada, encontrou-se as células multinucleadas e binucleadas, da mesma forma que o observado por SHARMA *et al.* (1983) e KATHIRESAN *et al.* (1992).

De um modo geral essas células também são descritas nos ruminantes por STEVEN (1983), KING e ATKINSON (1987), LEISER e KAUFMANN (1994), ENDERS *et al.* (1998), LEISER *et al.* (1998) e DANTZER (1999) e mais especificamente, em bovinos por BJÖRKMAN e SOLLÉN (1960), KING *et al.* (1979), KING *et al.* (1980) e LATSHAW (1987) e em ovinos por DAVIES e WINSATT (1966) e LAWN *et al.* (1969).

Estas células binucleadas apresentam reação histoquímica intensamente positiva para PAS, semelhante ao observado por SHARMA *et al.* (1983) e KATHIRESAN *et al.* (1992) em seus trabalhos.

A camada de células trofoblásticas apresenta regiões sinciciais em ovelhas, cabras (LATSHAW, 1987) e em bovinos (LEISER e KAUFMANN, 1994). ENDERS *et al.* (1998) comentam, a presença de sincício na placenta dos artiodáctilos, porém não são específicos na sua descrição. Em búfalos, SHARMA *et al.* (1983) descreve uma aparência sincicial na interface materno-fetal, enquanto que KATHIRESAN *et al.* (1992) afirma não existir uma estrutura sincicial verdadeira. Nossos resultados morfológicos corroboram os achados deste autor, uma vez que

formações sinciciais nunca foram observadas em nossas amostras, em nenhuma fase da prenhez. Nos ruminantes as células binucleadas fundem-se com células epiteliais uterinas, ocupando espaços na camada epitelial, num deslocamento conhecido como migração. Estas células porém, jamais ultrapassam a membrana basal do epitélio uterino (KING e ATKINSON, 1987; LEISER e EGLOFF, 1990; LEISER e KAUFMANN, 1994; LEISER, 1997a; ENDERS *et al.* 1998; DANTZER, 1999). A migração das células binucleadas de búfalos para o epitélio uterino, não foi objeto desta pesquisa.

Ao microscópio eletrônico de transmissão, as células trofoblásticas mostram núcleos eucromáticos com nucléolos evidentes e predomínio de ribossomos livres sobre as demais organelas, onde mitocôndrias com cristas em prateleira e poucas cisternas do retículo endoplasmático granular e aparelho de Golgi são observadas, indicando células metabolicamente ativas, porém não envolvidas com a secreção de moléculas.

Tanto na camada de células trofoblásticas, quanto no epitélio uterino dos búfalos, a presença de microvilos na superfície de contato entre estas células foi freqüentemente observada.

Subcelularmente, células binucleadas apresentam-se com núcleos eucromáticos, numerosas cisternas do retículo endoplasmático granular e vesículas eletrondensas associadas às cisternas do Golgi, o que sugere alta atividade metabólica. A grande quantidade de vesículas de diferentes eletrondensidades, compatíveis com grânulos de secreção, preenchem grande parte do citoplasma destas células e indicam sua potencialidade em secretar moléculas, ao contrário das demais células trofoblásticas.

Isto também é descrito em bovinos por BJÖRKMAN e SOLLEÉN (1960), BJÖRKMAN (1973), WOODING (1997), KING *et al.* (1979) e LEISER e KAUFMANN (1994) e em ovinos por WOODING (1992). Nestas espécies, à estas células tem sido atribuída a função de secreção do hormônio placentário lactogênico, de fundamental importância para o sucesso da prenhez.

O mesênquima, abaixo do trofoblasto e o estroma endometrial subepitelial são ricamente vascularizados. É flagrante o aumento numérico de capilares presentes nestes tecidos com o avançar da prenhez. Outra característica que chama a atenção é o aprofundamento destas estruturas na camada trofoblástica e no epitélio uterino, dando a impressão de serem estruturas intraepiteliais. Muito provavelmente este arranjo é o reflexo das necessidades crescentes de gases e metabólitos para o desenvolvimento fetal, que acompanha a evolução da prenhez. A invasão do trofoblasto pelos capilares também é descrita em ovinos por DAVIES e WINSATT (1966) e STEVEN (1975) e em búfalos por SHARMA *et al.* (1983).

Extravasamento de sangue na interface materno-fetal formando hematomas, foi ocasionalmente observado no 7º mês de prenhez, sendo no entanto, muito mais freqüente nas etapas mais finais, aos 9-10 meses de prenhez. Nestas regiões as células trofoblásticas mostram hemácias em seu interior, indicando atividade fagocitária.

Hematomas semelhantes, também foram observados por MYAGKAYA *et al.* (1976) a partir dos 70 dias de prenhez, em ovelhas, tornando-se especialmente desenvolvidos após o 150º dia de prenhez (MURAI e YAMAUCHI, 1986). LATSHAW (1987) também relata a presença de hematomas na 2ª metade da

prenhez, na ovelha. Na placenta a termo do gato doméstico, LEISER e ENDERS (1980) também descrevem hematomas na região central da placenta zonária.

Hematomas são considerados fonte de ferro para o desenvolvimento embrionário, na medida em que as hemácias maternas são fagocitadas e digeridas pelo trofoblasto (MYAGKAYA *et al.*, 1976). É possível que em búfalos, este achado também corresponda à transferência de ferro para o feto, nas fases finais da prenhez.

O desenvolvimento do placentônio se dá em forma de “pinheiro natalino”, onde a árvore vilosa se estabelece com a penetração dos vilos coriônicos nas criptas endometriais. Os vilos ficam mais ramificados e longos com o avançar da prenhez e o endométrio permanece intacto. Este processo é semelhante aos demais ruminantes (STEVEN, 1975; LEISER e KAUFMANN, 1994; LEISER *et al.* (1997a); LEISER *et al.* (1998); DANTZER (1999).

6 CONCLUSÕES

Do exposto anteriormente, concluímos que:

1. Os órgãos genitais das fêmeas de búfalas (*Bubalus bubalis bubalis*) quando comparados aos das fêmeas de bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*), apresentaram semelhanças morfológicas descritas em nossos resultados. Embora não tenhamos encontrado diferenças significativas em relação aos achados morfológicos, a puberdade e a maturidade sexual da búfala é mais tardia e o período de prenhez maior, em relação às fêmeas bovinas.

2. Em relação ao tipo, a placenta da búfala é classificada macroscopicamente como múltipla ou cotiledonária. Com relação às camadas que compõe a membrana inter-hemática, a placenta da búfala é classificada como epiteliocorial, sendo que a definição entre os termos epiteliocorial e sinepiteliocorial, neste caso, necessita de estudos mais detalhados.

3. O placentônio é constituído de 2 partes: uma materna, representada pela carúncula uterina, que é formado pelo epitélio e estroma endometrial e uma parte fetal, representada pelo cotilédone, que é convexo e formado por numerosos vilos coriônicos arranjados em tufos. O formato do placentônio é muito variado, mas geralmente se apresenta na forma de cogumelo, com um pedúnculo pequeno, menor e mais achatado do que o observado em bovinos.

4. A área intercotiledonária é formada pelo cório liso, sendo então, desprovida de placentônios.

5. Analisando macroscopicamente a carúncula uterina, pudemos concluir que ela possui um aspecto semelhante a “favo-de-mel”.

6. O desenvolvimento do placentônio se dá em forma de “pinheiro natalino” e a árvore vilosa estabelece-se com a penetração dos vilos coriônicos nas criptas endometriais, os ficam mais ramificados e longos com o avançar da prenhez, sendo que o endométrio permanece intacto.

7. Durante todo o período estudado a interação materno-fetal deu-se por meio da interdigitação de microvilos presentes na superfície do trofoblasto e epitélio uterino.

8. O epitélio uterino é do tipo cúbico e estroma endometrial apresentou um considerável número de fibroblastos e vasos que aumentaram em número com o progresso da prenhez.

9. O trofoblasto é constituído por uma única camada de células cúbicas, onde também estão contidas células binucleadas e multinucleadas. As células trofoblásticas apresentam características subcelulares de células metabolicamente ativas, mas não comprometidas com secreção. Estas células mostraram-se unidas por complexos juncionais, principalmente desmossomas. Subcelularmente, as células binucleadas apresentaram REG (retículo endoplasmático granular) e complexo de

Golgi bem desenvolvidos, além de grande quantidade de grânulos de secreção, indicando comprometimento com síntese proteica.

10. O mesênquima trofoblástico no cório, se apresenta intensamente vascularizado e esta vascularização aumenta com o avanço da prenhez.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAOULF, M.; BADAWI, H.M. Morphological study of uterine caruncles in Egyptian Buffalo Cows. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v.13,p. 252-63, 1966.
- ABDEL-RAOULF e EL-NAGGAR, 1968 *apud* RIBEIRO, A.A.C.M., 1998, 182p.
- AMOROSO, E. G. Placentation. *In*: LAMMING, G. E. **Marshall's physiology of reproduction**. 3.ed. London : Chapman & Hall, 1952. v.2 p. 12-311.
- BARONE, R. **Anatomie comparée des mammifères domestiques**. Splanchnologie II. Paris : Éditions Vigot, 1990. p. 565-605.
- BJÖRKMAN, N. Fine structure of the fetal-maternal area of exchange in the epithelial and endothelial types of placentation. **Acta Anatomica**, v.86, p.1-22, 1973. Supplement 1.
- BJÖRKMAN, N. Placentation *In*: DELLMAN, D.H.; BROWN, E.M. **Textbook of veterinary histology**. Philadelphia : Lea & Febiger, 1987. p.351-69.
- BJÖRKMAN, N.; SOLLÉN, P. Morphology of the bovine placenta at normal delivery. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v.1, p.347-62, 1960.
- DANTZER, V.; LEISER, R.; KAUFMANN, P.; LUCKHARDT, M. Comparative morphological aspects of placental vascularization. **Trophoblast Research**, v.3, p.235-60, 1988.
- DANTZER, V. Epitheliochorial Placentation. *In*: Knobil, E.; Neill, J.D. **Encyclopedia of reproduction**. San Diego : Academic Press, v.1.p. 18-28, 1999.
- DAVIES, J.; WINSATT, W.A. Observation on the fine structure of the sheep placenta. **Acta Anatomica**, v.65, p.182-223, 1966.

- ENDERS, A.C.; BLANKENSHIP, T.N.; LANTZ, K.C.; ENDERS, S.S. Morphological variation in the interhemal areas of chorioallantoic placentae. **Trophoblast Research**, v.12, p.1-19, 1998.
- ENRIQUEZ-YAP, E. L. The placentome of the philippine carabao (*Bubalus bubalis*) In mid-pregnancy: a study to stablish the basis of clinico-pathological analysis on the possible causes of early reproductive failures. **The Philippine Journal of Veterinary Medicine**, p.1-25, 1975.
- FEITOSA-JÚNIOR, F.S. **Pesquisa anatômica sobre a ramificação e distribuição das artérias e veias da placenta em búfalas**. São Paulo, 1997. 237p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- GREENSTEIN, J.S.; MURRAY, R.W.; FOLEY, R.C. Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine pre - attachment placenta between 16 and 33 days of gestation. **The Anatomical Record**, v.132, p.321-41, 1958.
- HAFEZ, S. The placentome in the buffalo. **Acta Zoologica**, v.35, p.177-91, 1954.
- HAFEZ, E.S.E. Foetal-maternal attachments in buffalo and camel. **Indian Journal Veterinary Sciences and Animal Husbandry**, v.25, p.109-15, 1955.
- HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. São Paulo : Manole, 1982. 582p.: Gestação, Fisiologia Pré-Natal e Parto.
- HARRISON, R. J.; HYETT, A. R. The development and growth of the placentomes in the Fallow Deer (*Dama dama* L.). **Journal of Anatomy**, v.88, p.338-54, 1954.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinaria**. 4.ed. Zurich, 1994. (Together with nomina histologica , 2.ed., 1992 and nomina embriologica veterinaria, 1992).
- JENKINSON, J.W. **Vertebrate embriology**. London : Oxford University Press, p.193-232, 1925.

- KATHIRESAN, R.; RAJASUNDARAM, R.C.; PATTABIRAMAM, S.R. Histological and histochemical changes in the endometrium and placenta during different stages of gestation in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Indian Veterinary Journal**, v.69, p.326-28, 1992.
- KING, G.J.; ATKINSON, B.A.; ROBERTSON, H.A. Development of the bovine placentome during the second month of gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.55, p.173-80, 1979.
- KING, G.J.; ATKINSON, B.A.; ROBERTSON, H.A. Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.59, p.95-100, 1980.
- KING, G. J.; ATKINSON, B. A. The bovine intercaruncular placenta throughout gestation. **Animal Reproduction Science**, v.12, p.241-54, 1987.
- LAMMING, G.E. **Marshall's physiology of reproduction**. London : Chapman & Hall, 1994, v.3.367p.
- LATSHAW, W.K. **Veterinary developmental anatomy. A clinically oriented approach**. Toronto: B.C. Decker, 1987. 283p.: Extraembryonic membranes and placentation.
- LAWN, A.M.; CHIQUOINE, A.D.; AMOROSO, E.C. The development of the placenta in the sheep and goat: an electron microscopy study. **Journal of Anatomy**, v.105, n.3, p.557-78, 1969.
- LEISER, R.; EGLOFF, T. Ultrastructural correlates of placental substance transfer: a state-of-art-review. **Placental communications: biochemical, morphological and cellular aspects**. v.199, p.219-38, 1990.
- LEISER, R.; ENDERS, A.C. Light and electron microscopy study of the near-term paraplacenta of the domestic cat II. paraplacental hematoma. **Acta Anatomica (Basel)**, v.106, n.3, p.312-26, 1980.
- LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v.102, p.122-34, 1994.

- LEISER, R.; KREBS, C.; EBERT, B.; DANTZER, V. Placental vascular corrosion cast studies: a comparison between ruminants and humans. **Microscopy Research and Technique**, v.38, p.76-87, 1997b.
- LEISER, R.; KREBS, C.; KLISCH, K.; EBERT, B.; DANTZER, V.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B. Fetal vilosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation. **Journal of Anatomy**, v.191, p.517-27, 1997a.
- LEISER, R.; PFARRER, C.; ABD-ELNAEIM, M.; DANTZER, V. Feto-maternal anchorage in epitheliochorial and endothelial placental types studied by histology and microvascular corrosion casts. **Trophoblast Research**, v.12, p.21-39, 1998.
- LORDY, C. **Embriologia humana e comparada**. Onto e teratogênese. São Paulo : Melhoramentos, 1940. 799p.
- McEWEN, R.S. **Vertebrate embriology**. New York : Henry Holt and Company, p. 497-521. 1931.
- MIGLINO, M.A. **Pesquisa anatômica sobre a ramificação e distribuição das artérias e veias da placenta de bovinos**. São Paulo, 1991. 303p. Tese (Livre Docência) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- MYAGKAYA, G.; VREELING-SINDELAROVA, H. Erythrophagocytosis by cells of the trophoblastic epithelium in the sheep placenta in different stages of pregnancy. **Acta Anatomica**, v.95, p.234-48, 1976.
- MOSMMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes**. New Brunswick : Rutgers University Press, 1987, 383p.
- MURAI, T.; YAMAUCHI, S. Erythrophagocytosis by the trophoblast in a bovine placentome. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v.48, n.1., p.74-87, 1986.
- PELAGALLI, G.V.; MATRONARDI, M.; POTENA, A. La circolazione placentare in alcuni ruminanti. **Acta Medica Veterinaria**. v.19, n. I/II. p.3-31, 1973.

- RAM, R.; CHANDRA, G. Macroscopic studies of the placenta of buffalo (*Bubalus bubalis*). **Indian Veterinary Journal**, v.61, p.458-62, 1984.
- RIBEIRO, A.A.C.M. **Estudo anatômico dos gânglios celíaco, celiacomesentérico e mesentérico cranial e de seus componentes aferentes em fetos de búfalos (*Bubalus bubalis* – Linnaeus, 1758)** São Paulo, 1998. 182p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- SHARMA, R. D.; NANDA, B.S.; SAIGAL, R.P.; KHATRA, G.S.; GUPTA, S.K. Histomorphological and histochemical studies of placentome and expelled foetal membranes of buffalo. **Indian Journal Animal Science**, v.53, n.9, p.964-67, 1983.
- STEVEN, D. H. **Comparative placentation**. Essays in structure and Function. London : Academic Press, 1975. 315 p.
- STEVEN, D.H. Interspecies differences in the structure and function of trophoblast. In: WHITE, A.; LOKE, Y.W. **Biology of trophoblast**. Amsterdam : Elsevier, 1984. 706p.
- VALE, W.G. **Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução**. Campinas : Fundação Cargill, 1988. 86p.
- WOODING, F.B.P. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**, v.13, p.101-13, 1992.
- WOODING, F.B.P.; MORGAN, G.; ADAM, C.L. Structure and function in the ruminant synepitheliochorial placenta: central role of the trophoblast binucleate cells in deer. **Microscopy Research and Technique**, v.38, p.88-99, 1997.