

Características histomorfométricas do placentomo de vacas Nelore nos terços inicial, médio e final de gestação

[*Histomorphometric characteristics of Nelore cows placentome in the initial, middle, and third terms of gestation*]

E.R. Machado¹, P.R. Xavier¹, A.P. Marques Júnior^{2*}

¹Aluno de pós-graduação - EV-UFGM – Belo Horizonte, MG

²Escola de Veterinária - UFGM
Caixa Postal 567
30123-970 – Belo Horizonte, MG

RESUMO

Avaliaram-se as características histomorfométricas do placentomo da vaca Nelore nos terços inicial, médio e final da gestação utilizando-se 52 úteros gestantes. Para a estimativa do estágio gestacional, foram utilizados aspectos do desenvolvimento fetal. Foram coletados fragmentos de um placentomo localizado no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, os quais foram imersos em solução de formol e, posteriormente, processados histologicamente, incluídos em parafina e corados com hematoxilina-eosina. O estudo das proporções volumétricas foi feito utilizando-se microscópio de luz equipado com ocular integradora. Foi feita, também, a quantificação das células epiteliais nas criptas das carúnculas por meio de microscopia de luz e uma ocular micrométrica com 100 divisões. Foi verificado decréscimo no número das células maternas do epitélio das criptas no final da gestação. Os números médios das células binucleadas do trofoblasto, nos terços inicial, médio e final da gestação, mantiveram-se semelhantes, bem como a proporção volumétrica dos componentes dos tecidos conjuntivos materno e fetal e dos vasos no tecido materno. No tecido fetal, ocorreu aumento gradativo do tecido conjuntivo nos terços inicial, médio e final.

Palavras-chave: vaca, Nelore, placentomo

ABSTRACT

Histomorphometric characteristics of the placentome of the Nelore cow in the initial, medium, and final trimesters of pregnancy were evaluated using 52 pregnant uteri. For the estimation of the gestational age, aspects of fetal development were used. Fragments of a placentome of the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum, which were immersed in formalin solution were collected, and processed for routine histological technique, included in paraffin, and stained with hematoxylin-eosin. The study of the volumetric proportion was done using a light microscope equipped with an integrated ocular. It was also made the quantification of the epithelial cells in the crypts of caruncles by light microscopy and with the help of a micrometric ocular with a grid of 100 divisions. It was found a decrease in the number of maternal cells of the epithelium in the crypts in advanced pregnancy. The average number of binucleate trophoblast cells remained similar throughout gestation, as well as the volumetric proportion of components of the maternal and fetal connective tissue and maternal blood vessels. For the fetal tissues, there was a progressive increase in the connective tissue in the three trimester of pregnancy.

Keywords: cow, Nelore, placentome

Recebido em 7 de abril de 2009

Aceito em 29 de novembro de 2010

Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: ampinho@ufmg.br

INTRODUÇÃO

A placenta dos mamíferos da subclasse Euteria possui estrutura e características funcionais comuns. Nos ruminantes, a placenta é classificada como cotiledonária, com base em suas características anatômicas; epiteliocorial ou sinepiteliocorial; vilosa, devido à presença dos vilos e não decíduada, porque as partes maternas e fetais podem ser separadas sem causar danos à mucosa uterina após o parto (Wooding, 1992; Meça et al., 2006). Ela exibe áreas discretas de ligação, os placentomos, que são formados pela interação do corioalantoide com o endométrio. A parte fetal do placentomo é o cotilédone, enquanto que a parte materna de contato é a carúncula (Igwebuike, 2006).

Os componentes fetais constituem o endotélio, o mesênquima e o trofoblasto, enquanto os maternos são o epitélio uterino, o tecido conjuntivo e o endotélio (Björkman, 1976). Entre 70 e 120 placentomos são formados durante a gestação no bovino, os quais aumentam diversas vezes seu tamanho original, sendo maiores aqueles localizados no terço médio do corno gestante, com a estabilização do crescimento ocorrendo entre os dias 180 e 210 da gestação (Marques Júnior et al., 1993).

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

A maturação e a liberação normal da placenta parecem estar relacionadas com o decréscimo das células binucleadas do trofoblasto, embora este processo ainda não esteja completamente elucidado (Gross et al., 1991). Esses autores mostraram que a porção fetal da placenta de vacas com retenção de placenta converte PGF₂

em PGE₂ e as células binucleadas do trofoblasto possivelmente são as responsáveis por essa conversão. Dessa maneira, um dos possíveis mecanismos pelos quais as células binucleadas do trofoblasto podem estar envolvidas na etiopatogenia da retenção da placenta seria por meio de sua interferência com o metabolismo das prostaglandinas. O feto aparentemente participa da maturação da população de células binucleadas (Wooding et al., 1986).

A maturação da placenta tem início com o achatamento do epitélio nas carúnculas, o qual é intensificado três a cinco dias antes do parto, aliada à diminuição do número de células trofoblásticas binucleadas presentes no tecido fetal e células epiteliais das carúnculas (Santos et al., 1996). O feto participa aparentemente da manutenção da população de células binucleadas, e as alterações hormonais antes do parto parecem favorecer a diminuição dessas células. O número de células nas criptas carunculares declina a partir dos 270 dias de gestação (Marques Júnior et al., 1993).

A retenção placentária, considerada um problema relevante na reprodução bovina, pode causar perdas na produção, redução na fertilidade, aumento no número de coberturas por concepção e aumento do intervalo de partos. Conhecer mais a fisiologia da placenta e suas características teciduais, entendendo seu processo de desenvolvimento, maturação e liberação por ocasião do parto, torna-se relevante para a ampliação de conhecimentos sobre a relação entre endocrinologia e mudanças estruturais na placenta no contexto dos efeitos das consequências econômicas de sua retenção. Este trabalho teve o objetivo de quantificar a população de células epiteliais das criptas e determinar as proporções volumétricas das células trofoblásticas binucleadas e dos demais componentes estruturais do placentomo de vacas Nelore ao longo da gestação.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se espécimes de genitais obtidos de 52 vacas da raça Nelore, gestantes e saudáveis, abatidas em frigorífico na cidade de Araguari-MG, com tempo de gestação variando de 77 a 261 dias. Em função do desenvolvimento fetal, a gestação foi dividida em três períodos: terço inicial (77-100 dias de gestação; n= 13), médio

(101-180 dias de gestação; n= 19) e final (181-261 dias de gestação; n= 20).

Instantes após o abate dos animais, foram iniciados os procedimentos de coleta do material. Realizou-se uma incisão no corno uterino gestante, com posterior secção do cordão umbilical e exteriorização do feto. Para a estimativa da idade gestacional, foram utilizados aspectos do desenvolvimento fetal e o comprimento da crista nugal (osso occipital) até a primeira vértebra coccígea (CR= *Crow-Rump*) do feto, segundo a fórmula de Richardson (1996).

Após a mensuração fetal, o interior do corno uterino gestante era exposto e o número de placentomas quantificado. Para este experimento, o útero foi dividido topograficamente em três regiões, sendo: região proximal a extremidade adjacente à cérvix, região medial e região distal a extremidade mais afastada da cérvix. Um placentomo de cada uma dessas regiões foi medido em seus diâmetros longitudinal e transversal, com o auxílio de um paquímetro, tendo sido anotados os dados correspondentes e convertidos em diâmetro médio. Com isso, foram obtidos os diâmetros médios para cada região estudada do útero.

$$n = \frac{4s^2}{l^2}, \quad \text{em que: } n = \text{número de repetições; } s = \text{desvio-padrão e } l = \text{limite intervalo de confiança a 95\% de probabilidade.}$$

Para determinação da proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo, foi utilizada a microscopia de luz, com objetiva de 40X, a qual foi equipada com uma ocular integradora, contendo um retículo com cinco linhas horizontais e 25 pontos equidistantes (Zeiss KPL 10X). Microscopicamente, a grade contendo 25 pontos equidistantes foi sobreposta a 80 campos microscópicos escolhidos aleatoriamente, totalizando 2000 pontos por lâmina. O número de vezes em que os pontos atingiram uma determinada estrutura foi utilizado para calcular a proporção volumétrica dela, segundo a fórmula de Sharpe et al. (1989).

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

Um placentomo localizado no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, na região da sua curvatura maior, foi coletado, bem como seu respectivo ovário contendo o corpo lúteo, e foi anotado o lado de ocorrência. Deste placentomo, de cada animal, foi feita a coleta de fragmentos, os quais foram imersos em solução de formol a 10% e, em seguida, cortados em fragmentos menores de aproximadamente 0,5cm de espessura, em plano sagital, do ápice até a base. Para o processamento, utilizou-se a técnica histológica clássica de inclusão em parafina e as lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE).

A quantificação das células epiteliais nas criptas das carúnculas foi realizada em todas as 52 amostras, em lâminas coradas pela HE. A avaliação foi realizada por meio da microscopia de luz, com objetiva de 40X e auxílio de uma ocular micrométrica de 100 divisões. Dessas, utilizaram-se 30 divisões que foram alinhadas paralelamente às células maternas, que delimitaram a extensão do campo, no qual foram contadas as células, segundo a metodologia empregada por Marques Júnior (1988). As células maternas foram contadas em 20 campos microscópicos aleatórios. O número de campos microscópicos examinados foi determinado para se obter o intervalo de confiança de 95%, segundo a seguinte fórmula (Snedecor e Cochran, 1994):

do valor médio da proporção. Esta estimativa foi feita segundo Snedecor e Cochran (1989).

Para todas as amostras, em lâminas coradas pela HE segundo técnica de rotina, foi feita a proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo, incluindo tecido fetal, tecido materno, células binucleadas e vasos (materno e fetal), e a quantificação das células epiteliais nas criptas das carúnculas. A quantificação das células epiteliais nas criptas foi realizada por meio da microscopia de luz, com objetiva de 40X e auxílio de uma ocular micrométrica de 100 divisões. Dessas, utilizaram-se 30 divisões, alinhadas paralelamente às células maternas que delimitaram a extensão do campo, no qual foram contadas as células, segundo a metodologia empregada por Marques Júnior (1988). As

células maternas foram contadas em 20 campos microscópicos aleatórios. O número de campos microscópicos a serem examinados foi determinado para se obter o intervalo de confiança de 95%, segundo Snedecor E Cochran (1989). Quando algum ponto da ocular integradora incidia sobre o artefato de técnica e sobre as áreas de retração entre os tecidos materno e o fetal, ele foi computado para avaliação da qualidade das lâminas, porém descartado para o cálculo das proporções volumétricas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias por meio do cálculo da diferença mínima significativa, pelo teste t. O nível de significância estabelecido foi de 5% (Sampaio, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisarem-se os resultados obtidos (Tab. 1), verifica-se um declínio no número médio de células das criptas no terço final de gestação. Apesar de a metodologia utilizada no presente trabalho ser diferente daquela de Grunert et al. (1976), os resultados mostram similaridade com os obtidos pelos autores que verificaram um rápido decréscimo destas células a partir do sétimo mês de gestação até próximo ao parto. Woicke et al. (1986) também encontraram diminuição do número de células das criptas em

torno do dia 270 de gestação, em vacas de origem europeia.

Tabela 1. Médias das células maternas do epitélio de criptas carunculares do placentomo de vacas Nelore, nos terços inicial, médio e final da gestação, bem como seus respectivos desvios-padrões.

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

Médias acompanhadas por letras distintas, na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa (P<0,05).

A diminuição do número de células epiteliais ao final da gestação é um aspecto importante no processo de maturação da placenta e subsequente separação entre os tecidos materno e fetal (Grunert, 1976). Os mecanismos fisiológicos que determinam este processo não estão esclarecidos, porém pode ocorrer um processo de degeneração gradativa dessas células ao longo da gestação (Wagner, 1989), o que ocorreu também no placentomo da vaca Nelore, entre o primeiro e o último terço da gestação.

O número médio de células binucleadas do trofoblasto, nos terços inicial, médio e final da gestação, manteve-se semelhante (P>0,05), (Tab. 2).

Tabela 2. Proporções volumétricas (%) das células binucleadas (CB) do trofoblasto, dos vasos nos tecidos fetal (VTF) e materno (VTM), dos componentes dos tecidos conjuntivos fetal (TF) e materno (TM) no placentomo de vacas Nelore, no terço inicial (0-100 dias de gestação), no médio (100-180 dias de gestação) e no final (180-270 dias de gestação), bem como seus respectivos desvios-padrões.

Períodos gestacionais	Proporções volumétricas %				
	CB	VTM	VTF	TF	TM
0-100	2,17±0,53a	0,92±0,28a	0,32±0,17a	35,34±3,95a	20,68±3,09a
100-180	2,29±0,73a	0,93±0,55a	1,18±1,41ab	36,75±3,30a	21,19±2,98a
180-270	2,89±0,75a	0,87±0,37a	2,07±1,84b	37,57±3,46a	20,47±3,62a

Médias acompanhadas por letras distintas, na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente significativa (P<0,05).

O resultado do número médio das células binucleadas do trofoblasto (Tab. 2) assemelha-se ao encontrado por Wooding (1983) e Moura (2008), que verificaram a manutenção da estabilidade deste até próximo ao dia 260 da gestação. Entretanto, esses dados são diferentes dos obtidos por Grunert et al. (1976), que descreveram a ocorrência de um decréscimo no

número destas células e a diminuição significativa das células binucleadas a partir de sete meses de gestação.

A idade mais avançada da gestação conseguida no abatedouro foi de 261 dias, com média de 213 dias no terço final da gestação, o que impossibilitou avaliar a ocorrência de alteração

no número de células binucleadas do trofoblasto e na proporção volumétrica em gestações acima de 260 dias. Este resultado é devido à impossibilidade de ter sido feita coleta de uma quantidade expressiva de placentomas em momentos mais próximos ao parto, por não ser comum o abate de matrizes em estado de gestação tão avançado.

A proporção volumétrica dos vasos no tecido materno ao longo da gestação não sofreu alterações significativas ($P>0,05$). Já no tecido fetal, a mesma proporção aumentou com o avançar do tempo de gestação, apresentando diferença significativa ($P<0,05$). O aumento gradativo na proporção volumétrica encontrado para os vasos no tecido fetal aparentemente deve-se ao crescimento do feto, o que possibilita um maior aporte de nutrientes e troca de metabólitos de forma satisfatória. Moura (2008) não encontrou diferença nas proporções volumétricas dos vasos dos placentomas de vacas mestiças nos terços inicial, médio e final da gestação, aventando a explicação de que isto ocorreu pelo fato de não terem sido avaliadas as proporções volumétricas separadas de tecidos materno e fetal.

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) na proporção volumétrica dos componentes dos tecidos conjuntivos materno e fetal ao longo da gestação (Tab. 2), provavelmente devido à técnica histológica utilizada, uma vez que os tecidos sofreram relativo grau de retração, o que pode ter influenciado os resultados.

Ao se analisar exclusivamente o tecido conjuntivo fetal, apesar de não haver diferença significativa, observa-se aparente aumento na média da proporção volumétrica com o avançar da gestação, semelhante ao verificado por Sharpe et al. (1989), em estudos morfométricos ao longo da gestação de vacas da raça Holandesa, que o colágeno presente no cotilédone tende a aumentar proporcionalmente, enquanto o colágeno do componente materno tende a diminuir. Contudo, esses autores não verificaram diferença significativa da proporção volumétrica do colágeno fetal entre vacas com liberação normal ou com retenção de placenta. Foi demonstrado que vacas com retenção de placenta apresentam maior proporção de colágeno do tipo III no placentomo, em comparação a vacas que tiveram liberação normal da placenta (Sharpe et

al., 1990), o que não pode ser avaliado no presente estudo em função da metodologia utilizada.

Conclui-se que houve decréscimo no número de células do epitélio caruncular nos períodos de gestação avaliados e que não ocorreu diferença na proporção volumétrica das células binucleadas, dos componentes dos tecidos conjuntivos materno e fetal e dos vasos no tecido materno, nos diferentes terços gestacionais, enquanto ocorreu aumento gradativo na proporção volumétrica dos vasos no tecido fetal, constituindo informações relevantes para ampliar os conhecimentos existentes sobre a estrutura da placenta da vaca Nelore.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BJÖRKMAN, N. Placentation. In: DELLMAN, H.D.; BROWN, E.M. (Eds). *Textbook of veterinary histology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p.351-369, 1976.
- GROSS, T.S.; WILLIAMS, W.F., RUSSEK-COHEN, E. Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. *Placenta*, v.12, p.27-35, 1991.
- GRUNERT, E.; SCHULZ, C.; AHLERS, D. Retained placenta problems induced labor in cattle. *Ann. Rech. Vet.*, v.7, p.135-138, 1976.
- IGWEBUIKE, U. Trophoblast cells of ruminant placentas - A minireview. *Anim. Reprod. Sci.*, v.93, p.185-198, 2006.
- MARQUES JÚNIOR, A.P. *Leucocyte chemotaxis activity by cotyledons of dairy cows with normal delivery and retained placenta*. 1988. 182f. Tese (Doutorado) - University of Illinois, Urbana.
- MARQUES JÚNIOR, A.P.; BARRETO FILHO, J.B.; SATURNINO, H.M. Aspectos morfométricos da placenta de vacas zebu (*Bos taurus indicus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.45, p.213-219, 1993.
- MEÇA, K.K.O.L.; VASCONCELOS, A.C.; MORO, L. Inibição de apoptose e retardo da maturação placentária: um provável mecanismo da retenção placentária na brucelose bovina (revisão de literatura). *Biosci. J.*, v.22, p.163-174, 2006.

- MOURA, M.R.P. *Citologia dos líquidos embrionários e morfometria do placentomo da vaca em diferentes fases da gestação*. 2008. 106f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RICHARDSON, C. Personal communication. In: ARTHUR, G.H.; PARKINSON, T.J. (Eds). The development of the conceptus. *Veterinary reproduction and obstetrics*. 7.ed. London: WB Saunders, 1996. p.51-62.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 8.ed. Ames: Iowa State University, 1989.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2007. 264p.
- SANTOS, R.L.; MARQUES JÚNIOR, A.P.; BARRETO FILHO, J.B. Proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentomo de vacas leiteiras com liberação normal e com retenção de placenta. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.48, p.317-324, 1996.
- SHARPE, K.L.; EILER, H.; CULLEN, W.C. et al. Morphometric analysis of collagen in gestational and retained bovine placentomes. *Theriogenology*, v.32, p.485-491, 1989.
- SHARPE, K.L.; EILER, H.; HOPKINS, F.M. Changes in the proportion of type I and type III collagen in the developing and retained bovine placentome. *Biol. Reprod.*, v.43, p.229-235, 1990.
- WAGNER, W.C. Endocrine physiology of the parturient cow and placental retention. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Supl., p.61-74, 1989.
- WOICKE, J.; SCHOON, H.A.; HEUWIESER, W. et al. Morphological and function aspects of placental maturation mechanisms in the cow. I. Light microscopy. *J. Vet. Med. Assoc.*, v.33, p.660-667, 1986.
- WOODING, F.B.P. Frequency and localization of binucleate cells in the placentomes of ruminants. *Placenta*, v.4, p.527-540, 1983.
- WOODING, F.B.P.; FLINT, A.P.F.; HEAP, R.B. et al. Control of binucleate cellmigration in the placenta of sheep and goats. *J. Reprod. Fertil.*, v.76, p.499-512, 1986.
- WOODING, F.B.P. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, v.13, p.101-113, 1992.