

## Imunolocalização de receptores de progesterona nas células trofoblásticas binucleadas na placenta de búfalo (*Bubalus bubalis*)

Ana Flávia de Carvalho<sup>1\*</sup>  
Celina Almeida Furlanetto Mançaneres<sup>1</sup>  
Flávia Thomaz Verechia Pereira<sup>2</sup>  
Carlos Eduardo Ambrósio<sup>3</sup>  
Maria Angélica Miglino<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos - Campus II  
Av Octávio Bastos s/n – Medicina Veterinária, CEP 13 870-000 São João da Boa Vista, SP

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Rod. João Ribeiro de Barros, km 651, CEP 17900-000, Dracena, SP

<sup>3</sup>Universidade de São Paulo, Av. Orlando Marques de Paiva, 87, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, CEP 05508-000, São Paulo, SP

\* Autor para correspondência

labvet01@unifeob.edu.br

Submetido em 25/07/2006  
Aceito para publicação em 15/03/2007

### Resumo

As células trofoblásticas binucleadas (CTBs) da placenta de búfalos (*Bubalus bubalis*), foram estudadas, com ênfase à presença de receptores de progesterona. Tecidos placentomais de 27 búfalas (2-10 meses de prenhez) foram processados e embebidos em paraplast (*Paraplast Embedding Media – Paraplast Plus*) para localização de receptores de progesterona, utilizando-se a técnica de imunohistoquímica. A reação de imunohistoquímica para receptores de progesterona através de anticorpo monoclonal PgR Ab2 mostrou marcação de CTBs, células do epitélio e do estroma caruncular, e pericitos de vasos presentes nos placentônios ao longo de todo o período gestacional analisado. Os resultados indicam a produção de progesterona com ação autócrina e parácrina no crescimento, diferenciação e regulação funcional.

**Unitermos:** trofoblasto, célula binucleada, receptor de progesterona, placentônio

### Abstract

**Immunolocalization of progesterone receptors in binucleate trophoblast cells of the buffalo placenta (*Bubalus bubalis*).** The binucleate trophoblast cells (CTBs) of the water buffalo placenta (*Bubalus bubalis*) were studied with emphasis on the presence of progesterone receptor. Placentomal tissues from 27 buffalos (2-10 months of pregnancy) were processed and embedded in paraplast (*Paraplast Embedding Media - Paraplast Plus*) to locate the progesterone receptors using the immunohistochemistry technique. The immunohistochemical reaction for progesterone receptor through monoclonal antibody PgR Ab2 showed staining of CTBs, caruncular epithelial and estromal cells and blood vessel estromal pericitos present in the placentome throughout the entire gestational period analyzed. These results indicate the production of progesterone with autocrine and paracrine action in the placentome growth, differentiation and functional regulation.

**Key words:** trophoblast, binucleate cell, progesterone receptor, placentome

## Introdução

Vários estudos sobre as mudanças ocorridas na placenta de ruminantes durante a gestação têm sido feitos para melhor esclarecer o mecanismo de liberação deste órgão do endométrio uterino (Ram e Chandra, 1984; Kathiresan et al., 1992; Malard et al., 1996).

Sharma et al. (1982) descreveram a presença de células gigantes, positivas para reação de Schiff, na carúncula e no epitélio trofoblástico da placenta, porém não demonstrou a capacidade fagocitária destas células, enquanto que Ram e Chandra (1984) descreveram, no tecido epitelial uterino, a presença ocasional de células gigantes.

Em vários ruminantes como, por exemplo: ovinos, caprinos, bovinos e cervídeos, as células binucleadas são formadas a partir do 17º dia de gestação no epitélio trofoblástico. As células jovens ou binucleadas estão habitualmente situadas entre as células do trofoblasto simples. São chamadas assim, pois podem ser uni ou multinucleadas, sendo a forma binucleada mais freqüente. Durante a formação das células trofoblásticas binucleadas ocorre a divisão nuclear de algumas células colunares simples do epitélio trofoblástico sem necessidade de divisão citoplasmática, o que conta para a condição binucleada ou multinucleada. As células binucleadas migram para o epitélio caruncular formando células gigantes. A divisão citoplasmática nunca ocorre nas células gigantes no epitélio caruncular, mostrando sua incapacidade de proliferação (Winsatt, 1980). Estas células possuem inicialmente um pequeno, porém denso volume citoplasmático, pequeno número de mitocôndrias, muitos polirribossomos e um extenso sistema de cisternas de retículo endoplasmático e, algumas vezes, apresentam um grande complexo de Golgi e grânulos característicos contendo microvesículas de densidade variável, quando observados em ultraestrutura. As células binucleadas maduras apresentam-se completamente granuladas atingindo um considerável tamanho (30 - 50µm) muito próximas da superfície do epitélio trofoblástico uninuclear (Wooding, 1982). Algumas destas células desenvolvem-se muito, contendo cisternas do retículo endoplasmático granular (REG) e do Golgi bastante pro-

eminentes. Grânulos ocupam 50% da área citoplasmática total (Wooding, 1992).

As células binucleadas possuem duas funções: formar o sincício materno/fetal, essencial para o sucesso da implantação e subsequente desenvolvimento placentomal, e produzir e liberar proteínas e hormônios esteróides. Estes compostos são sintetizados convencionalmente no REG e vão para o Golgi e posteriormente são armazenados em grânulos durante o crescimento e maturação destas células (Wooding, 1992). Wooding e Wathes (1980) utilizaram ácido fosfotúngstico (PTA) em pH 1,0 para estudos de marcação de células binucleadas em ultraestrutura. Conseguiram boa marcação e visualização das mesmas, demonstrando que os grânulos presentes nestas células eram glicoproteínas básicas. Estes grânulos apresentam conteúdo proteico e glicoproteico, incluindo o hormônio lactogênico placentário (LP). Exocitose destes grânulos para áreas de tecido materno tem sido observada. Os grânulos, provavelmente, contêm proteínas específicas da gestação e seriam importantes sítios de esteroidogênese (Flood, 1991).

A distribuição das células binucleadas na placenta de ovinos varia conforme a observação de diferentes regiões, onde são especialmente numerosas na extremidade do vilo, e moderadamente abundantes no cório, entre a base do vilo. Em bovinos, estão presentes confinadas ao cório, mas seus números relativos parecem aumentar gradualmente à medida que a gestação avança (Winsatt, 1980). Segundo Flood (1991), as células binucleadas, em bovinos, constituem aproximadamente 10% das células trofoblásticas nos dias 18º e 20º de gestação e 20% no restante da gestação. Somente 20% destas células têm capacidade de migração. Após a migração estas células aparecem no epitélio uterino onde se fundem com as células epiteliais, formando as células multinucleadas gigantes que correspondem a 50% da área do epitélio materno, no 24º dia de gestação. Estes eventos são similares nas ovelhas, mas, nas vacas, a atividade mitótica e o produto residual das células maternas são menores, ocorrendo total reconstituição do epitélio uterino no caminho da migração deixado pela célula trofoblástica. Nas ovelhas isso não ocorre. Próximo ao parto, o número de células binucleadas cai para ¼ de seu total. As características das células binucleadas em cervídeos são idênticas àquelas descritas

por Wooding et al. (1996) apresentando, também, características migratórias, produção de hormônios e capacidade de fusão (Wooding, 1980 e 1997). Esta característica foi também observada em búfalos por Carvalho et al. (2006), onde estas células foram caracterizadas morfológicamente, quantificadas em diferentes períodos gestacionais e submetidas a reações histoquímicas para lectinas e imunohistoquímica para lactogênico placentário (LP). O significado funcional desta multiplicação de genomas por binucleação pode estar relacionado com o aumento da capacidade de síntese, ocasionada pelo acréscimo de genes copiados, necessários, eventualmente, para o aumento gradativo de níveis hormonais placentários (Klisch et al., 1999).

Duello et al. (1986) utilizaram técnicas de imunohistoquímica para detectar e localizar o hormônio lactogênico placentário (bLP) nas células binucleadas de bovinos. Duas das três formas do hormônio já foram descritas em bovinos, a growth hormone (GH) (bGH) e a prolactina (PRL) (bPRL). A imunocitoquímica para bPL, utilizada para localizar bPL nos placentônios bovinos e medir a concentração de bPL no soro materno e fetal, demonstrou que as células binucleadas apresentaram marcação no trofoblasto. Em outros cortes de placentônios, células binucleadas, se estendem por todo epitélio materno, entrando no mesmo plano das células epiteliais, tanto em aposição quanto em justaposição, parecendo estarem inseridas ali (Duello et al., 1986).

Gross e Williams (1988) estudaram os placentônios bovinos durante o pré-parto (final de gestação) e pós-parto, determinando a síntese de prostaglandinas pelas células placentárias. Na fase do pré-parto, as células trofoblásticas produziam predominantemente prostaglandina E (PGE) proveniente do ácido aracdônico (AA). Já as células trofoblásticas binucleadas, embora exibissem uma menor capacidade de sintetizar prostaglandina a partir do ácido aracdônico, convertiam prostaglandina  $2\alpha$  (PGF  $2\alpha$ ) em prostaglandina E (PGE).

A síntese de progesterona pelas células binucleadas da placenta de bovinos foi determinada por Reimers et al. (1985) e confirmada por Ullman e Reimers (1989), inicialmente através de cultura celular. O corpo lúteo é o responsável pela produção de progesterona e manutenção da gestação em bovinos. Porém a placenta tam-

bém tem um papel importante, embora temporário neste processo. Através de imunohistoquímica foi detectada a presença de receptores para progesterona na região dos placentônios e carúncula, além de reatividade no pericito dos vasos carunculares (Shuler et al., 1999). A presença de receptores de progesterona na placenta bovina já tem sido há tempo discutida no contexto da esteroidogênese placentária por Boss et al. (2003 e 2006).

Wooding et al. (1996) demonstraram que as células trofoblásticas binucleadas da placenta de ruminantes apresentam características específicas durante o seu desenvolvimento, maturação e capacidade migratória, estando situadas tanto nas regiões cotiledonárias como nas intercotiledonárias. Preparados enriquecidos com células binucleadas mostraram diferenças no metabolismo de esteróides *in vitro*, fato este também observado nas espécies de origem (ovelha e cabra), dependendo da localização anatômica destas células. Em ovinos, o produto predominante da [ $^3$ H] pregnenolona nestas células foi a progesterona e em cabras é a  $5\beta$ -pregnona- $3\alpha$ ,  $20\alpha$ diol e ambos apresentaram quantidades proporcionais em relação ao número de células binucleadas. Estes resultados foram similares para células binucleadas derivadas das regiões cotiledonárias e intercotiledonárias. Estes estudos indicaram presença de regiões funcionalmente especializadas na placenta, enfatizando a atividade multifuncional das células binucleadas em ruminantes.

Wischral et al. (2001a e 2001b) descreveram que, em bovinos, ocorre retenção placentária quando ocorrem falhas na esteroidogênese devido, por exemplo, a mecanismos antioxidantes deficientes, como uma menor atividade da enzima antioxidante SOD (superóxido dismutase), menor concentração de estradiol  $17\beta$  por variar no parto, menor síntese de prostaglandinas, elevadas concentrações de PGEM (metabólito da prostaglandina  $E_2$  Bíciclo PGE $_2$ ) ou maior concentração dos ácidos linoléico e aracdônico nas carúnculas, o que também indica deficiência na síntese de prostaglandinas por alteração da ciclooxigenase.

O presente trabalho teve por objetivo verificar a presença de receptores para progesterona nas células trofoblásticas binucleadas (CTBs) através de imunohistoquímica, visando a esclarecer aspectos fun-

cionais destas células dentro da esteroidogênese placentária na espécie bufalina.

## Material e Métodos

Para a realização desse trabalho foram utilizadas fêmeas bufalinas prenhes, em diferentes fases da gestação. Estes animais eram provenientes de abatedouros de Feira de Santana (BA), Pirassununga (SP), Aguaí (SP) e Belém (PA) não tendo sido possível a determinação da idade das fêmeas abatidas. Os cornos uterinos foram abertos e as fases de prenhez estimadas através de medidas cefalococcígeas fetais (CR= "Crown-rump") seguindo os parâmetros utilizados por Abdel-Raouf (1969). De acordo com o CR obtido, os animais prenhes foram divididos em grupo I – n = 9 (60 a 180 dias de prenhez), grupo II – n = 13 (210-270 dias de prenhez), grupo III – n = 5 (271 a 318 dias de prenhez), totalizando 27 amostras.

O útero destes animais foi invertido e as áreas de interesse foram isoladas e perfundidas com 4% paraformaldeído (*Sigma Chemical Co. USA*) em PBS (*Dulbecco's phosphate buffer saline, Gibco Co, USA*) 0,1 M pH 7,4. A seguir, os placentônios próximos ao feto foram coletados, recortados em fragmentos de aproximadamente 1cm de espessura e imersos no mesmo fixador utilizado para perfusão.

### Processamento para embebição em parafina

As amostras foram desidratadas em gradientes de concentrações crescentes de etanol (70 a 100%), diafanizadas em xilol e embebidas em parafina (*Paraplast Embedding Media – Paraplast Plus*) de acordo com Tolosa et al. (2003). Cortes com 5µm de espessura, obtidos em um micrótomo (LEICA 2165), foram coletados em lâminas silanizadas (*Silano-Sigma Chemical Co., USA*) e mantidos em estufa a 40°C por 24 horas.

### Reação imunohistoquímica

Os cortes foram desparafinizados, hidratados e a peroxidase celular endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 3% em metanol (dois banhos de 10 minutos cada). Em seguida, foram imersos em tampão citrato pH 6,0 e irradiados em microondas na potência máxima por 4

ciclos de 5 minutos para recuperação antigênica. A seguir, foram lavados em água corrente e destilada e reequilibrados em PBS pH 7,4. Procedeu-se, então, à incubação com anticorpo monoclonal produzido em camundongo diluído na proporção de 1:60 em PBS 0,1 M, pH 7,4 – (*Lab vision-Neomarkers – PgR Ab2- progesteron receptor (Clone hPRA 2)*) durante 12 horas em câmara fria e úmida à 5°C. Os cortes foram então lavados em PBS (três banhos de 5 minutos cada) e foram submetidos à incubação com o anticorpo secundário biotilado anti-camundongo (*Biotinylated anti-mouse IgG (H+L) Vector USA*) diluído 1:200 em PBS 0,1 M, pH 7,4 por 30' em câmara úmida a temperatura ambiente. Foram lavados em PBS (três banhos de 5 minutos cada) e incubados com o complexo ABC (*Vector USA*) diluído em PBS 0,1M, pH 7,4, por 30 a 45 minutos em câmara úmida a 37°C. Foram lavados em PBS 0,1M, pH 7,4 (três banhos de 5 minutos cada) e revelados com DAB (*Diaminobenzidine-Sigma- USA*) 0,06g em 10 ml de PBS 0,1M, pH 7,4 adicionada de 120 ml de peróxido de hidrogênio 30V (volumes) por 3 a 7 minutos. A seguir, após lavagem em água corrente e destilada, foram contracolorados por hematoxilina de Harris. Controles foram realizados em iguais condições, omitindo-se a incubação com anticorpo primário.

## Resultados

A reação imunohistoquímica para receptores de progesterona foi positiva nos núcleos das células binucleadas trofoblásticas presentes nas amostras dos grupos: I – n = 9 (60 a 180 dias de prenhez, figuras 1a e 1b), grupo II – n = 13 (210-270 dias de prenhez, figuras 1c e 1d) e grupo III – n = 5 (271 a 318 dias de prenhez, figuras 1e e 1f).

A marcação positiva para as células binucleadas foi constante nos diferentes períodos gestacionais estudados, sendo que, no grupo I, cujos animais estavam em início da gestação (60 dias), a reatividade ao anticorpo foi forte somente nas células trofoblásticas binucleadas demonstrando assim a presença de receptores de progesterona nestas células (Fig. 2b). Nesta fase, porém as células estromais e dos pericitos maternos apresentaram baixa ou nula reatividade ao anticorpo empregado neste estudo.



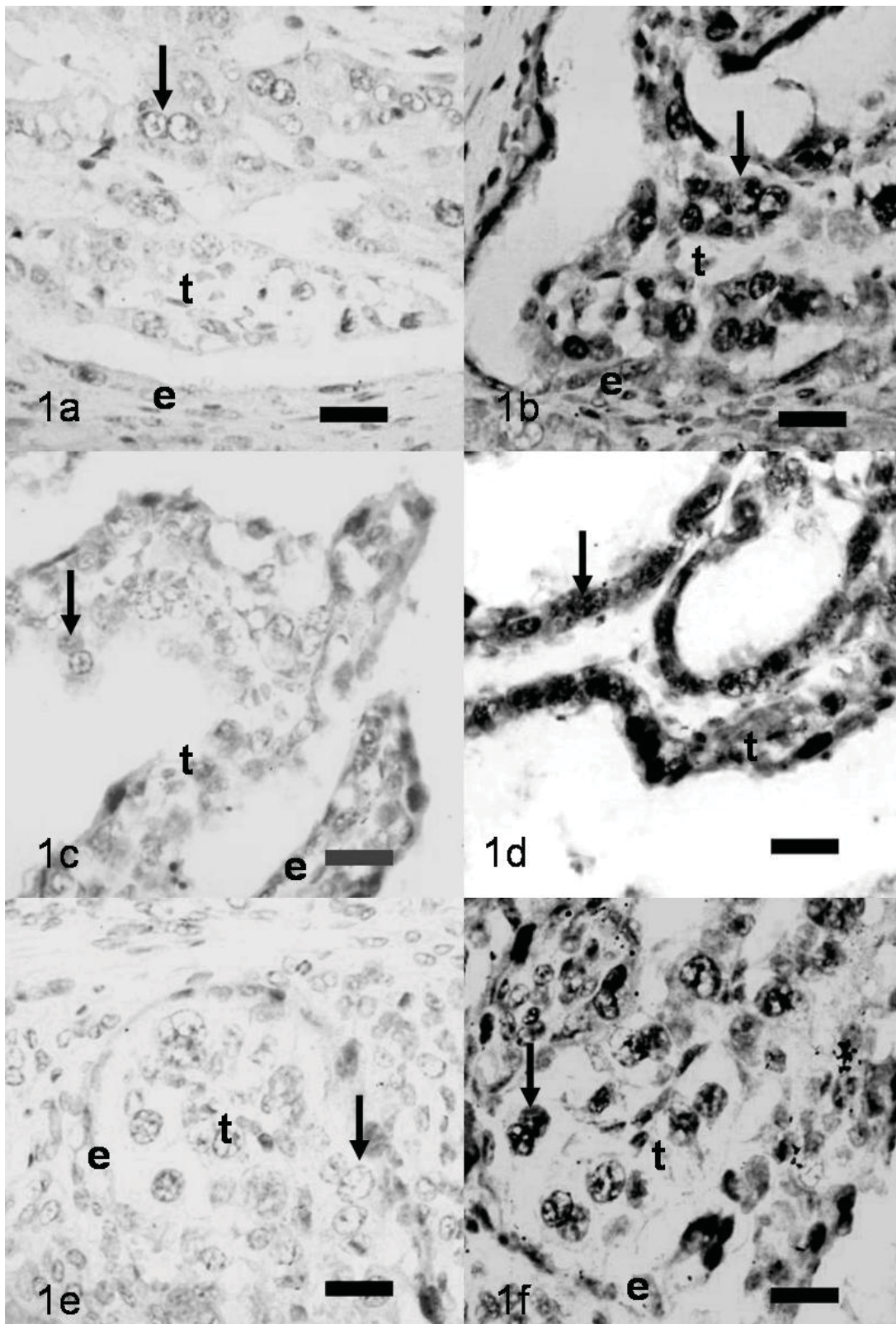


FIGURA 1: As fotomicrografias de 1a 1c e 1e (controles) e 1b, 1d e 1f mostram imagens da reação imunohistoquímica para receptores de progesterona nos núcleos das células binucleadas dos placentônios de búfalas. Trofoblasto (t); Epitélio uterino (e); Células binucleadas (seta cheia). Barra = 20µm. Grupo I – n = 9 (60 a 180 dias de prenhez, figuras 1a e 1b), grupo II – n = 13 (210-270 dias de prenhez, figuras 1c e 1d), grupo III – n = 5 (271 a 318 dias de prenhez, figuras 1e e 1f).

No grupo II, a reatividade das células binucleadas foi também bastante forte ao anticorpo, sendo que a reatividade das células estromais das células do pericito materno foram de moderadas à forte neste período gestacional (210-270 dias).

A observação das células do trofoblasto e estroma do grupo III com 271-318 dias de gestação, após a rea-

ção imunohistoquímica, revelou intensa reatividade das células trofoblásticas binucleadas, do epitélio caruncular, células do estroma e pericitos dos vasos maternos, indicando maior expressão destes receptores nestas regiões na fase final da gestação (Figuras 2b, 2d e 2f).

Células gigantes, oriundas da fusão das células trofoblásticas, bi ou multinucleadas com as células do

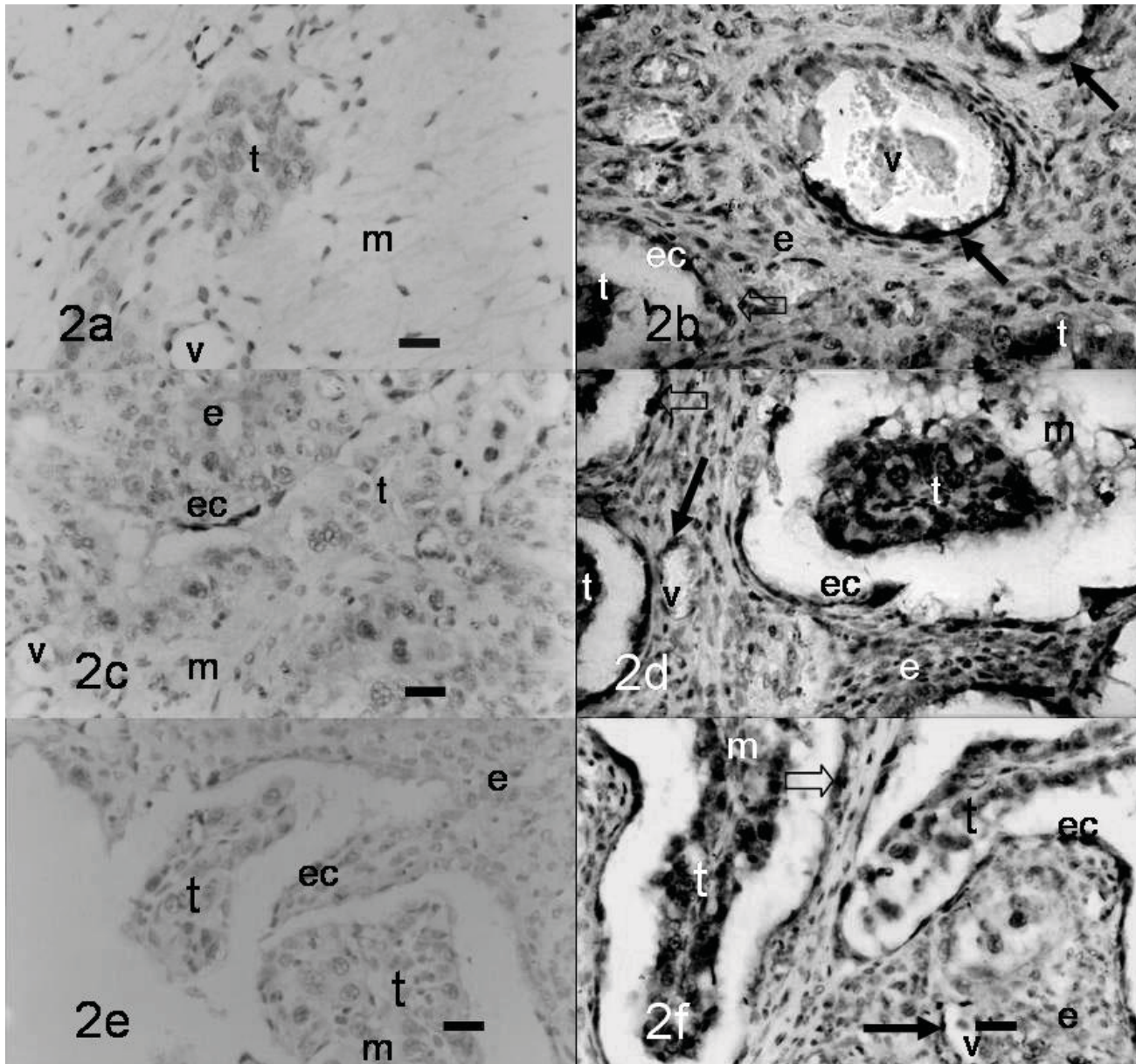


FIGURA 2: As fotomicrografias de 2a 2c e 2e (controles) e 2b, 2d e 2f mostram imagens da reação imunohistoquímica para receptores de progesterona nas células do epitélio caruncular, células estromais e pericitos dos vasos maternos (estromais). Trofoblasto (t); Epitélio caruncular (ec); Células estromais (e); Pericito de vasos maternos (seta cheia); Vasos (v); Células gigantes no epitélio caruncular (seta vazia); Mesênquima (m). Barra = 20µm. Grupo I – n = 9 (60 a 180 dias de prenhez, figuras 2a e 2b), grupo II – n = 13 (210-270 dias de prenhez, figuras 2c e 2d), grupo III – n = 5 (271 a 318 dias de prenhez, figuras 2e e 2f).



epitélio caruncular, foram observadas, apresentando alta reatividade do lado materno em todas as fases gestacionais estudadas (Figura 2b, 2d e 2f).

## Discussão

As células trofoblásticas binucleadas (CTBs) presentes nos placentônios de búfalos, mostram grande similaridade com as de bovinos. Frequentemente, as CTBs em bovinos se fundem com as células epiteliais uterinas e como resultado desta fusão há a formação de células trinucleadas ou multinucleadas gigantes (Wooding, 1992). Estas células tri ou multinucleadas entram em processo de apoptose logo após a fusão. Este fenômeno de fusão celular, comum entre os bufalinos e bovinos, pode estar relacionado com a proximidade filogenética, sendo, ambas, da família Bovidae (Hassanin e Douzery, 1999; Ritz et al., 2000). Apesar disto, existem claras diferenças entre as espécies como, por exemplo, o cariótipo do búfalo que é  $2n=50$  (Hsu e Benirschke, 1970) e o do bovino que é  $2n = 60$  (Hsu e Benirschke, 1967). A gestação do búfalo é 3-4 semanas mais longa que a do bovino (Andersen e Plum, 1965). Além disso, a formação de células híbridas gigantes tri ou multinucleadas foi observada em cervídeos filogeneticamente distantes dos búfalos (Wooding et al., 1997). Da mesma forma na cabra e na ovelha, grandes sincícios são formados pela invasão das CTBs (Wooding, 1992), sugerindo que o fenômeno da formação de células multinucleadas ou sinciciais seja um evento comum relacionado ao tipo de placentação do que com a proximidade genética.

Por outro lado os resultados positivos para receptores de progesterona nos placentônios de búfalos durante as diferentes fases de gestação assemelham-se aos achados de Schuler et al. (1999), em bovinos, o que pode ser decorrente da proximidade filogenética entre estas duas espécies. Nos búfalos, as células trofoblásticas binucleadas mostraram-se fortemente marcadas sendo que algumas células do epitélio trofoblástico simples e do epitélio caruncular também apresentaram a marcação. O fato de algumas células trofoblásticas uninucleadas apresentarem reatividade pode estar relacionado ao desenvolvimento destas células a partir do

epitélio trofoblástico simples de onde se originam, como descrito por Winsatt (1980).

Segundo Shuler et al. (1999) o corpo lúteo é o responsável pela produção de progesterona e manutenção da gestação em bovinos temporariamente no início da gestação, porém a placenta posteriormente tem um papel importante nesta biossíntese e secreção. Através de imunohistoquímica estes autores detectaram a presença de receptores para progesterona no trofoblasto e no epitélio caruncular e pericitos dos vasos carunculares durante os períodos de 150-, 220-, 240-, 270 dias de gestação em bovinos. Os nossos dados, encontrados em búfalos, coincidem temporal e topologicamente com aqueles descritos em bovinos.

Tendo em vista que as células binucleadas nos bovinos sintetizam progesterona (Reimers et al., 1985; Ullman e Reimers 1989) e possuem receptores de progesterona (Boss et al., 2003 e 2006), à semelhança com bufalinos, a co-expressão de progesterona e seu receptor sugere uma ação autócrina nas células trofoblásticas binucleadas e parácrina nas células do endométrio caruncular. Estas células, com receptores de progesterona presentes na placenta tanto do lado fetal quanto do materno ao longo da gestação, demonstram a importância da progesterona na manutenção da homeostasia da interface materno-fetal, atuando na diferenciação, crescimento e regulação placentária.

## Agradecimento

Fapesp – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo que nos permitiu o desenvolvimento deste trabalho através de projeto de Auxílio Pesquisa.

## Referências

- Abdel-Raouf, M.; el-Naggar, M. A. 1969. The biometry of the gravid uterus in Egyptian buffalo cows. *Zentralbl Veterinarmed A*, **16**: 838-854.
- Andersen, H.; Plum, M. 1965. Gestation length and birth weight in cattle and buffaloes: a review. *Journal Dairy Science*, **48**: 1225-1235.
- Boss, A.; Janssen, V.; Mülling, C. 2003. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction*, **126**: 469-480.

- Boss, A.; Kohtes, J.; Janssen, V.; Mülling, C.; Stelljes, A.; Zerbe, H.; Hässig, M.; Thole, H. H. 2006. Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes. **Animal Reproduction Science**, **91**: 55-76.
- Carvalho, A. F.; Klisch, K.; Miglino, M. A.; Pereira, F. T. V.; Bevilacqua, E. 2006. Binucleate trophoblast cells in water buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta. **Journal of Morphology**, **267**: 50-56.
- Duella, T. M.; Byatt, J. C.; Bremel, R. D. 1986. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. **Endocrinology**, **119**: 1351-1355.
- Flood, P. F. 1991. The development of the conceptus and its relationship to the uterus In: Cupps, P. T. (Ed.). **Reproduction in Domestic Animals**. Academic Press, New York, USA, p.315-356.
- Gross, T. S.; Williams, W. F. 1988. Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cells syntheses as modulates by binucleate cell. **Biology of Reproduction**, **38**: 1027-1034.
- Hassanin, A.; Douzery, E. J. 1999. The tribal radiation of the family Bovidae (Artiodactyla) and the evolution of the mitochondrial cytochrome b gene. **Molecular Phylogenetic Evolution**, **13**: 227-243.
- Hsu, T. C.; Benirschke, K. 1967. **An Atlas of mammalian chromosomes**. Springer-Verlag, New York, USA, 1634p.
- Hsu, T. C.; Benirschke, K. 1970. **An Atlas of mammalian chromosomes**. Springer-Verlag, New York, USA, 1230p.
- Kathiresan, R.; Rajasundaram, R. C.; Pattabiraman, S. R. 1992. Histological and histochemical changes in the endometrium and placenta during different stages of gestation in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Indian Veterinary Journal**, **69**: 326-328.
- Klisch, K.; Hecht, W.; Pfarrer, C.; Schuler, G.; Hoffmann, B.; Leiser, R. 1999. DNA content and ploidy level of bovine placental trophoblast giant cells. **Placenta**, **69**: 326-328.
- Malard, J. B.; Barreto Filho, R. L.; Marques Júnior, A. P. 1996. Proporção volumétrica dos componentes estruturais da placenta de vacas zebu ao longo da gestação. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, **48**: 553-558.
- Ram, R.; Chandra, G. 1984. Macroscopic studies of the placenta of buffalo (*Bubalus bubalis*). **Indian Veterinary Journal**, **61**: 458-462.
- Reimers, T. J.; Ullman, M. B.; Hansel, W. 1985. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblast cells. **Biology of Reproduction**, **33**: 1227-1236.
- Ritz, L. R.; Glowatzki-Mullis, M. L.; MacHugh, D. E.; Gaillard, C. 2000. Phylogenetic analysis of the tribe Bovini using microsatellites. **Animal Genetic**, **31**: 178-185.
- Sharma, R. D.; Nanda, B. S.; Saigal, R. P.; Khatra, G. S.; Gupta, S. K. 1982. Note on histological and histochemical study of accessory cotyledons of buffalo. **Indian Journal Animal Science**, **52**: 261-263.
- Shuler, G.; Wirth, C.; Klisch, K.; Pfarrer, C.; Leiser, R.; Hoffmann, B. 1999. Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and parturition. **Biology of Reproduction**, **61**: 797-801.
- Tolosa, E. M. C.; Rodrigues, C. J.; Behmer, O. A.; Freitas-Neto, A. G. 2003. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2. ed. Manole, São Paulo, Brasil, 331pp.
- Ullman, M. B.; Reimers, T. J. 1989. Progesterone production by binucleate trophoblastic cells of cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, **37**: 173-179.
- Winsatt, W. A. 1980. Observations on the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. **American Journal Anatomical**, **159**: 209-243.
- Wischrall, A.; Nishiyama-Naruke, A.; Curi, R.; Barnabe, R. C. 2001a. Plasma concentrations of estradiol 17beta and PGF2alpha metabolite and placental fatty acid composition and antioxidant enzyme activity in cows with and without retained fetal membranes. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, **65**: 117-124.
- Wischrall, A.; Verreschi, I. T.; Lima, S. B.; Hayashi, L. F.; Barnabe, R. C. 2001b. Pre-parturition profile of steroids and prostaglandin in cows with or without foetal membrane retention. **Animal Reproduction Science**, **67**: 181-188.
- Wooding, F. B. P. 1980. Electron microscopic localization of binucleate cells in sheep placenta using phosphotungstic acid. **Biology of reproduction**, **22**: 357-365.
- Wooding, F. B. P. 1982. The role of binucleate cell in ruminant placental structure. **Journal of Reproduction and Fertility**, **31**: 31-39.
- Wooding, F. B. P. 1992. The synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**, **13**: 101-103.
- Wooding, F. B.; Morgan, G.; Adam, C. L. 1997. Structure and function in the ruminant synepitheliochorial placenta: central role of the trophoblast binucleate cell in deer. **Microscopical Research Technology**, **38**: 88-99.
- Wooding, F. B. P.; Morgan, G.; Monaghan, S.; Hamon, M.; Heap, R. B. 1996. Functional specialization in the ruminant placenta: Evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. **Placenta**, **17**: 75-86.
- Wooding, F. B.; Wathes, D. C. 1980. Binucleate cell migration in the bovine placenta. **Journal of Reproduction and Fertility**, **59**: 425-430.