

Desenvolvimento embrionário/fetal, placentação e glicosaminoglicanos no aparelho reprodutor feminino e na placenta

Embryonic/Fetal Development, Placentation and Glycosaminoglycans in the Female Reproductive Tract and Placenta

Herson da Silva Costa¹, Felipe Venceslau Câmara², Ferdinando Vinicius Fernandes Bezerra¹, Carlos Eduardo Bezerra de Moura³, Alexandra Fernandes Pereira⁴, Alexandre Rodrigues Silva⁵, Hugo Alexandre de Oliveira Rocha⁶, Maria Angélica Miglino⁷ & Moacir Franco de Oliveira¹

ABSTRACT

Background: Fetal attachments, placentation and embryonic development have been widely discussed in rodents such as agoutis and cavies, as well as research on glycosaminoglycans (GAGs) in rats and rabbits. Moreover, studies on buffalo, cattle and sheep are described in ruminants, and work has also been reported in sheep with GAGs in placentoma. However, further studies are needed in this regard, since there are reports of economic losses associated with reproductive failures described for cattle such as changes in the chorion and allantois, and in sheep in which changes between the transition from vitelline to allantois circulation have been discussed.

Review: In relation to embryonic development, detailed studies have been described in rodents such as rats (12 days old), desert mouse (15 days old) and agoutis at 30 days. Macroscopic structures such as the cephalic region, nose, optic vesicle, cervical curvature, thoracic and pelvic limbs were observed, as well as microscopic structures such as the pituitary, lung, heart, brain cavity, liver, retina, and ossification regions. There are reports of buffalo and cattle studies in ruminants describing early embryonic development. However, the research in the case of sheep is limited, meaning there is only the ultrasound examination, such as gestational diagnosis and morphometric measurement of the embryonic vesicle. Still, studies with umbilical funicular and placental development of sheep with different gestational ages can be highlighted. Regarding extraembryonic annexes, four important structures which contribute to embryonic maintenance have been reported. These are called the chorion, amnion, allantois and yolk sac, respectively, and are responsible for originating the placenta, embryonic protection, collecting metabolic waste and early embryonic nutrition. In addition, correlating the annexes gives rise to the placentation process, which were described two models; the first is transient, called choriovitelline, and the second is called chorioallantoid, which represents the definitive model. Allied to the gestational process, the importance of glycosaminoglycans (GAGs) and proteoglycans are worth mentioning, as they are essential components of the extracellular matrix. They are related in the implantation process, tissue organization during gestation, and also in placental angiogenesis, as described in ruminants (i.e. involved in the vascular growth that accompanies the development of the placenta), which in turn causes an increase in blood flow in this organ, and constitutes a determining factor for fetal development.

Conclusion: Such studies regarding the embryonic development of ruminants are still limited to sonographic description and some information is only available in the context of extraembryonic membranes. For glycosaminoglycans, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparan sulfate and hyaluronic acid are identified in the reproductive tract and placenta. We intend to produce important information for the reproductive and sanitary management of ruminants with the information in this article, providing data to stimulate new studies aiming to minimize the occurrence of embryonic death and economic losses. In addition, further studies on GAGs are needed to better understand their true correlation with gestation, so they can intercede through supplementation and minimize reproductive losses.

Keywords: mammals, extracellular matrix, pathologies, reproductive events.

Descritores: mamíferos, matriz extracelular, patologias, eventos reprodutivos.

DOI: 10.22456/1679-9216.100339

Received: 28 January 2020

Accepted: 20 April 2020

Published: 4 May 2020

¹Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LABMORFA), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PROPPG), ²Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), ³Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA) & ⁴Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, PROPPG, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil. ⁵Setor da Clínica Médica de Grandes Animais, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Potiguar (UNP), Natal, RN, Brazil. ⁶Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), SP, Brazil. CORRESPONDENCE: H.S. Costa [herson-costa@hotmail.com]. Laboratório de Morfofisiologia Animal, CCBS - UFERSA. Av. Francisco Mota n. 572. CEP 59.625-900 Mossoró, RN, Brazil.

I. INTRODUÇÃO

II. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO/FETAL

III. ANEXOS EXTRAEMBRIÓNICOS E PLACENTAÇÃO

1. MORFOLOGIA DO SACO CORIÔNICO
2. MORFOLOGIA DO ALANTOIDE
3. MORFOLOGIA DO ÂMNIO
4. MORFOLOGIA DO SACO VITELINO
5. PLACENTA E PLACENTAÇÃO

IV. GLICOSAMINOGLICANOS NO APARELHO REPRODUTOR E NA PLACENTA

V. CONCLUSÃO

I. INTRODUÇÃO

No Brasil, a introdução de atividades envolvendo o melhoramento genético nos animais tem sido cada vez mais intensificada, favorecendo eventos associados ao processo produtivo. Esse direcionamento tem modificado o modelo de produção de subsistência tornando-a uma atividade economicamente viável, seja por meio da utilização da carne, peles ou até mesmo pela criação de animais com alta aptidão leiteira para comercialização no mercado interno e externo [6]. Associado a essa importância, as pesquisas científicas relacionadas à morfofisiologia e reprodução animal têm sido intensificada, em especial quanto ao desenvolvimento embrionário e placentação dos ruminantes, uma vez que, embora existam relatos a esse respeito, tais informações são complexas e necessitam de investigações mais concretas de forma permitir a ampliação de conhecimentos referente ao desenvolvimento embrionário.

Sobre este tema são descritos na literatura estudos que dizem respeito à relação entre o comprimento craniocaudal (CCC) e o diâmetro da vesícula embrionária/fetal (DVE) nos momentos 15º ao 45º dia após a cópula por meio de avaliação ultrassonográfica em ovino da raça Bergamácia [15] e avaliação ultrassonográfica do desenvolvimento embrionário/fetal em ovinos da raça Santa Inês, nos momentos 15º ao 45º dia de gestação onde são referenciados a vesícula embrionária, embrião, placentoma, batimento cardíaco, membrana amniótica, diferenciação entre cabeça e tronco, movimento fetal, cordão umbilical, botão dos membros torácicos e pélvicos e globo ocular [37].

Em trabalhos com ovinos sem raça definida, há relatos microscopicamente que o cordão umbilical foi composto por duas artérias, duas veias e um ducto

alantoide, observado tanto na porção justa fetal como na porção justa placentária [1].

Já quanto à placentação, há pesquisas que abordam o crescimento e o desenvolvimento das membranas extraembrionárias (cório, alantoide, âmnio e saco vitelino) ao longo do desenvolvimento do conceito, mas que ainda precisam ser melhores elucidadas, embora exista estudo em bovinos [2], em que se cita a existência de uma placenta coriovitelina transitória e, sobre a qual se dá pouca importância sobre seu papel participativo no desenvolvimento do embrião, mesmo diante de sua relevância, uma vez que estudos têm demonstrado problemas relacionados ao conceito, muitos deles diretamente relacionados às falhas no desenvolvimento inicial das membranas extraembrionárias, a exemplo do que descrevem para modificações no cório [8] e anormalidades no alantoide [59]. Já quanto ao saco vitelino, apenas Sousa *et al.* [55], levantam a hipótese de uma possível transição da circulação vitelina para a nutrição alantoidiana, estar relacionada com falhas embrionárias/fetais.

Assim, imbuídos de produção que melhor explicitem o entendimento a cerca das patologias reprodutivas, pesquisas inerentes ao nível celular tem sido realizadas, principalmente no âmbito da matriz extracelular, visto que possuem estruturas denominadas de glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos (PGs), os quais são responsáveis por garantir a hidratação e elasticidade tecidual podendo ter papel importante na gestação dos animais [31].

Dessa forma o objetivo dessa revisão é discutir sobre o desenvolvimento embrionário, placentação e ainda sobre glicosaminoglicanos no aparelho reprodutor feminino de ruminantes, de modo a contribuir para um melhor entendimento sobre processos patológicos reprodutivos que acometem os animais.

II. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO/FETAL

Quanto as pesquisas envolvendo o desenvolvimento embrionário, estudos mais aprofundados, envolvendo macróscopia e morfometria foram realizados em roedores, a exemplo de ratos [21] e cutias [44]. Já em ruminantes tais informações remetem a búfalos, ao estudar o desenvolvimento entre 10 a 60 dias de gestação [39] e bovinos, descrevendo o desenvolvimento gestacional entre 15 a 70 dias [3].

Já em ovinos, tais estudos limitam-se apenas a descrição por ultrassonografia, assim ao utilizar um

transdutor transretal de 7,5 MHz, detectaram pulsações rítmicas (batimentos cardíacos) entre os dias 18 e 19 de gestação e pelo menos um embrião foi detectado entre o 20° e 21° dia [53]. Em outro estudo, os batimentos cardíacos foram observados a partir do 21° dia de gestação [11].

Após o 25° dia de gestação, as visualizações do embrião e do seu batimento cardíaco tornam-se mais evidente [27]. Já Garcia *et al.* [25], ao examinarem o útero gestante de ovelhas por meio de ultrassonografia, observaram batimentos cardíacos durante os dias 21 a 34, demonstrando grande variação.

Na tentativa de avaliar as diferenças encontradas entre experimentos realizados com bovinos, verificam-se que a precocidade na observação do embrião deve ocorrer, principalmente em função da qualidade da resolução das imagens dos diferentes aparelhos utilizados e a frequência dos transdutores. Além disso, o comportamento do animal durante o exame, as diferenças entre raças e habilidade do operador são fatores que também influenciam nos resultados de diagnósticos precoces [57].

A presença de líquido intrauterino é geralmente o primeiro indicativo de gestação. Entretanto, nem sempre ocorre em forma de vesículas, podendo ser confundido com líquido proveniente da fase estrogênica [5] ou com líquido oriundo de casos de hidrometra [34].

Em ovelhas, relatam a presença de líquido intrauterino a partir do 15° dia da cobertura em 16,7% dos animais, podendo ser encontrado tardiamente no 19° dia de gestação [53]. Ao trabalhar com ovinos da raça Bergamácia, observam a presença de líquido intrauterino no 15° dia de gestação em 42,1% dos animais e no 20° dia em apenas 5,3% [15]. Já em relação à vesícula embrionária, descrevem as primeiras observações já a partir do 15° dia de gestação em 10,6% dos animais e no 21° dia em 5,3%, apresentando medidas de 5,33 cm aos 45° dias [15].

Em experimentos com ovinos sem raça definida, constataam através da ultrassonografia a presença da vesícula embrionária somente no 21° dia de gestação, caracterizada por apresentar uma área anecóica bem delimitada [18].

Morfológicamente, a diferenciação do embrião em cabeça e tronco, dar-se a partir do 26° dia gestação em ovinos da raça Merino [29]. Em outro trabalho, com ovelhas Bergamácia [15], esta diferenciação

varia entre o 25° e o 31° dia de gestação. Já na raça Santa Inês, afirmam a diferenciação a partir do 36° dia de gestação [5].

Quanto aos botões dos membros torácicos e pélvicos de ovinos, observa-se que existe variações numa mesma espécie, sendo detectado a partir do 34° dia de gestação [37], no 30° dia de gestação [15] e ainda, a partir do 29° dia de gestação [5]. Os achados mostram grande variação, o que pode está associado ao equipamento de ultrassonografia ou ao profissional que está realizando o exame.

No que diz respeito à morfometria, os estudos abordando estes aspectos são mais detalhados em roedores. Em ratos, identificam em embriões de 12 dias de gestação com medidas de 0,4 cm de Crown-Rump, estruturas macroscópicas como: região cefálica, 4° ventrículo, nariz, vesícula ótica, curvatura cervical, somitos, membros torácicos, membros pélvicos, cauda e início da diferenciação das extremidades dos membros torácicos em dedos separados [21]. O Crown-Rump (CR), corresponde a distância occípito-sacral, ou seja, medida entre a crista nugal e a última vértebra sacral.

Em outra pesquisa, agora com cutias, descrevem mensurações para diversas idades de embriões/fetos. Assim embriões aos 30 dias apresentam 10,75 ± 0,11 mm de crown-rump (CR), aos 35 dias: 15,6 ± 0,16 mm de CR, aos 45 dias: 40,8 ± 0,4 mm CR, aos 55 dias: 58,8 ± 0,1 mm de CR, aos 65 dias: 83 ± 0,08 mm, aos 85 dias: 127,7 ± 0,6 mm CR, aos 100 dias: 164,3 ± 10,4 mm de CR e já os neonatos aferiu-se valor de 179,1 ± 0,5 mm CR [44].

Já em estudos realizados em *Necromys lasiurus*, inferem que o estágio embrionário está presente até o 15° dia de gestação, podendo ser observado macroscopicamente o alongamento dos membros e aparecimento de dígitos, fechamento do canal auditivo, vasos sanguíneos, alongamento do crânio, aparência das pálpebras, espessura e coloração da pele) e microscopicamente as regiões de hipófise, pulmão, coração, cavidade cerebral, quarto ventrículo, desenvolvimento do fígado, cavidade oral e camadas que compõem a córnea, retina, camada pigmentada da retina, e ossificação de algumas regiões também foi observada [43].

Quanto ao globo ocular, sua visualização torna-se possível a partir do 41° dia de gestação na raça Corriedale [49], no 30° dia na raça Merino [29], no

33° dia na raça Bergamácia [15] e no 42° dia na raça Santa Inês [5].

Outro ponto importante é o tempo ideal para a contagem de fetos ovinos que corresponde a faixa entre os 45° e 90° dias de gestação, pois após esse período, os fetos tornam-se muito grandes para serem diferenciados entre si [27]. Já em outro estudo, afirmam que é possível diagnosticar em ovelhas, gestação múltipla

no 31° dia, apesar de ser mais segura entre o 40° e 100° dias de gestação [26].

III. ANEXOS EXTRAEMBRIONÁRIOS E PLACENTAÇÃO

O processo de placentação dos animais está diretamente relacionado à interação das membranas extraembrionárias, representadas pelo cório, alantoide, âmnio e saco vitelino (Figura 1).

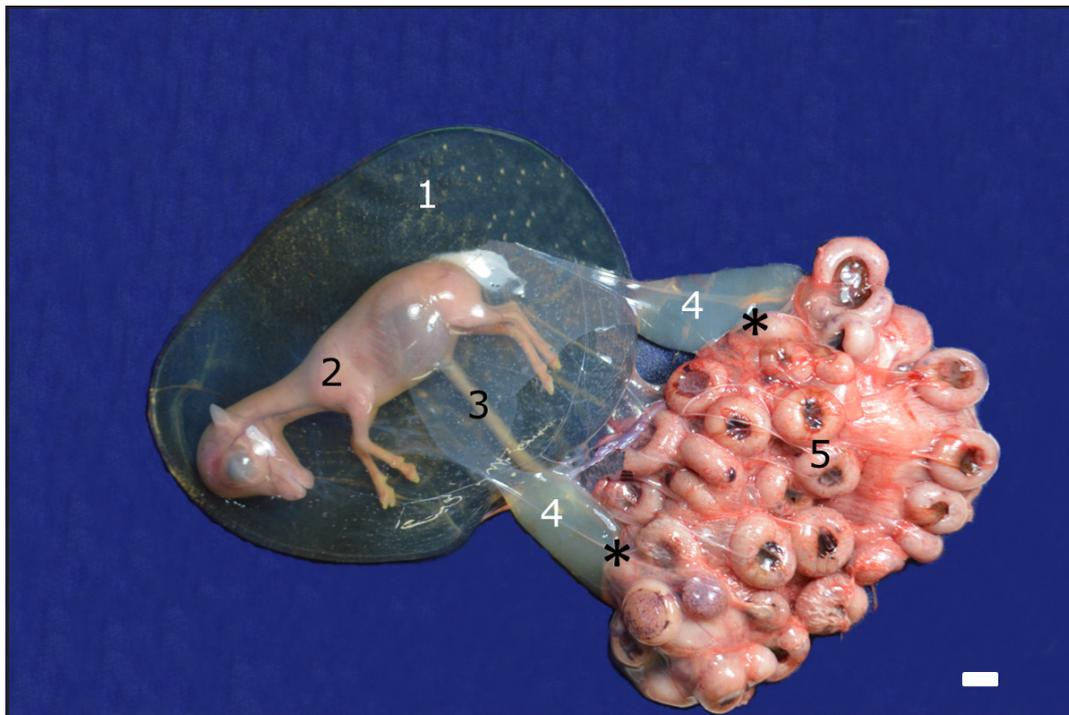


Figura 1. Placentação na espécie ovina com 60 dias de gestação. Observa-se a membrana amniótica (1), embrião (2), cordão umbilical (3), alantoide (4), placenta (5) e placentação corioalantoide (*) [Barra= 1 cm]. Fonte: Arquivo pessoal não publicado H.S. Costa.

1. Morfologia do saco coriônico

O cório é uma camada epitelial da parede externa do blastocisto. Durante a implantação ele é preenchido por uma camada interna de mesênquima, que deriva do embrião. Logo em seguida, o mesênquima desenvolve seu próprio sistema de capilarização. A cavidade circundada pelo cório, que contém o embrião, a vesícula amniótica, o saco vitelino e o alantoide, é denominada exoceloma [35]. Os autores relatam ainda que o cório é intrinsecamente um tecido avascular, sendo posteriormente vascularizado exclusivamente pelos vasos do alantoide, de forma que esse tipo de placenta é considerado corioalantoide. Esta, desenvolve importante papel na troca materno-fetal. Na verdade, essa membrana corresponde ao trofoblasto propriamente dito e serão suas células que se modificarão promoven-

do a invasão ou não do tecido materno, dependendo da espécie ou do grupo de mamíferos.

Em trabalhos com ovinos, o conceito entra no útero aproximadamente três dias após a ovulação, começando a expandir-se ao redor do 10° dia, onde é possível observar o crescimento da vesícula coriônica como um saco alongado que preenche completamente os cornos uterinos [39].

Ainda em ovelhas, ao estudar o desenvolvimento embrionário diário desde o acasalamento até 34° dia de gestação, constatam que o cório é uma estrutura aderida a mucosa uterina a partir do 17° ou 18° dias de gestação, sendo que aos trinta dias os vilos apareciam na superfície da membrana coriônica, promovendo uma relação mais íntima com as carúnculas uterinas [10].

Em pesquisas com vacas, observam que o cório a termo apresenta-se relativamente delgado,

frágil e de coloração branca e lisa. Na maior parte da sua superfície, encontram-se de 100 a 120 cotilédones volumosos que formam a placenta. Estes cotilédones são menos numerosos, entretanto, muito volumosos na parte mediana do concepto onde eles normalmente alcançam de 7 a 10 cm de diâmetro. Os cotilédones menores localizam-se nas extremidades coriônicas [7].

Já em trabalhos com búfalos, relatam que o trofoblasto é um epitélio constituído por células mononucleares de núcleos arredondados que são corados claramente. No citoplasma observam-se poliribossomos, mitocôndrias e retículo endoplasmático com reação PAS positiva no citoplasma granular refletindo a capacidade destas células de produzir e estocar proteínas, as quais são liberadas no organismo materno. Observa-se ainda, a presença das células trofoblásticas gigantes do tipo binucleadas, as principais organelas observadas são o retículo endoplasmático rugoso (RER) e mitocôndrias, além de discretos ribossomos. Enfatizam ainda que o número de vesículas localizadas na região basal das células trofoblásticas gigantes aumenta com a evolução da gestação, indicando desenvolvimento de função secretória [14].

Ao trabalhar com o desenvolvimento placentário de vacas, observam que o epitélio coriônico ou trofoblástico, apresenta-se contínuo e constituído por células trofoblásticas mononucleadas, e por células trofoblásticas gigantes binucleadas, sustentadas por um tecido mesênquimal. Além disso, possui altura epitelial constante. Observaram ainda, que nos embriões entre 15-20 dias de gestação a presença de núcleos ovais e citoplasmas ricos em grânulos nas células trofoblásticas binucleadas, sendo estas responsáveis pela regulação e produção de hormônios do crescimento e desenvolvimento fetal [3].

2. Morfologia do alantoide

O alantoide corresponde à bexiga urinária extraembrionária e se desenvolve a partir do intestino grosso embrionário. É caracterizado como um saco extraembrionário formado por uma camada simples de células pavimentosas que é envolvido por mesênquima extremamente vascularizado sendo encontrado ao lado do âmnio [3].

Em estudos na espécie bovina, relatam que o alantoide é caracterizado por projeta-se a partir do intestino posterior, como uma vesícula extraembrionária, que coleciona resíduos metabólicos nitrogenados. O mesoderma do alantoide serve de origem para vasos

alantocoriônicos, já que, o cório e o âmnio não se tornam vascularizados até que passem a manter uma relação direta com o alantoide, a quem se fundem. Os autores citam ainda que o epitélio do alantoide pode circundar a vesícula gestacional ou pode obliterar-se e finalmente regredir mesmo estando envolvido no processo transplacentário de trocas [35].

Já em ovinos o alantoide é grande, e se estende próximo às extremidades do saco coriônico, onde se fusionam, com exceção de uma região do feto, que está pressionada por uma das suas faces pelo grande saco amniótico [39].

Verificou-se ainda que o alantoide aparece geralmente à direita do embrião, em torno do 18° - 20° dia de gestação na ovelha [32] e entre 14° - 21° dias de gestação na vaca [59].

Do ponto de vista macroscópico, em ovinos, o alantoide aparece no 16° dia de gestação. Apresenta uma forma de lua crescente no 17° dia, e pode estar livre da parede do corpo do embrião no 18° dia. Aumenta rapidamente a partir do 19°, ocasião em que se torna semelhante a um saco semilunar preso ao intestino posterior por uma haste [10].

O alantoide, em vacas, possui crescimento cranial e caudal ao longo do embrião, sendo que durante a 4ª semana de gestação, este ocupa toda a cavidade celômica estendendo-se entre as membranas fetais. O alantoide adota o formato de “T” invertido com traço vertical situado no cordão umbilical [42].

Em ovelhas, reporta que o alantoide fecha totalmente o exoceloma na transição do 23° aos 24° dias de gestação e no 30° dia já se encontra fusionado ao cório [53].

No que se refere aos estudos de microscopia de luz, em vacas, observa-se que o epitélio do alantoide é formado por camada simples de células pavimentosas, sustentadas por tecido conjuntivo embrionário ou fetal, que constitui o mesênquima. Evidencia-se ainda, nas fases gestacionais 30, 40, 60 e 70 dias a presença de células lisas com núcleos de contornos irregulares, mitocôndrias alongadas e células granulares, com grânulos vesiculosos de glicogênio bem definidos [3].

Ao trabalhar com placentação de bovinos, relatam que o alantóide é formado por um epitélio cubóide simples observado entre 30 a 40 dias de gestação a partir de coloração azul de toluidina. A microscopia de varredura revelou um epitélio com células que apresentam uma forma que varia de pentagonal a hexagonal, observado

entre 15 a 20 dias de gestação. Em seguida a transmissão em técnica de microscopia de transmissão pode constatar células achatadas repletas de polirribossomos livres, fibroblastos e fibras de colágeno, além dos grânulos de glicogênio densos por elétrons e mitocôndrias alongadas, observados entre 30 a 40 dias de gestação [4].

3. Morfologia do âmnio

Durante o estágio de blastocisto ocorre a formação de quatro estruturas importantes, denominadas de massa celular interna, endoderma, mesoderma e trofoectoderma. A partir de dobras do trofoectoderma e mesoderma surge o âmnio, como resultado da fusão de dobras do trofoectoderma e mesoderma formando um espaço preenchido de líquido ao redor do embrião com funções de hidratação do feto, nutrição, lubrificação do canal do parto e proteção mecânica do feto [35].

Em ovinos, o âmnio se forma entre o 13º e o 16º dia de gestação e em seguida aumenta rapidamente. A amniogênese inicia-se a partir das pregas somatopleurais, onde persiste a zona de fusão representada pela união mesodérmica entre o âmnio e o cório, próximos à região dorsal do embrião. O âmnio cresce para fora e sobre o disco embrionário e envolve o embrião em crescimento. A partir de então, começa a formar um saco repleto de fluidos onde o feto irá flutuar até o final da gestação [50].

Ainda em ovelhas, aos 27 dias, observam que a membrana amniótica não está em aposição ao cório ou ao alantoide. O âmnio e o alantoide somente se juntam ao cório, a partir dos 60 dias [54].

Na microscopia de luz, relatam para bovinos que o âmnio apresenta células com formato poligonal, revestido por microvilos curtos, distribuídos por toda a parte superficial da membrana e delimitadas por fileiras microvilosas condensadas. Observa ainda que o epitélio amniótico é pavimentoso simples e apresenta poucas organelas citoplasmáticas nos estágios iniciais da gestação [3]. Já em ovinos, a partir do 27º dia de gestação, observa no epitélio do âmnio a presença de junções ocludentes entre as células, tais junções podem estar relacionadas aos mecanismos de transferência de solutos entre epitélios [54].

Ao pesquisar os bovinos, constatam que o âmnio apresentava células achatadas e mesênquima, entre 40 a 50 dias de gestação, vistas pela coloração hematoxilina-eosina (HE). A varredura revelou que as células do epitélio amniótico são delimitadas por uma linha densa de microvilos formando estruturas

poliedricas, relatado entre 50 a 60 dias de gestação. Já a transmissão pode constatar células achatadas com interdigitações citoplasmáticas, membrana basal, mesênquima e glicocalix, fetos entre 60 a 70 dias de gestação [4].

4. Morfologia do saco vitelino

O saco vitelino é formado a partir da camada primitiva endodérmica, sendo importante na manutenção nutritiva do embrião no estágio inicial. Inicialmente esta membrana é completamente vascularizada ao redor do 16º dia de gestação na ovelha, e 20º dia de gestação na vaca, onde permanece por pouco tempo, pois logo é deslocado pelo rápido crescimento do saco alantoide [62].

No que tange as membranas embrionárias, verificam para ovinos que o saco vitelino inicialmente é grande e vascularizado, sendo completamente envolvido pelo celoma e separado do cório no 17º dia de gestação [32].

Já em estudos com bovinos, citam que o saco vitelino involui e se degenera em um curto período de tempo, sendo por tanto, reduzido a um grupo sólido de células, com poucos vasos sanguíneos no 25º dia de gestação. Esta estrutura está separada do cório, atrofia-se precocemente, e degenera-se sem deixar vestígio [42].

A partir da microscopia de luz, observam para bovinos que o epitélio vitelino apresenta células endodérmicas inicialmente globosas, e embriões mais adiantados, as células se tornam colunares baixas. No mesênquima do saco vitelino de embriões bovinos de 15 a 20 dias, são visualizadas ilhas de sangue, contendo eritroblastos nucleados primitivos. As funções das “Ilhas de eritroblastos” estão relacionadas ao processo de diferenciação de células sanguíneas durante a eritropoiese, e com a vasculogênese [3].

Em relação ao saco vitelino, a literatura fornece estudos mais aprofundados em roedores, como ratos, onde Favaron *et al.* [22] descrevem células semelhantes a fibroblastos e semelhantes a epitélio com atividade multipotente, os quais se diferenciam em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica e não desenvolvem tumores. Estas células foram positivas para marcadores de células-tronco mesenquimais (Stro-1, CD90, CD105, CD73) e multipotência (Oct3 / 4, Nanog), bem como precursores de células-tronco hematopoéticas (CD117). Os autores concluem que as células progenitoras mesenquimais do saco vitelino são promissoras para uma ampla gama de aplicações na medicina regenerativa.

Em outro estudo realizado por Vale *et al.* [60], relatam em preás, que o saco vitelino é formado pelo endoderma parietal e visceral e após o 14º dia de gestação ocorre uma inversão do saco vitelino, caracterizada pela degeneração do endoderma parietal e trofoblasto mural. Após a inversão do saco vitelino, são favorecidas estreitas relações entre o saco vitelino e epitélio uterino de modo a elevar o potencial absorptivo de células endodérmicas, aptas à captação de substâncias secretadas pelas glândulas uterinas.

5. Placenta e Placentação

Os estudos de placentação foram descritos em roedores referem-se a placenta como sendo a interação entre duas membranas extraembrionárias distintas, podendo-se a exemplo disto citar o modelo coriovitelino formado pelo cório e saco vitelino e, o corioalantoide formado pela interação entre cório e alantoide [23].

No mocó [45] e paca [9], o modelo de placentação corioalantoide foi considerado como aquele com papel fundamental na manutenção embrionária e se constitui como o modelo definitivo na gestação. Além disto, relata a presença de uma barreira placentária do tipo hemomonocorial formada pelo sinciciotrofoblasto, membrana basal, tecido conectivo e capilar.

Em pesquisa com preá, define placentação como a interação corioalantoide localizada no antimesométrio do útero. Os autores citam algumas particularidades de acordo com a idade gestacional e observam que até o 9º dia de gestação, a placenta consiste de regiões sem vasos fetais e pela presença de trofoblasto sincicial [46].

Classificada como órgão transitório e complexo, encontrada apenas em mamíferos, e responsável pelas trocas fisiológicas entre mãe e feto, a placenta é o único órgão que resulta da interação entre células de dois indivíduos diferentes. A mesma é constituída por porções materna e fetal, cada porção possui células genéticas e imunologicamente diferentes. A porção fetal é representada pelo corio. Esse possui uma placa corial de onde partem vilos coriônicos provenientes de uma parte central conjuntiva que por sua vez é derivada do mesênquima extraembrionário, possui também as camadas de citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto; a porção materna, chamada de decídua basal, fornece sangue arterial para as lacunas entre os vilos secundários e recebe sangue pobre em oxigênio proveniente do mesmo local [28].

Nos ruminantes, a complexidade da placenta deve-se ao grau de interação entre tecidos de origem materno e fetal, além da presença de uma variedade de camadas intermediárias que se interpõem entre os leitos vasculares maternos e fetais, bem como devido à evolução das relações destes tecidos e das membranas fetais durante o período de implantação do blastocisto até o parto [38].

Nas espécies domésticas, observa-se que a placenta pode representar modelos do tipo: epiteliocorial, sinepiteliocorial, endoteliocorial e hemocorial de acordo com a forma de sobreposição e de interação entre o trofoblasto no epitélio uterino [13].

Nesse aspecto, pesquisa realizada nos ruminantes, classificam a placenta como sinepiteliocorial devido à perda do epitélio uterino promovido pelo cório [2].

Ainda nos ruminantes, reporta que a placenta é cotiledonária, devido ser caracterizada pela presença de muitas unidades placentárias denominadas cotilédones, que interagem com unidades maternas, formando os placentomas, os quais são separados por áreas intercotiledonárias de cório liso [35].

Já nos ovinos, aos 120 dias de gestação, verificam que a placenta apresenta placentomas, os quais podem variar consideravelmente em tamanho e número, apresentando-se como estruturas que medem entre 10 mm e 50 mm de diâmetro e com número variando de 20 a 70 por feto [51].

Histologicamente, em trabalhos com capivaras, revelam que a placenta no estágio embrionário é formada por um agregado de trofoblasto coberto por uma camada de mesoderma da qual vasos fetais penetram nas dobras da superfície. Aos 70 dias, a placenta contém áreas de labirinto (lobos) separados por áreas interlobulares. Aos 90 dias, a diferenciação da placenta é completa observando-se a sobreposição de vasos fetais e lacunas de sangue materno [30].

Oliveira [47], ao estudar o desenvolvimento placentário de ovinos mestiços, descrevem a partir da microscopia, a existência de artéria, arteríola, vênula, veia e capilar que não distinguiram, porém, há a presença de células trofoblásticas binucleadas e ainda, trinucleadas no grupo pertencente ao 2º terço da gestação, diferentemente dos ovinos do 3º terço da gestação, que observou-se apenas células trofoblásticas binucleadas.

Em catetos analisando diferentes idades gestacionais (> 35, 75, 115 e 135 dias), relatam a expressão de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular)

através da técnica de imunohistoquímica e RT-PCR em placentas e útero. Assim, observam que existe imunomarcagem positiva intensa para VEGF no epitélio uterino, glândulas uterinas e trofoblasto. Concluem assim, que o VEGF está relacionado fortemente com o processo de angiogênese necessário ao estabelecimento da gestação [52].

IV. GLICOSAMINOGLICANOS NO APARELHO REPRODUTOR E NA PLACENTA

Estudos pioneiros com glicosaminoglicanos (GAGs) foram realizados por Nader *et al.* [40] em 1984, em moluscos. Nesses estudos, infere-se que estas

substâncias são heteropolissacarídeos que possuem como estrutura básica, unidades alternadas de hexosamina e açúcar não-nitrogenado unidas por ligações glicosídicas, presentes em todas as células animais com diferenças estruturais dependendo do tecido ou do organismo de origem. Existe diversos tipos de GAGs, tais como, ácido hialurônico, heparina, condroitin sulfato, dentre outras. Essas moléculas estão presentes em cartilagem, superfícies celulares, membranas basais, epitélios e placenta, além do plasma sanguíneo e urina. Nesse aspecto, a literatura nos fornece alguns estudos os quais são identificados os GAGs em mamíferos (Tabela 1).

Tabela 1. Glicosaminoglicanos (GAGs) no útero e placenta de mamíferos.

Espécie	Localização dos GAGs	Tipos de GAGs	Referência
Rato	Corno uterino	HA	[12]
Rato	Cérvix	DS, HS e HA	[16]
Rato albino	Cérvix (gestante)	CS, DS, HS, HA (ambos em baixa concentração)	[56]
Rato/mulher	Cérvix (gestação a termo)	HA	[58]
Mulher	Endométrio	CS, DS e HS (dois últimos em baixa concentração)	[41]
Coelho	Útero	HS, DS, HA, CS	[19]
Mulher	Placenta (jovem/a termo)	Jovem: CS (alta concentração) A termo: DS e HS	[33]
Mulher	Placenta (três primeiros meses/ a termo)	CS, HA, HS e DS	[61]
Ovino	Placentoma	HA, alta concentração.	[48]

CS= condroitin sulfato; DS= dermatan sulfato; HS= heparan sulfato; HA= ácido hialurônico.

Os principais glicosaminoglicanos encontrados em animais são: condroitin 4 e 6 sulfatos, dermatan sulfato, heparan sulfato, heparina, queratan sulfato e ácido hialurônico, que diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não aminado (ausência do grupo NH₂), quanto ao grau e posição de sulfatação, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter e intradissacarídica. Com exceção do ácido hialurônico, todos os glicosaminoglicanos estão ligados covalentemente ao esqueleto proteico, formando proteoglicanos [24].

Os GAGs são componentes da superfície celular e da matriz extracelular, interagindo com colágenos, laminina e a fibronectina, além de interagirem com

determinados fatores de crescimento. A interação dos componentes da matriz extracelular com os proteoglicanos podem afetar o crescimento celular, a adesão e a diferenciação das células, no qual as suas funções são dependentes da cadeia lateral dos glicosaminoglicanos [36].

Além disso, os GAGs estão envolvidos em diversas funções biológicas como adesão, migração e proliferação celular, secreção de proteínas e expressão gênica, atuando como organizadores celulares e na maturação de tecidos especializados [17]. Contribuem ainda para a estrutura e as propriedades de permeabilidade do tecido conjuntivo, agem como guia para enzimas e fatores de crescimento tanto na matriz

quanto na superfície das células, estando direta ou indiretamente envolvidos com tumores e metástases, reações imunológicas, desenvolvimento folicular, infertilidade e angiogênese e, portanto, ao adequado desenvolvimento fetal [20].

Ao estudar a angiogênese placentária de ruminantes, relatam que os GAGs estão envolvidos no crescimento vascular que acompanha o desenvolvimento da placenta, que por sua vez, provoca um aumento no fluxo sanguíneo neste órgão, fator determinante para o desenvolvimento fetal [50].

Já em ovinos, os glicosaminoglicanos estão envolvidos na formação dos placentomas. No estágio inicial tem-se predomínio dessas substâncias na matriz extracelular dos placentomas em especial o ácido hialurônico. As concentrações dos glicosaminoglicanos aumentam no decorrer da gestação e atingem seus menores níveis no final da gestação, acompanhado pelo desenvolvimento do placentoma e crescimento fetal [48].

V. CONCLUSÃO

Conclui-se que, em relação ao desenvolvimento embrionário dos ruminantes, tais estudos ainda são limitados ao nível da descrição ultrassonográfica. Já no que diz respeito aos anexos e placentação as descrições existem informações fortemente elucidadas, principalmente na espécie bovina. Quanto aos glicosaminoglicanos, foram identificados a condroitin sulfato, o dermatan sulfato, o heparan sulfato e o ácido hialurônico no aparelho reprodutor e placenta de ratos, mulher, coelho e ovinos mestiços.

Espera-se que este texto de revisão possa contribuir para um melhor entendimento a cerca do processo reprodutivo, em especial sobre a importância dos glicosaminoglicanos no processo gestacional.

Acknowledgements. Agradecemos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de doutorado.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Almeida J.M., Santos R.M., Miglino M.A. & Morais-Pinto L. 2000. Morfologia do funículo umbilical em ovinos deslanados mestiços (*Ovis aries*, L. 1758). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 37(7): 189-193.
- 2 Amoroso E.C. 1959. Structural and functional aspects of the placenta: Comparative anatomy of the placenta. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 75(2): 855-872.
- 3 Assis Neto A.C. 2005. Desenvolvimento placentário em bovinos obtidos por gestações naturais e por fecundação *in vitro*. 223f. São Paulo, SP. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Universidade de São Paulo.
- 4 Assis Neto A.C., Santos E.C.C., Pereira F.T.V. & Miglino M.A. 2009. Initial development of bovine placentation (*Bos indicus*) from the point of view of the allantois and amnion. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 38(5): 341-347.
- 5 Azevedo A., Chalhoub M., Furst R., Moura Neto A.V. & Ribeiro Filho A.I. 2001. Momento de detecção ultrassonográfica de algumas características do concepto ovino Santa Inês do 20° ao 46° dia de prenhez. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 25(2): 1147-1148.
- 6 Bandeira D.A., Santos M.H.B., Correio Neto J. & Nunes J.F. 2004. Aspectos gerais da caprino-ovinocultura no Brasil e seus reflexos produtivo e reprodutivo. In: Santos M.H.B., Oliveira M.A.L. & Lima P.F. (Eds). *Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha*. São Paulo: Varela, pp.85-96.
- 7 Bertolini M. & Anderson G.B. 2002. The placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology*. 57(1): 181-187.
- 8 Bjorkman N. & Sollen N. 1960. Morphology of the bovine placenta at normal delivery. *Acta Veterinaria Scandinavia*. 1(1): 347-362.
- 9 Bonattelli M., Carter A.M., Machado M.R.F., Oliveira M.F., Lima M.C. & Miglino M.A. 2005. Placentation in the paca (*Agouti paca* L). *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3(9): 1-12.
- 10 Bryden M.M., Evans H.E. & Binns W. 1972. Embryology of the sheep: Extraembryonic membranes and the development of body form. *Journal of Morphology*. 138(2): 169-185.

- 11 Calamari C.V., Ferrari S., Leinz F.F., Rodrigues C.F.C. & Bianchini D. 2002. Acurácia da ultrassonografia transretal para diagnóstico precoce de gestação em ovelhas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 26(3): 258-259.
- 12 Carson D.D., Dutt A. & Tang J.P. 1987. Glycoconjugate Synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. *Developmental Biology*. 120(1): 228-235.
- 13 Carter A.M., Enders A.C., Kunzle H., Oduor-Okelo D. & Vogel P. 2004. Placentation in species of phylogenetic importance: the Afrotheria. *Animal Reproduction Science*. 82(1): 35-48.
- 14 Carvalho A.F., Klisch K., Miglino, M.A., Pereira F.T. & Bevilacqua E. 2006. Binucleate trophoblast giant cells in the water buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta. *Journal of Morphology*. 267(1): 50-56.
- 15 Chalhoub M., Prestes N.C., Lopes M.D., Ribeiro Filho A.L., Lopes R.M. & Trinca L.A. 2001. Relação entre comprimento craniocaudal e diâmetro da vesícula embrionária/fetal com idade de gestação por meio de avaliação ultrassonográfica em ovino da raça Bergamácia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 53(1): 71-77.
- 16 Cubas J.J.M., Simões R.S., Oliveira-Filho R.M., Simões M.J., Baracat E.C. & Soares-Jr. J.M. 2010. Glycosaminoglycan Distribution in the Rat Uterine Cervix During the Estrous Cycle. *Clinics. Sao Paulo*. 65(7): 703-708.
- 17 Dietrich C.P. 1984. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 17(1): 5-15.
- 18 Domingues E. & Trein E. 1995. Diagnóstico de gestação em ovinos através de ultra-sonografia. *A Hora Veterinária*. 15(87): 58-61.
- 19 Endo M. & Yosizawa Z. 1975. Glycosaminoglycans and acidic glycoproteins in rabbit uterus under estrogenic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 404(2): 274-280.
- 20 Esko J.D. 1991. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Current Opinion in Cell Biology*. 3(5): 805-816.
- 21 Favaron P.O., Rodrigues M.N., Oliveira M.F., Biasi C.M. & Miglino M.A. 2012. Embryonic and Fetal Development in - Pigmy Rice Rat - *Oligoryzomys* sp. (Rodentia, Sigmodontinae) and its Significance for Being a new Experimental Model. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 41(4): 286-299.
- 22 Favaron P.O., Mess A., Will S.E., Maiorka P.C., Oliveira M.F. & Miglino M.A. 2014. Yolk Sac Mesenchymal Progenitor Cells from New World Mice (*Necromys lasiurus*) with Multipotent Differential Potential. *Plos One*. 9(6): e95575.
- 23 Francioli A.L.R. 2007. Desenvolvimento embriológico e fetal em pacas (*Agouti paca*, Linnaeus 1766: estabelecimento de modelo experimental análogo murino para detecção de linhagens Germ Cells. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Universidade de São Paulo.
- 24 Fraser J.R.E., Laurent T.C. & Laurent U.B.G. 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*. 242(1): 27-33.
- 25 Garcia A., Neary M.K., Kelly G.R. & Pierson R.A. 1993. Accuracy of ultrasonography in early pregnancy diagnosis in the ewe. *Theriogenology*. 39(4): 847-861.
- 26 Gearhart M.A., Wingfield W.E., Knight A.P., Smith J.A., Dargatz D.A., Boon J.A. & Stokes C.A. 1988. Real-time ultrasonography for determining pregnancy status and viable fetal numbers in ewes. *Theriogenology*. 30(2): 323-337.
- 27 Ishwar A.K. 1995. Pregnancy diagnosis in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*. 17(4): 37-44.
- 28 Junqueira L.C. & Carneiro J. 2004. *Histologia Básica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 388p.
- 29 Kaulfuss K.H., Uhlich K., Brabant S., Blume K. & Strittmatter K. 1996. Die ultrasonographische Trächtigkeitsdiagnostik (B Mode) beim Schaf. Teil 2: Verlaufsuntersuchungen im ersten Trächtigkeitsmonat. *Tierärztliche Praxis*. 24(1): 559-566.
- 30 Kanashiro C., Santos T.C., Miglino M.A., Mess A.M. & Carter A.M. 2009. Growth and development of the placenta in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Reproductive Biology and Endocrinology*. 57(7): 1-13.
- 31 Kresse H. & Schönher E. 2001. Proteoglycans of the extracellular matrix of the placenta and growth control. *Journal of Cellular Physiology*. 189(3): 266-274.
- 32 Latshaw W.K. 1987. *Veterinary development anatomy: a clinical oriented approach*. Toronto: Decker, pp.49-74.
- 33 Lee T.Y., Jamieson A.M. & Schafer I.A. 1973. Changes in the composition and structure of glycosaminoglycans in the human placenta during development. *Pediatric Research*. 7(12): 965-977.
- 34 Lêga E. & Toniolo G. 1999. Hidrometra na espécie caprina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 23(3): 446-447.
- 35 Leiser R. & Kaufmann P. 1994. Placental structure: in a comparative aspect. *Experimental Clinic of Endocrinology*. 102(3): 122-134.

- 36 Merle B., Durussel L., Delmas P.D. & Clézardin P. 1999. Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycan side chain. *Journal of Cellular Biochemistry*. 75(3): 538-546.
- 37 Moraes E.P.B.X., Santos M.H.B., Aguiar Filho C.R., Neves J.P., Oliveira M.A.L. & Lima P.F. 2008. Avaliação ultra-sonográfica do desenvolvimento embrionário-fetal de ovinos da raça Santa Inês. *Ciência Animal Brasileira*. 9(1): 148-155.
- 38 Mossman H.W. 1987. *Vertebrate fetal membranes*. New Brunswick: Rutgers University Press, 383p.
- 39 Morini A.C. 2009. Desenvolvimento embrionário em búfalos (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758). 179f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Universidade de São Paulo.
- 40 Nader H.B., Ferreira T.M., Paiva J.F., Medeiros M.G., Jeronimo S.M., Paiva V.M. & Dietrich C.P. 1984. Isolation and structural studies of heparan sulfates and chondroitin sulfates from three species of molluscs. *The Journal of Biological and Chemistry*. 259(3): 1431-1435.
- 41 Nasciutti L.E., Ferrari R., Berardo P.T., Souza M.L., Takiya C.M. & Borojevic R. 2006. Distribution of chondroitin sulfate in human endometrium. *Micron*. 37(6): 544-550.
- 42 Noden D.M. & Lahunta A. 1990. *Embriologia de los Animales Domésticos*. Zaragoza: Acribia, 399p.
- 43 Olio R.L., Favaron P.O., Lobo L.M., Sea L.W., Santos A.C., Viana D.C., Oliveira M.F. & Miglino M.A. 2014. Characterization of Embryonic and Fetal Development of *Necomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae). *Journal of Cytology and Histology*. 5(4): 242-251.
- 44 Oliveira G.B., Araújo Junior H.N., Costa H.S., Silva A.R., Moura C.E.B., Rocha H.A.O., Miglino M.A. & Oliveira M.F. 2017. Post-implantation development of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). *Animal Reproduction Science*. 182(1): 35-47.
- 45 Oliveira M.F., Carter A.M., Bonatelli M., Ambrosio C.E. & Miglino M.A. 2006. Placentation in the rock cavy, (Wied). *Placenta*. 27(1): 87-97.
- 46 Oliveira M.F., Mess A., Ambrósio C.E., Dantas C.A.G., Favaron P.O. & Miglino M.A. 2008. Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). *Reproductive Biology and Endocrinology*. 6(1): 39.
- 47 Oliveira G.A.A.C. 2017. Desenvolvimento placentário em ovelhas mestiças Doper x Santa Inês suplementadas nos terços finais de gestação. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia Animal) - Programa de Pós-Graduação em produção Animal, Universidade Estadual Paulista.
- 48 Ott T.L., Wiley A.A. & Bartol F.F. 1997. Effects of Stage of Gestation and Uterine Ligation on Ovine Placentome Development and Glycosaminoglycans. *Journal of Animal Science*. 75(4): 1053-1062.
- 49 Picazo R.A., Barragán M.L., Valenciano M. & Sebastián A.L. 1991. Evolución de la imagen ecográfica durante la gestación de la oveja. *Medicina Veterinaria*. 8(1): 300-317.
- 50 Reynolds L.P. & Redmer D.A. 2001. Angiogenesis in the placenta. *Biology of Reproduction*. 64(4): 1033-1040.
- 51 Sammin D., Markey B., Bassett H. & Buxton D. 2009. The ovine placenta and placentitis - A review. *Veterinary Microbiology*. 135(1-2): 90-97.
- 52 Santos T.C., Oliveira M.F., Papa P.C., Dantzer V. & Miglino M.A. 2014. VEGF system expression by immunohistochemistry and real-time RT-PCR study on collared peccary placenta. *Theriogenology*. 82(6): 834-843.
- 53 Schrick F.N. & Inskeep E.K. 1993. Determination of early pregnancy in ewes utilizing transretal ultrasonography. *Theriogenology*. 40(2): 295-306.
- 54 Shandley L., Alcorn D. & Wintour E.M. 1997. Ovine amniotic and allantoic epithelia across gestation. *The Anatomical Record*. 248(4): 542-553.
- 55 Sousa P., King T., Harkness L., Young L.E., Walker S.K. & Wilmot I. 2001. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biology of Reproduction*. 65(1): 23-30.
- 56 Souza G.N., Camano L., Araújo Júnior E., Nader H.B., Medeiros V., Martins J.R. & Souza E. 2014. The expression of glycosaminoglycans and proteoglycans in the uterine cervix of albino rats after local hyaluronidase infusion. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 27(9): 879-886.
- 57 Souza V.F., Silva N.Q., Benevides Filho I.M. & Zamborline L.C. 1997. Desenvolvimento embrionário e fetal avaliado por ultra-sonografia do 25° ao 60° dia de gestação em nelore (*Bos taurus indicus*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 21(2): 15-17.

- 58 Straach K.J., Shelton J.M., Richardson J.A., Hascall V.C. & Mahendroo M.S. 2005.** Regulation of hyaluronan expression during cervical ripening. *Glycobiology*. 15(1): 55-65.
- 59 Thompson J.G. & Peterson A.J. 2000.** Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. *Human Reproduction*. 15(5 Suppl): 59-67.
- 60 Vale A.M., Oliveira G.B., Favaron P.O., Miglino M.A., Paula V.V., Silva A.R. & Oliveira M.F. 2013.** Dynamic inversion of the yolk sac in Spix's yellow-toothed (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(1): 1033-1040.
- 61 Wasserman L., Abramovici A., Shlesinger H., Goldman J.A. & Allalouf D. 1983.** Histochemical Localization of Acidic Glycosaminoglycans in Normal Human Placentae. *Placenta*. 4(1): 101-108.
- 62 Wooding F.B.P. & Flint A.P.F. 1994.** Placentation. In: Lamming G.E. (Ed). *Marshall's Physiology of Reproduction*. 4th edn. London: Chapman and Hall, pp.233-460.