MÍRYAN LANÇA VILIA ALBERTO

**Estudo de desenvolvimento do aparelho respiratório de embriões bovinos
(*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre
10 e 60 dias**

São Paulo
2006

MÍRYAN LANÇA VILIA ALBERTO

**Estudo de desenvolvimento do aparelho respiratório de embriões bovinos
(*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre
10 e 60 dias**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1798
FMVZ

Alberto, Míryan Lança Vília

Estudo de desenvolvimento do aparelho respiratório de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 60 dias / Míryan Lança Vília Alberto. – São Paulo: M. L. V. Alberto, 2006.
102 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Desenvolvimento. 2. Embrião bovino. 3. Aparelho respiratório.
I. Título.

ERRATA

Alberto, M. L. V. **Estudo de desenvolvimento do Aparelho Respiratório de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período compreendido entre 10 e 60 dias.** 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Folhas	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Abstract	I	5	Mestrado em Medicina Veterinária	Mestrado em Ciências
73	4º imagem		B	D
75	3º e 4º imagem		A e B	C e D

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo de desenvolvimento do sistema respiratório de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional de 10 a 60 dias", protocolo nº 846/2006, utilizando 50 (cinquenta) vacas (peças de matadouro), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Study about the development of respiratory system in bovines (*Bos indicus* and *Bos taurus*) during the gestation period (10 - 60 days)", protocol number 846/2006, utilizing 50 (fifty) bovines, under the responsibility of Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 20 de fevereiro de 2006

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALBERTO, Míryan Lança Vilia

Título: Estudo de desenvolvimento do Aparelho Respiratório de embriões bovinos
(*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido
entre 10 e 60 dias

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Anatomia dos Animais
Domésticos e Silvestres da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico,

Ao Prof. Dr. José Manoel,

A convivência vinda através da embriologia me trouxe a alegria de conhecê-lo, foi plantada então uma semente, a AMIZADE, e o tempo jamais irá conseguir cobri-la!

Como sempre disse... Meu Anjo de Candura...

Foi Aristóteles... quando me ensinou que devemos ver as coisas crescerem desde o início, assim teremos melhor visão delas;

Foi Pai... quando teve paciência para ouvir minhas palavras de desespero e acalmar, fazendo com que em minutos eu pudesse enxergar o outro lado do problema, a solução;

Foi Orientador... sanou sempre da melhor forma todas minha dúvidas, sem nunca reclamar, levantar a voz ou fazer cara feia;

Foi Professor... me ensinou a aprender, e todo seu conhecimento foi transferido de forma a me fazer entender o conteúdo, instigando sempre a querer saber mais;

*Enfim, foi **AMIGO**... e esta é a minha satisfação!!!*

Aos Meus Pais,

José Roberto Vília Alberto e Maria Angélica Lança Vília Alberto;

*Eu sei, eu tenho certeza que tenho os melhores pais do mundo!
Se nasci, cresci, aprendi e me tornei quem sou eu devo a eles!
Devo a presença Amiga, estando comigo nos maus e bons momentos, me apoiando ou até mesmo repreendendo, mas mostrando sempre o caminho da verdade;
Espalharam ao meu caminhar muitas esperanças, certezas e confiança;
Tiveram sempre um abraço aconchegante a me acolher;
Abdicaram muitas vezes seus próprios sonhos, só para poder realizar os meus!*

Eu AMO muito vocês!!

Maryna,

“Não se esqueça que... se a vida tiver que nos ensinar algo, com certeza será pelo modo mais difícil”.

Vó,

*“A arte da vida consiste em fazer da vida uma obra de arte”
Mahatma Gandhi*

Hugo Andrés,

“Ainda que eu falasse a língua dos homens, que falasse a língua dos anjos, sem amor eu nada seria”...

“E quem irá dizer que não existe razão nas coisas feitas pelo coração?”

*“Os poderosos podem matar uma;
duas ou até três rosas, mas jamais
poderão deter a primavera.”*

Che Guevara

Agradecimentos

Agradeço,

A DEUS, pela a oportunidade de realizar meus sonhos e fazer minha história;

Ao Caju, que mesmo dizendo que sou conturbada, acreditou em mim, e me trouxe pra este mundo!!...rs...rs...

A Prof. Dra. Maria Angélica Miglino pela oportunidade;

Ao Assis, pela colaboração no início deste trabalho;

A todos os professores pelos ensinamentos;

Aos AMIGOS, que de alguma forma fizeram parte desta caminhada;

A nossa famosa “TURMA DO EMBRIÃO”, Celina, Rita, Dani e Evander;

À Fapesp, por ter contribuído para o desenvolvimento deste trabalho e minha sobrevivência nesta cidade (processo nº 05/51602-4);

Aos técnicos Índio, Ronaldo, Sandra e Diogo, que colaboraram nos processamentos laboratoriais;

A Sandra, que esteve sempre pronta a me ajudar nesta fase final, quando tudo começa a dar errado e vem o desespero... Muito obrigada Sandrinha!!!

Aos funcionários Jaque, Maycon e Cauê por estarem sempre dispostos a nos ajudar;

Ao Frigorífico de Poços de Caldas – Frigonossa, que contribuiu em grande parte do trabalho, estando sempre de portas abertas para nos receber;

A todos, muito obrigada pela ajuda e compreensão durante todo este período;

A cada dia Deus nos dá uma página em branco do livro da nossa vida, onde tudo que fizermos ficará registrado. Cabe somente a nós escrevermos a nossa história, deixarmos boas ou más lembranças... as páginas em branco representarão a vida desperdiçada...

Resumo

RESUMO

ALBERTO, M. L. V. **Estudo de desenvolvimento do aparelho respiratório de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante do período gestacional compreendido entre 10 e 60 dias.** [Study about the development of respiratory system in bovine embryos (*Bos indicus* and *Bos taurus*) during the gestation period 10 – 60 days]. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A presente investigação científica visou estudar o desenvolvimento do Aparelho Respiratório de bovinos, durante o período embrionário, através de técnicas empregadas em microscopias de luz transmitida e eletrônica de transmissão. Em nossos resultados pudemos observar a formação do tubo laringotraqueal em embriões apresentando idade gestacional estimada de 20 / 21 dias (CR 9,0 mm), sendo sua parede formada por epitélio constituído de várias camadas de células apoiado em mesênquima. No interior do pulmão, as áreas subjacentes ao epitélio apresentam mesênquima condensado e áreas mais afastadas mesênquima frouxo, sendo que neste último já estão presentes os vasos sanguíneos, contendo células próprias em seu interior. As células mesenquimais apresentaram formas irregulares, com aspecto estrelado ou fusiforme estando unidas por desmossomos, locais onde o citoesqueleto se prende a membrana celular, formando um elo de ligação. A bifurcação da porção caudal da traquéia nos brônquios principais é simultânea ao surgimento do brônquio traqueal, ocorrendo em embriões com idade gestacional de 28 dias (CR 12,0 mm).

Palavras-chave: Desenvolvimento. Embrião bovino. Aparelho Respiratório.

Abstract

ABSTRACT

ALBERTO, M. L. V. **Study about the development of respiratory system in bovine embryos (*Bos indicus* and *Bos taurus*) during the gestation period 10 – 60 days.** [Estudo de desenvolvimento do Aparelho Respiratório de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante do período gestacional compreendido entre 10 e 60 dias]. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The present study aims at investigating the development of the respiratory system in bovine during embryonic phase, using techniques of transmitted light microscopy and electronic transmissions. The results show the development of the laryngotracheal tube in embryos at approximately 20 / 21 days of gestation (CR 9.0 mm), being the walls of the tube made of epithelium with several layers of cells supported by mesenchyme. Inside the lung, the areas next to the epithelium show a condensed mesenchyme and further, there is a loose mesenchyme where blood vessels containing cells of their own kind can be observed. The mesenchymal cell displays irregular shapes, stellate or fusiform, being united by desmosomes, where the cytoskeleton is attached to the cell membrane creating a link. The bifurcation of the tail end of the trachea in the main bronchi is concomitant to the arising of the tracheal bronchus, occurring in embryos at 28 days of gestation (CR 12.0 mm).

Key words: Development. Bovine Embryos. Respiratory System.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 9,0 mm e Idade gestacional estimada de 20 a 21 dias (A).....	61
Figura 2 -	Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 10,0 mm e Idade gestacional estimada de 25 a 28 dias (A).....	62
Figura 3 -	Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 12,0 mm e Idade gestacional estimada de 28 a 30 dias (A).....	63
Figura 4 -	Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 12,4 mm e Idade gestacional estimada de 28 a 30 dias (A).....	65
Figura 5 -	Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 15,4 mm e Idade gestacional estimada de 31 a 32 dias (A).....	66
Figura 6 -	Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 17,1 mm e Idade gestacional estimada de 32 a 34 dias (A).....	67
Figura 7 -	Fotografia de feto bovino, em vista lateral, apresentando CR 27,0 mm e Idade gestacional estimada de 45 a 46 dias (A).....	69
Figura 8 -	Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 9,0 mm e Idade gestacional estimada de 20 a 21 dias (A).....	72
Figura 9 -	Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 12,0 mm e Idade gestacional estimada de 28 a 30 dias (A).....	73
Figura 10 -	Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 17,1 mm e Idade gestacional estimada de 32 a 34 dias (A).....	74
Figura 11 -	Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 17,1 mm e Idade gestacional estimada de 32 a 34 dias (A).....	75
Figura 12 -	Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 17,1 mm e Idade gestacional estimada de 32 a 34 dias (A).....	76
Figura 13 -	Fotografia de feto bovino, em vista lateral, apresentando CR 27,0 mm e Idade gestacional estimada de 45 a 46 dias (A).....	77
Figura 14 -	Eletromicrografia de células mesenquimais de pulmão de embrião bovino.....	80
Figura 15 -	Eletromicrografia de células mesenquimais de pulmão de embrião bovino.....	81

Figura 16 - Eletromicrografia de células mesenquimais de pulmão de embrião bovino.....	82
Figura 17 - Eletromicrografia de células mesenquimais de pulmão de embrião bovino.....	83
Figura 18 - Eletromicrografia de células mesenquimais de pulmão de embrião bovino.....	84
Figura 19 - Eletromicrografia de células epiteliais e mesenquimais do “broto” pulmonar de embrião bovino.....	85
Figura 20 - Eletromicrografia de células epiteliais do “broto” pulmonar de embrião bovino.....	86

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Derivados embrionários do epiblasto e do hipoblasto (MOORE; PERSAUD, 2004)	35
--	----

Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CR	Crow Rump
°C	grau Célcus
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo
µm	micrômetros
mg	miligrama
MG	Minas Gerais
%	porcentagem
SP	São Paulo
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
UNIFEOB	Universidade Fundação de Ensino Octávio Bastos

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	REVISÃO DE LITERATURA	28
3.1	DO CONCEPTO À FORMAÇÃO DO EMBRIÃO	29
3.2	FASES DO PERÍODO GESTACIONAL	36
3.3	FORMAÇÃO DOS ANEXOS EMBRIONÁRIOS	37
3.4	DESENVOLVIMENTO DO APARELHO RESPIRATÓRIO	40
3.4.1	Maturação pulmonar	48
3.4.2	Características anatômicas particulares dos pulmões bovinos	50
3.5	MORTALIDADE DURANTE O PERÍODO EMBRIONÁRIO	52
4	MATERIAL E MÉTODO	54
4.1	ESTUDOS MACROSCÓPICOS: PREPARO DO MATERIAL	55
4.1.1	Parâmetros analisados	56
4.2	ESTUDO MICROSCÓPICO	56
4.2.1	Processamento Microscopia de Luz	57
4.2.2	Processamento Microscopia Eletrônica de Transmissão	57
5	RESULTADOS	59
5.1	MORFOLOGIA MACROSCÓPICA EXTERNA	60
5.2	MICROSCÓPICOS	70
5.2.1	Microscopia de Luz	70
5.2.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão	78
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	97

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A reprodução animal (sistema de cria) está sendo uma das atividades mais importantes para o sucesso da bovinocultura. Para que haja um manejo reprodutivo de qualidade, esta área necessita da utilização de técnicas inovadoras a fim de visar o desempenho reprodutivo e produtivo do rebanho. Entretanto, Pinto Neto et al. (1999) alega que a maioria das investigações ligadas à tecnologia de embriões tem sido destinada à animais de raças Européias, com poucos estudos realizados em animais zebuínos.

Alves et al. (2003) afirma que a produção *in vitro* de embriões bovinos obteve avanços consideráveis nos últimos anos e está sendo rapidamente incorporada aos projetos de produção.

Técnicas de transferência de embriões bovinos vem se desenvolvendo rapidamente e com elas surgem novas perspectivas para reprodução e melhoramento animal (FERNANDES, 1994). Tais inovações e estudos requerem dados detalhados relacionados ao desenvolvimento e crescimento do embrião, todavia não encontramos literatura que abordasse dados semelhantes sobre o desenvolvimento embrionário de bovinos provenientes de vacas criadas em ambiente natural.

Os bovinos domésticos pertencem à família Bovidae e estão divididos em duas espécies principais: *Bos taurus* e *Bos indicus* (HAFEZ, HAFEZ; 2004). Sabe-se ainda que estes animais apresentam alta capacidade de adaptações as variadas condições climáticas, manejo e tipo de pastagem.

Um estudo sobre a dinâmica da biologia do desenvolvimento em bovinos é essencial, podendo fornecer dados necessários à avaliação e conhecimento sobre a

espécie juntamente dos fenômenos relacionados a sua reprodução.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Estudar embriões bovinos quanto ao tempo de gestação relacionado ao seu estágio de desenvolvimento e crescimento no período inicial de prenhes (10 a 60 dias).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar a idade gestacional com medida de Crow-Rump.
- Estudar o desenvolvimento do Aparelho Respiratório do embrião, caracterizando as diferenças nos vários estágios do desenvolvimento durante o período inicial de prenhes.
- Identificar as características microscópicas no processo de formação do Aparelho Respiratório no embrião, juntamente de seus tecidos e constituição celular.

Revisão de literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

A literatura sobre desenvolvimento embrionário humano é ampla, porém, quando se refere à espécie animal torna-se bastante restrita. Neste capítulo, descrevemos o desenvolvimento embrionário do corpo e mais especificamente do aparelho respiratório. Para tanto, optamos por dividir este capítulo em tópicos.

3.1 DO CONCEPTO À FORMAÇÃO DO EMBRIÃO

A fertilização consiste essencialmente da fusão dos gametas do macho e da fêmea para formar uma única célula, sendo este um processo duplo; em seu aspecto embriológico envolvendo a ativação do oócito pelo espermatozóide, sem o estímulo da fertilização, o oócito não completa a sua mitose não havendo, portanto a formação do zigoto e conseqüentemente não ocorre o desenvolvimento embrionário, já em seu aspecto genético, fertilização envolve a introdução do material hereditário do macho dentro do oócito para posterior fusão dos pró núcleos (HAFEZ, 1982; MOORE, PERSAUD, 2004).

Gonçalves (1998) sugeriu que as etapas iniciais do desenvolvimento embrionário, anteriores a ativação gênica do embrião são provavelmente prescritas pelos produtos maternos estocados. O melhor indicador de maturação do oócito é o desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto.

Arthur (1979); Junqueira, Carneiro (2004); Moore, Persaud (2004) descrevem a formação do embrião e seus anexos a partir do oócito sendo fertilizado na ampola da tuba uterina, formação do zigoto, sendo que sua segmentação ocorre à medida

que ele se desloca passivamente em direção ao útero. Joshi (1988) complementa que a tuba uterina é um dos locais mais importantes nos processos reprodutivos, visto que na tuba ocorrem os eventos da capacitação e transporte do espermatozóide, o transporte do oócito, a fecundação e desenvolvimento dos primeiros estágios embrionários que antecedem a implantação, seu fluido é proveniente da secreção das células mucosas do epitélio e do transudato seletivo sangüíneo.

De acordo com Moore; Persaud (2004) e Gonçalves (1998) o epitélio da tuba uterina participa no processo da reprodução, as células ciliadas estão envolvidas no transporte do oócito e possivelmente, na regulação da progressão espermática, participam da reação de capacitação dos espermatozoides. Já as células não ciliadas (secretoras de muco) secretam fatores ligados à nutrição dos espermatozoides e das células embrionárias nos primeiros estágios do desenvolvimento.

Seguindo-se a fertilização, inicia-se a clivagem do zigoto com a formação dos blastômeros e, como resultado das contrações peristálticas e ciliares normais da tuba uterina, as células embrionárias são impulsionadas em direção do útero. Quando os blastômeros alcançam o útero, em três ou quatro dias nos bovinos (NODEN, LARUNTA; 1990), a figura embrionária apresenta-se formada por dezesseis a trinta e duas células originadas por mitoses sucessivas, constituindo assim a mórula. Trata-se de um aglomerado celular compacto e envolvido pela membrana de fertilização (HAFEZ, 1982; MOORE, PERSAUD, 2004). Lindner e Wright (1983), avaliando embriões obtidos de transferência embrionária descreveram o estágio de mórula, afirmando que a massa celular embrionária consiste de blastômeros individuais formando uma massa compacta, ocupando de

60 a 70% do espaço perivitelinico. A idade estimada é de 5 dias para o estágio de mórula e de 6 dias para o de mórula compacta.

Junqueira, Carneiro (2004); Moore, Persaud (2004) complementam ainda que, o acúmulo gradual de líquido aparece na parte central da cavidade da mórula. Os blatômeros afastados pelo líquido passam a constituir uma camada periférica, o trofoblasto; espessada num ponto onde permanece um aglomerado celular, o embrioblasto ou massa celular interna, que faz saliência para dentro da cavidade, constituindo o blastocisto. Durante este estágio, Lauria, Gandolfi (1992) afirmam que é necessária uma fonte de fator de crescimento para que se prossiga um desenvolvimento normal e transformações promovendo a expansão da cavidade blastocística.

Nesta fase o embrião ocupa de 70 a 80% do espaço perivitelinico, possibilitando-se uma diferenciação entre o trofoblasto e massa celular interna. Na fase de blastocisto expandido a zona pelúcida passa a ter 1/3 da espessura primitiva com ausência parcial ou completa cavidade blastocística. Quando o blastocisto é liberado apresenta-se com uma morfologia esférica e ausência completa de zona pelúcida (LINDNER, WRIGHT; 1983).

Esper, Barbosa (1991) em seus estudos sobre ultraestrutura comparativa de embriões bovinos, consideraram que blastocistos de *Bos indicus* apresentam uma maior superfície de contato por unidade de citoplasma e diminuição da área média das mitocôndrias em relação às de *Bos taurus*. Já quanto às estruturas como trofoblasto, as mitocôndrias estão em maior número por unidade de área de citoplasma do que na massa celular interna. Em relação aos lisossomos, verificaram que em *Bos taurus* há uma maior superfície de contato por unidade de citoplasma e menor área média de lisossomos em relação ao *Bos indicus*, além do que, células

de blastocistos de *Bos taurus* possuem lípides com maior volume.

Nos ruminantes (ovinos e bovinos) e nos não ruminantes, as células do trofoblasto, durante e após a nidação no endométrio, secretam o hormônio gonadotrofina coriônica que prolongam o período de vida útil do corpo lúteo além do ciclo estral; este período é denominado de reconhecimento materno da prenhes (HAFEZ, HAFEZ; 2004). Fonseca (2001) descreve ainda que o peso do corpo lúteo está relacionado com sua capacidade de produzir progesterona, adequado ao desenvolvimento embrionário e manutenção do próprio corpo lúteo durante o período crítico da vida embrionária (da ovulação à implantação), quando ocorre o reconhecimento materno da gestação.

Na fase de blastocisto, a zona pelúcida se adelgaça e se desfaz, permitindo que as células do trofoblasto que agora sofrem diferenciação para constituírem o sinciciotrofoblasto e o citotrofoblasto, por ação enzimática, invadem a mucosa fazendo com que o blastocisto fique implantado no endométrio. Nessa fase do desenvolvimento, a nutrição do blastocisto é histotrófica com a participação endometrial (JUNQUEIRA, CARNEIRO; 2004; MOORE, PERSAUD; 2004). A estimativa de idade para a fase blastocística em bovinos vai de 7 a 9 dias até sua liberação (Lindner e Wright, 1983).

Nas espécies bovinas e ovinas, o período completo de implantação dura 40 – 45 e 14 – 16 dias, respectivamente (NODEN, LAHUNTA; 1990), sendo que os bovinos apresentam um processo de implantação superficial, não invasivo envolvendo três fases: aposição, adesão e fixação (HAFEZ, HAFEZ; 2004; KING et al, 1982).

Após a implantação do embrião o endométrio modifica-se e passa a ser chamado de decídua, distinguindo-se em decídua basal localizada entre o embrião e

o miométrio, decídua capsular entre o embrião e a luz do útero e decídua parietal, que é o restante da decídua (JUNQUEIRA, CARNEIRO 2004; MOORE, PERSAUD; 2004).

Neste estágio de desenvolvimento já existe um mesênquima extra-embriônico, derivado do hipoblasto que aparece no blastocisto contribuindo para formação dos anexos embrionários (JUNQUEIRA, CARNEIRO; 2004; MOORE, PERSAUD; 2004).

Rodrigues (1997) afirma que as células do embrioblasto conservam sua totipotencialidade após o estágio de blastocisto, preservando a capacidade de reprogramarem-se geneticamente ao momento da fecundação.

Estas células do embrioblasto, por diferenciação formam o epiblasto que junto com o hipoblasto passam a constituir o embrião bidérmico ou disco embrionário bilaminar. No interior do epiblasto surge uma cavidade que é o primórdio da cavidade amniótica, células derivadas do epiblasto localizadas lateralmente e dorsalmente passam a constituir os amnioblastos e esses passam a formar o âmnio que reveste a cavidade amniótica e o futuro saco amniótico na região dorsal do disco embrionário. O hipoblasto prolifera ventralmente ao epiblasto e passa a revestir internamente a cavidade blastocística, constituindo o saco vitelínico primitivo. Células se desprendem do hipoblasto e passam a se posicionarem entre o hipoblasto e o citotrofoblastos, estas células passam a formar o mesoderma extra-embriônico (MOORE, PERSAUD; 2004).

Do epiblasto surge o ectoderma que forma o âmnio e a células da linha primitiva que futuramente formarão parte do mesoderma extra-embriônico, mesoderma do embrião, o processo notocordal e endoderma embrionário. O hipoblasto é responsável pela formação do endoderma que reveste o saco vitelínico

primitivo e parte do mesoderma extra-embriônico (MOORE, PERSAUD; 2004).

O aparecimento da linha primitiva, o desenvolvimento da notocorda e a diferenciação dos três folhetos germinativos são eventos que ocorrem a partir do disco embrionário bilaminar e caracteriza um rápido crescimento do embrião (MOORE, PERSAUD; 2004) (Quadro 1).

Com o surgimento dos três folhetos embrionários, os mesmos durante a morfogênese são responsáveis pela formação dos órgãos e sistemas. No embrião, passam a ocorrer movimentos e dobramentos laterais e antero-posteriores que resultam na inflexão do embrião e o mesmo passa a adquirir um aspecto tubular em forma de letra C (MOORE, PERSAUD; 2004). Ao final da segunda semana, o endoderma da parte média do terço cefálico do disco apresenta um espessamento arredondado, denominado placa precordial, que se adere firmemente ao ectoderma constituindo uma futura membrana bucofaríngea, e seu rompimento estabelece a comunicação entre a cavidade oral primitiva e o intestino Katchburian, Arana (1999).

Embrião bilaminar	Epiblasto			Hipoblasto
	Amnioblastos	Ectoderma do embrião	Linha primitiva	Endoderma do saco vitelínico primitivo
	Âmnio		Mesoderma extra-embriônico	Mesoderma extra-embriônico
			Mesoderma do embrião	
			Processo notocordal	
			Endoderma do embrião	

Quadro 1: Derivados embrionários do epiblasto e do hipoblasto (MOORE; PERSAUD, 2004).

Em bovinos, a maioria dos órgãos e parte do corpo é formada entre a segunda e a sexta semana da gestação. Durante este período, o trato digestivo, os pulmões, o fígado e o pâncreas se desenvolvem a partir do intestino primitivo. No 21º dia da gestação o coração começa a funcionar e inicia-se a circulação (HAFEZ, 1982).

Gilardi (2004) supõe que embriões machos possuam metabolismo diferenciado quando em meios de cultivo em certas condições, como presença de alguma substância ou hormônio, provocando desenvolvimento embrionário mais

acelerado quando comparado ao de embriões femininos.

Assis Neto (2004) verificou em seus estudos que, um embrião com 35 dias de gestação, apresentava os anexos embrionários já formados juntamente dos seus órgãos, tais como: coração, pulmão, fígado, estômago, rim primitivo, intestino primitivo e somitos.

3.2 FASES DO PERÍODO GESTACIONAL

O desenvolvimento pré-natal dos animais domésticos pode ser dividido em três períodos principais. O período de zigoto culmina com a união inicial do blastocisto, porém anterior ao estabelecimento da circulação intra-embrionária. A duração da gestação é calculada como o intervalo entre o serviço fértil e o parto, e à medida que ela progride o útero aumenta gradativamente para permitir a expansão do feto, porém o miométrio permanece quiescente para prevenir uma expulsão prematura. O período embrionário se estende de 15 a 45 dias de gestação na vaca. Neste período, ocorre um rápido crescimento e diferenciação, durante o qual os principais tecidos, órgãos e sistemas são estabelecidos e as principais características da forma externa do corpo são reconhecidas (HAFEZ, HAFEZ; 2004).

À medida que cresce, desde zigoto até o feto a termo, o embrião não apenas aumenta de tamanho e peso, como também sofre muitas modificações morfológicas. O padrão de crescimento, isto é, o aumento percentual em peso e dimensões por unidade de tempo é muito mais rápido nos estágios iniciais e diminuem à medida que a gestação progride, enquanto que o incremento absoluto por unidade de peso aumenta exponencialmente atingindo o máximo no final da gestação (HAFEZ, 1982).

Evans, Sack (1973) consideram que, de acordo com as curvas de

crescimento e características externas analisadas, aos 18 dias os embriões bovinos apresentam-se na fase de gástrula, com formação de âmnio e linha primitiva. A partir dos 19 dias surgem os primeiros somitos derivados do dobramento da placa neural, sendo que aos 23 dias o tubo neural se fecha e aparece o 1º arco branquial, as vesículas ópticas e placódios óticos. De 24 a 26 dias as três vesículas encefálicas tornam-se visíveis, presença do 2º ao 4º arco branquial, mamilos e brotos dos membros. Com 30 dias ocorre a formação das fossetas nasais, pigmentação da retina, e placas dos membros torácicos já está presente. Entre 34 e 38 dias surge o meato acústico, fossetas nasais tornam-se salientes, ocorrendo formação das pálpebras e presença de genitais, raios digitais apresentam-se visíveis entre os dígitos. Já, a partir de 45 dias surgem os folículos pilosos acima dos olhos e lábios, meato acústico é recoberto e dígitos distais são separados. De 56 a 60 dias o palato e as pálpebras são fusionados, ocorre diferenciação dos genitais externos, formação de cascos e cornos.

Duplessis (1970) complementa os achados de Evans, Sack (1973) afirmando que o aparelho respiratório inicia seu desenvolvimento no final da 3ª semana (entre 20 e 21 dias) de gestação, e o pulmão ao 6º mês apresenta-se formado por completo, podendo assegurar a vida em caso de nascimento prematuro. O período fetal se estende a partir de 34 dias na ovelha e 45 dias na vaca. Este período caracteriza-se pelo crescimento e modificações do formato do feto (HAFEZ, HAFEZ; 2004).

3.3 FORMAÇÃO DOS ANEXOS EMBRIONÁRIOS

A formação dos anexos embrionários apresenta diversos aspectos nos

mamíferos, sendo as primeiras etapas do desenvolvimento comparáveis entre si, assemelhando-se muito às aves (HOUILLO, 1972). As membranas embrionárias são um elo de comunicação entre os organismos materno-embrionário e posteriormente irão formar a placenta, órgão vital para o desenvolvimento e crescimento fetal (ASSIS NETO, 2005).

Arthur (1979); Mies Filho (1987) afirmam que entre o momento da chegada no útero até implantação, o ovo é impulsionado ou aspirado na luz, sendo nutrido pelo líquido uterino (nutrição embriotrófica). Após o nono dia, o blastócito alonga-se rapidamente por todo corno prenhe da vaca, e a migração do embrião no útero ocorre em doze dias. O embrião bovino alonga-se lentamente e um mês após o acasalamento ele apresenta um comprimento um pouco maior que 1 cm (ARTHUR, 1979).

O início do desenvolvimento placentário bovino ocorre antes da “implantação” definitiva do ovo fecundado, e a morfogênese placentária durante a gestação inicial está intimamente relacionada às membranas extra-embrionárias, diferenciadas em cório, alantóide, âmnio e saco vitelino (HAFEZ, HAFEZ; 2004; KING et al, 1982).

Assis Neto (2005) descreveu o desenvolvimento placentário em bovinos e verificou que o saco vitelino está localizado na cavidade exocelomática, na porção central do embrião, próximo ao cordão umbilical, permanecendo conectado ao intestino posterior do embrião e suas extremidades alongam-se acompanhando o alantóide ventralmente. Entre 15 e 20 dias de gestação nos bovinos, o saco vitelino apresenta 9,08 cm, persistindo até os 70 dias medindo 0,30 cm.

Aos 15 e 20 dias de gestação, os sacos gestacionais ocupavam ambos os cornos uterinos, o cório apresentava-se como a membrana mais externa, desprovida de formações cotiledonárias e de vasos sanguíneos sob a superfície. O alantóide

encontrava-se transparente e completamente separado do cório e do âmnio, com poucos vasos próximos a face ventral do embrião e a membrana amniótica mostrava-se transparente, lisa e desprovida de vasos na sua superfície, formando uma delgada película envolvendo o embrião (ASSIS NETO, 2005).

Em embriões de 40 a 50 dias foi observado por Assis Neto (2005) a justaposição das três camadas das membranas, sendo o cório mais superficial com formações colídonárias e vasos evidentes. Antes deste momento, o embrião é nutrido através de seu córion e âmnio pela difusão de líquido uterino denominado fluído endometrial, posteriormente o feto receberá seu suprimento de nutrientes da circulação materna, através da placenta (ARTHUR, 1979; ASSIS NETO, 2005; HAFEZ, HAFEZ; 2004).

O alantóide difunde-se para dentro da vesícula coriônica e faz contato externo com o córion formando o alantocóron vascular e internamente funde-se com o âmnio para conferir um aumento ao alanto-âmnio. Quando a vascularização do córion pelo alantóide esta completa (aproximadamente 40 a 60 dias na vaca) o alantocóron encontra-se apto a participar da função placentária (ARTHUR, 1979; HAFEZ, HAFEZ; 2004).

Rieger (1992) em seus estudos destaca que a compreensão da relação entre o metabolismo energético e desenvolvimento do embrião é importante para o entendimento da biologia do desenvolvimento e para melhorar os resultados e técnicas como fecundação *in vitro*, cultivo, clonagem, transferência genética e criopreservação.

Villalon et al. (1982) detectaram em seus estudos *in vitro* que é provável que o ambiente da tuba uterina compense algumas deficiências da expressão genômica no embrião, secretando componentes não específicos, como por exemplo, lipídeos e

fatores de crescimento, necessários ao desenvolvimento.

3.4 DESENVOLVIMENTO DO APARELHO RESPIRATÓRIO

Duplessis (1970); Moore, Persaud (2004); Moore, Persaud, Shiota (2002) descrevem o desenvolvimento dos órgãos do Aparelho Respiratório inferior em humanos e consideram que o início do primórdio respiratório aparece aproximadamente no 28º dia como um sulco mediano na extremidade caudal da parede ventral da faringe primitiva: a fenda laringotraqueal. No final da quarta semana, a fenda já se invaginou para formar um divertículo respiratório saculiforme (broto pulmonar), localizado na região ventral da porção caudal do intestino anterior, quando o estomodeu e o intestino primitivo fundem-se e as membranas se desintegram (CRELIN, 1976). Gattone, Morse (1984); Larsen (1997); Sadler (2005) complementam, afirmando que a quarta semana abrange três subdivisões do celoma entre: pleura, pericárdio e cavidade pericárdica. A primeira divisão é o septo transversal, o qual separa o celoma em cavidade pericárdica torácica primitiva e cavidade abdominal peritoneal.

Os brotos pulmonares se ramificam contendo mesênquima circundante seguido de expansão mesenquimal, a fim de formar os lobos segmentares (HISLOP, 2002).

Cardoso (1995); Peters et al. (1994) ao descreverem sobre formação e desenvolvimento pulmonar, afirmam que o pulmão é originado de um broto epitelial do endoderma do intestino primitivo, sendo os túbulos epiteliais circundados por células mesodérmicas soltas que surgem em cada compartimento a fim de ser diferenciadas, mas na verdade são conhecidas para expressar genes específicos

dos pulmões até o tempo prematuro. O estágio prematuro estende a proliferação destes tubos gerando um sistema de ramificação que logo estabelece o modelo do órgão maduro, estas ramificações e distintas células fenotípicas aparecem ao longo dos túbulos epiteliais associando componentes mesenquimais do desenvolvimento pulmonar.

Wessells (1970) sugere que quando o mesoderma traqueal está localizado próximo da traquéia, numerosos brotos crescem ventralmente. Verificou ainda que o mesoderma consiste de uma camada igualmente orientada e com altas fibras colágenas, principalmente entre a bainha celular e a lâmina basal. Tais fibras raramente são observadas em microscopia eletrônica. Bradley et al. (1975) complementa em seus achados que o pulmão de coelhos em desenvolvimento apresenta uma rápida acumulação de colágeno por unidade de massa pulmonar. Essa rápida acumulação deve-se a mudança dos tipos de proteínas sintetizadas pelas células pulmonares.

Deterding, Shannon (1995); Minoo, King (1994) realizaram um trabalho sobre interações epitélio mesenquimais do pulmão em desenvolvimento, verificando seu processo de formação. Constataram uma estrutura morfológicamente uniforme, emergindo do esôfago primitivo se desenvolvendo entre o tecido com diversidade celular significativa, a qual será passada para células filhas. Relatam ainda que, a ramificação morfogênica é dependente de interações epitélio mesenquimais na matriz extracelular funcional, sendo os componentes essenciais desta, a Laminina (glicoproteína) detectada assim que ocorre a pré-implantação embrionária, presente em todos os estágios de desenvolvimento; a fibronectina produzida por uma variedade de células encontradas em todo tecido conjuntivo pulmonar e a tenascina (glicoproteína).

Células epiteliais em estágio glandular podem proliferar formando estruturas tri-dimensional na ausência de mesênquima pulmonar, constituindo células diferenciadas de forma consistente com a formação de células alveolares tipo II (DETERDING, SHANNON,; 1995).

Os pulmões em desenvolvimento ainda revestidos pela lâmina de mesotélio (mesoderma envoltório da porção do canal pericárdio-pleuro-peritoneal), projetam-se para os lados, em sua respectiva cavidade pleural. O mesênquima que envolve a árvore brônquica origina os tecidos (cartilagens, músculos lisos, tecidos conjuntivos) circundantes da parede epitelial dos brônquios (LOBO, 1966).

De acordo com Gattone, Morse (1984) o mesotélio do canal pleuroperitoneal de embriões de rato com 15 dias de gestação apresenta epitélio do tipo pseudoestratificado colunar simples, e a microscopia eletrônica de transmissão revela dois tipos de células nesta área escura, com junções complexas observadas entre células mesoteliais adjacentes.

As células mesoteliais da pleura dobram-se dorsalmente e são fusiformes, com um longo eixo orientado na direção mediolateral, e os nódulos mesenquimal-mesotelial fundidos no dobramento ventral. Nas pontas abaixo dos lobos pulmonares são inicialmente fundidas até a abertura cranial do canal pleuroperitoneal, com 14 dias se alongam com associação da pleura sendo posicionados medialmente para a abertura do canal pleural (GATTONE, MORSE; 1984).

Tyler (1983) ao estudar anatomia dos pulmões, relata que a pleura pulmonar ou visceral dos grandes animais tende a ser espessa, enquanto que a dos pequenos tende a ser fina. Assim sendo, a pleura espessa é suprida por um ramo de artérias bronquiais com maior conectividade de tecidos entre os lóbulos adjacentes e septos interlobulares, diferentemente da pleura fina, a qual é suprida pelas artérias

pulmonares.

De uma forma mais detalhada Larsen (1997); Sadler (2005) descrevem o início da organogênese do Respiratório a partir do 22º dia, onde o intestino primitivo sofre uma evaginação ventral e o broto pulmonar inicia seu crescimento ventrocaudalmente através do mesênquima circundante do intestino e fatores de crescimento de fibroblasto, sendo então denominado divertículo respiratório ou broto pulmonar, os quais crescem e tornam-se achatados, sendo recoberto pela esplancnopleura mesodérmica. Este processo é também reconhecido como o primórdio do aparelho respiratório por Pringle (1986).

O'rahilly (1984) descreve que aos 26 dias de gestação ocorre o desaparecimento da membrana orofaríngea e desenvolvimento dos brotos pulmonares, aos 28 dias tem-se a separação dos brotos pulmonares do tubo digestivo com reorganização da traquéia e esôfago. Aos 32 dias os sacos pulmonares curvam-se dorsalmente e “amplexam” o esôfago seguido de uma conexão do ducto faringotraqueal conectado ao primórdio do digestório e tubos respiratórios, e desenvolvimento dos brotos lobares. Com 37 dias a lâmina epitelial se completa e separa o tubo digestivo do respiratório, dando início a formação do palato primário. Aos 41 dias inicia-se o desenvolvimento dos brotos bronquiais segmentares e 44 dias surgimento de alguns brotos subsegmentares.

Esta primeira geração de brotos subsegmentares é completada aos 48 dias, sendo as artérias e veias pulmonares inicialmente organizadas em ramos segmentares (PRINGLE, 1986).

Lobo (1966) ao descrever a goteira laringo-tráqueo-brônquica em embriões com 3 mm de Crow Rump verificou que o isolamento da traquéia e do esôfago decorre do aparecimento das goteiras tráqueo-esofagianas, látero longitudinalmente

situadas em ambos os lados do intestino cefálico, entre o divertículo respiratório e o esôfago. Garcia et al. (1991); Sadler (2005) complementam relatando que o divertículo respiratório se separa da faringe primitiva através do septo traqueoesofágico derivados da fusão das cristas traqueoesofágicas (que diferenciavam o intestino anterior do divertículo), o qual diferenciara completamente a porção respiratória da digestiva, com exceção do orifício de entrada da laringe, sendo seu mesênquima circundante derivado do quarto e sexto pares de arcos branquiais.

O revestimento endodérmico do divertículo laringotraqueal origina o epitélio e as glândulas da laringe, traquéia, brônquios, bronquíolos e o epitélio de revestimento pulmonar, sendo que o da laringe se desenvolve do endoderma da extremidade cranial do tubo laringotraqueal. O broto traqueal que se desenvolve na extremidade caudal do divertículo respiratório durante a quarta semana, logo se divide em duas tumefações: os brotos brônquicos primitivos ou primários. Durante a quinta semana as conexões de cada broto com a traquéia crescem lateralmente nas paredes medianas dos canais pericardioperitoniais ou cavidades pleurais para formar o brônquio principal, sendo que a segunda geração de ramificações produz três brotos bronquiais secundários do lado direito e dois do lado esquerdo, os futuros primórdios dos lobos pulmonares. Os brotos bronquiais e suas bainhas de esplancnopleura continuam a crescer e bifurcar-se, preenchendo gradualmente a cavidade pleural (GARCIA et al. 1991; LARSEN, 1997; MOORE, PERSAUD; 2004). Simultaneamente a organogênese pulmonar ocorre o desenvolvimento de conexões vasculares (BURRI, 1984). Até os 28 dias gestacionais, os grupos de células endoteliais estão fundidos ao redor do mesênquima no divertículo ventral. Aos 34 dias de gestação, o plexo capilar circunda os dois brotos pulmonares, estando em conexão com artérias

e veias pulmonares (HISLOP, 2002).

Hilfer (1996) propõe ainda que os processos acima descritos por Garcia et al. (1991); Larsen (1997) ocorrem por uma série de ramificações dicotômicas da porção distal da traquéia, constituindo assim pontos ramificados, resultando na formação de tubos que vão reduzindo seu diâmetro a fim de formar sucessivas gerações bronquiais. Denomina-se ainda este processo de centrífugo, pois as ramificações tendem para o centro, em direção radial.

Em estudos realizados por Bluemink et al. (1976) sobre embriologia de pulmão de rato, pode-se constatar que estes apresentam uma ramificação da parede do esôfago, de forma a originar o primórdio do aparelho respiratório, sendo seu epitélio colunar pseudoestratificado, núcleo contendo um ou mais nucléolos, células mitóticas ocupando o lúmen, células mesenquimais distribuídas de maneira uniforme com tendência a se condensar ao circundar o final distal do brônquio primário.

Aos 12 dias, ambos os pulmões podem apresentar crescimento em comprimento, sem que haja ramificações, sendo dicotomizados mais tarde. São constituídos de muita fibra colágena na região de interface, protuberâncias epiteliais ou mesenquimais originam em uma seção de cruzamento exibindo íntimo contato celular e vacúolos densos predominando na extremidade basal das células epiteliais. A ausência da lâmina basal ao longo do crescimento distal é muito evidente no pulmão de 13 dias, o sistema de Golgi é visualizado no citoplasma apical, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias são encontrados por toda célula (BLUEMINK et al. 1976).

Bucher, Reid (1961) desenvolveram um estudo a fim de estabelecer um processo de ramificação da porção intrasegmental da árvore brônquica até as diferentes fases da vida intra-uterina e a relação do desenvolvimento da cartilagem

bronquial, uma vez que a cartilagem é formada de mesênquima em proliferação, alargamento e diferenciação dos condroblastos. Assim, puderam constatar que Hematoxilina e Eosina coram homogeneamente a matriz hialina observada entre os condroblastos, mostrando a inclusão de fibras colágenas. Notaram ainda que provavelmente a matriz tenha uma secreção celular, composta de proteínas de grupos colágenos juntamente aos sulfatos de condroitina; a cartilagem continua a crescer após a ramificação bronquial estar completa e novas cartilagens surgem até a 25ª semana de gestação, sendo que até a 10ª semana as placas de cartilagem dos brônquios principais são desenvolvidas em zonas de pré-cartilagem, apresentando consistência e concentração de largas células, com núcleos redondos e escuros, e o citoplasma é eosinófilo e claro (BUCHER, REID; 1961). Os descritos de Lobo (1966) acrescentam que, músculos e cartilagens originam-se de condensações mesenquimais derivadas do IV e do V par de arcos branquiais.

Na 16ª semana de gestação, todos os principais elementos estão formados, exceto aqueles envolvidos nas trocas gasosas, pois a respiração não é possível, levando a óbito os fetos que nascem durante este período (MOORE, PERSAUD; 2004).

Os brotos epiteliais dividem-se repetidamente constituindo tubos epiteliais de células cubóides. Nas extremidades, os tubos vão ficando menos calibrosos e de epitélio mais baixo. Durante a maior parte da vida fetal, o revestimento de toda a árvore brônquica é epitélio cúbico, os cílios surgem na traquéia e nos brônquios principais dos fetos de cinco meses. Já do sexto ao sétimo mês de vida fetal, as células dos brônquios terminais são cubóides, baixas, permanecendo assim até o nascimento (LOBO, 1966).

Langston et al. (1984) descreve que o pulmão imaturo (19-28 semanas

gestacionais) apresenta um simples espaço de ar interno, composto de parede lisa, fundo cego e canal respiratório separado por tecido intersticial relativamente grosso. Estes canais são formados por epitélio cuboidal, de forma enrugada e capilar disperso no tecido intersticial.

Hyde et al. (1979) realizou um estudo com aparelho respiratório de furões e verificou semelhanças com os cães em relação a estrutura epitelial, apresentando poucas diferenças nas gerações dos bronquíolos terminais, densidade da cartilagem bronquial e glândulas submucosas. Observou ainda que a parede epitelial da traquéia, brônquio segmentar, subsegmentar e primário consiste de células ciliadas e globulares, contendo inúmeras glândulas.

Numerosos microvilos caracterizaram a superfície apical das células, as quais apresentaram sulcos enrugados. Estas mesmas células estão organizadas em um epitélio colunar pseudoestratificado, do brônquio distal, consistindo de células ciliadas com citoplasma, mitocôndrias, e algumas inclusões de células globulares com grande número de grânulos secretores (HYDE et al. 1979).

Duplessis (1970); Garcia et al. (1991) relatam que, por volta da 24ª semana, os bronquíolos respiratórios já estão estabelecidos e, nas suas extremidades, desenvolveram-se alguns sacos terminais denominados alvéolos primitivos que apresentam parede epitelial delgada, e vascularização mais desenvolvida no tecido conjuntivo. Larsen (1997); Sadler (2005) descrevem ainda que o pulmão é composto de tecido endodérmico e mesodérmico, sendo que o endoderma do broto pulmonar fornece a mucosa o revestimento dos brônquios e das células epiteliais dos alvéolos, o mesoderma que recobre a parte externa do pulmão desenvolve-se em pleura visceral e a camada mesodérmica somática, que recobre internamente a parede corporal torna-se a pleura parietal, sendo o espaço formado entre as pleuras

denominado cavidade pleural. Entre a 36ª semana até o nascimento os alvéolos já amadureceram, no entanto, alvéolos adicionais continuam a ser produzidos durante a infância, até os oito anos de idade nos humanos (LARSEN, 1997).

3.4.1 **Maturação pulmonar**

De acordo com MOORE, PERSAUD (2004); MOORE, PERSAUD, SHIOTA (2002), o desenvolvimento pulmonar é dividido em quatro períodos, sendo o primeiro pseudoglandular (da 5ª a 17ª semana), quando se formam os brônquios e bronquíolos terminais. PRINGLE (1986) sugere que ao início da vida fetal, os pulmões estão claramente na fase pseudoglandular, e esta se encerra na 18ª semana de gestação, sendo caracterizado por uma parede lisa. O fundo cego dos canais respiratórios é constituído por epitélio cuboidal e separado por um septo intersticial celular espesso, sendo os capilares fundidos no tecido intersticial.

Hislop (2002) acrescenta ainda que é durante a fase pseudoglandular que a parede das células se diferenciam para formar estruturas adultas de cartilagem, glândulas submucosas, músculo liso bronquial e diferentes tipos de células epiteliais.

Seguindo esta fase inicia-se o período canalicular (da 16ª a 25ª semana) no qual a luz dos brônquios e bronquíolos terminais se alargam, desenvolvem-se os bronquíolos respiratórios e os ductos alveolares, o tecido pulmonar torna-se altamente vascularizado e células alveolares tipo I e tipo II desenvolvem-se durante este período (LANGSTON et al., 1984; MOORE, PERSAUD; 2004; PRINGLE, 1986). Hilfer (1996) afirma ainda em seus estudos de morfogênese pulmonar que durante este estágio o epitélio é do tipo pseudoestratificado e forma túbulos estreitos, incapazes de se observar em microscopia de luz. Contudo, os brotos terminais são

um tanto grandes e o mesênquima é dividido entre denso, partições celulares ou septos entre ramos.

Langston et al. (1984) afirmam que entre a 28ª e 36ª semana gestacional cristas secundárias subdividem as estruturas de espaço de ar distal em unidades menores, os subsacos. Tais cristas tornam-se delgadas e altas, com fibras livres na margem.

Hilfer (1996); Moore, Persaud (2004) complementam que durante o período do saco terminal (por volta da 24ª semana ao nascimento), os ductos alveolares dão origem aos sacos terminais (alvéolos primitivos), marcados por células epiteliais especializadas, sendo elas pneumócito tipo I que forma o revestimento da região expandida e pneumócito tipo II que contém corpos lamelares. Inicialmente, os sacos terminais estão revestidos por epitélio cúbico, que começa a se adelgaçar tornando-se um epitélio pavimentoso com cerca de 26 semanas. Nesta época, redes capilares proliferam junto ao epitélio alveolar, ocorre expansão dos sacos alveolares acompanhado por um delgado septo mesenquimal além de um aumento na chegada da matriz extracelular. Este septo continua no estágio alveolar para formar o fino e elástico tecido de conexão cercado por alvéolos, tecido conjuntivo denso contendo cartilagem e músculo liso circundando o “caminho do ar”. Assim, os pulmões estão suficientemente bem desenvolvidos para permitir a sobrevivência do feto caso este venha a nascer prematuramente.

O período alveolar é o estágio final do desenvolvimento pulmonar, ocorre a partir do período fetal terminal até cerca de 8 anos de idade, quando os pulmões amadurecem aumentando bronquíolos respiratórios e alvéolos primitivos (MOORE, PERSAUD; 2004). Latimer (1949) ao descrever o crescimento pré-natal do coração e pulmões de cão asseverou que a cor dos pulmões é indubitavelmente variável,

sendo que alguns dos fetos analisados apresentaram uma coloração bastante avermelhada, similar a “puro sangue”, o qual não é removível; sendo provavelmente um sangue coagulado.

Pringle (1986) ao estudar diferentes modelos animais verificou que em primatas (*mulatta*, *fasciculares* e *nemestrina*) com gestação normal de 165 dias a fase pseudoglandular se estende até 85 dias de gestação. A fase canalicular inicia com 70 – 75 dias e percorre até 150 dias. A fase sacular inicia com 105 dias e os alvéolos aparecem até 120 – 130 dias. Já no pulmão humano a fase pseudoglandular corresponde a 50% do período gestacional com fase sacular e alveolar de 60 a 70% da gestação. Em contraste, a fase pseudoglandular do pulmão de rato prolonga-se até o 24º dia gestacional, sendo que esta fase prematura da gestação ocupa 75% do período e as três fases seguintes são rapidamente atravessadas, cerca de 3 a 4 dias cada.

No cordeiro, a fase pseudoglandular estende-se de 85 a 90 dias de gestação, ou seja 59%; uma vez que o período de prenhes destes animais é aproximadamente 145 dias (PRINGLE, 1986). Liggins (1981) relaciona a maturidade funcional dos pulmões sugerindo que esteróides podem acelerar o desenvolvimento pulmonar. A prostaglandina pode aumentar os movimentos respiratórios, entre outros hormônios como pituitários, tiroxinas, epinefrinas e possivelmente insulina e testosterona.

3.4.2 Características anatômicas particulares dos pulmões bovinos.

De acordo com Dyce, Sack, Wesing (2004) os pulmões de bovinos apresentam um formato piramidal, distinguindo-se por sua lobação pronunciada,

lobulação bastante evidente e simetria acentuada. O pulmão esquerdo é dividido em lobos cranial e caudal, sendo que o primeiro se divide ainda em duas partes: uma estende-se para frente junto ao ápice do saco pleural; a outra prolonga-se ventralmente sobre o pericárdio. A borda ventral é sinuosa, mas sua principal característica é a incisura existente entre as duas partes do lobo cranial, a qual se estende do terceiro espaço intercostal até a quinta costela e permite que o coração entre em contato com a parede torácica. A borda basal muda sua posição de acordo com a fase da respiração.

O pulmão direito é maior do que o esquerdo, onde, além dos lobos cranial e caudal, possui um lobo médio e um pequeno lobo acessório, que se desenvolve a partir da face medial da base. O lobo cranial direito é ventilado por um brônquio traqueal, o qual se origina independente, partindo da traquéia cranialmente a sua bifurcação (DYCE, SACK, WESING; 2004).

Os pulmões dos bovinos distinguem-se pelos septos de tecido conjuntivo espessos, que demarcam áreas na superfície e se prolongam para dentro, dividindo o parênquima pulmonar em segmentos. Sua capacidade respiratória é limitada quando comparada à outras espécies, devido a área total de superfície alveolar relativamente pequena e menor densidade de capilares (DYCE, SACK, WESING; 2004).

Ribeiro, Ramos, Pinto (1998) estudaram a ramificação e distribuição do tronco pulmonar em relação aos brônquios, em fetos bovinos azebuados, e constataram que o tronco pulmonar acompanha ventralmente a porção torácica da traquéia dividindo-se em duas artérias pulmonares (direita e esquerda), em alturas diferentes, mas sempre proximal ao brônquio traqueal até alcançarem os hilos pulmonares, onde penetram acompanhando os brônquios principais, lobares e segmentares. No

entando, Trindade, Andrade, Melo (2003) complementam os descritos acima, com seu trabalho sobre segmentação do pulmão de fetos de bovinos azebuados, onde concluiu que estes animais apresentam segmentação brônquiopulmonar variando de 10 a 11 segmentos.

3.5 MORTALIDADE DURANTE O PERÍODO EMBRIONÁRIO

A mortalidade pré-natal é responsável por aproximadamente um terço de todas as falhas de gestação podendo ser dividida em mortalidade embrionária e mortalidade fetal.

Segundo Hafez, Hafez (2004) aproximadamente 25 a 40% dos embriões de bovinos são perdidos entre o período de penetração dos espermatozóides no oócito e o processo final de implantação. O zigoto se desenvolve até a mórula ou estágio precoce de blastocisto, porém degenera antes da metade do ciclo estral. Os blastocistos degeneram após a fase média do ciclo, antes ou imediatamente após a implantação. Rodrigues (1997) sugere ainda que a diferenciação celular durante o desenvolvimento cause modificações, sendo algumas irreversíveis ao genoma, levando a perda da totipotencialidade celular.

A mortalidade pré-natal pode ser devida a fatores maternos, a fatores embrionários ou a interações maternos fetais. A falha embrionária afeta os embriões individualmente, deixando os outros ilesos, sendo o período crítico de sobrevivência embrionária o estágio final de blastocisto (HAFEZ, 1982).

Arthur (1979); Moore, Persaud (2004) relatam que o período embrionário é o período de maior susceptibilidade a teratógenos, esta é a época em que as primitivas camadas germinativas e os rudimentos de órgãos são formados. Cada

órgão tem um período crítico de desenvolvimento e os processos bioquímicos envolvidos no crescimento e diferenciação de cada órgão tem uma seqüência ordenada que é controlada por vários genes.

Existe uma relação entre as anomalias e a mortalidade embrionária. À medida que avança a gestação, o embrião torna-se cada vez mais dependente da placenta para sua sobrevivência, com o aumento do número de implantações diminui o suprimento vascular para cada local, restringindo o desenvolvimento placentário. Isto resulta em alta taxa de mortalidade embrionária e fetal e provavelmente explica a maior incidência de mortalidade embrionária em bovinos e ovinos após ovulações duplas mais do que ovulações simples (HAFEZ, 1982).

Recentemente os estudos têm evoluído para realização de diagnósticos pré-implantacionais embrionários. Os objetivos destes testes são evitar a transmissão de enfermidades genéticas, predizerem características genotípicas, como a determinação do sexo e de padrões produtivos e reprodutivos (HASSUM FILHO, 1998), apontando de certa forma, os riscos de anomalias no embrião.

Pinto Neto et al. (1999) em seus estudos relacionados à transferência de embriões em bovinos, associado à superovulação das fêmeas, diz ser um artifício técnico que permite a multiplicação de caracteres de um único animal de padrão genético elevado, tornando possível a produção de vários bezerros no mesmo intervalo de tempo, com melhora qualitativa do rebanho.

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

As coletas de úteros gestantes foram realizadas em Frigoríficos e Abatedouros da Região de Dracena-SP, Poços de Caldas-MG e São José dos Campos-SP. Obteve-se uma coleta de 50 embriões, em diferentes estágios gestacionais.

Os úteros foram abertos e os embriões fixados em solução de paraformaldeído a 4%, formol tamponado a 10% e líquido de Bouin. Os embriões foram transportados para os Laboratórios de Anatomia e Histologia da Unidade Diferenciada de Dracena/UNESP Laboratório de Anatomia e Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/FMVZ – USP e Laboratório de Anatomia e Histologia da Unifeob – São João da Boa Vista, dependendo, portanto da localidade onde a coleta foi realizada.

Os períodos gestacionais foram estimados conforme metodologia preconizada por Evans, Sack (1973); Noden, Lahunta (1990) com mensurações da distância occípito-sacral da cabeça, tomando como referência a crista nugal numa extremidade e a última vértebra sacral na extremidade oposta (Crow-Rump / CR). Após tal procedimento, os embriões foram dissecados e fotografados.

4.1 ESTUDOS MACROSCÓPICOS: PREPARO DO MATERIAL

Os úteros foram dissecados e em seguida realizou-se uma incisão dorsal ao cérvix para avaliações macroscópicas dos embriões. Para os embriões pequenos foram utilizadas lupas estereomicroscópicas¹ e lupa cirúrgica². Para documentação e

descrição utilizamos esquemas, desenhos e fotografias.

4.1.1 Parâmetros analisados

Foram avaliados os parâmetros relativos ao desenvolvimento externo (de acordo com os estudos de Evans, Sack (1973) e proporções de tamanho dos embriões. Com auxílio de um paquímetro inoxidável com divisões em milímetros (150 mm x 0.02 mm) realizamos as medidas de comprimento (crânio-caudal) e largura (latero-lateral).

4.2 ESTUDO MICROSCÓPICO

O estudo microscópico foi realizado através de técnicas de inclusão e cortes seriados, com a finalidade de se obter resultados precisos sobre o assunto.

¹ Zeiss, Stemi DV4

² Leica

4.2.1 Processamento Microscopia de Luz

Os embriões foram colocados em solução fixadora de Bouin, onde permaneceram embebidos por 24 horas, até sua completa fixação. Após este processo, o material foi desidratado em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 50 a 100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em paraplant^{®3}.

Foram realizados cortes consecutivos de 3 a 5µm de espessura, corados por métodos de rotina para posterior descrição e documentação.

4.2.2 Processamento Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os embriões foram previamente fixados em glutaraldeído 2,5%⁴ em tampão fosfato 0,1M, PH 7,2. Ao término da fixação o material foi lavado em tampão fosfato de sódio a 0,1M, PH 7,4 por três vezes durante 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%⁵ por 1 hora. Após novas lavagens em tampão fosfato os embriões foram desidratados em álcool etílico a 50%, 70%, 90% e 100% e lavados em óxido de propileno⁶.

³ Parablant Embedding Media_Paraplant Plus, Sigma, Oxford Lab., USA

⁴ Glutaraldehyde grade I: 70% aqueous solution – Sigma chemical Co., USA

⁵ Osmium tetroxide 4% w/w solution in water – polyscience, Inc., USA

⁶ Propylene oxide EM Grade, Polysciences, Inc, USA

Por um tempo de 12 a 16 horas os fragmentos de embriões permaneceram sob rotação a 1:1 de óxido e propileno e resina⁷. Na seqüência, essa mistura foi substituída por resina pura por 4 a 5 horas. Após este período foram embebidas com resina pura em moldes. Uma vez incluídos, os embriões permaneceram em estufa a 69°C por 72 horas para consolidar a polimerização da resina.

Os blocos foram cortados em ultra-micrótomo⁸. Cortes semi finos de 1µm de espessura foram obtidos corando-se à quente com solução de borato de sódio a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de Toluidina para observação ao microscópio de luz.

Os cortes ultrafinos de cerca de 60nm de espessura foram colhidos em telas de cobre e contrastados pelo acetato de uranila 2% em água destilada por 5 minutos e pelo citrato de chumbo 0,5% em água destilada durante 10 minutos. As observações e eletro micrografias sub-celulares foram realizadas no microscópio eletrônico⁹.

⁷ Araldite – 502 EMBEDDING, Kit-Electron Microscopy Sciences, USA

⁸ Leica ULTRACUT UCT®

⁹ MORGAGNI – modelo 268D, Microscópio Eletrônico de Transmissão – Philips

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 MORFOLOGIA MACROSCÓPICA EXTERNA

O embrião com CR 9,0 mm e idade gestacional aproximada de 20 a 21 dias, apresentou na região cervical o esboço da formação dos arcos branquiais e encéfalo anterior em desenvolvimento. No embrião com CR 10,0 mm e idade gestacional de 25 a 28 dias pode-se visualizar flexura cervical, encéfalo médio, arcos branquiais, coração, encéfalo posterior, encéfalo anterior, local do cálice óptico e da fosseta nasal, broto do membro torácico, medula nervosa, cauda, local da crista mesonéfrica e somitos (Figura 1).

Já no embrião com CR 12,0 mm e idade gestacional aproximada de 28 a 30 dias observa-se nitidamente a divisão dos arcos branquiais, não havendo ainda fechamento completo do neuróporo cranial. A curvatura cervical é acentuada e os somitos já estão delimitados e individualizados. Ventralmente a região cervical, pode-se notar a presença da área cardíaca e fígado, sendo que dorsalmente ocorre o surgimento do broto do membro torácico, o qual apresenta formato de “remo”. Na região caudal do embrião visualizamos a curvatura crânio-caudal, permitindo ao embrião uma posição em forma de “C”, nesses embriões podemos notar o início do surgimento da cauda (Figuras 2 e 3).

Legenda: Em B, desenho ilustrativo indicando as estruturas observadas em A: Região cefálica (1), Curvatura cervical (2), Somitos (3), Área do coração (4), Broto do membro torácico (5), Fígado (6) e Cauda (7)

Figura 1 - Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 9,0 mm e Idade gestacional estimada de 20 a 21 dias (A)

B

Legenda: Em B, desenho ilustrativo do indicando as estruturas observadas em A: Flexura cervical (1), Encéfalo médio (2), Arcos branquiais (3), Coração (4), Encéfalo posterior (5), Encéfalo anterior (6), local do Cálice óptico (7), local da Fosseta nasal (8), Broto do membro torácico (9), Medula nervosa (10), Cauda (11), local da crista mesonéfrica (12) e Somitos (13)

Figura 2 - Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 10,0 mm e Idade gestacional estimada de 25 a 28 dias (A)

Legenda: Em B, desenho ilustrativo indicando as estruturas observadas em A: Abertura do tubo neural na região do quarto ventrículo encefálico (1), Flexura cervical (2), Encéfalo anterior (3), Arcos branquiais – sulco branquial entre o 3º e 4º Arcos (4), Olho com pigmentação da retina (5), Membrana amniótica (6), Saco vitelínico (7), Broto do membro torácico (8), Coração (9), Cauda (10), Crista mesonéfrica (11), Somitos (12) e Broto do membro pélvico (13)

Figura 3 - Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 12,0 mm e Idade gestacional estimada de 28 a 30 dias (A)

Nos embriões apresentando CR 12,4 mm (idade gestacional estimada de 28 a 30 dias), CR 15,4 mm (Idade gestacional estimada de 31-32 dias) e CR 17,1 mm (Idade gestacional estimada 32 a 34 dias) podemos observar a região encefálica rostral contendo uma abertura no tubo neural na área do quarto ventrículo encefálico e flexura cervical acentuada. Na região dos olhos pode-se observar a presença da pigmentação da retina. O broto do membro torácico mostra-se mais desenvolvido que o broto do membro pélvico no embrião com 31 dias gestacionais, embora apresente sua extremidade em forma de “remo”. O fígado é visível estando posicionado ventralmente ao corpo do embrião, e dorsolateralmente tem-se a presença da crista mesonéfrica. Já, na região caudal pudemos visualizar o início do crescimento de uma cauda característica (Figuras 4 a 6).

Legenda: Em B, desenho ilustrativo indicando as estruturas observadas em A: Quarto ventrículo encefálico (1), Flexura cervical (2), Encéfalo médio (3), Olho com pigmentação da retina (4), Arcos branquiais (5), Local da fosseta nasal (6), Coração (7), Broto do membro torácico com formato semelhante a um remo (8), Cauda (9), Fígado (10), Broto do membro pélvico (11) e Somito (12)

Figura 4 - Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 12,4 mm e Idade gestacional estimada de 28 a 30 dias (A)

Legenda: Em B, desenho ilustrativo indicando as estruturas observadas em A: Quarto ventrículo encefálico (1), Flexura cervical (2), Encéfalo médio (3), Somitos (4), Olho com pigmentação da retina (5), Arcos branquiais (6), Encéfalo anterior (7), Coração (8), Broto do membro torácico com formato semelhante a um remo (9), Fígado (10), Cauda (11) e Broto do membro pélvico (12)

Figura 5 - Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 15,4 mm e Idade gestacional estimada de 31 a 32 dias (A)

Legenda: Em B, desenho ilustrativo indicando as estruturas observadas em A: Abertura no tubo neural na região do quarto ventrículo encefálico (1), Flexura cervical (2), Encéfalo anterior (3), Olho com pigmentação da retina (4), Broto do membro torácico (5), Fígado (6), Cauda (7), Crista mesonéfrica (8) e Broto do membro pélvico (9)

Figura 6 - Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 17,1 mm e Idade gestacional estimada de 32 a 34 dias (A)

No feto apresentando CR 28,0 mm e idade gestacional estimada de 45 dias, pudemos notar a formação dos membros e sua bipartição (cascos), presença de meato acústico recoberto, pigmentação dos olhos, completo fechamento dos neuróporos, formação de um longo focinho (divisão completa da cavidade nasal e cavidade oral), a vascularização da derme é visível e em algumas áreas podemos notar a presença de hematomas (Figura 7).

Legenda: Em B, desenho ilustrativo indicando as estruturas observadas em A: Região cefálica (1), Vasos sanguíneos da derme (2), Região frontal – encéfalo (3), Pavilhão auricular – orelha externa (4), Olho (5), Região do pescoço (6), Membro torácico – casco (7), Focinho (8), Fígado (9), Costelas (10), Membro pélvico – casco (11), Área de hematoma na derme (12) e Cauda (13)

Figura 7 - Fotografia de feto bovino, em vista lateral, apresentando CR 27,0 mm e Idade gestacional estimada de 45 a 46 dias (A)

5.2 MICROSCÓPICOS

Visando o melhor entendimento e buscando evidenciar as minúcias da formação do aparelho respiratório “inferior”, procuramos evidenciar duas técnicas microscópicas, e assim subdividimos este capítulo.

5.2.1 Microscopia de Luz

O desenvolvimento embrionário do aparelho respiratório “inferior” se relaciona com a porção anterior do intestino primitivo. Em nossos resultados, observamos a formação do tubo laringotraqueal em embriões apresentando idade gestacional de aproximadamente 20 a 21 dias e com CR de 9 mm. A parede do tubo laringotraqueal é formada por epitélio constituído de várias camadas de células, o qual se apóia no mesênquima. Podemos notar a presença da prega traqueoesofágica que delimita o tubo laringotraqueal do esôfago, sendo que ambos encontram-se ligados à região dorsal do embrião através de uma lâmina de mesênquima, o mesentério dorsal (Figura 8).

Dorsalmente ao mesentério, observamos a aorta dorsal, a notocorda e o tubo neural (o qual ainda não se fechou). Lateralmente, de ambos os lados do mesentério dorsal, pudemos visualizar os ductos mesonéfricos. O celoma intra-embrionário encontra-se dividido pela membrana pleuroperitoneal, constituída por mesênquima. Abaixo desta fina estrutura, observamos a presença do primórdio do fígado (Figura 8).

O brônquio traqueal, característica da espécie bovina, foi observado em

embriões com idade gestacional estimada de 28 a 30 dias e CR 12,0 mm. Através dos cortes consecutivos podemos notar a presença da traquéia e brônquio traqueal, seguido da bifurcação da mesma originando os brônquios principais e persistência do brônquio traqueal (Figura 9).

Nos embriões com idade gestacional estimada de 32 a 34 dias e CR 17,1 mm, já se é possível observar a separação do tubo laringotraqueal do esôfago, estando este localizado na porção dorsal e ventralmente o tubo laringotraqueal. Lateralmente a traquéia, observa-se a presença da artéria carótida do lado esquerdo, o nervo vago e veia jugular (formação do feixe vaso nervoso), o mesmo se forma do lado direito. Já no plano mediano, ventralmente a traquéia é possível observar a presença dos brotos brônquicos principais (Figura 10).

Em cortes seriados, passando pela região cervical do embrião, observamos a ocorrência das primeiras bifurcações bronquiais: os brônquios principais, e a partir destes a formação dos brônquios secundários (lobares) e segmentares (Figura 11). Cada brônquio lobar é constituído por epitélio apresentando várias camadas de células, apoiado em mesênquima, tecido conjuntivo embrionário. Na região subjacente ao epitélio visualizamos mesênquima condensado e nas regiões mais afastadas mesênquima frouxo, sendo que neste último estão presentes os vasos sanguíneos, contendo células próprias em seu interior (Figura 12).

Fetos com CR 27,0 mm e idade gestacional aproximada de 45 a 46 dias apresentam pulmão em fase pseudoglandular, com subdivisões dos lobos pulmonares em cranial e caudal, juntamente de suas ramificações partindo de um brônquio principal. O órgão mostra-se com grande quantidade de vasos sanguíneos (Figura 13).

Legenda: Em B, desenho ilustrativo indicando os planos de corte apresentado nas Fotomicrografias C e D.
 C: Observar o Tubo neural (Tn), Ductos mesonéfricos (Dm), Aorta dorsal (Ad), Tubo laringotraqueal (TI), Fígado (F), Celoma intra-embriônico (Ci), Mesênquima (M), Notocorda (Nt), Mesentério dorsal (Md), Membrana pleuroperitoneal (Mp). Coloração: Hematoxilina e eosina.
 D: Observar: Porção esofágica (E). Porção traqueal (T), Epitélio (Ep), Prega traqueoesofágica (Pt), Celoma intra-embriônico (Ci), Mesênquima (M), Fígado (F), Mesentério dorsal (Md), Membrana pleuroperitoneal (Mp). Coloração: Hematoxilina e eosina

Figura 8 - Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 9,0 mm e Idade gestacional estimada de 20 a 21 dias (A)

Legenda: Em B, desenho ilustrativo indicando o plano de corte apresentado nas Fotomicrografias C e D.
 C: Observar: Esôfago (E), Traquéia (T), Brônquio traqueal (Bt) e parte do Lobo cranial esquerdo (Le). Coloração: Hematoxilina e eosina.
 D: Observar: Esôfago (E), Traquéia (T), Brônquio traqueal (Bt) e Brônquios principais (Bp). Coloração: Hematoxilina e eosina

Figura 9 - Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 12,0 mm e Idade gestacional estimada de 28 a 30 dias (A)

Legenda: Em B, desenho ilustrativo indicando os planos de corte apresentado na Fotomicrografia C.

C: Observar: Esôfago (E), Traquéia (T), Brônquios principais (Bp), Artéria carótida (A), Nervo (N), Celoma intra-embrionário (Ci) e Mesênquima (M).
Coloração: Hematoxilina e eosina

Figura 10 – Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 17,1 mm e Idade gestacional estimada de 32 a 34 dias (A)

Legenda: Em B, desenho ilustrativo indicando os planos de corte apresentado nas Fotomicrografias C e D.
 C: Observar: Esôfago (E), Brônquio principal (Bp), Brônquios lobares (Bl), Pleura parietal (Pp), Pleura visceral (Pv), Cavidade pleural (Cp), Local de divisão dos lobos pulmonares (*), Veia (V), Nervo (N). Coloração: Hematoxilina e eosina.
 D: Observar: Esôfago (E), Brônquio principal (Bp), Brônquios lobares (Bl), Pleura parietal (Pp), Pleura visceral (Pv), Cavidade pleural (Cp), local de divisão dos lobos pulmonares (*), Veia (V), Nervo (N), Artéria (A), Costela (C), Vértebra (Vt). Coloração: Hematoxilina e eosina

Figura 11 - Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 17,1 mm e Idade gestacional estimada de 32 a 34 dias (A)

Legenda: Em B, desenho ilustrativo indicando o plano de corte apresentado na Fotomicrografia C.

C: Observar brônquio lobar apresentando: Mesênquima frouxo (Mf), Mesênquima condensado (Mc), Bronquíolo lobar (Bl), Epitélio (E) e Vaso sangüíneo (V) apresentando células do sangue em seu interior. Coloração: Hematoxilina e eosina

Figura 12 - Fotografia de embrião bovino, em vista lateral, apresentando CR 17,1 mm e Idade gestacional estimada de 32 a 34 dias (A)

Legenda: Em B, desenho ilustrativo indicando o plano de corte apresentado nas Fotomicrografias C e D.

C e D: Notar que o pulmão encontra-se na fase pseudoglandular, contendo as seguintes estruturas: Brônquios principais (Bp), Brônquios secundários (Bs), Área de intensa vascularização (→), Mesênquima condensado (Mc), Mesênquima frouxo (Mf), Pleura visceral ou pulmonar (*), Pleura parietal (Pp) e Cavidade Pleural (c). Coloração: Hematoxilina e eosina

Figura 13 - Fotografia de feto bovino, em vista lateral, apresentando CR 27,0 mm e Idade gestacional estimada de 45 a 46 dias (A)

5.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

No primórdio das vias respiratórias e pulmão de embriões bovinos, observamos a presença de estruturas epiteliais se proliferando no interior do mesênquima. As células mesenquimais apresentaram formas irregulares, com aspecto estrelado ou fusiforme e delicadas extensões citoplasmáticas ramificadas, entrelaçada por todo o tecido formando uma rede. Em algumas células, as projeções citoplasmáticas encontram-se próximas e unidas por estruturas denominadas desmossomos (Figuras 14 e 15).

Nas células mesenquimais observamos a presença de um núcleo volumoso e nucléolo. A cromatina encontra-se regularmente distribuída formando grânulos de tamanho variável dispersos no nucleoplasma e aderida ao envoltório nuclear. No citoplasma dessas células, constatamos a presença de retículo endoplasmático rugoso e retículo endoplasmático liso, e em algumas células encontramos vacúolos formados por unidade de membrana (Figuras 14 a 17).

Junto ao epitélio, nas áreas de mesênquima condensado (Figuras 17 e 18), as células se apresentam mais próximas, o mesmo não ocorre em áreas mais afastadas do epitélio, onde o mesênquima é frouxo com células distante umas das outras.

O material extracelular é constituído principalmente por substância intersticial amorfa e apresenta fibrilas de colágeno (Figura 16).

Separando o mesênquima do epitélio, observamos a presença da membrana basal, delimitando área de mesênquima e epitélio, formador do brônquio pulmonar, sendo o mesmo observado na área de formação da traquéia, brônquios principais e brônquio traqueal.

O epitélio é composto por várias camadas de células apresentando formato irregular, agrupadas e unidas umas as outras, possuindo pouca ou ausência de material extracelular. O núcleo da célula epitelial acompanha a formato da célula, apresentando aspecto globoso ou fusiforme, o nucléolo está presente e a cromatina distribuída homogeneamente formando grânulos (Figuras 19 e 20).

No pólo apical das células epiteliais, observamos a presença de projeções da membrana plasmática e vesículas constituídas por membrana (Figura 20).

Legenda: Observar projeções da membrana plasmática (Mp), o núcleo (N) contendo cromatina (cr) distribuída uniformemente no centro e agrupada na periferia em pequenas zonas próximas ao envoltório nuclear (en). Notar a presença de áreas de aproximação entre duas células adjacentes e de desmossomos fazendo a união entre estas células (dm)

Figura 14 - Eletromicrografia de células mesenquimais de pulmão de embrião bovino

Legenda: Observar projeções da membrana plasmática (Mp) dando um aspecto estrelado para a célula, o núcleo (N) contendo cromatina (cr) uniformemente distribuída no centro e agrupada na periferia em pequenas zonas próximas ao envoltório nuclear (en). Notar a presença de áreas de aproximação entre duas células adjacentes (seta) e presença de desmossomo unindo duas células adjacentes (dm)

Figura 15 - Eletromicrografia de células mesenquimais de pulmão de embrião bovino

Legenda: Observar a membrana plasmática (Mp). No citoplasma estão presentes Retículo Endoplasmático Rugoso (reg) e Retículo Endoplasmático Liso (rel), núcleo (N) contendo cromatina (cr) uniformemente distribuída no centro e agrupada na periferia em pequenas zonas próximas ao envoltório nuclear (en) e poro nuclear (pn). Notar ainda a presença de fibras colágenas na matriz extracelular (fc)

Figura 16 - Eletromicrografia de células mesenquimais de pulmão de embrião bovino

Legenda: Observar projeções da membrana plasmática (Mp) promovendo aspecto estrelado a célula. No citoplasma a presença do Reticulo Endoplasmático Rugoso (reg) e Reticulo Endoplasmático Liso (rel), núcleo (N) contendo cromatina (cr) uniformemente distribuída no centro e agrupada na periferia em pequenas zonas próximas ao envoltório nuclear (en). Notar a presença de áreas de aproximação entre duas células adjacentes (seta) e presença de fibras colágenas na matriz extracelular (fc)

Figura 17 - Eletromicrografia de células mesenquimais de pulmão de embrião bovino

Legenda: Observar projeções da membrana plasmática (Mp), núcleo (N) contendo cromatina (cr) uniformemente distribuída no centro e agrupada na periferia em pequenas zonas e nucléolo (nc). Notar ainda a presença de áreas de aproximação entre duas células adjacentes (setas)

Figura 18 - Eletromicrografia de células mesenquimais de pulmão de embrião bovino

Legenda: Observar a membrana basal (Mb) separando o epitélio (Ep) do mesenquima (M), no epitélio diferentes formatos de núcleo (N).

Figura 19 - Eletromicrografia de células epiteliais e mesenquimais do “broto” pulmonar de embrião bovino

Legenda: Observar a membrana plasmática (Mp), o núcleo (N) contendo o nucléolo (nc) e a cromatina regularmente distribuída no nucleoplasma formando grânulos (cr). No pólo apical das células epiteliais, notar a presença de projeções da membrana plasmática (seta) e vesículas (vs)

Figura 20 - Eletromicrografia de células epiteliais do “broto” pulmonar de embrião bovino

Discussão

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento embrionário marca o início da gestação nos bovinos, sendo que o período embrionário estende-se da fecundação até 45º dia gestacional. Durante este período ocorre um rápido crescimento e diferenciação, onde tecidos, órgãos e sistemas são estabelecidos e as principais características da forma externa do corpo são reconhecidas (HAFEZ, HAFEZ; 2004). Neste mesmo intervalo de tempo, tem-se o aparecimento do caractere morfológico e estrutural das estruturas iniciais, contribuindo para a sustentação imediata do embrião e condições que afetarão o futuro bem estar do desenvolvimento do feto.

Nosso estudo foi iniciado com embriões de idade gestacional estimada de 20/21 dias (CR 9,0 mm), apresentando aspectos morfológicos característicos do início do desenvolvimento embrionário, como esboço da formação dos arcos branquiais, região encefálica com encéfalo anterior em desenvolvimento, curvatura cervical, presença de somitos, área cardíaca, fígado e cauda. Tais informações vêm a confirmar os descritos de Evans, Sack (1973) ao descreverem que os primeiros somitos aparecem aos 19 dias gestacionais, após o dobramento da placa neural. No entanto, nos nossos resultados encontramos o primeiro par de arcos branquiais em embriões com 23 dias de gestação. Hafez (1982) afirma ainda que no 21º dia o coração começa a funcionar iniciando então a circulação sanguínea para dar um suprimento nutricional adequado com o desenvolvimento, tais dados são confirmados quando observamos em embriões com 20/21 dias a presença do coração na área cardíaca.

Aos 24 / 26 dias de gestação, as três vesículas encefálicas tornam-se visíveis, presença do 2º ao 4º branquial, mamilos e brotos dos membros (EVANS, SACK;

1973). Nossos achados vêm complementar essas informações uma vez que até os 28 dias de gestação (CR 10,0 mm) o broto do membro pélvico ainda não é visível, iniciando seu aparecimento no 29º dia gestacional. Acrescentamos ainda que, durante o período de 25 (CR 10,0 mm) a 30 (CR 12,0 mm) dias de gestação é possível visualizar o coração, divisão do encéfalo anterior e posterior, local do cálice óptico e fosseta nasal, medula nervosa, cauda e local da crista mesonéfrica. Aos 30 dias de gestação o neuróporo cranial ainda não se fechou por completo, a curvatura cervical é acentuada e somitos delimitados e individualizados. A curvatura crânio-caudal já permite ao embrião uma posição em forma de “C”.

Embriões com idade gestacional estimada de 30 (CR 12,0 mm) a 35 (CR 17,0 mm) dias apresentam pigmentação da retina, broto do membro torácico mais desenvolvido que o membro pélvico, com extremidade em forma de “remo” ou pá, o fígado é visível e posicionado ventralmente ao corpo do embrião, dorsolateralmente encontra-se a crista mesonéfrica. Tais características citadas confirmam e complementam os achados de Assis Neto (2004), no entanto não estão de acordo com Evans, Sack (1973) ao afirmarem que aos 23 dias o tubo neural se fecha, pois pudemos visualizar a região encefálica rostral contendo uma abertura do tubo neural na área do 4º ventrículo encefálico em embriões com 35 dias de gestação (CR 17,0 mm).

Fetos com idade gestacional estimada de 45 dias (CR 28,0 mm) apresentaram membros bipartidos, presença de orelha externa, pigmentação dos olhos, completo fechamento dos neuróporos, formação de um longo focinho e vascularização da derme, presença de costelas e o fígado inserido na cavidade abdominal. Não verificamos ainda a formação de pálpebras e folículos pilosos, o que diferencia os achados de Evans, Sack (1973).

O início do primórdio do aparelho respiratório inferior em humanos surge no 28º dia de gestação, com um sulco mediano na extremidade caudal da parede ventral da faringe primitiva, a fenda laringotraqueal. Ao final da 4ª semana do desenvolvimento humano, a fenda já se invaginou formando um divertículo respiratório saculiforme, o broto pulmonar, localizado na região ventral da porção caudal do intestino anterior (CRELIN, 1976; DUPLESSIS, 1970; MOORE, PERSAUD; 2004; MOORE, PERSAUD, SHIOTA; 2002).

Diferentemente dos humanos, a formação do tubo laringotraqueal aparece em embriões bovinos com 20/21 dias de gestação (CR 9,0 mm), a partir de um broto epitelial do endoderma do intestino primitivo. Verificamos ainda que a parede deste tubo é formada por epitélio constituído de várias camadas de células e apoiado em mesênquima. Ao relacionarmos com os achados macroscópicos, acreditamos que o desenvolvimento do pulmão acompanhe surgimento e desenvolvimento dos arcos branquiais, uma vez que estes também são visíveis aos 20/21 dias de gestação (CR 9,0 mm).

O estágio prematuro nos humanos estende a proliferação destes tubos, gerando um sistema de ramificação, que logo estabelece o modelo do órgão maduro (CARDOSO, 1995; PETERS et al., 1994). Verificamos que nos bovinos, acompanhando este sistema de ramificação iniciado pela divisão da porção caudal da traquéia nos brônquios principais, temos ao mesmo tempo o surgimento do brônquio traqueal, o qual é independente, partindo da traquéia cranialmente a sua bifurcação, e de acordo com Dyce, Sack, Wesing (2004), no período pós-natal terá função de ventilação do lobo cranial direito.

Observamos que a bifurcação da porção caudal da traquéia nos brônquios principais, simultaneamente ao surgimento do brônquio traqueal, ocorre em

embriões com idade gestacional de 28 dias (CR 12,0 mm), enquanto que em humanos com esta mesma idade está ocorrendo o surgimento do tubo laringotraqueal.

A partir deste processo, dá se início a divisão dos brônquios principais em brônquios secundários (lobares) e segmentares. O'rally (1984) relata que em humanos o desenvolvimento dos brotos segmentares se inicia aos 41 dias de gestação, e os brotos subsegmentares aos 44 dias gestacionais. Nos bovinos com esta idade os lobos pulmonares já iniciaram a divisão em cranial e caudal, tendo a divisão brônquica iniciada no 28º dia da gestação.

Notamos ainda que, cada brônquio lobar é constituído por epitélio apresentando várias camadas celulares, estando apoiado em mesênquima, sendo que na região subjacente ao epitélio está presente mesênquima condensado e nas regiões mais afastadas o mesênquima frouxo. Acredita-se que o mesênquima condensado seja responsável por originar cartilagem brônquica e músculo liso, enquanto que o mesênquima frouxo dá origem ao tecido conjuntivo, responsável por dar forma ao órgão. O mesmo ocorrendo na traquéia.

Simultaneamente a organogênese pulmonar ocorre o desenvolvimento das conexões vasculares (BURRI, 1984). Aos 34 dias de gestação (CR 17,0 mm), o plexo capilar circunda os dois brotos pulmonares, estando em conexão com as artérias e veias pulmonares (HISLOP, 2002).

Durante o período embrionário humano, o pulmão encontra-se em fase pseudoglandular, quando se formam os brônquios e bronquíolos terminais. a próxima fase período do desenvolvimento pulmonar é o canalicular, caracterizado pela sua alta vascularização (MOORE, PERSAUD, 2004; MOORE, PERSAUD, SHIOTA; 2002). Nossos achados estão de acordo com a descrição dos autores e

acrescentamos que na espécie bovina, no início do período fetal (45/46 dias, CR 27,0 mm) o pulmão ainda em fase pseudoglandular apresenta grande quantidade de vasos sanguíneos, iniciando seu processo de vascularização, antes mesmo de passar para o estágio canalicular.

Os brotos pulmonares se ramificam contendo mesênquima circundante, seguido de expansão mesenquimal, a fim de formar lobos segmentares (HISLOP, 2002). As células mesodérmicas tendem a se diferenciar, associando componentes mesenquimais ao desenvolvimento pulmonar (CARDOSO, 1995; PETERS et al., 1994). Em nossos estudos, as células mesenquimais apresentaram formas irregulares, com aspecto estrelado ou fusiforme e delicadas extensões citoplasmáticas ramificadas, entrelaçadas por todo tecido formando uma espécie de rede. Algumas células apresentaram-se unidas por desmossomos, locais onde o citoesqueleto se prende a membrana celular, formando um elo de ligação. Essas informações nos levam a entender que existe uma intensa comunicação celular, local de transmissão das informações célula a célula, de forma a gerar fatores indutores responsáveis pelo desenvolvimento o órgão.

O núcleo das células mesenquimais apresentou-se volumoso contendo nucléolo em seu interior, estando a cromatina bem distribuída, formando grânulos de tamanhos variáveis, dispersos no nucleoplasma e aderidos ao envoltório nuclear, o qual possui poros que regulam o intenso trânsito de macromoléculas entre núcleo e citoplasma, tais características morfológicas fundamentam nosso entendimento no que diz respeito a atividade secretora dessas células, tentamos ainda justificar a intensa comunicação celular.

No citoplasma das células mesenquimais constatamos a presença de retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso e vacúolos, sendo que o

retículo endoplasmático rugoso tem papel fundamental na síntese de proteínas.

Bluemink et al. (1976) relata que as células mesenquimais são distribuídas de maneira uniforme, se condensando ao circundar os brônquios. Confirmamos tal afirmação quando visualizamos células bem próximas umas as outras na formação do mesênquima condensado ao redor do epitélio bronquial, e mais distante, o mesênquima frouxo. No entanto, ambas apresentam elo de ligação, sendo que as projeções de membrana são mais longas no mesênquima frouxo, talvez devido ao espaço extracelular.

Verificamos, assim como Bluemink (1976), Wessells (1970), material extracelular constituído por substância intersticial amorfa e fibras colágenas, que futuramente se diferenciaram em colágeno.

Delimitando área mesenquimal da área epitelial observamos a presença da membrana basal. O tecido epitelial mostrou-se composto por várias camadas de células com formatos irregulares, agrupadas e unidas umas as outras, com pouco ou ausência de material extracelular. O formato do núcleo acompanhava o formato da célula, com cromatina distribuída de maneira homogênea e nucléolo único, diferente dos relatos de Bluemink (1976), que afirma que o núcleo pode conter um ou mais nucléolos. Talvez a quantidade de nucléolos aumente com as posteriores diferenciações celulares. Nessa fase do desenvolvimento, não ocorreu ainda à diferenciação das células epiteliais da traquéia e dos brônquios, não observamos a presença de célula ciliada e células caliciformes típicas.

O desenvolvimento pulmonar ocorre no interior do celoma intra-embriônico, quando a somatopleura, derivada do mesoderma lateral, forma a pleura parietal e a esplancnopleura, também derivada do mesoderma, forma a pleura visceral pulmonar (MOORE, PERSAUD; 2004; MOORE, PERSAUD, SHIOTA; 2002). Concordamos

com tais descrições e afirmamos que no início da formação do pulmão e da vias respiratórias, existe a presença de uma cavidade, o celoma intra-embrionário delimitado pelo mesênquima visceral e parietal. Nesse mesênquima tem-se o revestimento por epitélio pavimentoso simples. Acreditamos que futuramente o mesênquima se diferencie para formar o tecido conjuntivo da pleura e mesotélio o epitélio.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos no presente estudo, julgamos poder concluir que:

- A formação do tubo laringotraqueal aparece em embriões bovinos com 20/21 dias de gestação (CR 9,0 mm), a partir de um broto epitelial do endoderma do intestino primitivo.
- A bifurcação da porção caudal da traquéia nos brônquios principais é simultânea ao surgimento do brônquio traqueal, ocorrendo em embriões com idade gestacional de 28 dias (CR 12,0 mm).
- Os lobos pulmonares de embriões bovinos com idade gestacional de 44 dias já iniciaram a divisão em cranial e caudal.
- O brônquio lobar é constituído por epitélio apoiado em mesênquima, sendo que na região subjacente ao epitélio mesênquima condensado e nas regiões mais afastadas mesênquima frouxo.
- No início do período fetal (45/46 dias, CR 27,0 mm) o pulmão ainda em fase pseudoglandular apresenta grande quantidade de vasos sanguíneos, iniciando seu processo de vascularização.
- As células mesenquimais apresentam formas irregulares, com aspecto estrelado ou fusiforme estando unidas por desmossomos, indicando existirem locais de comunicação celular.
- Área mesenquimal e delimitada da área epitelial através da membrana basal.

Referências

REFERÊNCIAS

ALVES, D. F.; RAUBER, L. P.; RUBIN, F. B. Desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Braz. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 40, n. 4, p. 279 - 286, 2003.

ARTHUR, G. H. **Reprodução e Obstetrícia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 1979, 573 p.

ASSIS NETO, A. C. **Avaliação morfológica da placentação em bovinos de gestações normais e de gestações manipuladas em laboratórios**. 220 p. Exame qualificação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BLUEMINK, J. G.; MAURIK, P. V.; LAWSON, K. A. Intimate cell contacts at the epithelial/mesenchymal interface in embryonic mouse lung. **J. Ultrastruc. Res.**, v. 55, n. 02, p. 257 - 270, 1976.

BRADLEY, K.; McCONNELL-BREUL, S.; CRYSTAL, R. G. Collagen in the Human Lung: quantitative of rates of synthesis and partial characterization of composition. **The J. of Clin. Invest.**, v. 55, p. 543 - 550, 1975.

BUCHER, U.; LYNNE, R. Development of the intrasegmental bronchial tree: The pattern of branching and development of cartilage at various stages of intra-uterine life. **Thorax**, v. 16, p. 207 - 218, 1961.

BURRI, P. H. Fetal and Postnatal development of the lung. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 46, p. 617 - 628, 1984.

CARDOSO, W. V. Transcription factors and pattern formation in the developing lung. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. L429 - L442, 1995.

CRELIN, E. S. Development of the upper respiratory system. **Clin. Symp.**, v. 28, p. 03 - 30, 1976.

DETERDING, R. R.; SHANNON, J. M. Proliferation and differentiation of fetal rat pulmonary epithelium in the absence of mesenchyme. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 2963 - 2972, 1995.

Diretrizes para apresentação da dissertação e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 4. ed. São Paulo: Revista atualizada de ampliada, 2003, 84 p.

DUPLESSIS, H. **Embriologia: Cuadernos Practicos**, 1. ed. Barcelona: s.n., 1970, v. 3, 144 p.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WESING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3. ed. [s. n.] Elsevier, 2004, 813 p.

ESPER, C. R.; BARBOSA, J. C. **Ultraestrutura comparativa de embriões bovinos**: In Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991, v. 2, 295 p.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anat., Histol., Embryol.**, v. 2, p. 11 - 45, 1973.

FERNANDES, C. A. C. Inovações não cirúrgicas e taxa de gestação de receptoras de embrião. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 51, n. 3, 1999.

FERREIRA, A. B. H. **Mini Aurélio**: Dicionário da Língua Portuguesa. 6. ed. Curitiba: Positivo, 2004, 895 p.

FONSECA, J. F.; SILVA FILHO, J. M.; PINTO NETO, A.; PALHARES, M. S. Estágio de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 53, n. 6, 2001.

GARCIA, S. M. L.; JECKEL NETO, E.; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia Humana**. 1. ed. [s. n.] Artes Médicas, 1991, 350 p.

GATTONE, V. H.; MORSE, D. E. Pleuroperitoneal Canal Closure in the Rat. **The Anat. Rec.**, v. 208, p. 445 - 460, 1984.

GILARD, S. G. T.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; MACHADO, M. A.; SERAPIÃO, R. V.; SOARES, A. B. M.; PINHO, T. G.; VIANA, J. H. M. Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 56, n. 5, 2004.

GONÇALVES, R. J. **Estudo morfológico de células epiteliais da tuba uterina de bovinos *in vitro***. 150 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 4. ed. [s. n.] Manole, 1982, 720 p.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. [s. n.] Manole, 2004, 513 p.

HASSUM FILHO, P. A. **Criopreservação de embriões bovinos micromanipulados e sexados pela técnica de Primer Extension Preamplification-Polymerase Chain Reaction (PEP – PCR)**. 114 p, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

HILFER, S. R. Morphogenesis of the lung: Control of Embryonic and Fetal Branching. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 58, p. 93 - 113, 1996.

HISLOP, A. A. Airway and blood vessel interaction during lung development. **J. Anat.**, v. 201, p. 325 - 334, 2002.

HOUILLON, C. **Embriologia**. 1. ed. [s. n.] Edgard Blucher Ltda, 1972, 160 p.

HYDE, D. M.; SAMUELSON, D. A.; BLAKENEY W. H.; KOSCH, P. C. A correlative light microscopy, transmission and scanning electron microscopy study of the ferret lung. **Scan. Electron. Microsc.**, n. 3, p. 891 - 898, 1979.

JOSHI, M. S. Isolation, cell culture and immunocytochemical characterization of oviduct epithelial cells of the cow. **J. of Reprod. and Fert.**, v. 83, p. 249 -261, 1988.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 388 p.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 381p.

KING, G. J.; ATKINSON, B. A.; ROBERTSON, H. A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. **J. of Reprod. and Fert.**, v. 59, n. 31, p. 17 - 30, 1982.

LANGSTON, C.; KIDA, K.; REED, M.; THURLBECK, W. M. Human lung growth in late gestation and in the neonate. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 129, p. 607 - 613, 1984.

LARSEN, W. J. **Human Embryology**. 2. ed. [s. n.] Churchill Livingstone, 1997, 512 p.

LATIMER, H. B. The prenatal growth of the heart and the lungs in the dog. **Anat. Rec.**, v. 104, p. 287 - 298, 1949.

LAURIA, A.; GANDOLF, F. **Embryonic Development and Manipulation in Animal Production – Trends in Research and Applications**, 2. ed. [s. n.] Portland Press, 1992, 282 p.

LINDNER, G. M.; WRIGHT, R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriog.**, v. 20, n. 4, p. 407 - 416, 1983.

LIGGINS, G. C. Premature delivery of fetal lambs infused with glucocorticoids. **J. Endocrinol.**, v. 45, p. 515, 1969.

LOBO, B. A. **Noções Básicas de Embriologia Humana** 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1966, 318 p.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais**. 6. ed. [s. n.] Sulina, 1987, 314 p.

MINOO, P.; KING, R. J. Epithelial-mesenchymal interactions in lung development. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 56, p. 13 - 45, 1994.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 609 p.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V.; SHIOTA, K. **Atlas Colorido de Embriologia Clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 284 p.

NAYAK, R. K.; ELLINGTON, E. F. Ultrastructural and ultracytochemical cyclic changes in the bovine uterine tube (oviduct) epithelium. **Am. J. of Vet. Res.**, v. 38, p. 157 - 168, 1977.

NODEN, D. M.; de LAHUNTA, A. **Embriología de los animales domésticos** 1. ed. [s. n.] Acribia, 1990, 399 p.

O'RAHILLY, R. Respiratory and alimentary relations in staged human embryos. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, v. 93, p. 421 - 429, 1984.

PETERS, K.; WENER, S.; LIAO, X.; WERT, S.; WHITSETT, J.; WILLIAMS, L. Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. **The EMBO J.**, v. 13, p. 3296 - 3301, 1994.

PINTO NETO, A.; SILVA FILHO, J.M.; FONSECA, J.F.; PALHARES, M.S.; COSTA, E.P. Taxa de gestação e morfologia de embriões bovinos da raça Nelore resfriados por 24 horas a 5°C em contêiner modelo Celle modificado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 51, n. 2, 1999.

PRINGLE, K. C. Human fetal lung development and related animal models. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 29, p. 502 - 513, 1986.

RIBEIRO, A. A. C. M.; RAMOS, D. B.; PINTO, M. R. A. ramificação e distribuição do tronco pulmonar em relação aos brônquios, em fetos bovinos azebuados. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 35, n. 2, p. 57 - 60, 1998.

RIEGER, D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriog.**, v. 37, n. 1, p. 75 - 93, 1992.

RODRIGUES, J. L. Perspectivas da Biotecnologia na reprodução animal. **Rev. do Cons. Fed. de Med. Vet.**, p. 25 - 28, 1997.

SADLER, T. W. **Jan Langman** – Embriologia Médica, 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 347 p.

TRINDADE, L. B. de; ANDRADE, E. A. A. de; MELO, A. P. F. Segmentação dos pulmões de fetos de bovinos azebuados. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 40, p. 95 - 99, 2003.

TYLER, W. S. Small Airways and Terminal Units: Comparative Subgross Anatomy of Lungs. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 128, p. S32 - S37, 1983.

VILLALON, M.; ORTIZ, M.E.; AGUAYO, C.; MONOZ, J.; CROXATTO, H.B.
Differential transport of fertilized and unfertilized ova in the rat. **Biol. of Reprod.**, v. 26, p. 337 - 341, 1982.

WESSELLS, N. K. Mammalian lung development: interactions in formation and morphogenesis of tracheal buds. **J. Exp. Zool.**, v. 175, p. 455 - 466, 1970.