MARIA VITÓRIA PIEMONTE CONSTANTINO

**Morfologia e organogênese em dois períodos gestacionais em suínos (*Sus scrofa*
domesticus)**

São Paulo

2012

MARIA VITÓRIA PIEMONTE CONSTANTINO

Morfologia e organogênese em dois períodos gestacionais em suínos
(*Sus scrofa domesticus*)

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:

Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto

São Paulo

2012

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.2661
FMVZ

Constantino, Maria Vitória Piemonte
Morfologia e organogênese em dois períodos gestacionais em suínos (*Sus scrofa*
domesticus) / Maria Vitória Piemonte Constantino. -- 2012.
80 f., il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto.

1. Embriões suínos. 2. Embriologia. 3. Morfologia. 4. Morfometria.
5. Organogênese. 6. Mortalidade pré-natal. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Morfologia e organogênese em dois períodos gestacionais em suínos (*Sus scrofa domesticus*)", protocolado sob o nº 2750/2012, utilizando 25 (vinte e cinco) embriões de suínos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/9/2012.

We certify that the Research "Comparative morphology and organogenesis in two periods of pregnancy in pigs (*Sus scrofa domesticus*)", protocol number 2750/2012, utilizing 25 (twenty five) swine embryos, under the responsibility Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/19/2012.

São Paulo, 20 de setembro de 2012.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CONSTANINO, Maria Vitória Piemonte

Título: Morfologia e organogênese em dois períodos gestacionais em suínos (*Sus scrofa domesticus*)

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: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Elizabeth e Edson

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, pela atenção, paciência e companheirismo durante todas as etapas deste trabalho.

Aos meus queridos amigos e companheiros, Letícia Salvadori e Maicon Silva, pela amizade, disposição e boa vontade em ajudar sempre que precisei.

Aos “assises” Paulo Ramos, Maria Angélica (M.A.), Franceliusa Delys, Daniela, Amilton, Bruno, Diego, por contribuírem para meu crescimento profissional e pessoal, carinho e amizade.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres Rose Ely, Jaqueline, Bernadete e Ronaldo, pela amizade e convivência durante essa fase tão importante da minha vida.

Á Prof^a. Dr^a. Carina Alexandra Rondini, pela colaboração na realização deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

CONSTANTINO, M. V. P. **Morfologia e organogênese em dois períodos gestacionais em suínos (*Sus scrofa domesticus*)**. [Morphology and organogenesis in two gestational periods in pigs (*Sus scrofa domesticus*)]. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O estudo objetivou caracterizar o desenvolvimento morfológico e organológico de embriões suínos da raça Landrace (*Sus scrofa domesticus*) aos 20 (n=6) e 30 (n=7) dias pós inseminação artificial (p.i.), utilizando técnicas macroscópicas e microscópicas, além da análise morfométrica dos principais órgãos (coração, pulmão, fígado e mesonefro), inferindo sua importância na manutenção do conceito. Os embriões aos 20 p.i. apresentaram macroscopicamente pele translúcida; prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo; vesícula óptica sem pigmentação da retina; arcos branquiais; curvatura cervical; broto do membro torácico em forma de “remo”; fígado; coração; mesonefro; somitos e vascularização dermal. Nas análises histológicas, visualizaram-se as vesículas encefálicas; arcos branquiais; vesícula óptica sem pigmentação da retina; flexura encefálica; na região torácica e abdominal o coração e o fígado respectivamente; mesonefro (rim primitivo); intestino primitivo e somitos. Morfometricamente, os principais órgãos (coração, fígado e mesonefro) dos embriões aos 20 dias p.i., não diferiram significativamente ($p<0,05$), demonstrando desenvolvimento organológico apropriado a esta fase. As avaliações morfológicas e histológicas dos embriões aos 30 dias p.i. revelaram características semelhantes aos de 20 dias p.i., exceto pela presença do 4º ventrículo encefálico; curvatura cervical acentuada; fosseta nasal; vesículas ópticas com pigmentação da retina; membros torácicos e pélvicos com distinção dos dígitos; cauda; fígado volumoso e coluna vertebral, macroscopicamente; e pela presença das vesículas encefálicas secundárias; medula espinhal; medula oblonga; 3º ventrículo encefálico; coluna vertebral; pulmão; intestino primitivo e metanefro, microscopicamente. Entretanto, as análises estatísticas revelaram que as avaliações morfométricas do coração, pulmão, fígado e mesonefro diferiram entre si ($p<0,05$) em relação ao desenvolvimento dos principais órgãos. A comparação entre as médias das áreas totais do coração, fígado e mesonefro, pelo teste Mann-Whitney, indicaram que os

embriões, aos 20 e 30 dias p.i., apresentaram diferença significativa ($p<0,05$). Este estudo sugeriu que a taxa de uniformidade e desenvolvimento dos embriões podem ser determinantes para a manutenção do conceito durante o período gestacional. Porém, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos acerca do desenvolvimento embrionário no terço inicial da gestação a fim de minimizar as perdas gestacionais na espécie suína.

Palavras-chave: Embriões suínos. Embriologia. Morfologia. Morfometria. Organogênese. Mortalidade pré-natal.

ABSTRACT

CONSTANTINO, M. V. P. **Morphology and organogenesis in two gestational periods in pigs (*Sus scrofa domesticus*).** [Morfologia e organogênese em dois períodos gestacionais em suínos (*sus scrofa domesticus*)]. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The study aimed to characterize the morphological and organology development of Landrace pigs embryos (*Sus scrofa domesticus*) at 20 days (n=6) and 30 days (n=6) post artificial insemination (p.i.) through macroscopic and microscopic techniques, besides morphometric analysis of the major organs (heart, lung, liver and mesonephros) inferring its importance in the conceptus maintenance. Embryos at 20 days p.i. macroscopically presented translucent skin; forebrain, midbrain and hindbrain; optic vesicle without retinal pigmentation; branquial arches; cervical curvature; forelimb bud-shaped "paddle"; liver; heart; mesonephros; somites and dermal vasculature. In the histological analysis were visualized the encephalic vesicles (forebrain, midbrain and hindbrain); branquial arches with its respective pouches and clefts; encephalic flexure; in the thoracic and abdominal portion the heart and liver respectively; mesonephros (primitive kidney); primitive gut and somites. Morphometrically, the major organs (heart, liver and mesonephros) of embryos at 20 days p.i. did not differ significantly ($p<0.05$) demonstrating organological appropriate development at this stage. The morphological and histological evaluations of embryos at 30 days p.i. revealed similar characteristics to the embryos at 20 days p.i., except for the presence of the 4th encephalic ventricle; accentuated cervical curvature; nasal pit; optic vesicles with pigmentation of the retina; thoracic and pelvic members with distinction of the digits; tail, voluminous liver, and vertebral column, macroscopically; and the presence of secondary encephalic vesicles; spinal cord; medulla oblongata; 3rd encephalic ventricle; vertebral column; lung; "U-shaped" intestine, and mesonephros, microscopically. However, statistical analyzes revealed that the morphometric evaluations the heart, lung, liver and mesonephros differ significantly ($p<0,05$) regarding the development of the major organs. The comparison between the means of the total areas of the heart, liver and mesonephros, through Man-Whitney test indicated that the embryos at 20 and

30 days p.i., demonstrated significant differences ($p < 0,05$). This study suggested that the embryo uniformity and development rate may be crucial in the maintenance of the conceptus during the gestational period. However, more studies are necessary to elucidate the mechanisms of the embryonic development regarding the first third of pregnancy in order to minimize gestational losses in swine.

Keywords: Pig embryo. Embryology. Morphology. Morphometric. Organogenesis.
Prenatal mortality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia macroscópica de embriões suínos aos 20 dias p.i. da raça Landrace, vista lateral	28
Figura 2 - Fotografia macroscópica de embriões suínos, E1, E4 e E9, aos 20 dias p.i. da raça Landrace, vista lateral.....	29
Figura 3 - Fotografia macroscópica de embriões suínos, E11, E13 e E14, aos 20 dias p.i. da raça Landrace, vista lateral	30
Figura 4 - Fotomicrografia de embriões suínos aos 20 dias p.i. HE	31
Figura 5 - Fotomicrografia da região cranial de embriões suínos aos 20 dias p.i. HE	32
Figura 6 - Fotomicrografia da região cardíaca de embriões suínos, E1, E4 e E9, aos 20 dias p.i. HE	34
Figura 7 - Fotomicrografia da região cardíaca de embriões suínos, E11, E13 e E14, aos 20 dias p.i. HE	35
Figura 8 - Fotomicrografia da região gastro-pulmonar de embriões suínos aos 20 dias p.i. HE.....	37
Figura 9 - Fotomicrografia dos arcos branquiais, e das estruturas que os compõe, de embriões suínos aos 20 dias p.i. HE.....	38
Figura 10 - Fotomicrografia do estômago primitivo de embriões suínos aos 20 dias p.i. HE	39
Figura 11 - Fotomicrografia do mesonefro de embriões suínos aos 20 dias p.i. HE	41
Figura 12 - Fotomicrografia da região vertebral de embriões suínos aos 20 dias p.i. HE	42
Figura 13 - Fotografia macroscópica de embriões suínos aos 30 dias p.i. da raça Landrace, vista lateral	44
Figura 14 - Fotografia macroscópica de embriões suínos aos 30 dias p.i., da raça Landrace, E1 e E2, vista lateral.....	46
Figura 15 - Fotografia macroscópica de embriões suínos aos 30 dias p.i., da raça Landrace, E1 e E2, após diafanização, vista lateral	47
Figura 16 - Fotografia macroscópica de embriões suínos aos 30 dias p.i., da raça Landrace, E3 e E5, vista lateral.....	48

Figura 17 - Fotografia macroscópica do embrião suíno aos 30 dias p.i., da raça Landrace, E3, após diafanização, vista lateral	49
Figura 18 - Fotografia macroscópica de embriões suínos aos 30 dias p.i., da raça Landrace, E6 e E7, vista lateral.....	50
Figura 19 - Fotografia macroscópica do embrião suíno aos 30 dias p.i., da raça Landrace, E7, após diafanização, vista lateral	51
Figura 20 - Fotomicrografia de embriões suínos aos 30 dias p.i. HE	52
Figura 21 - Fotomicrografia da região cranial de embriões suínos aos 30 dias p.i., E2, E3 e E4. HE	53
Figura 22 - Fotomicrografia da região cranial de embriões suínos aos 30 dias p.i., E5, E6 e E7. HE	54
Figura 23 - Fotomicrografia da região cardíaca de embriões suínos aos 30 dias p.i., E2, E3 e E7. HE	55
Figura 24 - Fotomicrografia do pulmão de embriões suínos aos 30 dias p.i. HE.....	57
Figura 25 - Fotomicrografia da região abdominal de embriões suínos aos 30 dias p.i. HE	59
Figura 26 - Fotomicrografia dos órgãos urinários de embriões suínos aos 30 dias p.i. HE	61
Figura 27 - Fotomicrografia do metanefro do embrião suíno aos 30 dias p.i., E6. HE	61
Figura 28 - Fotomicrografia do mesonefro do embrião suíno aos 30 dias p.i., E5. HE	62
Figura 29 - Fotomicrografia da região vertebral de embriões suínos aos 30 dias p.i. HE	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área total (μm^2), média ($\bar{x}$) e erro padrão da média (EPM) de embriões suínos aos 20 dias p.i – São Paulo – 2012	27
Tabela 2 - Características morfológicas externas de embriões suínos aos 20 dias p.i. – São Paulo – 2012.....	28
Tabela 3 - Média ($\bar{X}$) e erro padrão da média (EPM) do coração, nos embriões suínos aos 20 dias p.i. – São Paulo – 2012	33
Tabela 4 - Área total, média ($\bar{X}$) e erro padrão da média (EPM) do fígado de embriões suínos aos 20 dias p.i. – São Paulo 2012	36
Tabela 5 - Área total, Média ($\bar{X}$) e erro padrão da média (EPM) do mesonefro de embriões suínos aos 20 dias p.i. – São Paulo – 2012	40
Tabela 6 - Crow-Rump (mensuração occípito-sacral) (cm) e o peso (g) dos embriões suínos (<i>Sus scrofa domesticus</i>) aos 30 dias p.i. – São Paulo 2012	43
Tabela 7 - Embriões suínos (<i>Sus scrofa domesticus</i>) aos 30 dias p.i., da raça Landrace, e suas respectivas características morfológicas externas observadas – São Paulo – 2012	45
Tabela 8 - Área total, e índice H do coração de embriões suínos aos 30 dias p.i. – São Paulo – 2012.....	55
Tabela 9 - Área total, e índice H do pulmão de embriões suínos aos 30 dias p.i. – São Paulo – 2012.....	56
Tabela 10 - Área total, e índice H do fígado de embriões suínos aos 30 dias p.i. – São Paulo 2012.....	58
Tabela 11 - Área total, e índice H do mesonefro de embriões suínos aos 30 dias p.i. – São Paulo 2012.....	60
Tabela 12 - Média ($\bar{X}$) do coração, fígado e mesonefro entre os embriões suínos aos 20 e 30 dias p.i. – São Paulo 2012	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1	Animais	21
2.2	Coletas do material	22
2.3	Dados biométricos	22
2.4	Análises macroscópicas.....	23
2.5	Análises microscópicas – microscopia óptica	23
2.5.1	Protocolo de inclusão de amostras em parafina para microscopia de luz	23
2.5.2	Protocolo para cortes de amostras incluídas em parafina	24
2.5.3	Protocolo de coloração de hematoxilina-eosina adaptado de Luna, (1968).....	25
2.6	Morfometria dos principais órgãos dos embriões suínos (<i>Sus scrofa</i> <i>domesticus</i>) aos 20 e 30 dias de gestação.....	25
2.7	Análises estatísticas	26
3	RESULTADOS.....	27
3.1	Embriões aos 20 dias p.i.	27
3.1.1	Área total dos embriões.....	27
3.1.2	Análise macroscópica.....	28
3.1.3	Análise microscópica	30
3.1.4	Desenvolvimento da região cranial	32
3.1.5	Aparelho cardiovascular.....	33
3.1.6	Sistema gastro-pulmonar.....	35
3.1.7	Órgãos urinários	39
3.1.8	Sistema musculoesquelético.....	41
3.2	Embriões aos 30 dias p.i.	42
3.2.1	Análise macroscópica.....	42
3.2.2	Análise Microscópica.....	51
3.2.3	Desenvolvimento da região cranial	52
3.2.4	Aparelho cardiovascular.....	55
3.2.5	Aparelho respiratório	56
3.2.6	Aparelho digestório	58
3.2.7	Órgãos urinários	59

3.2.8 Sistema musculoesquelético.....	62
4 DISCUSSÃO.....	64
4.1 Análises morfológica dos embriões suínos aos 20 dias p.i..	64
4.2 Análises morfológica dos embriões suínos aos 30 dias p.i.	68
4.3 Análises morfométricas entre os dois períodos gestacionais.....	73
5 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estudos e investimentos no setor da suinocultura posicionaram o Brasil em quarto lugar no ranking de produção e exportação mundial de carne suína. Ainda, elementos importantes como sanidade, nutrição, bom manejo da granja, produção integrada e aprimoramento dos produtores contribuíram para aumentar a oferta interna e colocar o país em destaque no cenário mundial (MAPA, 2012).

O conhecimento dos fatores que determinam o crescimento e desenvolvimento do organismo animal como um todo é fundamental para identificar problemas que possam ocorrer durante a gestação, para reduzir a mortalidade embrionária e, até mesmo, garantir o potencial de desenvolvimento desses animais na idade adulta (MAPA, 2012).

A embriologia é um tema de grande importância quando se pretende estudar o desenvolvimento e formação dos seres vivos, e, pouco se sabe a respeito do crescimento embrionário no terço inicial da gestação. O estabelecimento da gestação depende de três principais aspectos: da secreção uterina, que é essencial para o desenvolvimento do embrião; de sinais específicos a partir do embrião para o útero materno e, principalmente, que o embrião e a mãe estejam em sintonia para o estabelecimento da gestação (WILMUT; RITCHIE; HALEY, 1992). Vários fatores influenciam a mortalidade pré-natal em embriões suínos. No entanto, a probabilidade de que um embrião sobreviva depende de uma série de fatores ambientais, genéticos, nutricionais, hormonais e bioquímicos nos quais interagem e interferem no ambiente em que os embriões se desenvolvem (ASHWORTH; PICKARD, 1998).

As perdas pré-natais em suínos são de aproximadamente 30 a 40% e, a maior parte dessas perdas, ocorrem durante os primeiros 30 dias de gestação (VAN DER LENDE et al., 1994; ASHWORTH; PICKARD, 1998). Fêmeas com altas taxas de ovulação podem ter maiores índices de perdas pré-natais (FOXCROFT et al., 2000; BENNEMANN et al., 2004; BERNARDI; WENTZ; BORTOLOZZO, 2006). Apesar dos avanços em tecnologias da reprodução assistida, as taxas de perdas embrionárias permanecem altas influenciando economicamente a indústria pecuária (ALMIÑANA et al., 2012).

Nos 35 primeiros dias de gestação, os embriões são vulneráveis a qualquer tipo de estresse sofrido pela mãe. Portanto, deve-se evitar, neste período, qualquer tipo de movimentação, mistura de lotes dos animais, manuseio, mudanças de dieta ou qualquer outro distúrbio (MEREDITH, 1995). Alguns estudos sugerem que a variação no desenvolvimento do embrião pode ser prejudicial para sua sobrevivência pré-natal (WILMUT; SALES; ASHWORTH, 1986; POPE et al., 1990). De acordo com Bazer et al. (1988), durante a gestação, a redução na variação do tamanho dos embriões no ambiente uterino permitiria que todos se desenvolvessem de forma igualitária, ou seja, todos os embriões estariam na mesma fase de desenvolvimento, reduzindo, assim, a mortalidade embrionária.

Apesar da grande importância econômica da produção de embriões nas espécies de interesse zootécnico, ainda há uma necessidade de estudos sobre a morfologia embrionária durante as fases de pré-implantação e implantação que correspondem aos períodos críticos de perdas embrionárias (NEWCOMB; CHRISTIE; ROWSON, 1978; MADDOX; HYTTEL, 2003; ASSIS NETO et al. 2010). As causas de mortalidade embrionária em suínos não pode ser completamente explicada, mas acredita-se que a assincronia do desenvolvimento embrionário seja bastante relevante. Quando os embriões maiores desencadeiam mudanças no ambiente uterino, os menores não resistem. A mortalidade embrionária, em suínos, ocorre principalmente antes dos 30 dias de gestação (PERRY; ROWLANDS, 1962; POLGE, 1982) e dos óvulos fertilizados, apenas 60 a 65% vem a termo (WRATHALL, 1971). A taxa de mortalidade embrionária é de 15 a 20 % entre 30 a 50 da gestação (DZUIK, 1968; FENTON et al., 1972; WEBEL; DZUIK, 1974).

Ainda, nos primeiros 30 dias de gestação, segundo Bazer et al. (1988), pode haver uma competição natural entre os embriões, pela sobrevivência, dentro do útero. Em estudos realizados em bovinos, Reichenbach et al. (2003) afirmam que a taxa de mortalidade embrionária no terço inicial da gestação tornou-se uma das maiores causas de perdas econômicas relacionadas à produção animal. De acordo com Pope (1994), em suínos, as elevadas taxas de perdas gestacionais têm sido atribuídas à assincronia do desenvolvimento embrionário no útero materno. Sendo assim, para minimizar perdas embrionárias, que resultam em perdas econômicas, são necessários estudos que contemplem o entendimento de toda a organogênese, assim como as alterações morfológicas internas e externas, durante esse período crítico do desenvolvimento. Para tanto, é de grande importância estudar a embriologia da espécie suína para mapear

possíveis interferências que esses animais podem sofrer durante o desenvolvimento gestacional.

Ao mesmo tempo em que há um avanço relativo na reprodução da espécie suína, principalmente no que diz respeito às técnicas de inseminação artificial, transferência de embriões, estudos morfológicos da placentária e clonagem, os relatos encontrados na literatura sobre o entendimento da formação ou disposição da organogênese do embrião suíno, são escassos. Portanto, o objetivo deste estudo foi de comparar o desenvolvimento e a taxa de uniformidade de embriões suínos (*Sus scrofa*) aos 20 e 30 dias p.i., além de analisar e comparar o desenvolvimento embrionário macroscópico e microscopicamente nos dois períodos gestacionais, inferindo sua importância na manutenção do conceito.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de fotodocumentação, fixação, emblocamento para estudos histológicos e análises microscópicas foram realizados no Laboratório de Anatomia e Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo número 2750/12).

O material e os procedimentos realizados neste estudo estão subdivididos em:

2.1 Animais

Foram utilizados, para este estudo embriões suínos (*Sus scrofa domesticus*), da raça Landrace, aos 20 (n=6) e 30 (n=6) dias pós inseminação artificial (p.i.). Todo o procedimento de detecção de cio, inseminação e acompanhamento gestacional foram realizados na propriedade rural localizada na cidade de Salinas, Estado de Minas Gerais, no mês de Setembro de 2011. O abate das porcas foi realizado de acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, utilizando os critérios mínimos de bem-estar dos animais. As informações sobre a vida reprodutiva das fêmeas utilizadas estão descritos nos quadros 1 e 2.

Quadro 1 – características gestacionais da porca – gestação de 20 dias p.i

Características	Parições			
	1ª	2ª	3ª	4ª
Nascidos vivos	10	11	12	6
Natimortos	0	2	1	0
Mumificados	1	2	0	2
Período de gestação	115	114	114	117
Leitões desmamados	10	10	10	10

Quadro 2 – características gestacionais da porca - gestação de 30 dias p.i

Características	Parições			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
Nascidos vivos	12	12	14	12
Natimortos	1	0	0	1
Mumificados	1	0	1	1
Período de gestação	114	113	115	115
Leitões desmamados	10	9	9	12

2.2 Coletas do material

Após o abate, os úteros foram colocados em uma caixa térmica e transportados para o Laboratório de Anatomia e Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram abertos cirurgicamente para a recuperação dos embriões via lavagem uterina com solução salina (PBS). Em seguida, os embriões foram fixados em paraformaldeído 4% para posterior descrição dos resultados.

2.3. Dados biométricos

Para os embriões aos 20 dias p.i. a mensuração da área total (AT) foi realizada por meio de análise histológica de cortes seriados. Os embriões aos 30 dias p.i. foram pesados em uma balança analítica e mensurados com o auxílio de um paquímetro, de acordo com a metodologia adotada por Evans e Sack (1973), Noden e Lahunta (1990) com mensurações da distância occípito-sacral da cabeça, tomando como referência a crista nugal numa extremidade e da última vértebra sacral na extremidade oposta (Crow-Rump/CR).

2.4 Análises macroscópicas

Após a coleta dos dados biométricos, realizou-se a descrição morfológica externa mediante observação das estruturas presentes nos embriões suínos de ambas as idades. Durante o processo de inclusão em parafina (Paraplast®), optou-se por fotografar os embriões quando estes atingissem a etapa “diafanização”, no qual consiste em mergulhar a estrutura desejada em solução de Xilol I (1 hora) e Xilo II (1 hora) para que as mesmas fiquem transparentes, possibilitando assim a observação macroscópica das estruturas internas.

A nomenclatura utilizada está de acordo com a *Nomina Anatomica Veterinaria* (1992) e *Nomina Embryologica Veterinaria* (1994).

2.5 Análises de microscopia de luz

Para o estudo histológico, os embriões foram fixados inteiros em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Em seguida as amostras foram submetidas a uma série crescente de etanóis para inclusão em parafina (Histosec®).

Para análise histológica dos embriões como um todo e das estruturas evidentes, foram realizados cortes seriados de 5 µm, no micrótomo Leica RM2255 de todo o bloco de parafina e, em seguida, realizamos a coloração com Hematoxilina-Eosina. Depois de realizada a coloração e montagem das lâminas estabeleceram-se, para cada embrião, as lâminas que melhor representavam o meio do bloco de parafina.

2.5.1 Protocolo de inclusão de amostras em parafina para microscopia de luz

As amostras foram fixadas por 24h para o procedimento de ensaios histológicos. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão PBS e colocadas em cassetes devidamente identificados. Após a lavagem com PBS, os cassetes foram colocados em

um recipiente de vidro para o procedimento de desidratação e diafanização das amostras. O quadro 3 apresenta as soluções utilizadas e tempo de cada uma delas.

Quadro 3 – Protocolo de inclusão em parafina – São Paulo – 2012

Solução	Tempo
Álcool 70 %	Overnight
Álcool 80%	1 hora
Álcool 90 %	1 hora
Álcool 100 %	1 hora
Álcool 100 %	1 hora
Xilol (I)	1 hora
Xilol (II)	1 hora

A partir deste momento, as amostras foram retiradas dos cassetes e colocadas em copos de vidro identificados com caneta. Os copos, contendo parafina, foram mantidos em estufa (56 a 58°C) para a infiltração da parafina:

- Parafina pura (I) por 1 h - estufa;
- Parafina pura (II) por 1 h - estufa;

Após o período de infiltração da parafina, as amostras foram colocadas em travas de alumínio identificadas sobre uma peça de madeira lisa coberta com papel manteiga. Essas travas foram preenchidas com a parafina definitiva. Após solidificação total, os blocos de parafina foram desbastados para posterior corte das amostras.

2.5.2 Protocolo para cortes de amostras incluídas em parafina

O bloco de parafina contendo a amostra foi fixado no micrótomo e nivelado em relação à navalha. Para o desbaste foi utilizada uma espessura de 10 µm, maior do que a indicada para o corte. Uma vez obtido os cortes na integra, o micrótomo foi regulado para 4 a 5 µm.

Com o auxílio de um pinça, os cortes seriados foram delicadamente coletados e levados ao banho histológico à aproximadamente 38-40° C. Em seguida, os cortes foram em uma lâmina, identificados e armazenados até o momento da coloração.

2.5.3 Protocolo de coloração de hematoxilina-eosina adaptado de Luna (1968)

O quadro 4 apresenta o protocolo de coloração utilizado neste estudo.

Quadro 4 – Protocolo de coloração de hematoxilina-eosina (HE) – São Paulo – 2012

Solução	Tempo
XIOL I	5 minutos
XIOL II	5 minutos
ALCOOL 100%	5 minutos
ALCOOL 95%	5 minutos
ALCOOL 90%	5 minutos
ALCOOL 70%	5 minutos
AGUA CORRENTE	10 minutos
HEMATOXILINA	4 minutos
AGUA CORRENTE	10 minutos
EOSINA	5 segundos
ALCOOL 70%	Passagem rápida
ALCOOL 90%	Passagem rápida
ALCOOL 100%	Passagem rápida
ALCOOL 100%	Passagem rápida
ALCOOL 100%	Passagem rápida
XIOL I	5 minutos
XIOL II	Até a montagem das lâminas com Permount®

2.6 Morfometria dos principais órgãos dos embriões suínos (*Sus scrofa domesticus*) aos 20 e 30 dias de gestação

Para a mensuração da AT dos embriões aos 20 dias p.i. e dos principais órgãos (coração, fígado e mesonefro) de ambos os períodos, foram feitos cortes seriados de 5 µm no micrótomo Leica RM2255. Depois de finalizada a coloração com Hematoxilina-Eosina, foram selecionadas dez lâminas de cada embrião de ambas as idades. Depois de selecionadas as dez lâminas de cada embrião, a AT dos embriões aos 20 dias p.i. e os principais órgãos de ambos os períodos gestacionais foram mensurados no programa Leica QWin Plus Versão 3.5.1 na objetiva de 2.5x. Em seguida, uma média foi

estabelecida para possibilitar a comparação das estruturas entre os embriões da mesma gestação e entre as gestações. As estruturas citadas foram mensuradas no Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião (L@mpe) da UNESP – Campus de Dracena/SP.

2.7 Análises estatísticas

Para comparar o desenvolvimento dos principais órgãos entre os embriões do mesmo período gestacional realizou-se análise de variância, média e erro padrão das médias, sendo as médias comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, do programa BIOESTAT 5.3, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Este é um teste não paramétrico utilizado para comparar três ou mais amostras. A análise de variância, para comparar o desenvolvimento dos principais órgãos entre os períodos gestacionais, foi realizada pelo teste Mann-Whitney, do programa BIOESTAT 5.3, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

Foram avaliados dados macroscópicos e microscópicos do desenvolvimento inicial de embriões suínos aos 20 e 30 dias p.i. provenientes de inseminação artificial. Primeiramente, foram apresentados os resultados macroscópicos e, para facilitar a compreensão, os resultados microscópicos foram agrupados por sistemas funcionais. As principais características do desenvolvimento foram apresentadas baseadas em dados da literatura e nas observações feitas em embriões inteiros e cortes seriados.

3.1 Embriões aos 20 dias p.i.

3.1.1 Área total dos embriões

Para estas análises, foram utilizados 6 embriões suínos aos 20 dias p.i. provenientes de inseminação artificial (Figura 1). A tabela 1 é referente à área total dos animais coletados. Depois de realizado os cortes histológicos dos embriões, as lâminas foram analisadas sob o microscópio Leica DM 2500 e a área total dos embriões foi estabelecida segundo o programa de imagens Leica QWin Plus Versão 3.5.1 na objetiva de 2.5x. A tabela 2 é referente às estruturas externas observadas.

Tabela 1 – Área total (μm^2), média ($\bar{x}$) e erro padrão da média (EPM) de embriões suínos aos 20 dias p.i. - São Paulo - 2012

Animal	Área total (AT) (μm^2)	EPM
E1	4694000.00	685380.1865
E4	5186000.00	469271.7763
E9	4708000.00	292342.2652
E11	4692000.00	598133.7643
E13	4362000.00	373381.8421
E14	4010000.00	604574.2303
Média	0.6953	

3.1.2 Análise macroscópica

Figura 1 – Fotografia macroscópica de embriões suínos aos 20 p.i. da raça Landrace, vista lateral. Régua:

1 cm

Tabela 2 – Características morfológicas externas de embriões suínos aos 20 dias p.i. - São Paulo - 2012

Embriões	Características externas
E1	Pele translúcida, prosencéfalo, mesencéfalo, vesícula óptica sem pigmentação da retina, arcos branquiais, curvatura cervical, flexura encefálica, broto do membro torácico em forma de “remo”, fígado, coração, crista mesonéfrica, somitos e vascularização dermal.
E4	Pele translúcida, prosencéfalo, mesencéfalo, arcos branquiais, curvatura cervical, flexura encefálica, vesícula óptica sem pigmentação da retina, fígado, coração, crista mesonéfrica e somitos.
E9	Pele translúcida, prosencéfalo, mesencéfalo, flexura encefálica, vesícula óptica sem pigmentação da retina, arcos branquiais, fígado, coração, crista mesonéfrica, somitos e vascularização dermal.
E11	Pele translúcida, prosencéfalo, mesencéfalo, flexura encefálica, arcos branquiais, curvatura cervical, fígado, coração e crista mesonéfrica.
E13	Pele translúcida, prosencéfalo, mesencéfalo, curvatura cervical, flexura encefálica, fígado e coração.
E14	Pele translúcida, prosencéfalo, mesencéfalo, flexura encefálica, arcos branquiais, curvatura cervical, fígado, coração e crista mesonéfrica.

Nos embriões 1 (E1), 4 (E4) e 9 (E9) com $6.34e+006$, $5.02e+006$ e $4.27e+006$ μm^2 de AT respectivamente, observou-se, na região encefálica, início do desenvolvimento das vesículas encefálicas, o prosencéfalo e o mesencéfalo e, ventralmente à essas estruturas, a divisão dos arcos branquiais com os sulcos que os dividem. Ainda, observou-se que esses embriões apresentaram pele translúcida com o início da vascularização dermal, broto do membro torácico em forma de “pá” (E1 e E4), curvatura cervical acentuada e somitos aparentes. Na região torácica e abdominal visualizaram-se, respectivamente, o coração e o fígado fracamente marcado. O E1, E4 e E9 possuíam forma de “C” devido à curvatura craniocaudal. Foi possível visualizar no E1 e E4 vesícula óptica sem pigmentação da retina, abertura do tubo neural na região do 4º ventrículo encefálico em desenvolvimento (E4) e local da fosseta nasal (Figura 2).

Figura 2 – Fotografia macroscópica dos embriões suínos, E1, E4 e E9, aos 20 dias p.i., da raça Landrace, vista lateral

Legenda: Em E1: prosencéfalo (1), broto do membro torácico (2), somitos (3) e fígado (4). Em E4: mesencéfalo (5), abertura do 4º ventrículo encefálico (6) e coração (7). Em E9: vesícula óptica sem pigmentação da retina (8), local da fosseta nasal (9), arcos branquiais (10), pele translúcida (11). Régua: 1 cm

Assim como nos embriões citados anteriormente, nos embriões 11 (E11), 13 (E13) e 14 (E14), com $5.07e+006$, $5.21e+006$ e $3.55e+006$ μm^2 de AT respectivamente, as seguintes características morfológicas externas foram visíveis: na região encefálica, início do desenvolvimento das vesículas encefálicas. Ventralmente a essas estruturas, visualizamos a divisão dos arcos branquiais com os sulcos que os dividem (E11 e E14). Ainda, observamos o local da fosseta nasal e abertura do 4º ventrículo encefálico em desenvolvimento. Os embriões apresentaram forma de “C” devido à curvatura crânio caudal acentuada. Além disso, apresentaram pele translúcida e início da vascularização dermal. Ventralmente aos arcos branquiais, na região torácica e abdominal, observou-se

a presença do coração e do fígado respectivamente. Nesses embriões não foi possível visualizar macroscopicamente a vesícula óptica e os somitos (Figura 3).

Figura 3 – Fotografia macroscópica dos embriões suínos, E11, E13 e E14, aos 20 dias p.i., da raça Landrace, vista lateral

Legenda: Em E11: na região encefálica presença das vesículas ópticas em desenvolvimento o prosencéfalo (1) e mesencéfalo (2). Ventralmente a essas estruturas observaram-se os arcos branquiais (3) com os sulcos que os dividem. Em E13: Na região torácica e abdominal visualizou-se o coração (4) e o fígado (5), além de apresentar pele translúcida (6). Em E14: observou-se início da vascularização dermal (7), presença do 4º ventrículo encefálico em desenvolvimento (8) e curvatura cervical (9) acentuada. Régua: 1 cm

3.1.3 Análise Microscópica

Os mesmos embriões suínos aos 20 dias p.i. utilizados para a análise macroscópica foram também analisados microscopicamente. Para um melhor entendimento, primeiramente será exposto uma visão geral dos embriões e, em seguida, uma análise histológica mais detalhada dos principais sistemas orgânicos.

Os embriões E1, E4, E9, E11, E13 e E14 com $6.34e+006$, $5.02e+006$, $4.27e+006$, $5.07e+006$, $5.21e+006$ e $3.55e+006 \mu\text{m}^2$ de AT, respectivamente, apresentaram, aos cortes histológicos, as seguintes estruturas: na região encefálica observou-se a presença das vesículas encefálicas em desenvolvimento, o prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Ventralmente a região encefálica visualizou-se a presença dos arcos branquiais com os sulcos que os dividem. Na região torácica e abdominal foi possível visualizar o coração e o fígado, respectivamente; além da presença do

mesonefro (rim primitivo) localizado na região caudal do embrião. Ainda, observaram-se os somitos em todos os embriões analisados (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografia de embriões suínos aos 20 dias p.i.

Legenda: Observar as estruturas em E1, E4, E9, E11, E13 e E14. Hematoxilina-Eosina (HE)

A seguir, os resultados histológicos dos embriões analisados serão apresentados por sistemas funcionais para facilitar a compreensão.

3.1.4 Desenvolvimento da região cranial

Ao analisar os embriões aos 20 dias p.i., observou-se a formação das vesículas encefálicas, o prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Ainda, notou-se a presença da flexura encefálica, da vesícula óptica, originada do neuroectoderma do prosencéfalo e, da vesícula ótica, no qual sua parte interna se origina do rombencéfalo. O E13 apresentou desenvolvimento das vesículas encefálicas, prosencéfalo e mesencéfalo, diferenciado (Figura 5).

Figura 5 – Fotomicrografia da região cranial de embriões suínos aos 20 dias p.i.

Legenda: Em A: prosencéfalo (p), rombencéfalo (r) e flexura encefálica (fe). Em B, o semicírculo pontilhado representa a vesícula óptica originada do prosencéfalo. Em C, o semicírculo contínuo representa a vesícula ótica originada do rombencéfalo. Em D, observar o desenvolvimento diferenciado do prosencéfalo (p) e rombencéfalo (r). HE

3.1.5 Aparelho cardiovascular

Nos embriões E1, E4 e E9, o coração não se apresenta mais como um único tubo cardíaco, entretanto, notou-se o início da divisão átrio ventricular do coração. No E1 observou-se, cavidade pericárdica, contendo o átrio, o ventrículo e o *Bulbus cordis* (dilatação transitória do coração embrionário), sendo estes dois últimos separados externamente por um sulco. No E4 visualizou-se o coração se dividindo nos compartimentos atriais e ventriculares. O ventrículo perde a forma de “ferradura” e adquire uma forma oval. No E9 observou-se a crista bulbar direita e esquerda e os coxins endocárdicos fundidos. Nos três embriões acima citados, visualizou-se a estratigrafia do coração: o epicárdio, miocárdio e endocárdio (Figura 6). Após a determinação da média total da área do coração dos embriões, realizamos a análise de variância e constatamos que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os embriões desse estudo (Tabela 3 e Tabela 12).

Tabela 3 – Média (X) e erro padrão da média (EPM) do coração, nos embriões suínos aos 20 dias p.i. - São Paulo - 2012

Embriões	Área total do coração (μm^2)	EPM
E1	586356.23	70477.1285
E4	604265.31	52770.2550
E9	534196.52	59773.4755
E11	504997.31	56734.8540
E13	537927.13	62378.2936
E14	506483.77	46898.6172
Média	2.6118	

Figura 6 – Fotomicrografia da região cardíaca de embriões suínos aos 20 dias p.i., E1, E4 e E9

Legenda: Em A, B, C e D: cavidade pericárdica (cp), átrio (a), ventrículo (v), *Bulbus cordis* (b), sendo os dois últimos separados externamente por um sulco (traço pontilhado). Ainda, visualizamos a crista bulbar direita (cd), crista bulbar esquerda (ce) e os coxins endocárdicos fundidos (cf), além do epicárdio (ep), miocárdio (mi) e endocárdio (ed). HE

Nos embriões E11, E13 e E14, assim como nos citados acima, visualizou-se o início da divisão átrio ventricular do coração. O embrião E11 apresentou o ventrículo com uma camada espessa característica desta estrutura. Ainda, observou-se o átrio direito e esquerdo divididos pelo septo primeiro (*septum primum*). No E13 e E14 visualizou-se a separação átrio ventricular. Ainda, no E14, a cavidade pericárdica estava evidente; além dos coxins endocárdicos ventral e dorsal. A estratigráfica do coração representada pelo epicárdio, miocárdio e endocárdio também foram visualizados nos três embriões (Figura 7).

Figura 7 – Fotomicrografia da região cardíaca de embriões suínos aos 20 dias p.i., E11, E13 e E14

Legenda: Observar as estruturas em A, B, C e D: ventrículo (v), septo primeiro (sp), átrio direito (ad), átrio esquerdo (ae), cavidade pericárdica (cp), coxín dorsal (cd), coxín ventral (cv), epicárdio (ep), miocárdio (mi), endocárdio (ed). HE

3.1.6 Sistema Gastro-pulmonar

Observou-se nos embriões suínos, E1, E9 e E13, aos 20 dias p.i. a presença da cavidade oral primária, o estomodeo (*stomodeum*), sendo este considerado o precursor da boca. Esta estrutura é revestida por uma camada ectodérmica. Os demais embriões, E4, E11 e E14 apresentaram a cavidade oral pouco desenvolvida devido à presença da membrana bucofaríngea (Figura 8). Em todos os embriões analisados observou-se a presença do I, II, III e IV arcos faríngeos, também chamados de arcos branquiais, originados a partir da porção cranial do intestino primitivo. Caudalmente a cada arco, observamos, na porção interna, os sulcos que os dividem e, na porção externa, as fendas faríngeas correspondentes a cada sulco. Os arcos, sulcos e fendas faríngeas são revestidos, externamente, por um epitélio ectodérmico e, internamente, pelo epitélio endodérmico. Os arcos branquiais são compostos de mesênquima originado a partir da crista neural (Figura 9). Na porção caudal do intestino primitivo encontramos uma dilatação de formato alongado, o estômago primitivo. Ainda, em todos os embriões

estudados, observamos o fígado com a presença de células endodérmicas de núcleo grande que darão origem aos hepatócitos (Figura 10). Depois de determinarmos a média total da área do fígado dos embriões, realizamos a análise de variância e constatamos que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os embriões desse estudo (Tabela 4 e Tabela 12).

Tabela 4 – Área total, média (X) e erro padrão da média (EPM) do fígado de embriões suínos aos 20 dias p.i. - São Paulo - 2012

Embriões	Área total do fígado (μm^2)	EPM
E1	178366.00	86963.4464
E4	213182.50	95463.4347
E9	197661.59	88947.7606
E11	213309.19	92437.5863
E13	203096.79	79971.1343
E14	223348.11	84028.8888
Média	1.8852	

Figura 8 – Fotomicrografia da região gastro-pulmonar de embriões suínos aos 20 dias p.i.

Legenda: Observar as estruturas em A – F: estomodeo (s), camada ectodérmica (ce), membrana bucofaríngea (mb). HE

Figura 9 – Fotomicrografia dos arcos branquiais, e das estruturas que os compõem, de embriões suínos aos 20 dias p.i.

Legenda: Observar as estruturas em A: I – IV arcos branquiais, 1 – 3 sulcos faríngeos e primeira fenda faríngea (seta) revestida pelo epitélio ectodérmico (eec). Em B: epitélio endodérmico (een) e sulco faríngeo (sf). HE

Figura 10 – Fotomicrografia do estômago primitivo de embriões suínos aos 20 dias p.i.

Legenda: Observar as estruturas em A e B: estômago primitivo (ep), fígado (f) e células endodérmicas de núcleo grande (círculo). HE

3.1.7 Órgãos urinários

Os embriões suínos (*Sus scrofa domesticus*) aos 20 dias p.i., E1, E4, E9, E11, E13 e E14 apresentaram, aos cortes histológicos, apenas o mesonefro, devido ao estágio

de desenvolvimento. O mesonefro, considerado o rim provisório, aparece como sendo um vestígio do cordão nefrogênico. Ainda, observamos nessa estrutura os túbulos mesonéfricos e glomérulos (Figura 11). Depois de determinarmos a média total da área do mesonefro dos embriões, realizamos a análise de variância e constatamos que não houve diferença significativa entre os embriões desse estudo (Tabela 5 e Tabela 12).

Tabela 5 – Área total, Média (X) e erro padrão da média (EPM) do mesonefro de embriões suínos aos 20 dias p.i. - São Paulo - 2012

Embriões	Área total do mesonefro (μm^2)	EPM
E1	351878.77	47838.1924
E4	344685.47	35727.7698
E9	370258.97	42890.5850
E11	388822.55	36239.9554
E13	346498.13	49191.2706
E14	407653.30	37424.2965
Média	2.1869	

Figura 11 – Fotomicrografia do mesonefro de embriões suínos aos 20 dias p.i.

Legenda: Observar as estruturas em A: mesonefro (ms), túbulos mesonéfricos (tm) e glomérulos (g). B representa maior aumento de A. HE

3.1.8 Sistema musculoesquelético

Os embriões suínos aos 20 dias p.i., E1, E4, E9, E11, E13 e E14 apresentaram nos somitos as células esclerótomas. Ainda, observou-se a presença de cartilagem primária no qual irá formar a vértebra. Os somitos estavam revestidos internamente por uma camada muscular e externamente pelo ectoderma (Figura 12).

Figura 12 – Fotomicrografia da região vertebral de embriões suínos aos 20 dias p.i.

Legenda: Observar as estruturas em A: somito (s). B representa maior aumento de A: células esclerótomas (ce), cartilagem primária (círculo), camada muscular (cm) e ectoderma (ec). HE

3.2 Embriões aos 30 dias p.i.

3.2.1 Análise macroscópica

Foram analisados 7 embriões suínos (*Sus scrofa domesticus*) da raça Landrace aos 30 dias p.i. provenientes de inseminação artificial (Figura 13). A tabela 6 é referente ao peso e ao Crow-Rump (CR) dos animais coletados (mensuração occípito-sacral), metodologia determinada por Winter et al. (1942); Melton et al. (1951) e Evans e Sack

(1973) no qual a mensuração é feita por meio de um paquímetro a partir da cabeça até a última vértebra sacral na extremidade oposta. A tabela 7 apresenta, macroscopicamente, as estruturas observadas.

Tabela 6 – Crow-Rump (mensuração occípito-sacral) (cm) e o peso (g) dos embriões suínos (*Sus scrofa domestica*) aos 30 dias p.i. - São Paulo - 2012

Embriões	Crow-Rump (cm)	Peso (g)
E1	2,47	1,48
E2	1,85	1,25
E3	1,95	1,46
E4	2,06	1,4
E5	2,10	1,5
E6	1,92	1,42
E7	2,13	1.25

Figura 13 – Fotografia macroscópica de embriões suínos aos 30 p.i. da raça Landrace, vista lateral. Barra: 1 cm

Tabela 7 – Embriões suínos (*Sus scrofa domesticus*) aos 30 dias p.i., da raça Landrace, e suas respectivas características morfológicas externas observadas - São Paulo - 2012

Embriões	Características externas
E1	Prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, fosseta nasal, vesículas ópticas, membros torácicos e pélvicos com distinção dos dígitos, fígado, coração e cauda.
E2	Pele translúcida, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, 4º ventrículo encefálico, curvatura cervical, fosseta nasal, vesículas ópticas, membros torácicos e pélvicos com distinção dos dígitos, fígado, coração.
E3	Pele translúcida, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, 4º ventrículo encefálico, curvatura cervical, fosseta nasal, vesículas ópticas, membros torácicos e pélvicos com distinção dos dígitos, fígado, coração.
E5	Pele translúcida, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, fosseta nasal, vesículas ópticas, membros torácicos e pélvicos com distinção dos dígitos, fígado, coração.
E6	Vascularização na cabeça e pele translúcida, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, 4º ventrículo encefálico, curvatura cervical, fosseta nasal, vesículas ópticas, membros torácicos e pélvicos com distinção dos dígitos, fígado, coração e cauda.
E7	Vascularização da cabeça, pele translúcida, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, 4º ventrículo encefálico, curvatura cervical, fosseta nasal, vesículas ópticas, membros torácicos e pélvicos com distinção dos dígitos, fígado, coração e cauda.

Os embriões 1 (E1) e 2 (E2) com 2,456 e 1,848 cm de CR respectivamente, apresentaram as seguintes características morfológicas visíveis: na região cervical, observou-se as vesículas encefálicas em desenvolvimento (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo), além do 4º ventrículo encefálico e uma curvatura cervical acentuada (E1). Na região facial, observaram-se a fosseta nasal e vesículas ópticas com pigmentação da retina, ambas em desenvolvimento. Os brotos dos membros torácicos e pélvicos se encontravam em desenvolvimento e em forma de remo com uma pequena distinção dos dígitos em ambos os embriões. Ainda, foram evidenciados a presença do fígado e coração na cavidade abdominal e torácica (Figura 14).

Figura 14 – Fotografia macroscópica de embriões suínos aos 30 p.i., da raça Landrace, E1 e E2, vista lateral

Legenda: Observar as estruturas em E1 e E2: fosseta nasal (1), 4º ventrículo encefálico (2), vesícula óptica pigmentada (3), fígado (4), prosencefalo (5), mesencefalo (6), membro torácico (7), membro pélvico (8), curvatura cervical (9) e dígitos em formação (círculo). Barra: 1 cm

O E1, após diafanizado, não apresentou desenvolvimento encefálico normal, ou seja, a região encefálica apresentou-se de forma “oca”, visualizou-se apenas uma estrutura repleta de fluidos. Porém, notou-se um esboço da coluna vertebral e o fígado na região abdominal. No E2, a região encefálica estava visualmente normal aos 30 dias de gestação, sendo possível observar o 4º ventrículo encefálico e coluna vertebral (Figura 15).

Figura 15 – Fotografia macroscópica de embriões suínos aos 30 p.i., da raça Landrace, E1 e E2, após diafanização, vista lateral

Legenda: Observar as estruturas em E1 e E2: região encefálica “oca” (1), fígado (2), coluna vertebral (3) e 4º ventrículo encefálico (4). Barra: 1 cm

Os embriões 3 (E3) e 5 (E5) apresentaram as seguintes características morfológicas visíveis: pele translúcida e o início da vascularização. Na região cervical, observou-se as vesículas encefálicas em desenvolvimento (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo), além do 4º ventrículo encefálico e uma curvatura cervical acentuada no E3. Porém, no E5, não foi possível observar a curvatura cervical devido ao rompimento da coluna vertebral. Assim como o E1 e E2, na região facial, observou-se a fosseta nasal e vesículas ópticas com pigmentação da retina, ambas em desenvolvimento. Os brotos dos membros torácicos e pélvicos se encontravam em desenvolvimento e em forma de remo com uma pequena distinção dos dígitos em ambos os embriões. Ainda, observou-se a presença do fígado volumoso e coração na cavidade abdominal e torácica (Figura 16).

Figura 16 – Fotografia macroscópica de embriões suínos aos 30 p.i., da raça Landrace, E3 e E5, vista lateral

Legenda: Observar as estruturas em E3 e E5: vesícula óptica pigmentada (1), vascularização (2), pele translúcida (3), membro torácico (4), coração (5), fígado (6), membro pélvico (7), fosseta nasal (8), prosencéfalo (9), mesencéfalo (10), 4º ventrículo encefálico (11), curvatura cervical (12) e dígitos em formação (círculo). Barra: 1 cm

Após diafanização do E3 observou-se o fígado e coração distintos na cavidade abdominal e torácica, respectivamente. Foram observadas: a língua, o 4º ventrículo encefálico, a coluna vertebral e a medula. O E5, após diafanizado, não apresentou diferenças morfológicas visíveis (Figura 17).

Figura 17 – Fotografia macroscópica do embrião suíno aos 30 p.i., da raça Landrace, E3, após diafanização, vista lateral

Legenda: Observar as estruturas em E3: na região abdominal o fígado (1), na região torácica o coração (2), na região cranial a língua (3), o 4º ventrículo encefálico (4) e na região dorsal a coluna vertebral (5) e a medula (6). Barra: 1 cm

Ao analisar o E6 e E7 observou-se significativa vascularização na cabeça e a pele se mostrava translúcida. Os dois embriões apresentaram, na região cervical, as vesículas encefálicas em desenvolvimento (prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo), além do 4º ventrículo encefálico com uma curvatura cervical acentuada. Como nos demais embriões já citados, também foram visualizados, na região facial, a fosseta nasal e vesículas ópticas com pigmentação da retina, ambas em desenvolvimento. Nesta fase do desenvolvimento embrionário dos suínos, observou-se que os brotos dos membros torácicos e pélvicos possuíam forma de remo com uma discreta distinção dos dígitos. Ainda, observou-se a presença do fígado volumoso e coração na cavidade abdominal e torácica, respectivamente. No E6 observou-se, fracamente, a coluna vertebral, e, no E7 foi possível visualizar a cauda (Figura 18).

Figura 18 – Fotografia macroscópica de embriões suínos aos 30 p.i., da raça Landrace, E6 e E7, vista lateral

Legenda: Observar as estruturas em E6 e E7: vascularização da cabeça (1), na região encefálica o prosencéfalo (2) e mesencéfalo (3) e o 4º ventrículo encefálico (4). Curvatura cervical acentuada (5), fosseta nasal (6), vesícula óptica pigmentada (7). Os membros torácico (8) e pélvico (9) apresentaram discreta distinção dos dígitos (círculo). Fígado volumoso (10) na cavidade abdominal e coração (11) na torácica. Coluna vertebral (12) e cauda (13). Barra: 1 cm

Após diafanização do E7, observou-se significativa vascularização da cabeça, da cavidade torácica e abdominal. Ainda, visualizou-se o 4º ventrículo encefálico, a curvatura cervical acentuada e coluna vertebral. O E6 não apresentou diferença significativa após diafanização (Figura 19).

Figura 19 – Fotografia macroscópica do embrião suíno aos 30 p.i., da raça Landrace, E7, após diafanização, vista lateral

Legenda: Observar as estruturas em E7: vascularização da cabeça (1), 4º ventrículo encefálico (2), curvatura cervical (3), coluna vertebral (4) e fígado (5) na cavidade abdominal. Barra: 1 cm

3.2.2 Análise microscópica

Os mesmos embriões suínos aos 30 dias p.i. utilizados para a análise macroscópica foram também analisados microscopicamente. Para um melhor entendimento, primeiramente será exposto uma visão geral dos embriões e, em seguida, uma análise histológica mais detalhada dos sistemas será apresentada.

Os embriões suínos E2, E3, E5, E6 e E7 apresentaram, aos cortes histológicos, algumas estruturas importantes, tais como, vesículas encefálicas evidentes (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo), plexo coróide em formação, abertura do 4º ventrículo encefálico, olho, cavidade oral, coração, pulmão, corpos vertebrais, fígado, mesonefro, medula espinhal, pulmão (Figura 20). Pelo fato do E1 apresentar desenvolvimento embrionário anormal, não foi possível analisá-lo microscopicamente.

Figura 20 – Fotomicrografia de embriões suínos aos 30 dias p.i.

Legenda: Observar as estruturas em A, B, C, E, F e G. Hematoxilina-Eosina (HE)

A seguir, os resultados histológicos dos embriões analisados serão apresentados conforme os sistemas e aparelhos funcionais os quais pertencem para facilitar a compreensão.

3.2.3 Desenvolvimento da região cranial

Através das análises de microscopia de luz, observou-se, nos embriões suínos E2, E3, E4, E5, E6 e E7 a formação das três vesículas encefálicas embrionárias, sendo elas o prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. No prosencéfalo, visualizou-se o

telencéfalo, o diencéfalo e o terceiro ventrículo. No rombencéfalo, observou-se o metencéfalo, o mielencéfalo e a medula oblonga. Além disso, observou-se a presença do 4º ventrículo encefálico, medula espinhal e plexo coroide em desenvolvimento.

Nos embriões, neste estágio do desenvolvimento, a medula espinhal apresentou epitélio espesso (neuroepitélio). Subjacente a esta estrutura, observou-se uma camada de tecido conjuntivo frouxo em conjunto com o desenvolvimento da coluna vertebral. Esta última apresenta tecido cartilaginoso em diferenciação e tecido fibrocartilaginoso com fibras colágenas ao redor do disco vertebral. Ainda, foi possível observar o mesênquima, no qual irá formar a meninge primitiva (Figura 21 e 22).

Figura 21 – Fotomicrografia da região cranial de embriões suínos aos 30 dias p.i., E2, E3 e E4

Legenda: Observar as estruturas em A, B e C: três vesículas encefálicas: prosencéfalo (p), mesencéfalo (m), rombencéfalo (r), mielencéfalo (ml), terceiro ventrículo (3ºv), plexo coroide (círculo), 4º ventrículo encefálico (seta), medula espinhal: (seta dupla), tecido conjuntivo (tc), coluna vertebral com formação de cartilagem (c), meninges primitivas (mp) e tecido fibrocartilaginoso (tf). HE

Figura 22 – Fotomicrografia da região cranial de embriões suínos aos 30 dias p.i., E5, E6 e E7

Legenda: Observar as estruturas em A, B e C: três vesículas encefálicas: prosencefalo (p), mesencefalo (m), rombencefalo (r), telencefalo (t), diencefalo (d), metencefalo (mt), plexo coróide (círculo), medula oblonga (mo), 4º ventrículo encefálico (seta), medula espinal: (seta dupla), tecido conjuntivo (tc), coluna vertebral com formação de cartilagem (c), meninges primitivas (mp) e tecido fibrocartilaginoso (tf). HE

3.2.4 Aparelho cardiovascular

Nos embriões suínos aos 30 dias de gestação E2, E3 e E7 observaram-se o átrio e ventrículo em expansão. O epicárdio, miocárdio e endocárdio também estavam visíveis neste estágio do desenvolvimento. A cavidade ventricular apresentou cardiomioblastos (Figura 23). Após a determinação da média total da área do coração dos embriões, realizamos a análise de variância e constatamos que houve diferença significativa ($p < 0,05$) e, conseqüentemente, aplicamos o teste Post-Hoc Dunn para confirmar esta diferença (Tabela 8 e Tabela 12).

Tabela 8 – Área total, e índice H do coração de embriões suínos aos 30 dias p.i. - São Paulo - 2012

Embriões	Área total do coração (μm^2)
E2	2110878.41 a
E3	2061670.91 a
E4	2486000.00 a
E5	2110878.41 a
E6	724986.24 b
E7	1926662.73 a
H	21.1681

Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Post-Hoc Dunn ($p < 0,05$).

Figura 23 – Fotomicrografia da região cardíaca de embriões suínos aos 30 dias p.i., E2, E3 e E7

Legenda: Observar as estruturas em A, B e C: ventrículo (v), epicárdio (ep), miocárdio (m), endocárdio (en), cardiomioblastos (c). HE

3.2.5 Aparelho Respiratório

Nos embriões suínos aos 30 dias p.i., E2, E3, E4, E5, E6 e E7, observaram-se as seguintes estruturas no pulmão: brônquios lobares e brônquio traqueal, lobo esquerdo e lobo direito. No tecido pulmonar observou-se uma transição do estágio pseudoglandular para o canicular. O lúmen bronquial e os bronquíolos terminais são visíveis e mais vascularizados. Os brônquios principal e secundário se apresentam como estruturas tubulares. São constituídos de epitélio ciliado pseudoestratificado colunar com células caliciformes denominado epitélio respiratório e circundados por uma camada muscular lisa. Ainda, observaram-se capilares sanguíneos envoltos por primórdios cartilagosos envolvidos por tecido conjuntivo (Figura 24). Após a determinação da média total da área do pulmão dos embriões, realizamos a análise de variância e constatamos que houve diferença significativa ($p < 0,05$) e, conseqüentemente, aplicamos o teste Post-Hoc Dunn para confirmar esta diferença (Tabela 9 e Tabela 12).

A cavidade nasal primitiva é a primeira estrutura facial visível. Esta estrutura se desenvolve dorsalmente, lateralmente e ventralmente à cavidade oral. Nos embriões suínos, aos 30 dias p.i., observou-se uma proeminência nasal.

Tabela 9 – Área total, e índice H do pulmão de embriões suínos aos 30 dias p.i. - São Paulo - 2012

Embriões	Área total do pulmão (μm^2)
E2	1024790.09 a
E3	879127.16 a
E4	1499000.00 ab
E5	1024790.09 a
E6	662980.370 ab
E7	565956.610 ab
H	24.4018

Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Post-Hoc Dunn ($p < 0,05$).

Figura 24 – Fotomicrografia do pulmão de embriões suínos aos 30 dias p.i.

Legenda: A: visão geral do pulmão (p). Em B visualizamos o brônquio traqueal (bt); brônquio pulmonar (bp); primórdio de cartilagem (pc); fusão da prega traqueoesofágica (ft); brônquio principal (bpr) e brônquio secundário (bs). Em C visualizamos capilares sanguíneos (c); lúmen (l); divisão dos lobos pulmonares (*); mesênquima (m); bronquíolo (b); camada muscular (cm); epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc). HE

3.2.6 Aparelho digestório

Nos resultados obtidos, observou-se que, nos embriões suínos aos 30 dias p.i., E2, E3, E4, E5, E6 e E7, o estômago primitivo aparece como uma dilatação na cavidade abdominal adjacente ao fígado. Esta última estrutura, que tem sua origem a partir da porção caudal do intestino anterior, ocupou quase toda a cavidade abdominal.

No fígado em desenvolvimento, foi possível observar veias centro lobulares em toda extensão do parênquima hepático, presença de cordões de hepatócitos e sinusóides hepáticos. Na porção intestinal, observaram-se as alças intestinais, em forma de U, originadas do intestino primitivo médio. Nesta estrutura, observou-se um epitélio colunar estratificado em formação. Inclui-se também neste sistema a cavidade oral, observada nos embriões suínos de aos dias de idade. Nesta estrutura observou-se a lâmina lábio gengival superior e inferior originada do espessamento ectodérmico. O E2 com 1,948 cm de CR não apresentou, na porção intestinal, as alças intestinais, as demais estruturas foram semelhantes (Figura 25). Após a determinação da média total da área do fígado dos embriões, realizamos a análise de variância e constatamos que houve diferença significativa ($p < 0,05$) e, conseqüentemente, aplicamos o teste Post-Hoc Dunn para confirmar esta diferença (Tabela 10 e Tabela 12).

Tabela 10 – Área total, e índice H do fígado de embriões suínos aos 30 dias p.i. - São Paulo - 2012

Embriões	Área total do fígado (μm^2)
E2	5554000.00 a
E3	5736000.00 a
E4	2069000.00 ab
E5	5554000.00 a
E6	14.3e64 ac
E7	16942000.00 ad
H	18.5420

Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Post-Hoc Dunn ($p < 0,05$).

Figura 25 – Fotomicrografia da região abdominal de embriões suínos aos 30 dias p.i.

Legenda: observar as seguintes estruturas: alças intestinais (ai); cavidade abdominal (ca); cordões hepáticos (ch), cavidade oral (co); epitélio colunar estratificado (e); estômago primitivo (ep); fígado (f); lâmina lábio gengival superior (lgs); lâmina lábio gengival inferior (lgi); parênquima hepático (pe); sinusóides hepáticos (sh); veia centro lobular (v). HE

3.2.7 Órgãos urinários

Nos embriões suínos aos 30 dias p.i., E2, E3, E4, E5, E6 e E7 não se observou a presença do pronefro. O mesonefro apresentou-se ventralmente às vértebras em todos os embriões analisados. Os túbulos mesonéfricos possuíam arranjo tubular irregular e, observou-se um aglomerado de células mesenquimais (Figura 26). No E6 notou-se o desenvolvimento do rim metanéfrico, localizado caudalmente ao rim mesonéfrico com túbulos bem definidos e arquitetura morfológica no início de seu desenvolvimento. Ainda, neste embrião, o metanefro apresentou unidades filtradoras (néfrons), com seus respectivos glomérulos e túbulos (Figura 27). O E5 apresentou apenas mesonefro volumoso sem a presença de um aglomerado celular, localizado subjacente ao fígado

(Figura 28). Após a determinação da média total da área do mesonefro dos embriões, realizamos a análise de variância e constatamos que houve diferença significativa ($p < 0,05$) e, conseqüentemente, aplicamos o teste Post-Hoc Dunn para confirmar esta diferença (Tabela 11 e Tabela 12).

Tabela 11 – Área total, e índice H do mesonefro de embriões suínos aos 30 dias p.i. - São Paulo - 2012

Embriões	Área total do mesonefro (μm^2)
E2	2067821.64 a
E3	1612523.54 ac
E4	1786000.00 a
E5	2067821.64 ad
E6	4566000.00 abcd
E7	1688071.87 a
H	22.3085

Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Post-Hoc Dunn ($p < 0,05$).

Tabela 12 – Média (X) do coração, fígado e mesonefro entre os embriões suínos aos 20 e 30 dias p.i. - São Paulo 2012

Embriões	Coração (μm^2)	Fígado (μm^2)	Mesonefro (μm^2)
20 dias p.i.	536061.83 a	208139.65 a	361068.87 a
30 dias p.i.	2086274.66 b	5645000.00 b	1926910.82 b

Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Figura 26 – Fotomicrografia dos órgãos urinários de embriões suínos aos 30 dias p.i.

Legenda: Observar as estruturas em A e B: mesonefro (m), túbulos mesonéfricos irregulares (setas), túbulos mesonéfricos (tm) e aglomerado de células (círculo). HE

Figura 27 – Fotomicrografia do metanefro do embrião suíno, aos 30 dias p.i., E6

Legenda: em A e B o metanefro (mt) com arquitetura morfológica no início de seu desenvolvimento, túbulos metanéfricos (tt) bem definidos, glomérulos (círculos). HE

Figura 28 – Fotomicrografia do mesonefro do embrião suíno, aos 30 dias p.i., E5

Legenda: Mesonefro (m) volumoso sem a presença de um aglomerado celular e túbulos mesonéfricos irregulares (tm). HE

3.2.8 Sistema musculoesquelético

Todos os embriões suínos aos 30 dias p.i., E2, E3, E4, E5, E6 e E7, apresentaram corpos vertebrais com alguns pontos cartilagosos. Ainda, neste estágio, foi possível visualizar condrócitos e condroblastos nas vértebras em desenvolvimento e cartilagem hialina (Figura 29).

Figura 29 – Fotomicrografia da região vertebral de embriões suínos aos 30 dias p.i.

Legenda: Em A: visão geral de um embrião suíno de 30 dias p.i. mostrando (retângulo) as estruturas em B e C. Em B: pontos cartilagosos (pc). Em C: cartilagem hialina (ch) com a presença de condrócitos (círculo vermelho) arredondados. HE

4 DISCUSSÃO

Para facilitar a compreensão, a discussão será dividida de acordo com os períodos gestacionais.

4.1 Análises morfológicas dos embriões suínos aos 20 dias p.i.

A organogênese inicia-se a partir dos tecidos embrionários fundamentais (ectoderma, mesoderma e endoderma) do qual se originam os diferentes tecidos, órgãos e estruturas que o animal irá apresentar quando adulto; e compreende o conhecimento relativo ao início da vida e às mudanças que ocorrem durante o desenvolvimento pré-natal (SILVA et al., 1998; MOORE; PERSUAD, 2007).

Assim como nos resultados expostos, a descrição do desenvolvimento embrionário em outras espécies baseou-se nos estágios construídos através da idade, mudanças corporais por diferenciação gradual, aumento do tamanho do corpo e peso e desenvolvimento total de sistemas e órgãos (AMBRÓSIO et al., 2002; KNOSPE, 2002; BEAUDOIN; BARBET; BARGY, 2003, MIGLINO et al, 2006).

Poucos estudos têm sido realizados a respeito do desenvolvimento de embriões suínos (*Sus scrofa domesticus*). A tabela 1 demonstrou a área total (AT) dos embriões coletados, no qual a média obtida foi de $0.6953 \mu\text{m}^2$, não havendo, portanto, diferença significativa entre os embriões neste período gestacional, conforme demonstrado pelo teste de Kruskal-Wallis (programa BIOESTAT 5.3).

As características morfológicas externas dos embriões suínos aos 20 dias p.i apresentaram pele translúcida e início da vascularização dermal (Tabela 2). Em embriões equinos, foram descritas estruturas que correspondem à mesma fase do desenvolvimento do presente estudo (FRANCIOLI et al., 2011). Entretanto, a literatura é restrita no que se refere a um padrão comum de desenvolvimento normal dos embriões das espécies domésticas (SCHWARZE, 1972; LATSHAW, 1990; NODEN; LAHUNTA, 1990). Em estudos realizados em gatos, aos 17 dias de gestação, observou-se, na região encefálica, uma dilatação rostral correspondente ao prosencéfalo, o que se assemelha aos embriões do presente estudo. Ainda, segundo os autores, os embriões de

gatos apresentaram na região cervical um formato em “C”; com curvatura cervical definida, presença dos quatro arcos branquiais e sulcos que os dividem; proeminência cardíaca visível na cavidade torácica e presença de somitos na parede dorsal (ABREU et al., 2011). Essas características estão de acordo com as encontradas nos embriões suínos aos 20 dias de gestação.

Os embriões suínos aos 20 dias p.i. já apresentavam proeminência encefálica, vesícula óptica e flexura cervical. Estas características foram observadas por Sadler (2005) ao estudar embriões humanos. Ainda, observou-se embriões com curvatura craniocaudal em forma de “C” e broto dos membros torácicos em forma de “pá”, estas estruturas também foram descritas por Winters; Green; Constock (1942), Assis Neto (2005) em embriões bovinos. Em uma fase do desenvolvimento correspondente aos embriões do presente estudo foram descritos macroscopicamente as seguintes estruturas em embriões bovinos: arcos branquiais, vesículas encefálicas formadas, flexura cervical e saliência cardíaca visível (ALBERTO, 2006; MANÇANARES, 2007).

Evans e Sack (1973), ao estudarem embriões de *Guinea pig* entre 16 a 22 dias de gestação, relataram que estes apresentam as vesículas encefálicas, arcos branquiais evidentes, individualização dos somitos, vesícula óptica, saliência do coração e aparecimento dos brotos dos membros, assim como observamos em nosso estudo com os embriões suínos de 20 dias de idade. Theiler (1972) relatou também, no estudo realizado com embriões de ratos, a presença das vesículas encefálicas (prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo), fosseta nasal, bem como o aparecimento dos somitos. Ainda, de acordo com o autor, os embriões de ratos apresentaram, como características embrionárias, os arcos branquiais com seus sulcos e fissuras delimitando cada arco e presença dos brotos dos membros em forma de “remo”. Essas características foram encontradas nos embriões suínos aos 20 dias p.i. analisados neste estudo.

Os embriões suínos aos 20 dias p.i., assim como em humanos (MOORE; PERSUAD, 2004) por volta da quarta semana de gestação (HOAR; MONIE, 1981), apresentaram, aos cortes histológicos, vesículas encefálicas (prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo) localizadas a partir do tubo neural ao quarto par de somitos. De acordo com os resultados expostos, as vesículas encefálicas se originaram da fusão das pregas neurais, estando de acordo com relatos feitos Hyttel; Sinowatz; Vejlsted (2010) ao descrever o desenvolvimento do cérebro. Observou, na região cranial, a flexura encefálica, o que corresponde ao estudo descrito por Hyttel et al. (2012), no qual esta se origina a partir do dobramento mesencefálico. Assemelhando-se ao desenvolvimento

cranial de ratos (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012), os embriões suínos, no terço inicial da gestação, apresentaram vesícula óptica em desenvolvimento originada a partir de cavidades superficiais das laterais do prosencéfalo.

Nos embriões suínos aos 20 dias p.i., assim como em um estudo realizado com *Gatus domesticus* aos 19 dias de gestação (ABREU et al., 2011) e equinos aos 24 dias de gestação (FRANCIOLLI et al., 2011), observou-se a presença do coração constituído de duas câmaras cardíacas (atrial e ventricular) e as camadas que as compõe, o epicárdio e o miocárdio revestido internamente pelo endocárdio (GARCIA et al., 1991; FERNANDEZ, 1991; MOORE; PERSUAD; 2004; SADLER, 2005). O coração é considerado o primeiro sistema funcional e tem seu início durante a terceira semana de gestação (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010). A análise morfométrica indicou que a área total do coração não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os embriões analisados, conforme demonstrada na Tabela 3.

Ao analisar a região gastro-pulmonar observou-se que os embriões suínos E1, E9 e E13, apresentaram cavidade oral desenvolvida, o estomodeo (*Stomodeum*), sendo este considerado o precursor da boca (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012). Os demais embriões, E4, E11 e E14, apresentaram a cavidade oral pouco desenvolvida com a presença da membrana bucofaríngea visíveis. De acordo com os resultados expostos, assim como em gatos aos 19 dias de gestação (ABREU et al., 2011), observou-se nos embriões, aos 20 dias p.i., a presença do I, II, III e IV arcos faríngeos, também chamados de arcos branquiais, constituídos por um mesênquima, posicionados dorsal, lateral e ventralmente ao estomodeo e originados a partir da porção cranial do intestino primitivo, no qual irão formar as proeminências mandibulares e maxilares (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012). Caudalmente a cada arco observou-se, na porção interna, os sulcos que os dividem e, na porção externa, as fendas faríngeas correspondentes a cada sulco. Os arcos, sulcos e fendas faríngeas estavam revestidos, externamente, por um epitélio ectodérmico e, internamente, pelo epitélio endodérmico.

A região hepática os embriões apresentaram estruturas celulares em forma de cordões localizadas na cavidade abdominal, com parênquima em diferenciação. Essas estruturas celulares migram da porção mesogástrica ventral para o septo transversal, onde interagem com o mesênquima circundante para formar outros componentes celulares característicos do fígado embrionário e fetal como, por exemplo, tecido conjuntivo, células endoteliais e células hematopoiéticas (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010). Em relação à morfometria, não foram encontradas diferenças

significativas ($p < 0,05$) referentes a área total do fígado, conforme demonstrado na Tabela 4. Portanto, o desenvolvimento do fígado aos 20 dias p.i. mostrou-se normal.

Na cavidade abdominal observou-se, em todos os embriões analisados, uma dilatação da porção caudal do intestino primitivo, observado também em *Gatus domesticus* (ABREU et al., 2011) e equinos por volta dos 40 dias de gestação (FRANCILLI et al., 2011), com epitélio colunar estratificado em formação, o estômago primitivo simples, bem como relatou Hyttel; Sinowatz; Vejlsted (2012) ao descrever o desenvolvimento da região gastro-pulmonar.

De acordo com os resultados expostos, assim como no estudo acerca do desenvolvimento do sistema renal de embriões bovinos com idade gestacional entre 10 e 50 dias (CAGNOTO et al., 2009), observou-se nos embriões aos 20 dias p.i., o mesonefro localizado na parede dorsal do embrião. Esta estrutura apresentou túbulos mesonéfricos com arranjos irregulares e um aglomerado de células mesenquimais, demonstrado também em equinos entre 19 e 25 dias de gestação (FRANCIOLLI et al., 2011). Assim como no estudo realizado por Cagnoto et al. (2009) em embriões bovinos, em nossos estudos, não se observou a presença do pronefro e metanefro. A análise morfométrica demonstrou que a área total do mesonefro não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os embriões analisados, indicando atividade funcional normal para esta estrutura, conforme demonstrados na Tabela 5. Durantón et al. (1987) sugerem que a morfometria ajuda a comparar indivíduos em uma mesma população, além de colocar em evidência suas variações.

Ao longo da extensão dorsal dos embriões suínos deste estudo, e em equinos aos 35 dias de gestação (FRANCIOLLI et al., 2011), observou-se a presença de somitos constituídos de células esclerótomas e cartilagem primária no qual irá formar a vértebra. Assim como em nossos resultados, em embriões de gatos com 19 dias de gestação Abreu et al. (2011) revelou que os somitos tendem a formar placas ovaladas de tecido cartilaginoso. A principal função do sistema musculoesquelético é de dar suporte e movimento ao corpo e proteção dos órgãos vitais. As vértebras e costelas se originam a partir de populações celulares dos somitos, denominadas esclerótomos. Os esclerótomos começam a se condensar e a se diferenciar em cartilagem (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

4.2 Análises morfológicas dos embriões suínos aos 30 dias p.i.

Os dados biométricos dos embriões suínos aos 30 p.i. (tabela 6) contendo o Crow-Rump (CR/cm) e peso (g) obtiveram valores coincidentes com os do estudo realizado por Evans e Sack (1973), no qual a média foi 2,07 cm de CR. Poucos estudos têm sido realizados a respeito do desenvolvimento de embriões suínos (*Sus scrofa domestica*) no período crítico (VAN DER LENDE et al., 1994; ASHWORTH; PICKARD, 1998). De acordo com Ashworth; Haley; Wilmut (1992), em estudos realizados com embriões suínos da raça Meishan e Landrace, afirmam que aos 30 dias de gestação pode haver diferença no tamanho dos embriões devido às diferenças raciais. Ainda, segundo o autor, acredita-se que a uniformidade do embrião aumenta a sua taxa de sobrevivência. A mortalidade embrionária relacionada à capacidade uterina ocorre entre os dias 30 e 35 de gestação (WEBEL; DZIUK, 1974; KNIGHT et al., 1977) ou após os 30 dias (CHEN; DZIUK, 1993). Segundo Evans e Sack (1973), informações a respeito do desenvolvimento embrionário e fetal podem servir como um guia para a compreensão das consequências das influências nocivas nos vários estágios da gestação.

As características externas dos embriões aos 30 dias p.i apresentaram-se semelhantes entre si (tabela 7), estando de acordo com as citadas por Savaladori et al. (2012) ao descreverem a presença de pele translúcida com início da vascularização dermal, somitos e alguns pontos cartilagosos em embriões de ratos.

Na região cranial, observou-se a presença da placa nasal evidente, do 4º ventrículo encefálico, vesículas encefálicas (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo) e vesícula óptica e curvatura cervical. Na região torácica e pélvica os brotos dos membros apresentaram forma de “remo” com segmentação dos dígitos. Ainda, na região torácica e abdominal observou-se uma proeminência do coração e presença do fígado volumoso, respectivamente. Na parede dorsal dos embriões visualizou-se os somitos e a medula espinhal. As características acima estão de acordo com os relatos de Theiler (1972), Salvadori et al. (2012) ao estudarem embriões de ratos. As mesmas características foram encontradas no estudo realizado por Evans e Sack (1973) para embriões de *Guinea pig*, aos 31 dias p.i. Moore e Persuad (2004) observaram, em estudo com fetos humanos, que os membros já estavam visíveis e divididos em segmentos, o orifício bucal já estava separado das fossas nasais e os olhos estavam bem aparentes sem a presença de pálpebras, o que confirma nossos resultados. Outro estudo,

realizado por Butler; Juurlink (1987), descreve embriões humanos com a presença da vesícula óptica com pigmentação da retina, presença dos membros em desenvolvimento com segmentação dos dígitos, da fosseta nasal, bem como a presença de vascularização na região encefálica, confirmando assim, nossos resultados.

De acordo com as análises de microscopia de luz dos embriões suínos aos 30 p.i., observou-se, na região cranial, a presença das vesículas encefálicas (prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo) formadas a partir do tubo neural ao quarto par de somitos, conforme relatado por Moore e Persuad (2004) em humanos e em embriões equinos entre 24 e 36 dias de gestação (FRANCIOLLI et al., 2011). O prosencefalo representa a porção anterior da região cranial e sua porção anterior denomina-se telencefalo. O telencefalo, observado nos embriões suínos aos 30 dias p.i., forma os hemisférios cerebrais e os bulbos olfatórios (figura não mostra). A porção posterior do prosencefalo, o diencefalo, também observado em nossos resultados, dá origem ao terceiro ventrículo. No rombencefalo, observou-se o mielencefalo (vesícula mais posterior do cérebro) e o metencefalo, no qual se estende para formar a flexura do 4º ventrículo encefálico. O mielencefalo irá se desenvolver na medula oblonga (parte posterior do tronco encefálico), também observada em nossos resultados. A medula oblonga atua como um canal entre a medula espinhal e as regiões superiores do cérebro e, também, possui centros importantes para regulação da respiração e dos batimentos cardíacos. Observou-se, também, o desenvolvimento do plexo coroide (invaginações no interior do 4º ventrículo encefálico) originado da proliferação do mesênquima vascular, no qual produz fluidos cérebro-espinhais. A tela coroide, da qual o plexo coroide está suspenso no interior do lúmen ventricular, é formada pelo teto do diencefalo e pelo teto do terceiro e quarto ventrículos. O metencefalo (porção posterior do rombencefalo) se desenvolve em duas partes: a ponte, estrutura transversa na extremidade da medula oblonga; cerebelo, que tem como função a coordenação da postura e do movimento. Esta última estrutura não foi observada em nossos resultados. As flexuras cerebrais observadas nos embriões aos 30 p.i. são originadas a partir das cinco vesículas cerebrais secundárias (telencefalo, diencefalo, mesencefalo, metencefalo e mielencefalo). A flexura cefálica se origina do dobramento do mesencefalo e a flexura cervical se forma a partir do dobramento entre o encéfalo posterior e a medula espinha. Ainda, foi possível observar o mesênquima (camada que envolve o cérebro e a medula espinhal), no qual irá formar a meninge primitiva. Todas as estruturas, acima citadas, observadas nos

embriões suínos aos 30 dias p.i. estão de acordo com as descritas por Hyttel; Sinowatz; Vejlsted (2012).

O desenvolvimento das funções do coração é considerado um processo rápido devido ao crescimento acelerado do embrião, pois, este irá necessitar de intensa oxigenação. Nos embriões suínos aos 30 dias p.i. E2, E3 e E7 com 1,848; 1,948 e 2,134 cm de CR, respectivamente, observaram-se o átrio e ventrículo em expansão e, na cavidade ventricular, a presença de cardiomioblastos. Assim como em nossas observações, o coração tubular se alonga para dar início à formação do átrio e ventrículo (GARCIA et al., 1991; FERNANDEZ, 1991; MOORE; PERSUAD, 2004 e SADLER, 2005). Nas observações feitas por Hyttel; Sinowatz; Vejlsted (2010), o sistema cardiovascular, incluindo o coração, artérias, veias e sangue, tem o início do seu desenvolvimento a partir da terceira semana de gestação e é considerado o primeiro sistema funcional. O epicárdio, miocárdio e endocárdio também estavam visíveis neste estágio do desenvolvimento. Essas características estão de acordo com Garcia et al. (1991); Fernandez (1991); Moore; Persuad (2004) e Sadler (2005) ao relatarem que o miocárdio primitivo origina-se da fusão dos tubos cardíacos, o qual é revestido internamente pelo endocárdio. Ainda, segundo os autores, o epicárdio é derivado de células endoteliais que se originam da superfície externa do seio venoso. No estudo realizado em equinos, Francioli et al. (2011) observa o aparecimento do coração aos 24 dias de gestação e que, as camadas histológicas, epicárdio, miocárdio e endocárdio já podem ser distinguidas, assim como a cavidade ventricular com inúmeros cardiomioblastos. A análise morfométrica revelou que a área total do coração apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os embriões analisados, indicando anormalidade no desenvolvimento desta estrutura, conforme demonstrada na tabela 8. De acordo com Père et al. (1997), pode haver uma “competição” entre os embriões ou fetos no início da gestação, no qual limita seu crescimento e desenvolvimento normal dos órgãos no ambiente uterino. Em estudos realizados sobre a distribuição de peso e desenvolvimento corporal no início da fase fetal e sua relação com a mortalidade embrionária revelou que o crescimento do embrião depende de sua relação com o ambiente uterino (VAN DER LENDE et al., 1990). Ainda, segundo os autores, se um número mínimo de embriões bem desenvolvidos pode alterar o ambiente uterino para “acomodar” seu desenvolvimento, eles poderão criar uma assincronia entre o ambiente uterino e os embriões menos desenvolvidos.

No desenvolvimento do aparelho respiratório, observou-se a formação do broto pulmonar na região ventral da porção caudal do intestino anterior. Verificamos também que o aparelho respiratório encontrou-se no período embrionário, onde, observou-se a bifurcação dos brotos pulmonares para formarem os brônquios principais, sendo esses revestidos por epitélio colunar, essas características são similares as encontradas por Hyttel; Sinowatz; Vejlsted (2010). O desenvolvimento dos brônquios e dos pulmões se divide em períodos sequenciais: o período embrionário, quando o primórdio dos brônquios e dos pulmões é formado; o período fetal, quando os brônquios ramificados são formados e as estruturas preliminares para a trocas gasosas estão estabelecidas; e o período pós-natal, em que as estruturas definitivas para as trocas gasosas, os alvéolos, são desenvolvidas e os pulmões assumem a sua forma adulta (HYTTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010). Constatamos que as análises morfométricas do pulmão apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), conforme demonstrado na tabela 9. As perdas embrionárias ou desenvolvimento desigual dos embriões podem estar relacionados a mutações genéticas (WEBEL; DZUIK, 1974), além disso, a capacidade uterina pode ser responsável pelas taxas elevadas de perdas embrionárias e pelo desenvolvimento anormal dos embriões antes dos 35 dias de gestação (CHEN; DZIUK, 1993).

Os embriões suínos aos 30 dias p.i. apresentaram, na cavidade abdominal, fígado volumoso com parênquima em diferenciação para a formação dos cordões de hepatócitos. Segundo relatos de Hyttel; Sinowatz; Vejlsted (2010), as células endodérmicas hepáticas migram da porção mesogástrica ventral para o septo transversal, onde interagem com o mesênquima circundante de modo a formar outros componentes celulares característicos do fígado embrionário e fetal como, por exemplo, tecido conjuntivo, células endoteliais e células hematopoiéticas. Ainda, segundo os autores, as células endodérmicas, relativamente grandes, se diferenciam em hepatócitos dispostos em forma de “cordões” – cordões de hepatócitos. Desta forma, nossos resultados estão de acordo com os relatos descritos pelos autores. Em relação à morfometria, constatamos diferença significativa ($p < 0,05$) ao analisarmos a área total do fígado de todos os embriões, conforme demonstrado na tabela 10. Portanto, concluímos que estes apresentaram desenvolvimento anormal desta estrutura, indicando também baixa atividade funcional deste órgão, conforme relatado por Geisert; Yelich (1997), no qual as variações morfológicas são tão críticas para a sobrevivência do conceito. Ainda, de acordo com Bauer et al. (1998), ao descrever tamanho dos órgãos em suínos recém

nascidos, para determinar o retardo assimétrico do crescimento desses animais no ambiente uterino, relatou que o fígado foi o órgão que apresentou maior variação no desenvolvimento.

Observou-se nos embriões suínos aos 30 dias de p.i. a presença de alças intestinais em forma de “U” originadas do intestino primitivo médio. Esta estrutura apresentou epitélio colunar estratificado em formação. As características acima mencionadas estão de acordo com os autores citados. Confirmando nossos resultados Junqueira; Carneiro (2004); Moore; Persuad (2004), relatam que o desenvolvimento intestinal se caracteriza pelo rápido alongamento do intestino primitivo, resultando na formação da alça intestinal primária com epitélio em desenvolvimento.

No desenvolvimento dos órgãos urinários dos embriões suínos aos 30 dias p.i. não observou-se a presença do pronefro, assim como no estudo realizado por Cagnoto et al. (2009) com embriões bovinos com idade gestacional de 10 a 50 dias. Nossos relatos também estão de acordo com o estudo realizado pela autora, no qual o mesonefro localizou-se ventralmente às vértebras do embrião e a porção cranial do mesonefro estava próxima à borda do fígado e, já no embrião E6, a porção caudal apresentou-se junto ao metanefro. De acordo com Hyttel; Sinowatz; Vejlsted (2010), nos mamíferos, o desenvolvimento do sistema urinário, particularmente a formação dos rins (nefroênese), origina-se a partir de três porções do rim primitivo: o pronefro, mesonefro e metanefro. No mesonefro pudemos observar que os túbulos mesonéfricos possuíam arranjo tubular irregular e, um aglomerado de células mesenquimais, estando de acordo Franciulli et al. (2011) ao estudar sistema urogenital de embriões equinos. No embrião E6 o desenvolvimento do rim metanéfrico, localizado caudalmente ao rim mesonéfrico, apresentou túbulos bem definidos e arquitetura morfológica no início de seu desenvolvimento, essas características estão de acordo com as encontradas por Cagnoto et al. (2009). Ainda, neste embrião, o metanefro apresentou unidades filtradoras (néfrons), com seus respectivos glomérulos e túbulos os quais estão de acordo com Hyttel; Sinowatz; Vejlsted (2010) ao descreverem o metanefro em bovinos. Em relação à morfometria, observamos que o mesonefro dos embriões, aos 30 dias de gestação, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,5$) no desenvolvimento, conforme demonstrado na tabela 11. Essas diferenças podem estar relacionadas uma série de fatores ambientais, genéticos, nutricionais, hormonais e bioquímicos nos quais interagem e interferem no ambiente em que os embriões se desenvolvem (ASHWORTH; PICKARD, 1998).

As análises histológicas do sistema musculoesquelético dos embriões suínos, aos 30 dias p.i., revelaram a presença de corpos vertebrais com alguns pontos cartilaginosos. Ainda, neste estágio, visualizamos condrócitos e condroblastos nas vértebras em desenvolvimento e presença de cartilagem hialina. A principal função do sistema musculoesquelético é de dar suporte e movimento ao corpo e proteção dos órgãos vitais. As vértebras e costelas se originam a partir de populações celulares dos somitos, denominadas esclerôtomos. Os esclerôtomos começam a se condensar e a se diferenciar em cartilagem (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010). Nas observações feitas por Francioli et al. (2011) em embriões equinos de 35 dias de gestação, os somitos apresentam alguns pontos de diferenciação os quais irão formar os corpos vertebrais cartilaginosos. Ainda, segundo os autores, nessa fase do desenvolvimento, observou-se condrócitos e condroblastos e a formação da cartilagem hialina.

4.3 Análises morfométricas entre os dois períodos gestacionais

A comparação entre as médias das áreas totais, dos dois períodos gestacionais analisados no presente estudo (coração, fígado e mesonefro), pelo teste Mann-Whitney, indicam que os embriões, aos 20 e 30 dias p.i., apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si, comprovando o desenvolvimento embrionário normal dos 20 aos 30 dias p.i., conforme demonstrado na tabela 12. Alguns estudos sugerem que, até os 20 dias p.i. os embriões suínos não apresentam variação expressiva em relação ao desenvolvimento dos órgãos, porém, essa variação pode ser vista ao final do período embrionário, ou seja, aos 30-35 dias p.i., confirmando nossos resultados (VAN DER LAND et al., 1990).

5 CONCLUSÕES

Ao estudarmos a macroscopia e microscopia morfológica em suínos (*Sus scrofa domestica*) aos 20 e aos 30 dias p.i., além da organogênese e morfometria desses animais observamos que:

- Os embriões suínos aos 20 dias p.i. apresentaram macroscopicamente as seguintes características externas visíveis: pele translúcida, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, vesícula óptica sem pigmentação da retina, arcos branquiais (exceto E13), curvatura cervical, flexura encefálica, broto do membro torácico em forma de “remo”, fígado, coração, crista mesonéfrica, somitos e vascularização dermal. Porém, em três embriões (E11, E13 e E14) não foi possível observar os somitos, o início da vascularização dermal, o mesonefro, vesícula óptica sem pigmentação da retina.
- Microscopicamente os embriões suínos aos 20 dias p.i. apresentaram aos cortes histológicos, na região cranial, a presença das vesículas encefálicas primárias em desenvolvimento (prosencefalo, mesencefalo e rombencéfalo), vesícula óptica e vesícula ótica (E9) . Ventralmente à região cranial visualizou-se a presença dos arcos branquiais com os sulcos que os dividem e suas respectivas fissuras faríngeas. Na região torácica e abdominal foi possível visualizar o coração, dividido em duas câmaras (atrial e ventricular) e o fígado, respectivamente; além da presença do mesonefro (rim primitivo) com suas estruturas tubulares localizado na região caudal do embrião. Ainda, histologicamente, observaram-se os somitos em todos os embriões analisados. Observou-se que o E1, E9 e E13 apresentaram menor desenvolvimento dos arcos branquiais.
- Morfometricamente, os principais órgãos (coração, fígado e mesonefro) dos embriões aos 20 dias de gestação, não diferiram significativamente ($p < 0,05$), demonstrando desenvolvimento organológico apropriado a esta fase.

- As avaliações morfológicas e histológicas dos embriões aos 30 dias p.i. revelaram desenvolvimento organológico normal dos órgãos. Entretanto, as análises estatísticas revelaram que as avaliações morfométricas do coração, pulmão, fígado e mesonefro diferiram entre si ($p < 0,05$) em relação ao desenvolvimento dos principais órgãos.
- A comparação entre as médias das áreas totais do coração, fígado e mesonefro, pelo teste Mann-Whitney, indicam que os embriões, aos 20 e 30 dias p.i., apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si, comprovando o desenvolvimento embrionário normal de um período para o outro.
- Este estudo fornece uma visão holística das características macroscópica, microscópica e morfométrica dos embriões suínos no terço inicial da gestação sugerindo que a taxa de uniformidade e desenvolvimento dos embriões podem ser determinantes para a manutenção do conceito durante o período gestacional. Porém, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos acerca do desenvolvimento embrionário no início da gestação a fim de minimizar as perdas gestacionais na espécie suína.

REFERÊNCIAS

- ABREU, D. K.; RODRIGUES, E. A. F.; MONTEIRO, J. M.; FRANCIOLLI, A. L.; SOUZA, C. C.; ROBALLO, K. C. S.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Estudo microscópico e macroscópico, com enfoque radiográfico e de alizarina, no desenvolvimento embrionário e fetal de gatos domésticos (*Felis catus*) em diferentes idades gestacionais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 57-66, 2011.
- ALBERTO, M. L. V. **Estudo do desenvolvimento do aparelho respiratório de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 60 dias**. 2006. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.
- ALMIÑANA, C.; HEATH, P. R.; WILKINSON, S.; SANCHEZ-OSORIO, J.; CUELLO, C.; PARRILLA, I.; GIL, M. A.; VAZQUEZ, J. L.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E. A.; FAZELI, A. Early developing pig embryos mediate their own environment in the maternal tract, **PlosOne**, v. 7, n. 3, p. 1-15, 2012.
- AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; LIMA, A. R.; MARTINS, D. S.; ASSIS NETO, A. C.; BONATELLI, I. M.; VERECHIA, F. T.; CARVALHO, A. F. Placental fissure in mongrel cats, *Felis catus* Linnaeus 1758. Gross and microscopical aspects. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, p. 81-85, 2002.
- ASHWORTH, C. J.; HALEY, C. S.; WILMUT, I. Effect of regumate on ovulation rate, embryo survival and conceptus growth in meishan and landrace x large white gilts. **Theriogenology**, v. 37, n. 2, p. 433-443, 1992.
- ASHWORTH, C. J.; PICKARD, A. R. Embryo survival and prolificacy. In: WISEMAN, J.; VARLEY, M.A., CHADWICK, J.P. (Eds.). **Progress in pig science**. Nottingham: Nottingham University, 1998. p. 303-325.
- ASSIS NETO, A. C. **Desenvolvimento placentário em bovinos obtidos por gestações naturais e por fecundação *in vitro***. 2005. 223 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.
- ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, F. T. V.; AMBRÓSIO, C. E.; LEISER, R.; MIGLINO, M. A. Morpho-physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 760-772, 2010.
- BAZER, F. W.; THATCHER, W. W.; MARTINAT-BOTTE, F.; TERQUI, M. Conceptus development in Large White and prolific Chinese Meishan pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p. 37-42, 1988.
- BEAUDOIN, S.; BARBET, P.; BARGY, F. Developmental stages in the rabbit embryo: guidelines to choose an appropriate experimental model. **Fetal diagnosis and therapy**, v. 18, p. 422-427, 2003.

BAUER, R.; WALTER, B.; HOPPE, A.; GASER, E.; LAMPE, V.; KAUF, E.; ZWIENER, U. Body weigh distribution and organ size in newborn swine (*Sus scrofa domestica*) – A study describing an animal model for asymmetrical intrauterine growth retardation. **Experimental and Toxicology Pathology**, v. 50, p. 59-65, 1998.

BENNEMANN, P. E.; BERNARDI, M. L.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Relationship between corpora lutea and number of viable embryos in gilts and sows. In: **18th IPVS Congress**, 2004, Hamburg, v. 2, p.476, 2004.

BERNARDI, M. L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P. **Desenvolvimento do conceito suíno e fatores que predisõem à mumificação**. In: I Simpósio UFRGS sobre Produção, Reprodução e Sanidade Suína, 2006, p. 236-250.

BIOESTAT. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Versão 5.3. 2007.

BUTLER, H.; JUURLINK, B. H. J. **An Atlas for Staging mammalian and Chick Embryos**. Boca Raton: C.R.C. Press Inc., 1987.

CAGNOTO, D. G.; GUERRA, R. R.; ALBERTO, M. V.; AMBRÓSIO, C. E.; SANTOS, J. M.; MIGLINO, M. A. Morfologia e desenvolvimento ultraestrutural do sistema renal de embriões bovinos com idade gestacional entre 10 e 50 dias. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2154-2161, 2009.

CHEN, Z. Y.; DZIUK, P. J. Influence of initial length of uterus per embryo and gestation stage on prenatal survival, development, and sex ratio in the pig. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1895, 1993.

DURANTON, J. F.; LAUNOIS, M.; LUONG, H. L.; LECOQ, M. **Guia prático de luta contra os gafanhotos devastadores do Brasil**. Roma: Fao-Cirad-Prifas, 1987, p.343.

DZUIK, P. J. Effect of number of embryos and uterine space on embryo survival in the pig. **Journal of Animal Science**, v. 27, p. 673-676, 1968.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growthcurves, external features and selected references. **Anatomy, Histology and Embryology**, v. 2, p. 11-45, 1973.

FENTON, F. R.; SCHWARTZ, F. L.; BAZER, F. W.; ROBISON, O. W.; ULBERG, L. C. Stage of gestation when uterine capacity limits embryo survival in gilts. **Journal of Animal Science**, v. 35, p. 383-388, 1972.

FOXCROFT, G., WILSON, M., VONNAHME, K., QUIRK-THOMAS, M., FORD, S. P. **Changing patterns of prenatal loss in commercial sow genotypes**. In: 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, 2000, v. 2, 28p.

FRANCIOLLI, A. L. R.; CORDEIRO, B. M.; FONSECA, E. T.; RODRIGUES, M. N.; SARMENTO, C. A. P.; AMBROSIO, C. E.; CARVALHO, A. F.; MIGLINO, M. A.; SILVA, L. A. Characteristics of the equine embryo and fetus from days 15 to 107 of pregnancy. **Theriogenology**, v. 76, p. 819-832, 2011.

GARCIA, S. M. L.; JECKEL NETO, E.; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1991. 350p.

GEISERT, R. D.; YELICH, J. V. Regulation of conceptus development and attachment in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 133-149, 1997.

HOAR, R. M.; MONIE, I. W. Comparative development of specific organ system. In: KIMMEL, C.A.; BUELKE-Sam, J. (Eds). **Developmental Toxicology Raven Press**, New York, 1981.

HYTTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Essentials of domestic animal embryology**. Saunders, Elsevier, 2010.

HYTTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Essentials of domestic animal embryology**. Saunders, Elsevier, 2012.

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

KNIGHT, J. W.; BAZER, F. W.; THATCHER, W. W.; FRANKE, D. E.; WALLACE, H. D. Conceptus development in intact and unilaterally hysterectomized-ovariectomized gilts: interrelations among hormonal status, placental development, fetal fluids and fetal growth. **Journal of Animal Science**, v. 44, p. 620-637, 1977.

KNOSPE, C. Periods and stages of the prenatal development of the domestic cat. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 31, p. 37-51, 2002.

LATSHAW, W. K. **Veterinary development anatomy: a clinic oriented approach**. Toronto: Decker, 1990. p. 49-74.

LUNA, L. G. **Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. McGraw-Hill: New York, NY, 1968.

MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N. I.; VAJTA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, A.; TVEDEN-NYBORG, P.; TROUNSON, A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. **Reproduction**, v. 125, p. 607-623, 2003.

MANÇANARES, C. A. F. **Análise morfológica da área de transição do intestino primitivo para o saco vitelino em embriões e fetos bovinos (24 a 50 dias de gestação)**. 2007. 115f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

MEREDITH, M. J. Pig breeding and infertility. In: MEREDITH, M. J (Eds.). **Animal breeding and infertility**, Oxford: Blackwell Science, 1995. p. 278-353.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em: 18 out. 2012.

MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; PFARRER, C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, v. 66, p. 1699-1702, 2006.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 609p. 2004.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 536p. 2007.

NEWCOMB, R.; CHRISTIE, W. B.; ROWSON, L. E. A. Nonsurgical recovery of bovine embryos. **Veterinary Record**, v. 102, p. 414-417, 1978.

NODEN, D. M.; LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domesticos mecanismos de desarrollo y malformaciones**. Zaragoza: Acribia, 1990.

PÈRE, M. C.; DOURMAD, J. Y.; ETIENNE, M. Effect of number of pig embryos in the uterus on their survival and development and on maternal metabolism. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1337-1342, 1997.

PERRY, J. S.; ROWLANDS, I. W. Early pregnancy in the pig. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 4, p. 175, 1962.

POLGE, C. Embryo transplantation and preservation. In: COLE, D.J.A.; FOXCROFT, G. R. (Ed.) **Control of Pig Reproduction**. London: Butterworths Scientific. 1982. 277p.

POPE, W. **Embryonic mortality in swine**. Geisert, Rd ZM: Boca Raton: CRS Press. 1994. p. 53-77.

POPE, W. F.; XIE, S.; BROERMANN, D. M.; NEPHEW, K. P. Causes and consequences of early embryonic diversity in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 40, p. 251-260, 1990.

REICHENBACH, H. D.; DE OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; SANTOS FILHO, A. S.; ANDRADE, J. C. O. Morte embrionária na TE: redução através da melhor compreensão dos mecanismos da comunicação materno-embrionária? **O embrião**, n.17, p.3-6, 2003.

SADLER, T. W. **Embriologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

SCHWARZE, E. **Kompendium der Geflugelanatomie von Erich Schwarze**. Stuttgart: G. Fisher. 1972. p. 279.

SILVA, A. D.; GRAMAXO, F.; SANTOS, M. E.; MESQUITA, A. F.; BALDAIA, L. **Terra, universo de vida**. Biologia 12º ano, 2ª parte. Porto Editora, Porto, 1998.

THEILER, K. **The house mouse. Development e normal stages from fertilization to 4 weeks of age**. New York: Springer Verlag, 1972.

VAN DER LENDE, T.; SOEDE, N. M.; KEMP, B. V. Embryo mortality and prolificacy in the pig. In: COLE, D. J. A., WISEMAN, J., VARLEY, M. A. (Eds.). **Principles of pig science**. Nottingham: Nottingham University Press, 1994. p. 297-317.

VAN DER LENDE, T.; HAZELEGER, W.; DE JAGER, D. Weight distribution within litters at the early foetal stage and at birth in relation to embryonic mortality in the pig. **Livestock Production Science**, v. 26, p. 53-65, 1990.

WEBEL, S. K.; DZUIK, P. J. Effect of stage of gestation and uterine space on prenatal survival in the pig. **Journal of Animal Science**, v. 38, p. 960-963, 1974.

WILMUT, I.; RITCHIE, W. A.; HALEY, C. S.; ASHWORTH, C. J.; AITKEN, R. P. A comparison of rate and uniformity of embryo development in Meishan and European white pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 45-56, 1992.

WILMUT, I.; SALES, D. I.; ASHWORTH, C. J. Maternal and embryonic factors associated with pre- natal loss in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 76, p. 851-864, 1986.

WINTERS, L. M.; GREEN, W. W.; CONSTOCK, R. E. Prenatal development of the bovine. **Minnesota Agricultural Experiment Station Technical Bulletin**, n. 50, p. 1-50, 1942.

WRATHALL, A. E. **Prenatal survival in pigs. I. Ovulation rate and its influence on prenatal survival in pigs**. Commonwealth Agricultural Bureau. England: Farnham Royal. 1971. Review Series n. 9.