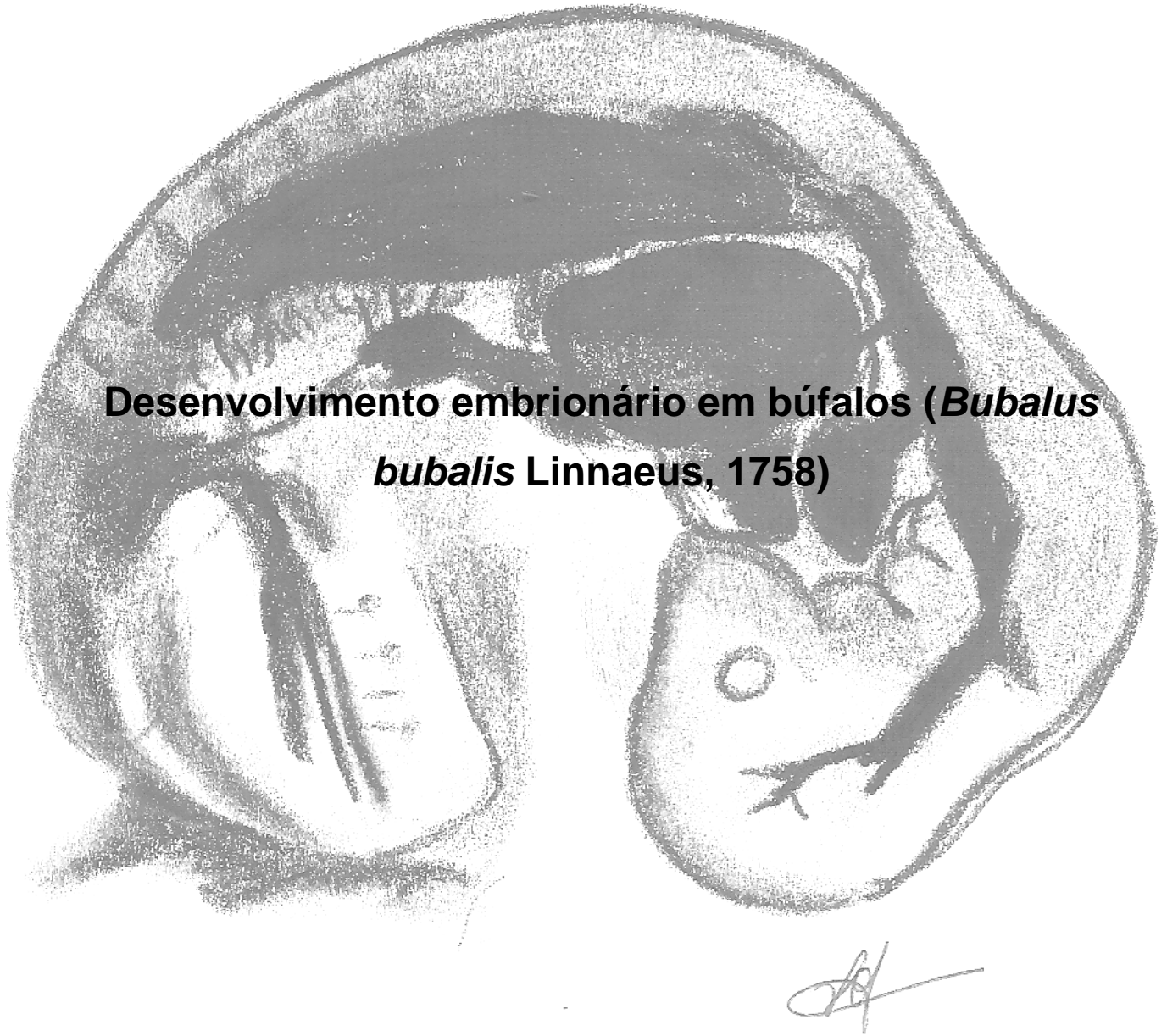


ADRIANA CAROPREZO MORINI

**Desenvolvimento embrionário em búfalos (*Bubalus  
bubalis* Linnaeus, 1758)**



São Paulo

2009

**ADRIANA CAROPREZO MORINI**

**Desenvolvimento embrionário em búfalos (*Bubalus bubalis*  
Linnaeus, 1758)**

Tese 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 Doutor em Ciências

**Departamento:**

Cirurgia

**Área de concentração:**

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

**Orientador:**

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo

**2009**

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

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2176  
FMVZ

Morini, Adriana Caroprezo  
Desenvolvimento embrionário em búfalos (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) /  
Adriana Caroprezo Morini. – São Paulo : A. C. Morini, 2009.  
179 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

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

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Bubalinos. 2. Desenvolvimento embrionário. 3. Embrião. 4. Células pluripotentes. 5. Morfologia. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

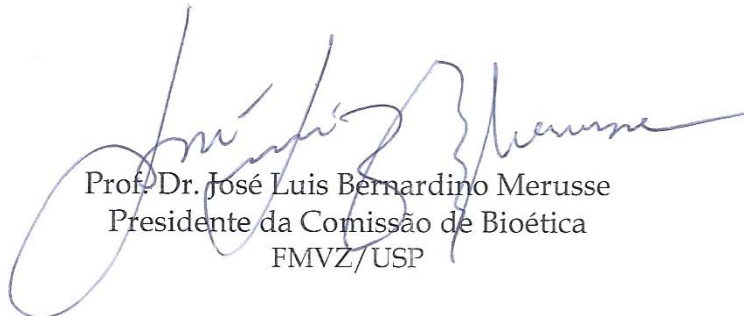
*Comissão Bioética*

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização do desenvolvimento embrionário em búfalos (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758)", protocolado sob o nº944/2006, utilizando 120 (cento e vinte) búfalos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/10/06".

(We certify that the Research "Characterization of the embryo development in buffalos (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758)", protocol number 944/2006, utilizing 120 (one hundred and twenty) buffalos, under the responsibility of Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 10/18/2006).

São Paulo, 18 de outubro de 2006



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MORINI, Adriana Caroprezo

Título: Desenvolvimento embrionário em búfalos (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758)

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2005

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

*“Nossos erros ocorrem porque agimos quando temos que pensar, e pensamos quando temos que agir.”*

(Autor desconhecido)

## DEDICATÓRIA

*A Deus*

*Por me permitir viver, errar e aprender com a vida.*

## DEDICATÓRIA

*A meus pais João Carlos Morini e Zuleida Caroprezo Morini  
Dois anjos e exemplos de casal, de amor, de fé, de vida...  
Muito Obrigada! Por esperar, por confiar, por motivar e por fim, por me amar.  
Amo vocês dois MUITO mesmo.*



## DEDICATÓRIA

*A meu irmão João Carlos Morini Júnior  
Pela paciência com a irmã “mala”, pelo amor que sempre demonstrou e por me permitir saber  
que sempre posso contar com você.  
A palavra IRMÃO define você.*

## DEDICATÓRIA

*O meu avô João Morini (in memorian), não tive tempo de conhecê-lo mas mesmo assim aprendi com suas histórias.*

*À minha avó Laura Amadi Morini (in memorian), aquela que aguardava ansiosa uma neta doutora, e que zelou por mim em suas orações*

*A meu avô (in memorian) Roque Caroprezo, por estar ao meu lado, por todo o carinho e principalmente pelos bons exemplos que me deu com o desprendimento, a amizade e a alegria que lhe eram tão peculiares.*

## DEDICATÓRIA

*À minha avó Cinira Pavão Caroprezo, por horas de sono perdido me esperando chegar em casa. Por ter sempre “a cama pronta...rango no fogão...luz acesa...”. Você é minha melhor amiga de república.*

*Aos meus fiéis companheiros Winnie (in memorian), Princesa, Scoti, Fiel I (in memorian),  
Fiel II, Cliff (in memorian), Roger (in memorian) e Sargento (in memorian).  
Aos que me proporcionaram horas mais do que agradáveis de liberdade Jungle, Hiffa, Arian  
(in memorian) e Joe Top Cody (Jay).  
Todos vocês me deram a certeza de que a profissão que escolhi é, dentre todas a melhor!*

## DEDICATÓRIA



*Ao meu AMIGO, e atual anjo da guarda, não te vejo mais, mas te sinto todo dia ao meu lado...a presença material já não existe e isso dói, mas você mereceu seguir em frente.*

## AGRADECIMENTOS

*À Profª Drª Maria Angélica Miglino, nesses 5 anos de convivência aprendi que a “chefa” não ensina só ciência, mas ensina a conservar as boas amizades, a estender a mão a quem precisa, a manter a mente aberta para novas idéias, e acima de tudo a cair e se reerguer sempre!*

*Por mais difícil que tenha sido a rasteira,  
“...levanta, sacode a poeira e dá a volta por cima...”.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao Prof. Dr. Haroldo Francisco L. Ribeiro pela contribuição ao estudo ao me receber em Belém e me apresentar o matadouro em Macapá de onde foram retirados todos os embriões deste estudo, sem esta contribuição, este estudo não passaria de uma boa idéia.*

*Prof. Dr. José Roberto Kfoury por me acompanhar em nossa primeira visita e coleta de material na cidade de Macapá.*

*Ao Prof. José Manoel dos Santos.*

## AGRADECIMENTOS

*Aos amigos Daniele dos Santos Martins e Carlos Eduardo Ambrósio, por se preocuparem cada qual com seu jeitinho, com todos nós!*

*Dani, lamento não ter conhecido você antes, enquanto estávamos em São João, mas agradeço por hoje termos nos tornado grandes amigas! Busco em você sempre uma dose extra de ânimo, palavras de conforto, momentos de risadas e VÁRIAS soluções para um único problema.*

*Cajú, você se preocupa demais conosco, isso nos torna mais distraídos e dependentes, você mimica demais a nós todos e agradeço por isso. Sua amizade e sua opinião sempre serão muito importantes pra mim.*



## AGRADECIMENTOS

*Aos amigos da “equipe búfalo” André Luiz Rezende Franciulli e Phelipe Oliveira Favaron, foram muitas as vezes que precisei de vocês, esse estudo teve muito da contribuição dos dois, cada qual a sua maneira, formamos sim uma equipe e tenho muito orgulho disso.*

*A amiga Marina P. Brólio, tudo o que fez até hoje por mim não fica nem aos pés do que fez pelo nosso amigo Whiskey, infelizmente não deu...mas valeu!*

*A amiga Flávia Thomaz V. Pereira, ou simplesmente Barbie, você me fez rir muito e olhar sempre o lado melhor das coisas, mesmo quando não estava presente sua lembrança alegrou muitos momentos.*

*A amiga Cristiane V. Wenceslau, que compartilhou junto comigo os momentos de tensão desde o envio do primeiro relatório, prestação de contas, qualificação, envio de resumos, UFA, foi um longo percurso.*

*A todos os funcionários do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ pela amizade e companheirismo, especialmente ao Ronaldo, que apesar do humor ácido típico sempre esteve a disposição para me ajudar em tudo que precisei, você é um grande amigo. A Tati, Jaqueline, e Índio, por me agüentarem nos dias ruins e por dividirem minhas alegrias nos bons. E ainda a bibliotecária Elza pelos momentos de descontração neste final do estudo.*

*A grande amiga Fernanda ou simplesmente Fezinha, por reaparecer em minha vida todas as vezes que precisei contar com uma verdadeira amizade.*

OBS: Todas as ilustrações desta tese foram feitas por Phelipe O. Favaron. Contato: [phelipe.favaron@yahoo.com.br](mailto:phelipe.favaron@yahoo.com.br)

## AGRADECIMENTOS

*As instituições FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.*

## RESUMO

MORINI, A. C. **Desenvolvimento embrionário em búfalos (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758)**. [The development of buffalo (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758). embryos]. 2009. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

No intuito de descrever a evolução do desenvolvimento do concepto bubalino entre 10 e 60 dias de gestação, esse estudo utilizou a metodologia de mensuração por “Crow rump” para revelar a idade estimada de 96 embriões e fetos coletados no Matadouro municipal de Macapá, no estado do Amapá entre os anos de 2006 a 2008. Os parâmetros utilizados consistiram em medidas de comprimento (crânio caudal) e peso utilizando-se balança eletrônica de precisão. Para visualização macroscópica foram feitas fotografias, e a microscopia eletrônica de varredura auxiliou na identificação de inúmeras estruturas externas dos embriões. Foram realizados cortes histológicos de 5µm os quais foram corados em HE e picosirius, e submetidos a técnicas de imunohistoquímica para detecção de Oct4, PCNA e vimentina. Nossos resultados revelam que embriões de mamíferos até a 5ª semana de gestação são muito semelhantes aos de outras espécies de mamíferos já estudados. Similaridades entre bovinos e bubalinos persistem com exceção dos estágios fetais onde aparentemente búfalos se desenvolvem mais rapidamente que bovinos. Em conclusão, o estudo indica características importantes que podem ser utilizadas para verificar a viabilidade de embriões de búfalos e auxiliar avaliações em exames complementares como os de ultrassonografia, e também indicam a presença de importantes sítios de células pluripotentes em regiões diferentes do embrião dependendo do estágio de desenvolvimento em que o mesmo se encontra.

Palavras-chave: Bubalinos. Desenvolvimento embrionário. Embrião. Células pluripotentes. Morfologia.

## ABSTRACT

MORINI, A. C. **The development of buffalo (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758). embryos.** [Desenvolvimento Embrionário em Búfalos (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758)]. 2009. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The aim of this study was to describe the developmental changes in the bubaline conceptus from 10-60 days of gestation using the “Crown rump” methodology to diagnostic the estimated age of those 96 embryos and fetuses obtained at Matadouro Municipal de Macapá, on Amapá state, from 2006 until 2008. Parameters used were cranio-caudal length (CR) and weight. For macroscopic view photographs were done, Scanning electron microscopy helps to identify inumerous external structures of the embryos. Histologic section of 5µm were done and stained using Hematoxilin-Eosin, picosirius, and also subjected to immunohistochemistry for Oct4, PCNA and vimentin were evaluated. Transmission electron microscopy was used in fetal membranes to describe it better. The obtained results revealed that mammal embryos until 5<sup>th</sup> weeks of gestation has to much similar characteristics to others studied species. Similarities between bovine and bubaline persist; except on fetal stages that buffalos seems develop faster than bovine ones. In conclusion, the overall data indicated the important characteristics that can be evaluated to verify the viability of buffalo embryos and help the evaluations of ultrasonographic exams, also identify the presence of important regions with pluripotente cells that changes according to the stage of the embryo development.

Keywords: Bubaline. Embryo development. Embryo. Pluripotent cells. Morphology.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1	JUSTIFICATIVA .....	25
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>26</b>
3.1	MÉTODOS DE ESTIMATIVA DA IDADE EMBRIONÁRIA .....	27
3.2	FECUNDAÇÃO, CLIVAGEM E IMPLANTAÇÃO .....	28
3.3	SOBRE AS CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS .....	30
3.4	MARCADORES DE PLURIPOTENCIALIDADE .....	31
3.5	DISCO GERMINATIVO BILAMINAR .....	41
3.6	DISCO GERMINATIVO TRILAMINAR .....	45
3.7	EXPLORANDO AS TRÊS LÂMINAS DO DISCO EMBRIONÁRIO .....	48
3.8	PERÍODO EMBRIONÁRIO .....	50
3.9	DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA URINÁRIO .....	52
3.10	DESENVOLVIMENTO HEPÁTICO .....	54
3.11	DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO .....	55
3.12	PLACENTA E PLACENTAÇÃO .....	55
3.12.1	<b>A placenta nos ruminantes</b> .....	<b>57</b>
3.12.2	<b>Membranas fetais</b> .....	<b>58</b>
3.12.2.1	Morfologia do saco coriônico .....	58
3.12.2.2	Morfologia do Alantóide .....	62
3.12.2.3	Morfologia do âmnion .....	64
3.12.2.4	Morfologia do saco vitelino .....	65
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>68</b>
4.1	COLETA DE MATERIAL .....	68
4.2	ESTUDO MACROSCÓPICO E MORFOMÉTRICO .....	71
4.3	MICROSCOPIA DE LUZ .....	71
4.4	IMUNOHISTOQUÍMICA .....	71
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	72
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	73
4.7	ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	73
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>74</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS .....	78
5.1.1	<b>Grupo I</b> .....	<b>78</b>
5.1.2	<b>Grupo II</b> .....	<b>81</b>
5.1.3	<b>Grupo III</b> .....	<b>84</b>
5.1.4	<b>Grupo IV</b> .....	<b>86</b>
5.1.5	<b>Grupo V</b> .....	<b>89</b>
5.1.6	<b>Grupo VI</b> .....	<b>91</b>
5.1.7	<b>Grupo VII</b> .....	<b>93</b>
5.1.8	<b>Grupo VIII</b> .....	<b>95</b>
5.1.9	<b>Grupo IX e Grupo X</b> .....	<b>97</b>
5.2	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS .....	102
5.2.1	<b>Sistema Músculo - Esquelético</b> .....	<b>102</b>
5.2.2	<b>Sistema cardiovascular</b> .....	<b>106</b>

5.2.4	<b>Sistema digestório</b> .....	113
5.2.5	<b>Sistema urogenital</b> .....	118
5.2.6	<b>Sistema nervoso</b> .....	124
5.2.7	<b>Membranas fetais</b> .....	125
5.2.7.1	Saco vitelino .....	125
5.2.7.2	Córión 129	
5.2.7.3	Alantóide .....	132
5.2.7.4	Âmnion .....	135
5.3	IMUNOHISTOQUÍMICA .....	138
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>144</b>
6.1	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS .....	144
6.1.1	<b>Grupo I</b> .....	146
6.1.2	<b>Grupo II</b> .....	148
6.1.3	<b>Grupo III</b> .....	148
6.1.4	<b>Grupo IV</b> .....	149
6.1.5	<b>Grupo V</b> .....	150
6.1.6	<b>Grupo VI</b> .....	150
6.1.7	<b>Grupo VII</b> .....	151
6.1.8	<b>Grupo VIII</b> .....	151
6.1.9	<b>Grupo IX e Grupo X</b> .....	152
6.2	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS .....	153
6.2.1	<b>Sistema músculo-esquelético</b> .....	153
6.2.2	<b>Sistema cardiovascular</b> .....	154
6.2.3	<b>Sistema respiratório</b> .....	155
6.2.4	<b>Sistema digestório</b> .....	156
6.2.5	<b>Sistema urogenital</b> .....	158
6.2.6	<b>Sistema nervoso</b> .....	161
6.2.7	<b>Membranas fetais</b> .....	162
6.2.7.1	Saco vitelino .....	162
6.2.7.2	Córión 164	
6.2.7.3	Alantóide .....	165
6.2.7.4	Âmnion .....	166
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>168</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>170</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os búfalos são pertencentes à ordem dos Artiodátilos ungulados, subordem Ruminantia, família Bovídea, subfamília Bovínea, gênero *Bubalus* e espécie *Bubalus bubalis bubalis* (PEREIRA, 2000).

O rebanho bubalino em todo o mundo atinge 130 milhões de exemplares, classificados como tipo rio (*river buffalo*) e tipo pântano (*swamp buffalo*). O primeiro deles é possuidor de 48 cromossomos, e utilizado como animal de tração, principalmente no leste asiático, e o segundo, possuidor de 50 cromossomos, é destinado à produção de leite desde a Índia até países do Mediterrâneo e Egito (HAFEZ, 2004).

O Carabao, uma das raças de búfalo de rio, tem cariótipo  $2n=48$  cromossomos e é também conhecido por “Búfalo Rosilho”, e as demais raças são conhecidas por “Búfalos Pretos” (PEREIRA, 2000).

No Brasil, no ano de 1993 a população de búfalos era de aproximadamente 1,5 a 2,0 milhões de animais, pertencentes à raça Mediterrânea, Carabao e seus mestiços, e estão distribuídos 50% na região Norte, 15% no Sudeste, 14% no Nordeste, 12% no Centro – Oeste e 9% na região Sul (BARUSELLI, 1993). Hoje a população bubalina no país encontra-se na casa dos 3 milhões de animais (RIBAS, 2009).

Devido à verificação de dados expressivos que trazem perspectivas de investimento na criação e verificando a carência de informações morfológicas na literatura, Oliveira et al. (2001), realizaram um estudo da pelvimetria e pelvilogia em búfalas mestiças. Assim como os autores acima encontraram carência de literatura, este estudo também teve como objetivo ampliar os conhecimentos sobre a espécie, principalmente em relação à biologia do desenvolvimento e também à organização das membranas fetais.

O fato dos búfalos serem dotados de características que os titulam como animais de produção adaptáveis a regiões onde os bovinos muitas vezes não conseguem se desenvolver de maneira adequada, nos leva a questionar a razão de não utilizá-los como modelo de estudos experimentais amplamente difundidos nos bovinos tais como a clonagem e a transgenia.

Ao mesmo tempo, a pronta resposta segue embasada no fato de haver pouca literatura a despeito da espécie; muitos são os estudos relacionados à reprodução da mesma, a morfologia da placentação bem como técnicas de inseminação artificial e transferência de embriões já se encontram em estágio avançado de pesquisa e utilização; no entanto são poucos os relatos da morfologia do concepto da espécie versus período de gestação, como é sua formação, como está disposta sua organogênese, e se existem sítios de células indiferenciadas, até qual estágio embrionário eles se encontram, onde eles se encontram, e como são caracterizados.

Diante dos fatos relatados lançou-se a hipótese da morfogênese embrionária bubalina assemelhar-se à bovina e se as linhagens germinativas de embriões dessa espécie encontram-se distribuídas em diferentes órgãos. De outra parte pretendeu-se verificar se durante a fase embrionária se existem células com capacidade de proliferação e também apoptóticas.



## 2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram: caracterizar o desenvolvimento morfológico de embriões bubalinos provenientes de gestação natural utilizando as técnicas de dissecação, descrição anatômica, mensuração macroscópica, microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e técnicas de imunohistoquímica.

Localizar os sítios de células germinativas nos embriões de diferentes idades através do marcador específico para “germ cells” Oct-4, e localização destas células nos diferentes estágios.

Descrever as especialidades celulares em cada região do embrião bubalino, no período de 10 a 60 dias, bem como fornecer parâmetros morfológicos e biométricos do desenvolvimento embrionário proveniente de gestação natural, tendo, portanto, dados que poderão ser aplicados à biotecnologia da reprodução destes animais.

### 2.1 Justificativa

Este trabalho visou estudar detalhadamente a morfologia do embrião de bubalinos, e estudar o desenvolvimento dos órgãos desta espécie.

Com isso, buscamos subsidiar dados que pudessem contribuir para o entendimento da biologia da reprodução bufalina no sentido de oferecer à área de biotecnologia parâmetros fundamentais à aplicação de técnicas inovadoras, necessárias à diminuição das taxas de mortalidade embrionária e fetal da espécie.

Além disso, mapeando as fontes de células germinativas, estas podem futuramente ser aplicadas aos diversos interesses relacionados à terapia celular bem como a outras pesquisas atinentes a origem e funções gonadais específicas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

Quanto às características reprodutivas os bubalinos são animais poliéstricos, recebendo de alguns autores a denominação de poliéstricos estacionais. Iniciam a puberdade em média aos 21 meses de idade, possuem um ciclo estral de aproximadamente 21 dias com duração de cio entre 17 e 24 horas (média 21 horas) (HAFEZ, 2004).

A ovulação ocorre de maneira espontânea em média 32 horas após o início das manifestações do cio e são liberados 1 oócito por ovulação. O corpo lúteo dos bubalinos permanece funcional por até 16 dias, no entanto a viabilidade do oócito dessa espécie em horas após a ovulação, bem como o tempo em horas da entrada do mesmo no útero, ainda são desconhecidos (HAFEZ, 2004).

A gestação dos bubalinos dura 315 dias (305-330), e a idade ao primeiro parto é em média 42 meses (36-56); após o parto a involução uterina nesses animais ocorre em 35 dias e a primeira ovulação leva cerca de 75 dias pós parto. O intervalo entre partos nas fêmeas bufalinas é de 18 meses (15-21) (HAFEZ, 2004).

Os búfalos possuem menor número de glândulas sudoríparas que os bovinos, possuem pele pigmentada e mais espessa o que não contribui para uma termorregulação eficiente, são mais suscetíveis à irradiação solar, a altas temperaturas e ao estresse térmico (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Ao estudar a fisiologia reprodutiva dos búfalos, Vale<sup>1</sup> et al. (1988, 1989 apud Grunert, Birgel e Vale, 2005). relataram que problemas de absorção embrionária e abortamento em búfalas estão relacionados ao manejo inadequado, principalmente no que se refere ao estresse térmico.

As diferenças reprodutivas entre bovinos e bubalinos (*Syncerus caffer* - búfalo africano e *Bubalus bubalis* – búfalo indiano) são refletidas mais obviamente nos diferentes tempos de gestação, sendo de 315 dias nos *B. Bubalis*, 280 dias no *B. taurus* e 343 dias no *S. caffer*. (KNECHTEL<sup>2</sup>, 1993 apud SCHMIDT, 2005).

---

<sup>1</sup>VALE, W. G. **Bubalinos**: fisiologia e patologia da reprodução. Campinas: Fundação Cargil, 1988.

<sup>1</sup>VALE, W. G. et al. Morte embrionária e fetal em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 13, n.3, p. 157, 1989.

<sup>2</sup>KENECHTE, C.; BRUNSTVERHALTEN. Kaffernbuffel (*Syncerus caffer caffer*).in Tierpark Berlin Friedrichsfelde. **Zool Gart.** v. 63, p. 32-58, 1993.

Os fatores morfológicos dos órgãos reprodutivos do grupo dos bovinos domésticos (*B. taurus* e *B. bubalis*) são similares (Abd-Elnacim, et al., 2003), no entanto no que se refere, por exemplo, a conteúdo de proteínas e imunoglobulinas (Ig) no colostro, as búfalas têm valores muito mais elevados que as vacas, o que promove as diferenças de susceptibilidade das espécies às infecções (SINGH, 1993).

As Ig(s) maternas não são transportadas entre as membranas da placenta de vacas e cabras e têm seu transporte limitado em búfalas (AHUJA<sup>3</sup>, 1988 apud SINGH, 1993).

Segundo Singh, (1993), as Ig(s) provenientes do colostro são absorvidas pelo intestino dos neonatos e sua natureza é similar as Ig(s) do plasma sanguíneo do bezerro antes de ingerir o colostro, o que confirma a absorção da mesma tanto pelo intestino quanto por transferência via placenta marginal.

Búfalos que são submetidos à sincronização de cio e IA durante um foto período de dias mais longos tem aumento relativamente maior nas ocorrências de mortalidade embrionária, isso pode ser associado à redução na secreção de progesterona, mas, fatores ainda desconhecidos do meio científico são responsáveis por 40 a 50% das perdas destes embriões (CAMPANILE et al., 2005). Segundo os autores, tais afirmativas induzem a elucidar os fatores que contribuem para a morte embrionária de búfalos.

### 3.1 Métodos de estimativa da idade embrionária

Evans e Sack (1973), descreveram um método eficaz para a determinação de idade gestacional dos embriões e fetos a partir da mensuração por meio de um paquímetro desde a região atlanto-occipital até a última vértebra sacral. Em seu estudo confeccionaram tabelas de crescimento embrionário e demonstraram por meio de esquemas as características macroscópicas mais importantes em cada fase, dentre as espécies estudadas encontram-se os bovinos, ovinos, roedores, cães, suínos, entre outros.

---

<sup>3</sup> AHUJA, S.P., 1987, 1988, unpublished data)

De acordo com os autores, embriões bovinos de 40 dias tem 5 cm de CR, os de 80 dias apresentam 10 cm e assim por diante em uma curva ascendente que termina nos valores de 280 dias e 95 cm.

Abdel-Raouf e El Nagar (1968) ao estudarem a biometria de úteros gravídicos de búfalas egípcias definiram duas diferentes fórmulas que consideraram eficaz para estimar a idade de fetos e embriões bubalinos, a primeira delas foi indicada para embriões com CR inferior a 20 cm e consiste em:  $Y=28,660+4,496x$ , onde Y é a idade em dias, e x o CR em cm; a segunda, indicada para maiores de 20 cm é:  $Y=73,544+2,256x$ . No entanto os autores iniciaram seus estudos em animais com idade superior a 30 dias.

De acordo com Assis Neto (2005) em seu estudo, embriões bovinos (*Bos taurus* x *Bos indicus*) de 15 a 20 dias de gestação apresentam  $0,71 \pm 0,17$  cm de CR, embriões de 20 a 30 dias de gestação possuem  $1,23 \pm 0,13$  cm, aqueles entre 30 e 40 dias demonstram  $1,90 \pm 0,27$  cm de CR; embriões com 40 a 50 dias de gestação têm em média  $2,79 \pm 0,19$  cm, enquanto que os de idade gestacional entre 50 a 60 dias, os quais o autor já considera fetos que apresentam cerca de  $3,76 \pm 0,52$  cm de CR.

### 3.2 Fecundação, clivagem e implantação

Os embriões dos vertebrados iniciam seu desenvolvimento de modo muito distinto, porém apesar das diferenças todos os embriões dos vertebrados desenvolvem estruturas surpreendentemente similares (NODEN, LAHUNTA, 1990).

Em humanos, a partir do dia da fecundação, uma série de eventos inicia-se para o desenvolvimento de uma nova vida. O procedimento denominado fertilização ocorre na ampola da tuba uterina e envolve a união do gameta masculino (espermatozóide) ao gameta feminino (oócito), resultando no zigoto (SADLER, 2005).

A fertilização se divide em três fases; a primeira delas consiste na penetração do espermatozóide na coroa radiada do oócito; a segunda trata da penetração do

mesmo na zona pelúcida, e, na terceira e última fase ocorre à fusão entre as membranas celulares do oócito e do espermatozóide (SADLER, 2005).

Após a introdução do gameta masculino, o mesmo se expande; uma nova divisão meiótica se inicia no oócito, e ambos os gametas geram os chamados pró-núcleos feminino e masculino, estes por sua vez replicam seus respectivos DNAs e, devido a semelhanças, entram em contanto íntimo perdendo ambos seus envoltórios nucleares (cariotecas) (SADLER, 2005).

No momento em que os pró-núcleos se unem cada par de cromossomos se separa e migra para um pólo oposto do zigoto fundindo-se a cromátide do outro par, provendo cada zigoto com o número diplóide normal de cromossomos; um sulco surge na superfície da célula no momento em que as cromátides irmãs estão migrando e divide o citoplasma em dois (SADLER, 2005).

A partir de então, se inicia a clivagem, onde várias divisões mitóticas ocorrem originando células menores em tamanho denominadas blastômeros. Até alcançar o número de oito células, o que ocorre na terceira clivagem, o aglomerado de células não é tão compacto, no entanto após a terceira clivagem o contato entre as células se torna mais intenso e estas se unem através de zônulas de oclusão num processo chamado compactação (SADLER, 2005).

Ao entrar na cavidade uterina, o embrião passa a se chamar blastocisto, isso ocorre devido à penetração de líquido nos espaços intercelulares da mórula, que se confluem e formam uma única cavidade de nome blastocele (HAFEZ, 2004, SADLER, 2005).

Nesta fase, a massa celular interna passa a se chamar embrioblasto e fica localizada no pólo oposto ao trofoblasto onde as células constituintes se achatam e formam a parede epitelial do blastocisto. Com o desaparecimento da zona pelúcida o processo de implantação inicia-se ainda na primeira semana do desenvolvimento embrionário (SADLER, 2005).

Winters, Green e Comstock (1942) avaliaram todo o desenvolvimento pré-natal de embriões bovinos com idade conhecida ou aproximada baseada em Crown-rump, em seguida fixaram o ovo ou blastocisto em Bouin e coraram em HE. Nos embriões, o âmnion não foi removido daqueles com idade inferior a 20 dias e os autores realizaram secções de 10 a 15µm, aqueles com mais de 230 dias foram imersos em água para documentação fotográfica e foi realizado procedimento de raio X nos mesmos.

Em seus estudos, os autores dividem a fase pré-natal dos bovinos em três distintas e que recebem o nome de ovo, embriônica e fetal de acordo com características marcantes de cada fase com comprimento, volume e peso, aparência e desenvolvimento de órgãos e tecidos (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

A fase de ovo consiste no momento da fecundação até o estágio de 10 a 12 dias de gestação, em bovinos nessa fase foram observadas a divisão em blastômeros, onde com 2 dias e 12 horas encontraram 2 células, com mais 2 horas, 6 células e 8 células após mais duas horas de gestação. Com 4 dias e 14 horas de gestação o ovo já possuía 16 células, e após 24 horas já possuía 32 células (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

### 3.3 Sobre as células germinativas primordiais

Os gametas derivam das células germinativas primordiais, formadas no epiblasto, na segunda semana de desenvolvimento do embrião. Estas células primordiais se movem para a parede do saco vitelino e, posteriormente, para as gônadas ao final da quinta semana de vida do embrião. As células primordiais passam para fase de gametas pelo processo denominado gametogênese, e finalizam sua maturação com a citodiferenciação (SADLER, 2005).

De acordo com Lawson e Pederson<sup>4</sup>, (1992 apud POTTEN, 1997) as células germinativas primordiais (PGCs) que dão origem à linhagem de células germinativas derivam de uma pequena população de células do epiblasto (ectoderma embrionário), localizadas em um estágio anterior ao das células cilíndricas da gastrulação.

Cerca de sete dias após o coito, os embriões de camundongos possuem 100 diferentes reações positivas a fosfatase alcalina de PCGs detectadas no mesoderma extraembrionário posterior no estágio de linha primitiva (GINSBERG, et al<sup>5</sup>, 1990 apud POTTEN, 1997). Mais tarde as PCGs migram para a base do alantóide e finalmente chegam à porção genital dividindo-se durante a migração e chegando ao

---

<sup>4</sup> LAWSON, K. A.; PEDERSON, R. A. In CIBA foundation symposium 165 **Post Implantation Development in the Mouse**, New York: John Wiley & Sons, 1992.v. 165, p. 3-26.

<sup>5</sup>GINSBURG, M.; et al. **Development**. 1990.v.110, p. 521-528.

<sup>6</sup> TAM, P.; SNOW, M. H. L. **J. Embryol. Exp. Morphol.** v. 64, p.133-147, 1981.

total de 10000 em cada gônada de camundongos de 13 dias (TAM; SNOW<sup>6</sup>, 1981 apud POTTEN, 1997).

As células embrionárias germinativas são células únicas, que em boas condições de cultivo formam colônias de células tronco embrionárias (ES) indiferenciadas, essas podem manter seu estágio indiferenciado por períodos amplos de tempo e proporcionar a multiplicação do fenótipo do embrião em culturas de monocamada ou em tumores (TAM; SNOW<sup>6</sup>, 1981 apud POTTEN, 1997).

### 3.4 Marcadores de pluripotencialidade

Segundo Vejsted (2006), em pesquisas envolvendo células tronco, o OCT-4 é o mais utilizado como marcador de pluripotencialidade da célula, e em camundongos e suínos esse marcador se restringe a linhagem germinativa de células primordiais, a vimentina, também é utilizada como marcador para células de mesoderma e mesenquimais, e nos bovinos localiza as mesmas células germinativas, porém no epiblasto.

Oct-4 é um membro da família POU (Pict-Oct-Unc) de fatores de transcrição que promovem a mediação da regulação transcripcional de genes marcados por bandas de um octâmero de seqüências reconhecidas com promotores de regiões fortes (KUROSAKA; ECKARDT; MCLAUGHLIN, 2004).

Camundongos Oct-4, codificados pelo gene *Pou5fl*, desenvolvem papel importante no estabelecimento e manutenção de uma população de células pluripotentes no desenvolvimento de embriões de camundongo. O marcador Oct-4 é expresso em células pluripotentes como nos blastômeros em estágio de clivagem, na massa celular interna do blastocisto, no epiblasto do embrião jovem pós implantação, e nas células tronco embrionárias (KUROSAKA; ECKARDT; MCLAUGHLIN, 2004).

A diferenciação trofodectodermal está correlacionada com a regulação de Oct4 e aumenta e diminui os níveis de expressão de Oct-4 resultando na diferenciação das células tronco em endoderma primitivo e trofoectoderma, respectivamente (KUROSAKA; ECKARDT; MCLAUGHLIN, 2004).

A expressão de Oct-4 é considerada chave marcadora para identificação de células pluripotentes no camundongo e potencialmente em outras espécies de mamíferos. Devido ao ortólogo do Oct-4 ter alta homologia as duas seqüências de proteínas e regiões de regulação, as PGCs vêm sendo identificadas em inúmeras espécies de mamíferos (KUROSAKA; ECKARDT; MCLAUGHLIN, 2004).

Em camundongos, humanos e bovinos os ortólogos são fortemente conservados nas regiões de regulação dos genes, sugerindo a conservação e expressão paterna (KUROSAKA; ECKARDT; MCLAUGHLIN, 2004).

As células pluripotentes podem proliferar-se indefinidamente *in vitro* sem se diferenciar, mas também podem diferenciar-se em inúmeras linhagens celulares se as condições de cultivo das células forem modificadas. Um exemplo dessas células são tipicamente as células tronco embrionárias. Recentemente várias evidências indicam que algumas células tronco adultas também possuem esta propriedade (MOREIRA et al., 2007).

Diante de novas promessas de terapias celulares que podem promover o tratamento de doenças genéticas, novas pesquisas tiveram início em inúmeras espécies com a finalidade de responder a questões práticas de sua aplicabilidade.

Sritanaudomchai et al. (2007) relataram pela primeira vez o isolamento e a descrição detalhada da utilização e caracterização de células tronco germinativas partenogenéticas (PGEs) de búfalo *in vitro* e *in vivo* e afirmaram ainda que células tronco derivadas dos embriões humanos partenogenéticos poderiam aliviar alguns problemas éticos sobre a pesquisa de células tronco germinativas e embrionárias.

Weismann (1885) classificava as linhagens celulares, identificando substâncias determinantes que são transmitidas de geração em geração na forma de linhagens celulares. Esse programa de desenvolvimento das linhagens celulares germinativas envolve diferenciação de dois tipos de células especializadas: espermatozoides e oócitos, a fusão destes dois é a subsequente regeneração das células germinativas (YEOM et al., 1996). Tais células são precursoras facilmente reorganizadas nos gametas de camundongos; durante a gastrulação as células progenitoras germinativa (PCGs) agrupam-se em 100 células, dentro da linha média do mesoderma extra-embrionário (GINSBURG; SNOW; McLAREN, 1990).

O molde único de expressão do OCT-4 em embriões de camundongo direciona para a hipótese do “ciclo totipotente” (PESCE; GROSS; SCHÖLER, 1998). De acordo com a classificação, as células OCT-4 perdidas durante o desenvolvimento



de diferenciação embrionário em linhagens somáticas a qual mantêm expressão de OCT-4 retém a totipotencialidade celular e apresentam competência no desenvolvimento de células germinativas (PESCE; SCHÖLER, 2001).

As células pluripotentes aparecem transientes no jovem embrião e têm a capacidade de representar a progênie de todas as três camadas embrionárias germinativas. Sob determinadas circunstâncias, estas células pluripotentes podem ser adaptadas na cultura *in vitro* como linhagens de células tronco (ES), as quais são propagado indefinidamente e mantêm-se em estado indiferenciado. As células ES são rotineiramente da MCI do blastocisto pré-implantado. Estas células são imortais e pluripotentes, isto é, são capazes de se proliferar indefinidamente e de diferenciar-se em uma variedade ampla de tipos celulares tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CALL. et al., 2000; BUTTERY et al., 2001). Células tronco de animais de produção servem de modelo para aplicação da medicina regenerativa.

As linhagens estáveis de células tronco embrionárias foram estabelecidas em diversas espécies incluindo camundongos (EVANS; KAUFFMAN, 1981; MARTIN, 1981), hamster (DOETSCHMAN et al., 1988), vison (Sukoyan et al., 1993), porcos (WHEELER, 1994), macacos rhesus (THOMSON et al., 1995), galinha (PAIN et al., 1996), marmoset (THOMSON et al., 1996), seres humanos (THOMSON et al., 1998), bovinos (MITALIPOVA et al., 2001), e equinos (SAITO et al., 2002). Há atualmente dois tipos de embriões usados como uma fonte de células tronco embrionárias para sua derivação: embriões em estágio pré-compactados e blastocistos do estágio produzidos *in vivo* ou em fertilização *in vitro* (FIV) e em embriões partenogênicos (PG) (CIBELLI et al., 2002; MITALIPOVA et al., 2001; NAKATSUJI, SUEMORI, 2002; THOMSON et al., 1996). O uso de embriões humanos na extração de células tronco (ES) é associado a interesses bioéticos. Entretanto, há utilização de embriões partenogênicos produzidos pode circundar este problema. As células tronco de embriões partenogênicos (PGES) podem ser utilizadas sem destruir um embrião viável, uma vez que, os sinais partenogênicos limitam o potencial de desenvolvimento *in vivo* (BOEDIONO et al., 1991). Durante o desenvolvimento partenogênico do embrião do camundongo, as conseqüências dramáticas de imprinting genômica foram demonstradas claramente tendo por resultado a falha a termo do produto e limitando a capacidade das células com genótipo uniparental em participar do desenvolvimento de quimeras (SURANI et al., 1990). Considerando o teste padrão dinâmico de mudanças epigenéticas, durante o desenvolvimento

adiantado, é de interesse particular examinar a estabilidade de imprinting em células ES. As propriedades de imprints parental poderiam ser examinadas comparando as células tronco derivadas de partenogênese e dos blastocistos normais (ALLEN et al., 1994; ZVETKOVA et al., 2005).

Em camundongos, humanos e bovinos, os ortólogos são fortemente conservados nas regiões de regulação dos genes, sugerindo a conservação da expressão paterna (KUROSAKA, ECKARDT, MCLAUGHLIN, 2004; NORDHOFF, et al., 2001;).

Apesar da organização genômica altamente conservada e das regiões reguladores de Oct-4 no gene de camundongos e seus ortólogos bovinos (outras espécies com proteína de mesmo genoma que a do camundongo específico), o Oct-4 bovino não é restrito à massa celular interna do blastocisto, sugerindo que o mesmo não pode ser um regulador chave da pluripotencialidade nessa espécie (KUROSAKA; ECKARDT; MCLAUGHLIN, 2004).

Analisando a distribuição temporal e espacial da transcrição de Oct-4 em oócitos dos bovinos e em embriões do estágio de pré implantação, foi verificado que a distribuição desta proteína é a mesma em ambas as espécies, camundongo e bovino (KUROSAKA; ECKARDT; MCLAUGHLIN, 2004).

O transcrito Oct-4 está expresso em baixos níveis nos oócitos dos bovinos. Assim como nos camundongos, a etapa de transcrição de Oct-4 nos bovinos começa um a dois ciclos celulares após a ativação zigótica do genoma, seguida por um aumento na transcrição subsequente a compactação (KUROSAKA; ECKARDT; MCLAUGHLIN, 2004).

A transcrição do está expressa em todas as células dos embriões no estágio de mórula; entretanto, em blastocistos dos Bovinos do dia 7, o sinal não é visível no trofotoderma perto da hibridação *in situ*, indicando que a regulação do transcrito de Oct-4 no estágio de diferenciação é similar àquele observado no camundongo e nos outros mamíferos. Estes resultados indicam que a distribuição da proteína que ocorre durante a transcrição e a regulação da transcrição de Oct-4 é semelhante entre as espécies dos mamíferos (KUROSAKA; ECKARDT; MCLAUGHLIN, 2004).

Os níveis de Oct-4 em blastocistos humanos são muito mais elevados na MCI comparada ao TE (HANSIS; GRIFO; KREY, 2000). As ES humanas e as células embrionárias do carcinoma (EC) expressam Oct-4 (REUBINOFF et al., 2000) e são reguladas por Oct-4 no estágio de diferenciação. A distribuição da proteína Oct-4 na

parede dos embriões no estágio de pré implantação do macaco são semelhantes as que observaram no camundongo, incluindo a regulação de Oct-4 no TE dos blastocistos de expansão (MITALIPOV et al., 2003).

O ortólogo dos bovinos Oct-4 é homólogo em níveis de proteína Oct-4 expressa em relação a seres humanos e camundongos, 90.6% e 81.7% respectivamente (NORDHOFF et al., 2001).

Em contrapartida, a conservação observada por Kurosaka, Eckardt e Mclaughlin (2004) na seqüência genômica e nas regiões reguladoras da proteína dos bovinos Oct-4, não é restringida aparentemente às células embrionárias pluripotentes nos estágios de pré-implantação.

A proteína Oct-4 dos bovinos está presente na MCI e no TE dos blastocistos nos estágios de contato e pós contato com a parede do útero assim como em todas as células em estágios subseqüentes aos de blastocisto no 13º dia (KIRCHHOF, et al., 2000; VAN EIJK et al., 1999).

Achados similares para Oct-4 suínos foram encontrados, esses também aparecem no TE do blastocisto expandido dessa espécie, fato esse que coloca em duvida se a função do Oct-4 é preservada em todas as espécies de mamíferos (KIRCHHOF et al., 2000).

Para Kurosaka, Eckardt e Mclaughlin (2004) não se sabe até que ponto a discrepância na distribuição da proteína entre embriões do estágio de pré implantação de diversas espécies está correlacionada com a regulação transcricional. Os autores examinaram a distribuição da transcrição de Oct-4 em embriões pré-implantados de bovinos para determinar até que ponto à regulação de genes de embriões bovinos em se tratando da transcrição de Oct-4 é homóloga a outros mamíferos.

Kurosaka, Eckardt e Mclaughlin (2004) afirmam que o fator de transcrição de Oct-4 é essencial para o controle do desenvolvimento da linhagem precoce no camundongo e é requerido em níveis críticos para a renovação da ES. No camundongo e, aparentemente, em outros mamíferos, incluindo o ser humano e o macaco, a expressão Oct-4 é restringida às populações pluripotentes da célula *in vivo* e *in vitro*, e a regulação de Oct-4 precede a diferenciação e a perda da totipotencialidade da célula embrionária. O Oct-4 bovino compartilha do fato de ser homólogo ao seu ortólogo murino, mas os produtos protéicos nos bovinos são encontrados em níveis similares em células pluripotentes e em células em estágio de

diferenciação do embrião pré-implantado. Conseqüentemente, Oct-4 não foi considerado aplicável como um marcador identificador de populações pluripotentes da célula nos bovinos.

Segundo o estudo de Kurosaka, Eckardt e Mclaughlin (2004) diferentemente da maneira de distribuição das proteínas, a expressão transcricional de Oct-4 em testes padrão é muito similar em embriões em estágio de pré-implantação do camundongo e dos bovinos. Nos bovinos o mRNA do Oct-4 é regulado no TE do blastocisto, confirmando que assim como com outros mamíferos, o transcrito dos bovinos Oct-4 é exclusivo das linhagens pluripotentes embrionárias. Durante o desenvolvimento e pré-implantação, a distribuição do transcrito Oct-4 em embriões dos bovinos é muito similar àquela no camundongo.

Em ambas as espécies, o início da expressão embrionária do mRNA Oct-4 ocorre um ou dois ciclos celulares após a ativação genômica (células germinativas, no estágio de 8 células em camundongos e no estágio 16 células nos bovinos. Além disso, os níveis de transcrição aumentam significativamente subseqüentes a compactação. Os blastocistos dos camundongos e dos bovinos expressam Oct-4 no mRNA da MCI visto que a transcrição de Oct-4 é regulada no TE (KUROSAKA; ECKARDT; MCLAUGHLIN, 2004).

Conseqüentemente, a regulação da transcrição é conservada espacialmente e ao longo do desenvolvimento embrionário, que é consistente com a similaridade elevada das regiões reguladoras do Oct-4 do camundongo e os genes dos bovinos. Contraditório às análises precedentes por RT-PCR (DANIELS, HALL, TROUNSON, 2000; VAN EIJK et al., 1999), o transcrito do Oct-4 não está em embriões no estágio de clivagem, e sim até o estágio de mórula na pré-compactação, como confirmam a hibridização *in situ*.

As análises precedentes da transcrição Oct-4 por RT-PCR relataram a presença do transcrito de Oct-4 nos bovinos em todos os estágios do desenvolvimento de pré-implantação ((DANIELS, HALL, TROUNSON, 2000; VAN EIJK et al., 1999), com níveis elevados no oócito e no blastocisto e níveis baixos nos estágios adiantados de clivagem (DANIELS, HALL, TROUNSON, 2000). Os resultados da hibridização *in situ* e do RT-PCR de Kurosaka et al. (2007) indicam que o transcrito maternal no oócito é muito menos abundante do que o transcrito embrionário na mórula densa e no blastocisto.

Os achados recentes indicam que os níveis de transcrição de Oct-4 em oócitos dos bovinos são mais elevados do que em estágios adiantados de clivagem, mas são 20% mais baixos do que nos blastocistos (VIGNEAULT et al., 2004).

No estudo de Kurosaka, Eckardt e Mclaughlin (2004) os níveis do transcritor em 40 oócitos/embriões em cada estágio foram analisados por PCR real-time, e os resultados de oócitos/embriões individuais são os mesmos descritos por Vigneault et al (2004).

Apesar da similaridade elevada na distribuição do transcritor, a distribuição da proteína Oct-4 é claramente heterogênea entre as espécies dos mamíferos. Visto que a proteína Oct-4 é ausente do TE do blastocisto expandido do camundongo e do macaco, e encontra-se em células da MCI e do TE do blastocisto dos bovinos nos estágios adiantados e expandidos (KIRCHHOF, et al., 2000; VAN EIJK et al., 1999).

Para Kurosaka, Eckardt e Mclaughlin, (2004), o transcritor Oct-4 é regulado no TE do blastocisto dos bovinos a partir do dia 7, a proteína Oct-4 detectada no TE em estágios mais atrasados deve ter sido produzida antes do estágio do blastocisto e, deve conseqüentemente ser estável por diversos dias. Assim, embora ocorra uma falha de trofotoderma em um nível da transcrição, o afastamento da proteína parece ser tardio. Isto, porém em escala bem menor, é observado também no camundongo.

Subseqüente a regulação transcricional de Oct-4 no TE do blastocisto, as quantidades substanciais de proteína remanescentes no TE e o afastamento não são observados até o estágio expandido do blastocisto (KIRCHHOF et al., 2000; PALMIERI et al., 1994).

De acordo com Kurosaka, Eckardt e Mclaughlin (2004) a disparidade entre o término da transcrição e a presença da proteína indica que a proteína Oct-4 é mais estável ou não está eliminada ativamente no TE dos embriões dos bovinos subseqüentes ao estágio do blastocisto.

Os autores ainda ressaltam que a persistência da proteína Oct-4 no TE de bovinos comparados ao camundongo poderia ser atribuída às diferenças na função trofotodermal das espécies. A implantação nos bovinos é tardia em comparação a do camundongo, e os blastocistos expandem e alongam antes da implantação, com ploriferação extensiva do TE.

O Oct-4 nos bovinos age como um repressor de genes TE - específicos, tais como o interferon-tau, e são implicados como reguladores da diferenciação

trofotodermal (EZASHI; GHOSH; ROBERTS, 2001). A proteína Oct-4 mantida no TE pode suprimir a expressão de genes linhagem-específicos extra-embrionárias durante o desenvolvimento da pré-implantação e permitir a proliferação extensiva do TE antes da implantação.

Estabelecer o uso do Oct-4 como um marcador para populações pluripotentes da célula, tem aplicabilidade na clonagem animal de células tronco em espécies domésticas. A distribuição aberrante dos níveis espaciais do transcrito Oct-4 são observados na maioria dos clones de camundongo provenientes de blastocistos e de blastocisto em expansão, e as linhagens das células tronco podem ser estabelecidas por meio de níveis elevados da expressão Oct-4 nos blastocistos clonados (BIOANI et al., 2002). Conseqüentemente, examinar o teste padrão da expressão do transcrito Oct-4 em clones bovinos pode ser um meio eficaz para avaliar a reprogramação nuclear em transferência nuclear. Devido às anormalidades na placenta serem observadas freqüentemente em animais clonados, a análise da expressão de Oct-4 em relação a sua interação no padrão das proteínas, particularmente, aquelas envolvidas na diferenciação de linhagens extra-embrionárias, pode fornecer informações importantes a respeito das anormalidades nos clones de células somáticas (KUROSAKA; ECKARDT; MCLAUGHLIN, 2004).

Sritanaudomchai et al. (2007), relataram o estabelecimento de linhagem de células tronco partenogenéticas de blastocisto de búfalo. Suas análises subseqüentes confirmaram que essas células possuem as propriedades chave das células tronco. As células PGES do búfalo assemelham-se morfológicamente a células tronco dos primatas (THOMSON et al., 1995), e mostram a capacidade indefinida de proliferação *in vitro*, ao manter seu potencial e diferenciar-se em derivações de todas as três camadas germinativas embrionárias (maior que 12 meses). As células tronco do camundongo e do cavalo crescem como colônias de camadas múltiplas com uma margem distinta e altamente nuclear à relação citoplasma (EVANS E KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981; SAITO et al., 2002). As células do búfalo PGES indicaram também uma relação elevada de núcleo/citoplasma, mas cresceram como uma colônia da monocamada similar àquela relatada para bovinos, macacos, e células tronco humanas (MITALIPOVA et al., 2001; REUBINOFF et al., 2000; THOMSON et al., 1995).

A atividade elevada da telomerase é correlacionada freqüentemente com a capacidade de replicação e expressa tipicamente em células germinativas, em

células cancerígenas, e em variedade de células tronco, mas ausente na maioria das células somáticas (AMIT et al., 2000; ARMSTRONG et al., 2004; KIM, HRUSZKEWYCZ, 2001;). As células PGES do búfalo indiferenciadas expressaram a atividade da telomerase consistente com sua propriedade indefinida. As PGES bubalinas expressam muito fracamente SSEA-1, um marcador de indiferenciação de células tronco do camundongo, mas indicador de ES diferenciadas de primatas (EVANS, KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981; THOMSON et al., 1995). Similar às células tronco do primata, células PGES do búfalo expressaram fortemente os epítomos SSEA-4 e TRA-1-81, mas não expressaram SSEA-3 (CIBELLI et al., 2002).

Oct-4 é um específico fator de transcrição para células pluripotentes do camundongo, macaco, e embriões humanos assim como para ES e células germinativas primordiais (BOIANI et al., 2002; CAUFFMAN et al., 2005; EVANS, KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981; MITALIPOV et al., 2003; PESCE, SCHOIER, 2001; REUBINOFF et al., 2000; THOMSON et al., 1995; TURNPENNY et al., 2003;). Nos blastocistos de suínos e bovinos a expressão da proteína Oct-4 não é restringida as linhagens pluripotentes, mas é detectada na MCI e no trofotoderma de blastocistos inteiramente expandidos de 8 dias (KIRCHHOF et al., 2000). Entretanto, o relatos recente de hibridização *in situ* demonstraram que a transcrição Oct-4 está restringido a MCI, indicando que a distribuição da proteína, em testes padrões da expressão do Oct-4 mRNA é similar àquela observada no camundongo e em outros mamíferos (KUROSAKA et al., 2004).

Sritanaudomchai et al. (2007) demonstraram que a expressão de Oct-4 é fortemente indiferenciada dentro células PGES bubalinas por imunohistoquímica e por RT-PCR.

Similar ao camundongo, ao macaco, ao ser humano e bovinos (EVANS, KAUFMAN, 1981; THOMSON et al., 1995, 1998; MITALIPOVA et al., 2001), as PGES de búfalos deram forma facilmente a corpos embrióides na cultura da suspensão. Corpos embrióides são tipicamente o material inicial de protocolos de diferenciação em tecido neuronal (SAITO et al., 2002), cartilagem, osteoblasto (METSARANTA et al., 1991; HEGERT et al., 2002), músculo (CSERJESI et al., 1995), ou progenitores de endoderma (HORI et al., 2002; OHNEDA et al., 2001).

Sritanaudomchai et al. (2007) relataram pela primeira vez o isolamento e a descrição detalhada da utilização e caracterização de células PGES de búfalo *in vitro* e *in vivo*. Os pesquisadores identificaram derivações de todas as três camadas

germinativas embrionárias nos corpos embrióides de células derivadas das PGES de búfalos. Mais ainda, a diferenciação dirigida para condrócitos *in vitro* foi evidente quando aplicados os protocolos previamente desenvolvidos para o mesmo.

A potencialidade de diferenciação *in vivo* seguida de injeção em um blastocisto receptor ou em camundongos nude foi utilizada como indicador de propriedades pluripotentes das células tronco (BRADLEY et al., 1984). No estudo de Sritanaudomchai et al. (2007) os autores investigaram o potencial de desenvolvimento de células PGES bubalinas *in vivo* pela injeção em camundongos nude. A grande maioria dos camundongos injetados deu forma a teratomas, com diferenciação em estruturas ganglionares (ectoderma), em músculo, em cartilagem (mesoderma), na glândula adrenal e em estruturas glandulares (endoderma) sugerindo natureza pluripotente.

Segundo os autores supracitados as células tronco derivadas dos embriões humanos partenogênicos poderiam aliviar alguns problemas éticos sobre a pesquisa de células tronco germinativas e embrionárias. Além disso, as células de PGES bubalinas fornecem um artigo de valor no modelo *in vitro* do efeito do imprinting na diferenciação celular. Estas células expressam os marcadores chaves para células ES capazes de diferenciar-se *in vitro* e *in vivo* em inúmeras variedades de tipos celulares.

Kurschstein e Skirboll (2001) comparando diferentes marcadores celulares para células tronco pluripotentes, declarou que as células tronco embrionárias (ES), células embrionárias de carcinoma (EC) e células germinativas embrionárias (EG) apresentaram-se positivas para Oct-4, enquanto que para humanos apenas as ES e EC mostraram imunopositividade ao Oct-4, e as EG humanas apresentaram resultados inconclusivos.

São muitas as oportunidades de estudo, em diversos campos da ciência, envolvendo a temática da biologia do desenvolvimento e o uso das células chamadas tronco. No entanto, não só o Brasil, como inúmeros outros países, enfrentam a dura batalha dos dogmas éticos e religiosos que travam as pesquisas em embriões humanos.

O grande leque fica, portanto por conta do uso de modelos experimentais animais que mimetizam doenças humanas conhecidas, seja por aspectos clínicos, ou alterações genéticas.



No entanto, para que um modelo experimental tenha sua aplicabilidade em humanos é necessário que o mesmo tenha semelhanças com o mesmo para que o uso de técnicas como os marcadores celulares tenha sucesso.

A ciência progrediu satisfatoriamente, em se tratando das pesquisas com as denominadas células tronco adultas, porém, a maior das riquezas sabe-se que se encontra nas células pluripotentes de origem embrionária.

Um segundo passo após a verificação da pluripotencialidade celular é a realização de seu cultivo, um teste que confirma a veracidade da capacidade celular em questão é a injeção dessas células em camundongos nude, a partir dessa injeção a origem teratomas, a biópsia dos mesmos e um exame histopatológico confirmam a formação de diversas colônias de diferentes tipos celulares, tais como cartilagem, tecido neuronal, músculo, tecido ósseo, entre outros derivados de endoderma. Mediante esses fatos confirma-se a pluripotencialidade celular.

Mais um teste utilizando embriões partenogênicos pode ser realizado, inclusive em embriões humanos já que a partenogênese inviabiliza o embrião, pode auxiliar no entendimento do desenvolvimento de estudos como os da clonagem, e mais uma vez, os animais como modelos experimentais, principalmente os de produção, assumem um papel importante no entendimento da ciência.

Diante do exposto nessa sucinta revisão bibliográfica podemos concluir brevemente que o marcador Oct4 é aplicável aos ruminantes de grande porte, mais recentemente aos búfalos, indicando a pluripotencialidade de células de embriões dessas espécies, portanto, estudos que se utilizam desse marcador como meio de confirmação da presença de células pluripotentes são verídicos e com embasamento científico comprovado.

### 3.5 Disco Germinativo Bilaminar

No oitavo dia as células do embrioblasto se diferenciam em duas camadas, a primeira (hipoblasto) com pequenas células cubóides adjacentes a cavidade do blastocisto, e a segunda (epiblasto), com células colunares altas adjacentes a cavidade amniótica. As duas camadas formam um disco achatado, e, no epiblasto

começa a se formar uma pequena cavidade que se expande tornando-se a cavidade amniótica (SADLER, 2005).

O crescimento do concepto bovino é surpreendente, ele passa de uma forma esférica de 3 mm no 13<sup>o</sup> dia de gestação para uma forma filamentosa de 25 cm no dia 17 (HAFEZ, 2004).

Com 7 dias e 14 horas a blástula se formou nos bovinos, há grande dificuldade de seccioná-las e corá-las; vinte e quatro horas depois a zona pelúcida ainda não estava presente. Aos 9 dias e 19 horas é visível o disco germinativo, e aos 10 dias e 15 horas já se considera o blastocisto como tardio, aos 11 dias e 20 horas por meio de lavagem uterina o blastocisto recuperado já se encontra em início de implantação na parede uterina (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

Os mesmos pesquisadores fazem ainda uma comparação destes estágios de blastocisto tardio com os de ovelha com mesma idade, no entanto os de ovelha encontram-se em fase mais avançada, cerca de um a dois dias em relação aos bovinos (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

No nono dia o blastocisto humano já está mais incrustado no epitélio superficial devido à nidação, e, no pólo embrionário células achatadas formam uma membrana denominada exocelômica, que reveste a superfície interna do citotrofoblasto que, junto com o hipoblasto, forma o saco vitelino primitivo (SADLER, 2005).

Nos dias 11 e 12 que se seguem, poucos são os eventos decorrentes no embrião humano propriamente dito, as células do endométrio tornam-se repletas de glicogênio e lipídeos e os espaços intercelulares ficam cheios de líquido, primeiramente apenas no local de implantação, e em seguida expandindo-se por todo o endométrio (SADLER, 2005).

Aos 12 dias e 15 horas, em embriões bovinos, o córion em seu estágio inicial de alongamento mede 4,1 x 1,65 mm e o embrião provavelmente perde sua área de implantação ao ser lavado do útero com solução salina. O próximo estágio compreende 13 dias e 14 horas, o córion apresenta 8mm de comprimento e o disco germinativo 0,398mm x 0,214mm, com o córion muito frágil e que não pode ser removido intacto, a área do disco germinativo encontra-se completamente elevada da superfície e células não trofoblásticas recobrem a área; o endoderma está completamente alinhado ao trofoblasto (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

A terceira semana de desenvolvimento tem como evento marcante a gastrulação, onde se estabelecem os folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma) (SADLER, 2005).

O início da gastrulação se dá com a formação da linha primitiva na superfície do epiblasto, e na sua extremidade cefálica surge o nó primitivo. Deduz-se, portanto que o epiblasto é responsável pela origem de todos os folhetos germinativos e que as células de cada um destes folhetos dará origem a todos os órgãos e tecidos do embrião (SADLER, 2005).

A linha primitiva já se encontra bem definida em embriões humanos de 15 e 16 dias, e à medida que mais e mais células se movem e se espalham, lateral e cefalicamente, à margem do embrião formam-se estruturas como a placa pré-cordal (SADLER, 2005).

A placa pré-cordal, formada entre a extremidade do notocórdio e da membrana bucofaringea, consiste em uma pequena região de células ectodérmicas e endodérmicas que futuramente serão a cavidade oral. O notocórdio definitivo, que será à base do esqueleto axial, se origina de células da placa notocordal que se destacam do endoderma (SADLER, 2005).

A membrana cloacal é formada na extremidade caudal do disco embrionário por células do ectoderma e do endoderma bem aderidas que quando aparecem, fazem com que a parede posterior do saco vitelino forme um divertículo chamado alantóide, onde são depositados produtos de excreção do sistema urinário em alguns vertebrados inferiores (SADLER, 2005).

O estabelecimento dos eixos corporais também se dá antes ou durante a gastrulação, o chamado anteroposterior em humanos, forma-se por células da margem anterior cranial do disco embrionário, chamado endoderma visceral anterior (EVA) que expressa genes essenciais para a formação da cabeça (SADLER, 2005).

Após a formação da linha primitiva, forma-se também o mesoderma dorsal e ventral e as estruturas da cauda e da cabeça. A proteína morfogenética óssea-4 junto aos fatores de crescimento de fibroblastos promove a ventralização do mesoderma e formação dos rins, sangue e mesoderma lateral (SADLER, 2005).

Uma série de outros genes interage acionando ou inibindo o crescimento, ventralização ou dorsalização do mesoderma; a expressão excessiva ou insuficiente de qualquer um deles acarreta em más formações graves principalmente da região cefálica (SADLER, 2005).

A regulação do mesoderma dorsal, médio e caudal é comandada por outra proteína, o gene *Brachyury*. E a lateralidade esquerda e direita também é controlada pelo FGF – 8, *Lefty* – 2, PITX2 e outras inúmeras proteínas. No entanto aqueles que regulam o desenvolvimento do lado direito ainda não foram tão bem definidos e o motivo pelo qual o desenvolvimento se inicia pelo lado esquerdo também continua sendo uma incógnita (SADLER, 2005).

O disco embrionário durante o crescimento torna-se bem alongado, desenvolve uma extremidade cefálica cada vez mais larga e a caudal estreita. O crescimento da região cefálica ocorre pela grande migração de células continua da linha primitiva em sua direção, o que ocorre até a quarta semana, quando então, a linha diminui de tamanho até desaparecer (SADLER, 2005).

O embrião se desenvolve no sentido craniocaudal. Enquanto na terceira semana as estruturas cefálicas já estão se diferenciando, somente ao final da quarta semana se inicia a diferenciação na parte caudal (SADLER, 2005).

Em bovinos, no 18º dia de gestação já se verifica a presença da linha primitiva e formação completa do âmnion, no 19º dia ocorre o dobramento neural e o surgimento dos primeiros somitos (EVANS, SACK, 1973).

No embrião bovino com 14 dias e 14 horas já há córion preenchendo, dois terços do corno uterino gestante, o mesoderma em formação pode ser visualizado não somente em fotografia, se estende por toda a metade em volta do tecido extra embrionário e divide-se em paredes mesodermais associadas ao trofoectoderma e endoderma formando a somatopleura, esplancnopleura e celoma extra embrionários, a área do disco germinativo neste estágio já se encontra muito bem definido (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

Os pesquisadores encontraram em embriões com 16 dias e 14 horas o córion preenchendo por dois terços da extensão total do corno uterino gestante. O próximo com 17 dias e 14 horas não difere muito dos dois últimos anteriores, ambos, embrião e córion encontram-se em crescimento e o último tomando toda a extensão do corno gestante (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

Em embriões bovinos com 18 dias e 19 horas a placa de ectoderma é visível assim como as placas neurais e o tubo neural, os autores não encontraram nenhum somito nessa idade, nessa espécie, aos 19 dias e 14 horas o córion já inicia sua invasão ao corno não gestante; uma diferenciação em estágio adiantado da região neural ocorre nos embriões com 19 dias e 19 horas, onde as placas neurais e o

folheto ectodermal encontram-se mais desenvolvidos na região cefálica além disso as placas neurais estão unidas e próximas a região média do embrião, nessa idade já podemos visualizar 5 pares de somitos, o que leva os autores a afirmação de que mesmo embriões com idades semelhantes apresentam características de desenvolvimento diferentes, e ainda afirmam que o desenvolvimento e aparecimento dos somitos ocorre de maneira extremamente veloz, fato confirmado pela presença dos mesmos apenas 5 horas após não haver nenhum par (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

Em embriões bovinos com 20 dias e 14 horas já constam 8 pares de somitos, as placas neurais da futura região do cérebro são muito distintas e o sinus rhomboidalis é visualizado; a notocorda também encontra-se bem desenvolvida nessa idade (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

### 3.6 Disco Germinativo Trilaminar

O período que segue da terceira a oitava semanas, ou seja, do 21º ao 56º dia de desenvolvimento, é chamado período embrionário ou de organogênese. Neste período os folhetos germinativos dão origem a seus próprios tecidos, órgãos e sistemas (SADLER, 2005).

O ectoderma origina sistema nervoso central e periférico, os epitélios sensoriais da orelha interna, nariz e olho; a pele, cabelo e unhas, e ainda hipófise, glândula mamária, sudorípara e o esmalte dos dentes (SADLER, 2005).

O mesoderma paraxial forma os somitômeros, e esses originam o mesênquima da cabeça se organizando em somitos, e esses em segmentos occipitais e caudais; dos somitos serão formados o miótomo (tecido muscular), o esclerótomo (tecido cartilágneo e ósseo) e o dermatomo (tecido subcutâneo), cada somito recebe sinais do notocórdio, tubo neural e epiderme para se diferenciar (SADLER, 2005).

O mesoderma também origina o coração, artérias, veias, vasos linfáticos, todas as células constituintes do sangue e da linfa, rins, gônadas e seus ductos, baço e córtex das supra-renais (SADLER, 2005).

O endoderma provê o sistema gastrointestinal, respiratório, bexiga, parênquima da tireóide, da paratireóide, do fígado e do pâncreas, e ainda o revestimento epitelial da cavidade timpânica e da tuba auditiva (SADLER, 2005).

Em conseqüência da formação rápida dos sistemas, o disco embrionário, antes plano, começa a se preguear em sentido cefalocaudal, estabelecendo a prega cranial e caudal, e, em sentido transversal, o que estabelece a forma corporal arredondada (SADLER, 2005).

Nos dias 20 e 21 as pregas neurais, formadas no dia anterior a partir do alongamento da placa neural e elevação de suas bordas laterais, também se elevam surgindo à goteira neural quando o sulco neural se aprofunda, neste período o embrião começa a dobrar seu corpo. Nesta fase os somitos variam de um a quatro e o comprimento do embrião humano varia de 2 a 3 mm (SADLER, 2005).

Nos dois dias que se seguem os somitos já são 5 a 12 e o embrião têm de 3 a 3,5 mm; neste período ocorre a fusão das pregas neurais na região cervical, os neuroporos cranial e caudal se encontram bem abertos; os arcos viscerais 1 e 2 estão presentes e se inicia o dobramento do tubo cardíaco (SADLER, 2005).

Em bovinos no dia 23 ocorre o fechamento do tubo neural, presença do primeiro arco branquial, crescimento da formação do alantóide, e presença das vesículas óptica e ótica (EVANS, SACK, 1973).

No período de 24 a 25 dias ocorre o dobramento cefalocaudal, o neuroporo cranial se fecha, formam-se as vesículas e placódios ópticos, os somitos já são em número de 13 a 20 e o comprimento do embrião varia de 3 a 4,5 mm (SADLER, 2005).

Em bovinos no vigésimo quarto dia as três primeiras vesículas cerebrais já estão visíveis, o segundo arco branquial está presente e aparece o broto do membro anterior, e no vigésimo quinto dia a forma do embrião é em C e o terceiro arco branquial está presente (EVANS, SACK, 1973).

O neuroporo caudal se fecha entre os dias 26 e 27, aparecem os brotos dos membros superiores e três dos pares de arcos viscerais, o embrião possui de 3,5 a 5 mm e os somitos variam de 21 a 29, nesta fase já ocorrida a fusão dos neuroporos o tubo neural está completo e passa a se chamar medula espinhal com dilatações chamadas de vesículas cerebrais (SADLER, 2005).

O dia 26 é marcado pelo surgimento do quarto arco branquial em bovinos, formação da glândula mamária e dos brotos do membro posterior (EVANS, SACK, 1973).

Em suas pesquisas os autores encontraram o canal neural completamente fechado e 18 a 19 pares de somitos em embriões com 22 dias e 16 horas, a torção, característica dessa idade, é nitidamente visualizada, a região cefálica bem definida, assim com os primeiros arcos branquiais, vesícula óptica e ótica; a proeminência cardíaca é distinta, o saco vitelino desenvolvido e o alantóide é proeminente (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

Winters, Green e Comstock (1942) seccionaram um embrião bovino de 22 dias e 16 horas de gestação em 475 cortes transversais, enumeraram os mesmos e demonstraram a perfeita visualização do bulbo, ventrículo, aortas dorsais e a primeira volta do arco aórtico; a região caudal do coração, e a de contato do âmnion com o ventre do embrião; também ilustraram veias umbilicais e vitelinas, intestino médio e região média do saco vitelino, veias cardinais, mesonefron, ductos mesonéfricos.

O mesmo processo foi feito com um embrião bovino de 26 dias e 2 horas de idade, externamente a forma do corpo do mesmo já foi modificada, não mais é um embrião com flexões e torções características de uma mais jovem e sim possui o formato em **C** que é mais acentuado pela flexura cefálica e curvatura da cauda. As vesículas ópticas são muito proeminentes assim como os três arcos branquiais; o otocisto, coração, fígado, e região mesonéfrica são fortemente distintos, todos os pares de somitos estão formados e os membros torácicos começam a aparecer. Na histologia o mesmo gerou 294 secções transversais, as quais demonstraram o fechamento da região cefálica em cordão espinhal, mielencéfalo e otocisto, região faringoesofagea, três câmaras cardíacas e estruturas próximas ao coração, membro torácico e tronco, além de ilustrar a região cloacal, flexura lombo-sacral (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

Em outro animal, também com 26 dias, foram realizados cortes longitudinais, no entanto esse em questão foi proveniente de frigorífico e teve sua idade estimada por mensurações do corpo, aparência e peso; nessa amostra foram visíveis o mesonefron em toda sua longa extensão, e as relações entre as varias estruturas gastrointestinais (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

Os pesquisadores encontraram o quarto arco branquial, presença de uma saliência cardíaca, larga proeminência mesonéfrica e melhor diferenciação das estruturas da cabeça em embriões com 26 dias e 15 horas. Já num embrião de 27 dias e 14 horas externamente (CR=0.826) existe uma organização do corpo mais evidente e a identificação do membro torácico é ainda mais fácil, quando seccionado, o mesmo gerou 524 cortes, quatro deles receberam especial atenção e foram incluídos na publicação, porém não foram narrados, apenas a ilustração foi inserida com setas apontando e reconhecendo órgãos e estruturas mais importantes (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

### 3.7 Explorando as três lâminas do disco embrionário

As células da borda lateral das pregas neurais de embriões humanos se dissociam e formam a crista neural que passará por uma transição de epitelial para mesenquimal ao sair do neuroectoderma. Estas células migram para duas regiões, ou chegam ao ectoderma formando melanócitos, ou tornam-se gânglios sensoriais, neurônios simpáticos e entéricos, células de “Schwann”, da medula da supra-renal, da glia, tecido conjuntivo, leptomeninges, odontoblastos, células da tireóide, gânglios dos nervos cranianos e o septo conotruncal do coração (SADLER, 2005).

Os placódios (ótico e do cristalino) se formam a partir de dois espessamentos bilaterais ectodérmicos da medula espinhal. Os óticos evoluem para estruturas de audição e equilíbrio (SADLER, 2005).

Inicialmente as células do mesoderma são um fino folheto de tecido entrelaçado frouxo de cada lado da linha média no 17º dia essas células proliferam e formam uma placa espessa de nome mesoderma paraxial, no entanto nas laterais a placa permanece fina e recebe o nome de mesoderma lateral dividido em duas camadas, somática ou parietal, e esplâncnica ou visceral, junto as duas revestem a cavidade intra-embriônica (celoma) (SADLER, 2005).

O mesoderma que une o paraxial ao lateral chama-se intermediário. No mesoderma axial o 1º par de somitos forma-se na região occipital do embrião por volta do 20º dia de desenvolvimento, a partir deste ponto os somitos aumentam em uma razão de aproximadamente 3 pares por dia (SADLER, 2005).



Em humanos, há quatro pares de somitos occipitais, 8 cervicais, 12 torácicos, 5 lombares, 5 sacros e 8 a 10 coccígeos. O primeiro occipital e os últimos 5 a 7 coccígeos desaparecem, os outros originam o esqueleto axial. Durante esse período a idade do embrião é expressa pelo número de somitos (SADLER, 2005).

Por volta do 28º dia, células das paredes ventral e medial dos somitos perdem sua organização compacta, passando a ser polimórficas, e circundam o notocórdio formando o mesênquima, esse circundará a medula espinhal e o notocórdio e formará a coluna vertebral (SADLER, 2005).

As células dorsolaterais dos somitos formam o miótomo, já as dorsais formam o dermatomo, cada um dos somitos conserva a inervação de seu segmento de origem, independente do local para onde as células migram.

O mesoderma intermediário diferencia-se em estruturas urogenitais (nefrótomos e cordão nefrogênico) que originam as unidades excretoras do sistema urinário e gônadas (SADLER, 2005).

O mesoderma em sua camada parietal formará membranas mesoteliais ou serosas e que revestirão a cavidade peritonial, pleural e pericárdica, e secretarão líquido seroso. A camada visceral junto ao ectoderma formará a parede do intestino primitivo e as serosas que revestirão os demais órgãos (SADLER, 2005).

As células tronco hematopoiéticas humanas originam-se dos hemangioblastos centrais, localizados em ilhotas de células mesodérmicas, ao redor da parede do saco vitelino, induzidas pelo fator de crescimento de fibroblastos (FGF) 2. Os hemangioblastos periféricos formam angioblastos (SADLER, 2005).

O endoderma origina os intestinos anterior, médio e posterior; o médio se comunica certo período com o saco vitelino pelo ducto vitelino que muito mais tarde é obliterado (SADLER, 2005).

A membrana bucofaríngea bloqueia também por certo tempo o intestino anterior em sua extremidade cefálica; no entanto essa membrana se rompe na quarta semana, e permite a conexão entre a cavidade amniótica e o intestino primitivo (SADLER, 2005).

O intestino posterior também irá terminar temporariamente na membrana cloacal que se rompe na sétima semana e produz abertura para o ânus (SADLER, 2005).

### 3.8 Período Embrionário

O período embrionário, segundo Winters, Green e Comstock (1942) é definido desde a implantação do embrião na parede do útero. Em bovinos não ocorre à invasão do tecido uterino que indica a real implantação do embrião, tal invasão ocorre em humanos. A implantação em bovinos, segundo os autores, está mais para um contato superfície-superfície, como ocorre em ovelhas e coelhos.

O quarto arco visceral é formado nos dias 28 a 30, também aparecem nesse estágio os brotos do membro posterior, e estão formadas a vesícula óptica e o cristalino (placódio), os somitos aumentam para 30 a 35 e o embrião já possui 4 a 6 mm (SADLER, 2005).

No trigésimo dia já é nítida a formação da fossa olfatória, os olhos já possuem pigmentação e os dígitos das patas dianteiras já são evidentes nos bovinos (EVANS, SACK, 1973).

Do 31º ao 35º dias o comprimento do embrião já se encontra entre 7 e 10 mm adquirindo o formato da letra C; seus membros torácicos possuem forma de pá e a cavidade nasal já está formada (SADLER, 2005).

Os raios digitais nas mãos e nas placas dos pés, a proeminência das vesículas cefálicas, o início da formação da orelha externa e a herniação umbilical ocorrem entre os dias 36 e 42 de vida do embrião que nesta fase já possui 9 a 14 mm de comprimento (SADLER, 2005).

No dia 34 em bovinos, a fossa olfatória é profunda, há presença do meato acústico e formação do sulco entre os dígitos do membro pélvico. Já no dia 38 surgem as pálpebras, tubérculos genitais e separação entre os dígitos do membro torácico (EVANS, SACK, 1973).

A pigmentação da retina já se torna visível entre os dias 43 e 49, quando o embrião já atinge entre 13 e 22 mm; os raios digitais já iniciam sua separação, formam-se mamilos, pálpebras e lábio superior e a herniação umbilical é bem proeminente (SADLER, 2005).

No quadragésimo dia nos bovinos, a extremidade da orelha cobre parte do meato acústico e, no quadragésimo quinto, folículos táteis surgem acima dos lábios e dos olhos, a língua já é visível, a extremidade triangular da orelha recobre todo o

meato acústico e os dígitos distais se separam completamente (EVANS, SACK, 1973).

Finalmente do 50<sup>o</sup> ao 56<sup>o</sup> dias o embrião já possui membros longos, dobrados nas articulações do joelho e do cotovelo, os dígitos dos pés e mãos já estão separados e já possui entre 21 e 31 mm de comprimento. Em humanos a herniação umbilical persiste até o terceiro mês de gestação (SADLER, 2005).

No dia 50 as pálpebras começam a recobrir os olhos, e no dia 56 ocorre à fusão do palato. No sexagésimo dia de gestação as pálpebras já estão fundidas, a genitália externa já está diferenciada e inicia-se a formação dos cascos dos embriões bovinos (EVANS, SACK, 1973).

Winters, Green e Comstock (1942) obtiveram um embrião de 30 dias e 11 horas com 1,113 cm de CR, onde já se visualizam as fossas nasais, a flexura cefálica, e ainda as flexuras cervical e caudal aparecem. Embriões com 32 dias e 14 horas e CR 1,19 cm já possuem vértebras mais organizadas e aumentando de tamanho, os membros não somente crescem como se tornam mais especializados; todas estas características coincidem com o estágio de embrião tardio e início do estágio fetal. O último embrião comentado gerou 425 cortes, e assim como o embrião anterior apenas às ilustrações entraram na publicação sem comentários escritos.

Uma amostra de 37 dias e 3 horas com Cr de 1,826cm recebeu comentários a despeito da condensação tecidual nas áreas de futuro desenvolvimento esquelético, em ambos os membros, na altura das vértebras e também nas costelas, e foi pela primeira vez citado além do mesonéfron, o metanéfron (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

O último exemplar, considerado embrião possuía 40 dias e 2 horas, com 2.28 cm de CR, apresentou pequenas diferenças no formato do corpo onde a flexura cervical não é tão distinta em embriões tardios, e a proeminência cefálica sofre um aumento de tamanho; um total de 760 cortes foram gerados a partir deste embrião, e destes novamente observou-se poucos comentários, porém atenção ao desenvolvimento das gônadas e desenvolvimento do metanéfron em dois níveis (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

Os próximos fetos descritos já possuíam 45 dias e 15 horas, 49 dias e 13 horas, 54 dias e 15 horas e 59 dias e 16 horas, neles as características marcantes foram à redução gradativa do tamanho da proeminência cefálica, recesso da flexura

cervical, formação das feições da face, o invólucro dos olhos feito por tampões, a alongamento do pescoço, e a rotação de 90° em direção ao axis longitudinal da cabeça, em relação ao axis do corpo do feto; as mudanças na região abdominal foram basicamente à redução da proeminência do fígado e extensão da parede do cordão umbilical, as costelas tornam-se mais proeminentes e algumas estruturas já apresentam ocorrência de ossificações (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942).

Winters, Green e Comstock (1942) relataram ainda que na fase fetal os membros sofrem uma mudança drástica de membros fracos, finos e curtos para longos e fortes, simultaneamente a precocidade do desenvolvimento dos membros torácicos é reduzido para tornarem-se iguais em nível, em relação aos membros pélvicos, essa redução ocorre não só em crescimento do comprimento como em diferenciação; algumas dessas diferenças fundamentais em proporções corporais continuam até os 70 dias de idade gestacional e após esta data as modificações não são mais tão radicais.

### 3.9 Desenvolvimento do sistema urinário

Cagnoto (2007) em seus estudos afirmou não haver literatura descrevendo a cronologia do desenvolvimento renal em embriões bovinos. De acordo com Dyce et al (2004) rins bovinos adultos mantêm a maioria da lobação fetal. Para Moore e Persaud (2004) em humanos, o sangue é filtrado, e a urina é produzida e excretada na cavidade amniótica durante toda a vida fetal. Segundo Cagnoto (2007) a lobação renal externa de bovinos adultos não está presente em embriões e fetos até 46 dias.

Segundo Junqueira e Carneiro (2004) o túbulo contorcido proximal (TCP) é composto por células com citoplasma acidófilo, apical, com microvilos que formam uma orla em escova e canalículos que aumentam a capacidade de absorver macromoléculas; possuem luz ampla e são circundados por muitos capilares sanguíneos. A alça de Henle é muito semelhante ao TCP em seu segmento delgado, porém em seu segmento espesso, na porção final, passa a se chamar túbulo contorcido distal (TCD) cuja distinção dá-se porque o TCD possui células menores sem orla estriada e menos acidófilas.

Browder et al. (1991) afirmaram que o sistema urinário e parte do reprodutivo se originam do mesoderma intermediário, Moore e Persaud (2004) relatam que o primeiro inicia seu desenvolvimento antes do segundo, porém ambos derivam da chamada crista urogenital.

Para Browder et al. (1991) 3 rins se desenvolvem em direção crânio caudal do embrião, substituindo um ao outro. O pronefro, o primeiro deles, é funcional somente em vertebrados adultos menos evoluídos, no restante ele regride e forma o mesonefro. Apenas uma porção, o chamado ducto pronefrico é mantida e dá origem ao ducto excretor do mesonefro.

De acordo com Moore e Persaud (2004) o pronefro é apenas um acúmulo de células e estruturas tubulares e tortuosas na região do pescoço do embrião que se degenera rapidamente

Segundo Browder et al. (1991) o mesonefro é funcional em anfíbios, peixes e embriões vertebrados superiores e para Moore e Persaud (2004) é possuidor de glomérulos e túbulos mesonéfricos que abrem-se em ductos e desembocam na cloaca, esses túbulos durante o processo de degeneração tornam-se os ductos eferentes do testículos em machos.

Browder et al. (1991) descreveram os túbulos como formadores de um cálice terminal por meio de alongamentos, e esse cálice é envolvido por inúmeros capilares (os glomérulos), segundo os autores esse rim é substituído pelo metanefro ou rim permanente ainda na fase embrionária, que tem origem da soma do ducto mesonéfrico com o blastema metanéfrico; o primeiro é fruto de seu próprio crescimento próximo a área de fusão cloacal (divertículo metanéfrico) e se alonga formando o futuro ureter, que termina em um saco cego e originará a pelve renal em humanos; o segundo é originário da condensação de mesoderma ao redor da pelve e forma os túbulos renais e os ductos coletores do metanefro.

Cagnoto (2007) não conseguiu visualizar o pronefro em bovinos com CR de 3mm (14 a 15 dias); para o autor, tal fato revela um estágio de desenvolvimento mais avançado nos bovinos em relação aos humanos. O mesonefro em seu estudo encontrou-se dorsal ao coração e fígado, com túbulos de epitélio simples cúbico e aspecto retorcido. Embriões com 8,3 mm (18 e 19 dias) possuíam túbulos mesonéfricos definidos, de epitélio simples cúbico ou colunar baixo, células com borda uniforme em alguns ductos e não uniforme em outros; junto aos ductos um havia um mesênquima frouxo e avascularizado.

Amostras de embriões bovinos de Cagnoto (2007) com CR 10mm (25 a 28dias) possuíam mesonefro ventral as vértebras, com sua porção cranial próxima a borda hepática e a caudal junto ao metanefro. Um aglomerado de células mesenquimais em sua porção central, envolvido por células sanguíneas e cercado por túbulos mesonéfricos, teria a mesma função dos glomérulos mesonéfricos organizados, descritos em humanos e em outros mamíferos. Os túbulos mesonéfricos já possuíam lúmen maior e irregular em relação ao de idade inferior.

Para o autor a presença de túbulos e células sanguíneas já indicava atividade no órgão, No metanefro, um arranjo celular levanta a possibilidade de ser um glomérulo. Aos 31 dias o arranjo tubular é parcialmente perdido e aos 45 dias foi visualizado o metanefro com arranjo tubular bem definido e arquitetura morfológica estabelecida. O início do desenvolvimento metanéfrico ocorreu entre 23 e 24 dias de gestação em bovinos, coincidindo com um processo de perda de arquitetura celular dos túbulos mesonéfricos conforme o aumento da idade.

### 3.10 Desenvolvimento hepático

Segundo Moore e Persaud (2004) o fígado surge do intestino anterior por meio de uma invaginação ventral da porção caudal do mesmo e a partir desse primeiro broto hepático uma massa de mesoderma esplâncnico invade o septo transversal entre coração e intestino médio crescendo rapidamente desde a 5ª até a 10ª semana em embriões humanos sendo que ao final da 10ª o órgão representa 1/10 do peso fetal.

De acordo com Winters et al. (1942) em embriões bovinos, o fígado por volta da 4ª semana já se encontra relativamente destacado do corpo do embrião. E segundo Moore e Persaud (2004) entre o 2º e o 7º meses de gestação esse órgão exerce papel fundamental na hematopoiese.

Lima (2007) encontrou primórdios hepáticos e os descreveu como cordões entrelaçados de células hepáticas e pequenos sinusóides com células sanguíneas em seu interior; esses achados ocorreram em embriões bovinos com 20 dias de idade gestacional (9,5mm). Aos 29 dias, o autor observou o duodeno partindo caudalmente ao estômago e constituindo parte do cordão umbilical conectado a

vesícula vitelina. Aos 34 dias descreve o fígado constituído por hepatócitos muito próximos uns dos outros, formando os cordões e presença de células sanguíneas típicas. Em exemplares com 23 mm de CR, o autor descreveu além dos achados anteriores a presença de espaços subendoteliais, os chamados espaços de Disse.

Segundo Moore e Persaud (2004) e Noden e De Lahunta (1990) o divertículo hepático cresce rapidamente e divide-se em duas partes; das células endodérmicas se originarão os cordões entrelaçados de células hepáticas e o epitélio de revestimento da porção intra-hepática; nessa fase os cordões se anastomosam em torno dos primeiros espaços revestidos por epitélio e formam os primeiros sinusóides hepáticos.

### 3.11 Desenvolvimento do sistema respiratório

O início da formação do sistema respiratório inferior ocorre em embriões humanos no 28º dia de gestação com o surgimento da fenda laringotraqueal que se invagina e forma o broto pulmonar, um divertículo respiratório em formato de saco localizado na região ventral da porção caudal do intestino anterior (MOORE, PERSAUD, 2004).

De acordo com Alberto (2006) a formação do túbulo em bovinos ocorre no 20º/21º dias de gestação e acompanha o surgimento dos arcos branquiais; sua parede é formada por várias camadas de epitélio apoiadas a um mesênquima. A formação do brônquio traqueal característico dos ruminantes, bem como a divisão brônquica em brotos segmentares e subsegmentares ocorre a partir dos 28 dias de gestação.

### 3.12 Placenta e placentação

De acordo com Oliveira et al. (2006) o sucesso do processo de implantação do blastocisto na parede do útero dá origem ao órgão funcional da unidade biológica materno-fetal extremamente complexo que sofre modificações em termos de

quantidade e qualidade macroscópica e microscópica, esse órgão é denominado placenta.

Em humanos, três dias após a fertilização, as células embrionárias se dividem novamente e originam a mórula, com 16 células, as mais internas constituem a massa celular interna que formará posteriormente o embrião, conseqüentemente, as mais externas formam a massa celular externa que originará o trofoblasto que contribuirá para a formação da placenta (SADLER, 2005).

Classificada como órgão transitório, encontrada apenas em mamíferos, e responsável pelas trocas fisiológicas entre mãe e feto, a placenta pode receber a denominação de único órgão formado por células de dois indivíduos diferentes. A mesma é constituída por porções materna e fetal, cada porção possui células genéticas e imunologicamente diferentes. A porção fetal é representada pelo córion, esse possui uma placa corial de onde partem vilos coriônicos provenientes de uma parte central conjuntiva que por sua vez é derivada do mesênquima extra-embriônico, possui também as camadas de citotrofoblasto e sinciotrofoblasto; a porção materna, chamada de decídua basal, fornece sangue arterial para as lacunas entre os vilos secundários e recebe sangue pobre em oxigênio proveniente do mesmo local (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Dyce et al. (1997) definem o órgão como o único que por meio de aposição, ou fusão de tecido materno e fetal é capaz de produzir hormônios e promover mudanças fisiológicas, e afirmam que, apesar de haver no início da gestação um órgão transitório estabelecido pelo saco vitelino, a placenta é a estrutura definitiva em todos os mamíferos eutérios. De acordo com Hildebrand (1995) a principal contribuição da porção fetal à placenta em marsupiais e roedores é o saco vitelino.

A chamada placenta definitiva dos mamíferos eutérios é constituída por córion e alantóide e é vascularizada pelos vasos sanguíneos umbilicais, sendo denominada de corioalantóide; no entanto, no início do desenvolvimento muitos mamíferos apresentam uma placenta coriovitelina, onde córion e saco vitelino são seus formadores, alguns ainda mantêm esse último até o fim da gestação com parcial ou completa inversão das camadas germinativas, é o caso dos roedores (CARTER et al., 2004)

Em seus estudos, Carter et al. (2004) afirmam que o trofoblasto invade a parede do útero em algumas espécies sendo essa invasão maior ou menor substituindo uma ou mais camadas de tecido materno, daí a classificação



placentária em epiteliocorial, endoteliocorial, ou hemocorial de acordo com a forma de sobreposição e relacionamento do trofoblasto no epitélio uterino, no endotélio dos vasos maternos, ou diretamente com o sangue materno respectivamente.

Segundo Ainudeen e Hafez (1995) o cordão origina-se dos envoltórios amnióticos ao redor do saco vitelino e envolve os vasos alantóides.

### 3.12.1 A placenta nos ruminantes

A placenta bovina é classificada como policotiledonária, composta por placentônios múltiplos separados por vilos cotiledonários interdigitais e criptas de carúnculas complementares. A morfologia macroscópica do placentônio e o molde das interdigitações feto maternas diferem consideravelmente entre as espécies bovinas e alteram o curso da gestação (LEISER et al., 1994, 1998).

A formação dos placentônios com barreiras interhemáticas sinepteliocoreais proporcionam apoio e troca de substâncias entre mãe e feto na maioria dos ruminantes (WOODING et al., 1992).

Guillomot e Guay (1982) em seus estudos relataram que a ultraestrutura (SEM) do epitélio uterino de animais gestantes do 7° ao 16° dia de gestação é similar ao de animais não gestantes que estejam ciclando. Os autores observaram células com microvilos exibindo protrusões citoplasmáticas desde o 13° dia, além disso, células ciliadas estavam presentes em todos os estágios estudados, já em animais gestantes com 18 a 21 dias de gestação o número de protrusões citoplasmáticas mostrou-se maior tanto nas regiões de carúncula quanto nas intercarunculares em ambos os cornos uterinos.

Os pesquisadores relataram que, no 18° dia de gestação em áreas em que o trofoblasto estava aderido, as protrusões eram raras, semelhantes a depressões de crateras na face epitelial. Essas protrusões se mostraram contínuas, com células contendo vacúolos citoplasmáticos apicais com baixo material eletrodense, entretanto também aparece, em alguns dos citoplasmas das protrusões, material denso contendo mitocôndrias e retículos endoplasmáticos.

De acordo com Guillomot e Guay (1982) do 10° ao 16° dias de gestação as células do trofoblasto tem aparência arredondada e a superfície recoberta por uma

cadeia abundante de delgados microvilos com 1 a 2  $\mu\text{m}$ . Na microscopia de transmissão observaram uma grande quantidade de material com numerosas vesículas envoltas por uma rede de microvilos trofoblásticos, na base destes, invaginações endocitóticas da membrana plasmática foram visualizadas no citoplasma, “lysosome-like bodies” estavam presentes, no dia 18 algumas das células trofoblásticas possuíam poucos microvilos.

Guillomot e Guay (1982) afirmam que o primeiro contato real entre o trofoblasto e o epitélio uterino foi observado nos dias 20 e 21 de gestação, quando as células trofoblásticas se encontraram com forma afilada e com a superfície celular irregular e completamente destituída de microvilos; no 20° dia a porção do concepto localizada no corno contralateral ao gestante (aquele que contem o corpo lúteo) ainda não se encontra aderido. Neste momento, microvilos ainda cobrem a superfície das células trofoblásticas não aderidas, porém as mesmas estão ausentes na porção aderida do corno ipsilateral.

Segundo os estudiosos após o contato celular ser estabelecida entre trofoblasto e epitélio uterino a porção de trofoblasto encobre o epitélio uterino glandular mostrando papilas cônicas de 50  $\mu\text{m}$  e podem ser observadas invadindo o lúmen glandular.

### 3.12.2 Membranas fetais

As membranas extra-embrionárias são o elo de comunicação entre o feto e a mãe, e posteriormente irão formar a placenta. Existem quatro tipos de membranas fetais, o saco coriônico, o alantóide, o âmnion e o saco vitelino (WOLF et al., 2003). Sendo que elas serão descritas a seguir.

#### 3.12.2.1 Morfologia do saco coriônico

O epitélio coriônico representa a decisiva barreira de trocas materno-fetais (LEISER e KAUFMANN, 1994). Durante a implantação, o corión é preenchido por

uma camada interna de tecido mesenquimatoso que deriva do embrião. Logo em seguida o mesênquima desenvolve seu próprio sistema de capilarização. A cavidade envolvida pelo coriôn é denominada exoceloma e contém o embrião, o âmnion, o alantóide e o saco vitelino (ASSIS NETO, 2005).

O coriôn consiste de uma camada de células epiteliais delicadas da parede externa do blastocisto, o trofoblasto, que durante o curso da implantação recebe uma camada de células derivadas da porção interna do mesênquima, que tem origem fetal. Pouco tempo depois o mesênquima desenvolve sua própria rede de capilares. Na maioria das espécies o epitélio coriônico, ou seja, o trofoblasto representa a principal barreira entre organismos maternos e fetais (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Os vilos coriônicos consistem de um mesênquima vascular, o qual é recoberto por um epitélio simples composto por citotrofoblastos com núcleo singular e células trofoblásticas gigantes com dois ou mais núcleos. As células uninucleares têm forma irregular e saliência entre as porções distais das células da cripta. Assim, a junção materno-fetal apresenta um perfil irregular (BJÖRKMAN, 1969).

Segundo Assis Neto (2005), em embriões de 15 a 20 dias de gestação o córion apresenta células trofoblásticas mononucleadas e células trofoblásticas gigantes em diferentes níveis do trofoblasto, sendo as últimas bem evidentes nessa fase, com citoplasma bem granular.

Durante o período estudado por Assis Neto (2005) as células trofoblásticas gigantes encontram-se entremeadas às células mononucleadas e seus citoplasmas são claros e seus núcleos globosos na microscopia de luz. Esta camada celular está apoiada no mesênquima extra embrionário.

Por ser responsável pela troca materno-fetal, o coriôn tem que apresentar uma circulação funcional. Entretanto é um tecido intrinsecamente avascular, sendo vascularizado exclusivamente por vasos do alantóide. (KAUFMANN; BURTON, 1994).

Nos ruminantes, a forma da vesícula coriônica muda rapidamente. É primeiramente esférica, transformando-se em um tubo longo e delgado no 12º ou 13º dia. Em seguida, ganha largura e toma a forma típica de um saco bicornual encurvado (SCHWARZE, 1972).

No início da gestação, delicados vilos aparecem na superfície da membrana coriônica em oposição às carúnculas maternas. Com o avanço da gestação estes

vilos se desenvolvem se encaixando nas concavidades protuberantes dos cotilédones (HAFEZ, 1954).

As vilosidades estão distribuídas de maneira difusa e assim permanecem nos animais tilópodos (camelos e lhamas), formando uma semiplacenta difusa, mas nos ruminantes domésticos essas vilosidades difusas dão lugar aos cotilédones. No final do segundo mês de prenhes os cotilédones se fundem com as carúnculas uterinas (porção aglandular da mucosa uterina) formando os placentônio. Os placentônio são característicos de uma semiplacenta múltipla ou cotiledonária. A placenta bovina é caracterizada, pela contribuição dos tecidos materno-fetais, como epiteliocorial (SCHWARZE, 1972).

O estudo histológico dessa membrana mostrou que existe uma íntima conexão entre as vilosidades fetais e o endométrio. O epitélio uterino que recobre a base dos cotilédones maternos desaparece, deixando o coriön em contato com o tecido conectivo do útero (HAFEZ, 1954).

Quando entra em contato com as criptas encontradas nas carúnculas uterinas, o tecido corioalantóide torna-se hiperplásico e hipertrófico. Entre o sétimo e o décimo dia depois do nascimento as criptas das carúnculas sofrem necrose por isquemia, e as células epiteliais descamam sendo assim, de acordo com o grau de implantação, a placenta dos ruminantes pode ser considerada parcialmente decídua (NODEN; LAHUNTA, 1990).

De acordo com Assheton<sup>6</sup> (1906 apud MARSHALL, 1952), o embrião bovino de 18 dias, com aproximadamente 10mm de comprimento, ocupa toda a extensão do útero, pelo crescimento do blastocisto. Os vilos aparecem na superfície do saco coriônico no 31º dia. Aos 44 dias os cotilédones são visíveis, arranjados em fileiras e com a superfície lisa. Nesse estágio há certo grau de aderência materno-fetal. No 78º dia as formas gerais da placenta já estão presentes e já existe uma implantação cotiledonária completa.

O coriön em bovinos reproduz macroscopicamente o formato geral do interior do útero. Apresenta-se relativamente delgado e frágil de coloração branca e lisa. Aproximadamente 100 a 120 cotilédones são encontrados em sua superfície, formando a placenta. Esses cotilédones são menos numerosos, mas muito

---

<sup>6</sup> ASSHETON, R. The morphology of the angulate, particularly the development of the organ in sheep, and notes upon placenta of the elephant and hyrax. **Philosophical of the Royal Society of London**, Serie B, v.198, p. 143-220, 1906.

volumosos na parte mediana do concepto. Os cotilédones menores encontram-se nas extremidades coriônicas (BARONE, 1986).

Ram e Chandra (1984) reportaram que os cotilédones fetais em búfalos são primeiramente encontrados sobre o saco coriônico na vizinhança do embrião até 2,5 cm de CR. O número de placentônios em búfalos aumentou de 89 para 173 durante o início até a metade da prenhes. Contudo, ao final da prenhe (36 a 72 cm de CR) o número de placentônios diminuiu de 162 para 77, e o tamanho dos mesmos aumentou. Os autores relataram pontas necrosadas nas extremidades do coriôn, resultantes do limitado suprimento sanguíneo naquela região.

#### 3.12.2.1.1 *Células Trofoblásticas Gigantes (TGCs)*

O epitélio trofoblástico, em geral, é formado de uma camada simples de células cubóides marcadas fortemente, mas em muitos lugares o epitélio é formado por duas ou mais camadas finas. Existem muitas células multinucleadas nessas camadas, especialmente na porção das carúnculas, mas não foi percebida uma estrutura sincicial verdadeira (KATHIRESAN et al., 1992). Segundo Schlafer et al. (2000), aproximadamente um quinto dos trofoblastos são binucleados.

Winsatt (1980) descreveu que em todas as placentas cotiledonárias já estudadas, células binucleadas estão presentes. Essas células têm origem trofoblástica e estão presentes ao longo da gestação, sendo confinadas ao coriôn na maioria das espécies. As células gigantes são morfologicamente semelhantes nas diferentes espécies de ruminantes e há evidências que sugerem que também são funcionalmente semelhantes nessas espécies.

Nos ruminantes em geral, as células estão amplamente distribuídas pelo coriôn, mas sua relação numérica varia significativamente, principalmente nas ovelhas. Nos bovinos, as células binucleadas só aparecem no trofoblasto no 17º dia de gestação, sugerindo a sua formação a partir da transformação de células ordinárias do trofoblasto. Novas células gigantes continuam a ser formadas dessa mesma maneira até o final da gestação, sendo uma importante maneira de comunicação entre o animal prenhe e o feto (CARVALHO, 2000; WINSATT, 1980).

Em búfalos as células gigantes trofoblásticas binucleadas mostram muita semelhança com essas células em bovinos. Em ambas as células existem estruturas que as tornam altamente capazes de produzir e estocar proteínas, que serão liberadas no organismo materno (CARVALHO et al., 2006).

Durante a transformação histológica das células trofoblásticas comuns em células gigantes, essas se tornam polarizadas e parece ocorrer divisão nuclear sem ocorrer divisão citoplasmática, podendo ser observadas Figuras de mitose. As células multinucleadas gigantes chegam a ter até 7 núcleos, embora o verdadeiro significado fisiológico dessa multiplicação nuclear ainda não ter sido satisfatoriamente analisada (WINSATT, 1980).

As TGCs são maturadas no epitélio uterino, sendo transportadas através das junções coriônicas íntegras (gap junction). Quando maduras, as células gigantes migram de volta à interface materno-fetal e fundem-se com o epitélio uterino, liberando o conteúdo de seus grânulos (CARVALHO, 2000; LEISER e KAUFMANN, 1994; WOODING, 1984).

### 3.12.2.2 *Morfologia do Alantóide*

O alantóide corresponde à bexiga urinária extra-embrionária e se desenvolve a partir do intestino grosso embrionário: é caracterizado como um saco extra-embrionário formado por camada simples de células pavimentosas que é envolvido por mesênquima extremamente vascularizado (ASSIS NETO, 2005; BJÖRKMAN, 1986). A filogenia do alantóide dos mamíferos tem sido bem documentada, e o desenvolvimento do alantóide bovino após inseminação artificial (MELTON et al., 1951) ou monta natural (GREENSTEIN et al., 1958) foi apenas morfológicamente descrito, havendo poucas informações sobre seu crescimento e desenvolvimento.

Reeves et al. (1972) descreveu o alantóide em ruminantes como sendo um grande saco repleto de líquido ao lado do âmnion. O alantóide projeta-se do intestino posterior, como uma vesícula extra-embrionária. A vascularização tem início quando o alantóide entra em contato com o córion, se espalhando rapidamente por toda a estrutura, incluindo o amniocórion. O mesoderma esplânico do alantóide serve de origem para os vasos alanto-córionicos. Entretanto o coriön e o âmnion não são

vascularizados até se fundirem com o alantóide (LATSHAW, 1987; WOODING; FLINT, 1994).

O epitélio alantóide pode circundar a vesícula gestacional ou pode regredir em algumas espécies. Essa estrutura está claramente envolvida no processo transplacentário de trocas (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O alantóide é constituído por uma delgada camada de células achatadas e pavimentosas que compõem a parte externa da membrana. Essas células são sustentadas por uma fina membrana basal e o mesênquima extra embrionário (ASSIS NETO, 2005).

Segundo Bacha (2000) o tecido mesenquimal é composto por células pálidas, com forma de estrelas se conectando por meio de processos citoplasmáticos formando dessa maneira um arranjo frouxo entre essas células. Estas células estão envoltas por uma substância com característica gelatinosa e amorfa que acumula fibras ao longo do desenvolvimento embrionário. Este tecido mesenquimal será responsável pela formação de todos os tecidos conjuntivos existentes

A membrana alantóide geralmente aparece à direita do embrião entre o 14<sup>o</sup> e o 21<sup>o</sup> dia de gestação em bovinos (NODEN; LAHUNTA, 1990; THOMPSON, PETERSON, 2000). A mesma cresce cranial e caudalmente ao longo das faces ventral e lateral do embrião, sendo que durante a 4<sup>a</sup> semana de gestação, este ocupa toda a cavidade celômica, estendendo-se entre as membranas fetais. A membrana adota o formato de “T” invertido, com traço vertical situado no cordão umbilical. Suas expansões laterais não cobrem dorsalmente o âmnion devido à existência de um mesoâmnion amplo que se funde com o córion e com a maior parte do âmnion (NODEN; LAHUNTA, 1990).

Essa estrutura tem o formato de um tubo longo dividido em dois compartimentos, que se comunicam entre si e com útero. As paredes são delgadas e transparentes, e se distribuem irregularmente dentro do coriôn, justapondo-se a uma das faces do âmnion (MARSHALL, 1952; BARONE, 1986).

Alguns autores denominam alantocóron, a porção do coriôn relacionada ao alantóide (BARONE, 1986).

Em ovinos o alantóide surge macroscopicamente no 16<sup>o</sup> dia de gestação (BRYDEN et al., 1972). Em bovinos o alantóide inicia sua fixação ao coriôn entre o 29<sup>o</sup> e o 33<sup>o</sup> dia de gestação. Este se expande rapidamente e, com cinco semanas, ocupam ambos os cornos uterinos (LATSHAW, 1987).

### 3.12.2.3 *Morfologia do âmnion*

A membrana amniótica é responsável pela hidratação do feto, nutrição, lubrificação do canal do parto e proteção mecânica do feto (LEISER, KAUFMANN, 1994). O âmnion se forma entre o 13º e o 16º dia de gestação (BRYDEN et al., 1972; LATSHAW, 1987; NODEN; LAHUNTA, 1990), e em seguida aumenta rapidamente. A amniogênese inicia-se a partir das pregas somatopleurais, o âmnion cresce para fora e sobre o disco embrionário e envolve o embrião em crescimento. Desse momento em diante começa a formar um saco repleto de fluidos, onde o feto irá flutuar até o final da gestação.

O alantóide nunca se estende sobre o topo do âmnion, sendo que o alantoâmnion se forma somente onde as duas membranas entram em contato. As membranas alantóide e amniótica obliteram completamente o exoceloma em fetos de bovinos com 6 cm de CR. Nos embriões menores o alantóide e o âmnion ainda não estão completamente fusionados (TIEDEMANN, 1982).

A parte embrionária do alantóide não rodeia o âmnion, nem se dispõe sobre o dorso do embrião, pois essas estruturas apresentam mesoderma vascularizado (LATSHAW, 1987).

Alguns autores denominam amniocórion, a porção do coriön relacionada ao âmnion (BARONE, 1986). O amniocório e o alantocórion fazem contatos com as carúnculas e participam da formação dos placentônios. Os placentônios amniocoriônicos são funcionais porque sofrem invasão de vasos sanguíneos oriundos do alantóide (LATSHAW, 1987).

O âmnion é formado por células epiteliais que apresentam morfologia uniforme e não difere dos outros mamíferos (STEVEN et al., 1982). As células que constituem o epitélio amniótico são pavimentosas, contínuas e organizadas, formando um epitélio pavimentoso simples, semelhante ao epitélio do alantóide. O epitélio amniótico está apoiado em uma camada de tecido conjuntivo embrionário, que constitui o mesênquima (ASSIS NETO, 2005).

É proveniente de dobras do ectoderma embrionário e assim como o coriön, recebe uma camada de suporte mesenquimal (LEISER; KAUFMANN, 1994). A parede da cavidade amniótica dos ruminantes é transparente, pouco vascularizada e apresenta uma extensa relação com o coriön. Sua face interna é caracterizada pela



presença de inúmeros relevos ou placas ricas em glicogênio que se desenvolvem em torno do terceiro mês, recobrando o cordão umbilical (BARONE, 1976; NODEN; LAHUNTA, 1990; SCHWARZE, 1972).

A cavidade do âmnion se encontra repleta de líquidos nos primeiros meses de gestação (SCHWARZE, 1972) que é responsável pela proteção adequada do embrião (REEVES et al., 1972). A quantidade de líquido amniótico aumenta rapidamente na primeira metade da prenhe, até alcançar 5 litros (BARONE, 1986). Em bovinos, o volume de líquido alantóide supera o amniótico durante o primeiro terço da gestação, invertendo essa relação durante o segundo terço, terminando com uma nova superação de líquido alantóide (6 a 9 litros) no terço final (NODEN; LAHUNTA, 1990).

O peso do feto aumenta mais que o âmnion com o decorrer da gestação, mas este último se estende até os cornos do saco embrionário. À medida que o feto progride na gestação, o âmnion adquire a forma de um ovo alargado. Uma grande parte dos cornos permanece isenta de âmnion, só contendo alantóide (SCHWARZE, 1972).

#### 3.12.2.4 *Morfologia do saco vitelino*

A importância do saco vitelino como órgão hematopoiético e placentário é bem conhecida nos roedores (DEREN et al., 1966; ENDERS, 1970; HAAR; ACKERMAN, 1971; SLADE, 1970). Mas esse tipo de informação é escassa para mamíferos domésticos. Sua estrutura, tempo de aparecimento e desaparecimento e distinção física variam grandemente de espécie para espécie e são pobremente descritas na literatura (MOSSMAN, 1987).

Os aspectos morfológicos e funcionais do saco vitelino e seus fenômenos de trocas com a cavidade coriônica não tem sido expressivamente estudado em ruminantes. Somente Russe et al. (1992) investigaram alguns eventos iniciais do desenvolvimento embrionário do epitélio vitelino em bovinos.

O epitélio do saco vitelino é composto por três camadas: uma camada única de células endodérmicas (endoderme), revestindo a cavidade vitelina; uma camada

simples mesotelial, voltada ao exoceloma (mesotélio); e uma camada intermediária mesenquimal vascular (mesênquima) (ASSIS NETO, 2005).

Kathleen (2005) descreveu o saco vitelino em mamíferos como sendo uma estrutura em bicamada derivada das células do mesoderma e do endoderma. As células viscerais do endoderma formariam um epitélio colunar com uma borda repleta de vilosidades. As células do mesoderma do saco vitelino seriam responsáveis pelas primeiras células sanguíneas do embrião em ilhas de sangue.

O endoderma apresenta células globosas e colunares que repousam sobre o mesênquima. Este se encontra repleto de vasos e ilhas eritroblásticas primárias. Os eritroblastos são encontrados em grupos, formando ilhas de sangue junto com vasos de diferentes tamanhos. Estas células podem ser encontradas tanto dentro como fora dos vasos (ASSIS NETO, 2005).

O saco vitelino se desenvolve de partes anexas ao intestino delgado e é constituído das camadas de epitélio ectodérmico acompanhadas pelo mesênquima fetal vascularizado, mas não participa da troca materno-fetal (BJÖRKMAN, 1986).

Nos ruminantes, o saco vitelino involui em um curto período de tempo (MOSSMAN, 1987; NODEN; LAHUNTA, 1990), e, a partir da terceira semana (BARONE, 1986) e no 25º dia de gestação (BRYDEN et al., 1972; MARSHALL, 1952) ele é reduzido a um grupo sólido de células com poucos vasos sanguíneos. Seus vestígios não são mais encontrados até o final da prenhe (LATSHAW, 1987; MARSHALL, 1952; WOODING; FLINT, 1994). Essa estrutura está separada do coriôn, o qual se atrofia precocemente e degenera-se sem deixar vestígio (NODEN; LAHUNTA, 1990; SCHARWZE, 1972).

Inicialmente o saco vitelino é grande e vascularizado, sendo completamente envolvido pelo celoma e separado do coriôn no 20º dia de gestação de bovinos, sendo completamente vascularizado nesta data. Entretanto, apresenta apenas uma existência transitória, pois é precocemente deslocada pelo rápido crescimento do alantóide (LATSHAW, 1987; NODEN; LAHUNTA, 1990).

Nos ovinos e bovinos o saco vitelino é composto de uma porção alargada semelhante a um saco, localizada abaixo do embrião. Suas duas extremidades seguem o curso alongado do trofoblasto. A parede dessa estrutura é especialmente bem vascularizada na porção alongada do mesmo. Eritropoiese primária ocorre dentro de seus capilares sanguíneos (RUSSE et al., 1992).

Embora seja uma estrutura transitória, o saco vitelino tem várias funções importantes. Ele serve para nutrir a placenta, permanente até que essa seja formada. Os primeiros eritrócitos embrionários são formados no mesoderma esplânico do saco vitelino. Alguns dos vasos sanguíneos são mantidos como principais vasos sanguíneos viscerais nos adultos entre outras funções.

Em algumas espécies, o saco vitelino se funde localmente com o coriôn, constituindo uma placenta coriovitelina, sendo, nesse caso, os vasos vitelinos mais importantes que seu epitélio para as trocas materno-fetais. A placenta coriovitelina se apresenta nos mamíferos como uma estrutura temporária que existe quando o exoceloma se estende na área vascular, se abre na esplanchnopleura vascular e na somatopleura avascular (coriôn verdadeiro). A placenta coriônica vem a existir independentemente da placenta coriovitelina e obviamente representa um passo na formação da placenta corioalantóidea, uma vez que, esta se tornará vascularizada por vasos alantoidianos (AMOROSO, 1959).

Uma placenta coriovitelina é essencial para a sobrevivência embrionária e representa um período crítico no desenvolvimento fetal de bovinos (GREENSTEIN et al., 1958).

## 4 MATERIAL E MÉTODO

O projeto proposto foi conduzido após aprovação da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

### 4.1 Coleta de material

Foram utilizados, 96 úteros gestantes de fêmeas bubalinas provenientes de diversas propriedades encaminhadas ao abatedouro por seus proprietários e que por ventura estavam gestantes. O material foi retirado do Matadouro Municipal da cidade de Macapá-AP.

Apenas os úteros em início de gestação foram analisados para obtenção de embriões concebidos por monta natural. Após a localização do corpo lúteo em um dos ovários do útero coletado, iniciou-se a abertura do útero por incisão dorsal a cérvix, imediatamente após a confirmação da presença das membranas fetais, o corno gestante foi separado do restante do útero com auxílio de *clamps*, e então soluções aquosas de paraformaldeído 3%, formol tamponado 10%, glutaraldeído 2,5%, ou Bouin foram injetadas na luz do órgão, e o material foi imerso na mesma solução (Figura 1).

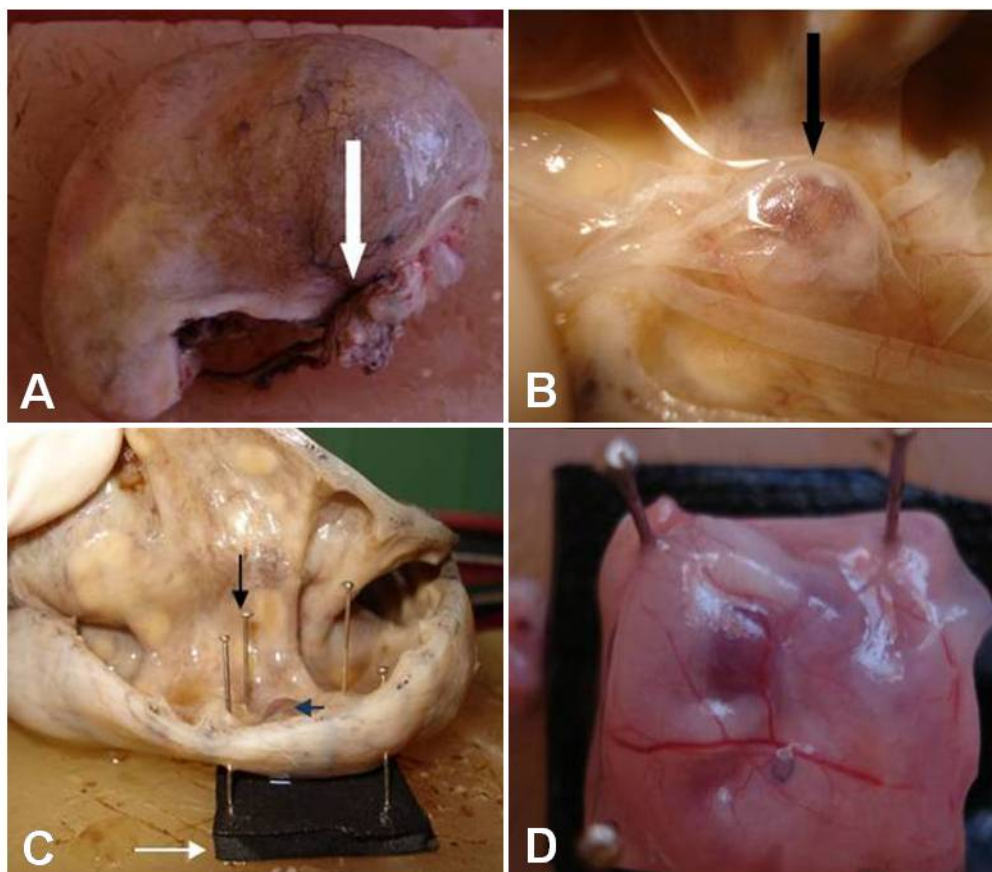


Figura 1: Fotografia demonstrando o procedimento de fechamento do corno uterino gestante com auxílio de barbante (seta branca) após identificação de gestação (A), em (B) abertura do corno e localização do embrião (seta preta), (C) fixação do embrião (seta azul) por meio dos alfinetes (seta fina preta) na placa de borracha (seta branca); em (D) o embrião já foi removido do corno

Após 48 horas de fixação por imersão, o corno uterino gestante foi incisado e o embrião juntamente com suas membranas fetais foi retirado; e posteriormente acondicionado em embalagem apropriada, para então ser transportado para processamento das análises no Laboratório de Histologia e Embriologia da FMVZ-USP - São Paulo/SP.

Os embriões foram distribuídos em grupos de acordo com sua idade, que foi estimado conforme metodologia adotada por Evans e Sack (1973) e Noden e Lahunta (1990), e foram mensuradas a distância occípito-sacral (“Crown-rump”/CR) partindo da crista nugal em direção a última vértebra sacral (Figura 2) com auxílio de um paquímetro com divisão em milímetros. Além das medidas relacionadas foram também avaliadas características morfológicas externas do desenvolvimento embrionário para definir o período gestacional.

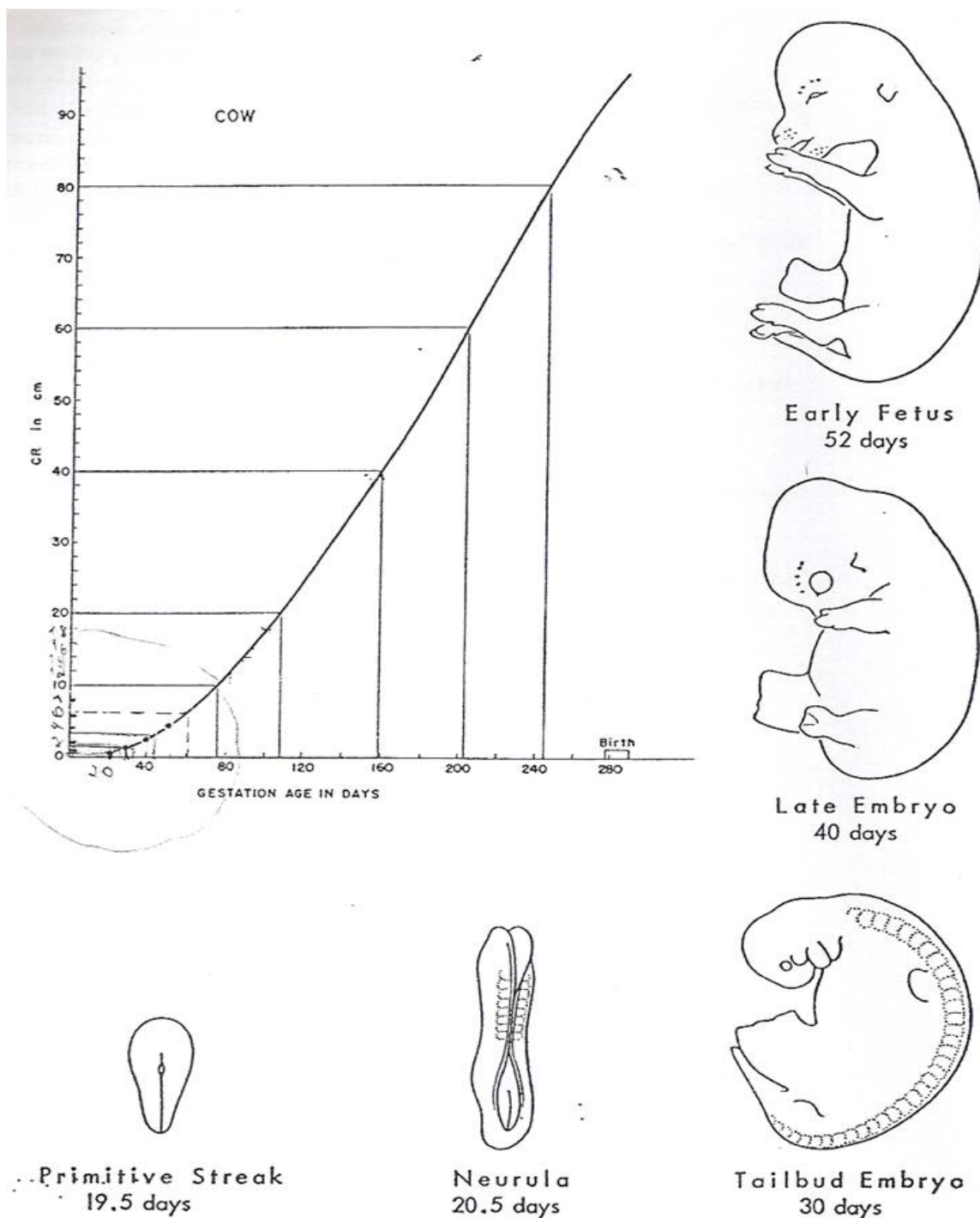


Figura 2: Figura extraída do trabalho de Evans e Sack (1973), demonstrando a curva de crescimento dos embriões de bovinos por meio da mensuração do comprimento crânio-caudal do animal

Após a mensuração do CR, os dados colhidos dos embriões foram inseridos em uma tabela contendo o Crow-rump, a idade estimada em dias e o peso daqueles que foram desconectados das membranas fetais.

## 4.2 Estudo macroscópico e morfométrico

Foram avaliados parâmetros relativos ao tamanho de 96 embriões, como as medidas de comprimento (crânio caudal) do mesmo através de mensuração com auxílio de um paquímetro com divisão em milímetros. Os embriões foram pesados utilizando-se balança eletrônica analítica – 200gr – 0,001 gr.

## 4.3 Microscopia de Luz

Os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído 3%, formaldeído 10% ou Bouin, em seguida lavados em solução salina fosfato (PBS<sup>7</sup>) e desidratados em uma série de etanóis de concentração crescente de 70 a 100%, só então foram diafanizados em xilol e incluídos em paraplast<sup>®8</sup>.

Após inclusão foram feitos cortes de 5 µm de espessura e corados por hematoxilina-eosina (HE) e picrossírius. Em seguida foi feita a montagem das lâminas e análise das mesmas. Fotomicrografias finalizam o processo.

## 4.4 Imunohistoquímica

A detecção de linhagem de células pluripotentes nos embriões bubalinos procedeu-se por meio do protocolo esquematizado. Mas antes os embriões fixados em paraformaldeído a 3,5% passaram por todo o processo de desidratação, diafanização e inclusão em paraplast; em seguida cortes de 5µm foram depositados em lâminas silanizadas sempre em número suficiente para haver ao menos um dos cortes como controle negativo.

Foram utilizados os anticorpos Oct-4, vimentina e PCNA.

---

<sup>7</sup> Dulbecco's Phosphate Buffer Saline – DPBS, Gibco Co, USA.

<sup>8</sup> Paraplast Embedding Media\_Paraplast Plus, Sigma, Oxford Lab., USA.

Após a desparafinização das lâminas em estufa e em seguida a passagem por três baterias de xilol de 30 minutos cada, os cortes sofreram rehidratação em alcoóis regressivos de 100 a 70%, seguidos de água corrente, água destilada e PBS no qual as lâminas ficaram depositadas por 12 hs (overnight). No dia seguinte iniciou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio por 20 minutos e novamente alcoóis 95, 70% e água destilada por 5 min cada. Após o bloqueio os cortes receberam tampão citrato fervente por 5 min para a abertura dos sítios de ligação, em seguida deu-se o esfriamento da solução por cerca de 20 min e a lavagem das lâminas em água destilada e PBS ambos por 5 min cada. A próxima etapa consistiu no bloqueio das proteínas indesejáveis por meio do protein block (DAKO) por 45 min em câmara úmida; em seguida foram depositadas uma gota do anticorpo primário (Oct 4; PCNA ou vimentina) diluído na proporção desejada (1:400; 1:300 e 1:400 respectivamente). A reação permaneceu nas lâminas em câmara úmida por 12 horas (overnight) em geladeira. Após a limpeza das lâminas banhadas em PBS por três vezes de 5 min se deu a aplicação do anticorpo secundário que permaneceu nos cortes por mais 45 min em câmara úmida. Em seguida nova lavagem com PBS 3 vezes de 5 min cada antecedeu a aplicação da estreptavidina nos cortes por novos 45 min em câmara úmida. Após nova lavagem com PBS por 5 min três vezes seguidas finalmente iniciou-se o processo de revelação com DAB por mais 5 min. E, seguiram-se as baterias de álcool 95 e 100%, álcool xilol e xilol para somente então serem montadas as lâminas com cola permount e lamínula para proteção dos cortes. Sempre em cada uma das lâminas, um dos cortes na etapa de recebimento do anticorpo primário recebia solução de PBS ficando assim sem a reação imunohistoquímica para servir de controlo do protocolo.

#### **4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para esta técnica os embriões foram fixados em glutaraldeído 2,5%, lavados em tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4, e pós fixados em tetróxido de ósmio a 1%, seguidas de desidratações a seco em ponto crítico (Balzers CPD 020), colocação em suportes metálicos e revestimento em ouro (“sputtering” Emitech K550). Para observar tais resultados foi utilizado o microscópio eletrônico ME Leo 435 VP.



#### **4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As membranas fetais foram fixadas em glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato 0,1M, PH 7.2. As membranas foram individualizadas e fragmentos separados do cório, alantóide, âmnio e saco vitelínico. Ao término da fixação, o material foi lavado em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, PH 7.4 por três vezes durante dez minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora. Após novas lavagens em tampão fosfato, os fragmentos de membrana foram desidratados em álcool etílico a 50%, 70%, 90% e 100% e lavados em óxidos de propilenos.

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

Com a finalidade de localizar e caracterizar as áreas de interesse, os blocos foram cortados em ultra-micrótino Leica ULTRACUT UCT®. Cortes semifinos de 1 µm de espessura foram obtidos, corando-se a quente com solução de borato de sódio a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de Toluidina para observação ao microscópio de luz.

Os cortes ultrafinos de cerca de 60 nm de espessura foram colhidos em telas de cobre e constatados pelo acetado de uranila 2% em água destilada por 5 minutos e pelo citrato de chumbo 0,5% em água destilada durante 10 minutos. As observações e eletromicrografias sub-celulares foram realizadas no microscópio eletrônico ZEISS EM-94S2 e JEOL CX-II-100.

#### **4.7 Análise dos resultados**

Os resultados obtidos foram analisados por meio de captura de imagens, confronto com dados de referências previamente consultadas e observação.

## 5 RESULTADOS

Os embriões coletados foram separados de suas membranas fetais, pesados e medidos, após as mensurações, um gráfico baseado no modelo anterior de Evans e Sack foi confeccionado (Gráfico 1) e foram aplicados dois métodos mencionados na revisão para determinar as idades, os resultados de todas as mensurações e aplicações em fórmulas encontram-se na tabela 1.

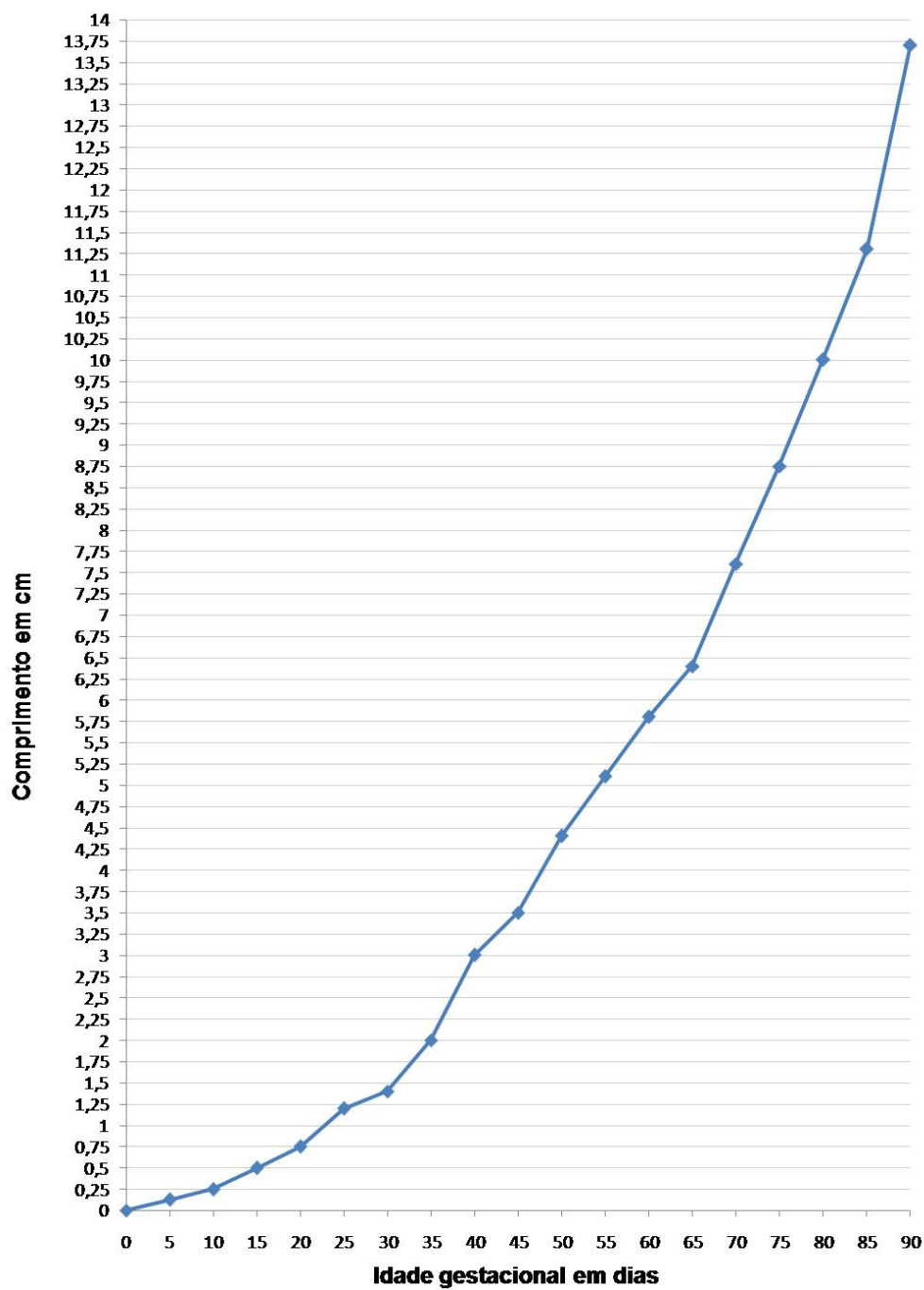


Gráfico 1: Curva de comprimento crânio caudal (CR) de embriões/fetos bubalinos correlacionada a idade gestacional estimada em dias

Tabela 1 - Identificação dos embriões coletados, comprimento em centímetros, idade estimada e peso – São Paulo, (continua) 2009

Grupo	Identificação	CR (cm)	Idade baseada em Evans e Sack	Idade baseada em Abdel-Raouf e El Nagar	Peso (g)	Grupo	Identificação	CR (cm)	Idade baseada em Evans e Sack	Idade baseada em Abdel-Raouf e El Nagar	Peso (g)
I	44_08	>0,3	10	30	0,019						
	45_08	>0,3	10	30	0,019						
	19_07	0,3	12	30	-		16_08	1,7	32	35	0,748
	43_08	0,4	13	30	0,051		21_08	1,7	32	35	1,079
	11_07	0,5	15	30	-		38_08	1,7	32	35	0,818
	12_07	0,5	15	30	-		18_08	1,9	34	37	1,040
	06_08	0,5	15	30	0,036		29_08	1,9	34	37	0,897
II	31_05	0,6	17	31	0,014	05_05	2,0	35	37	1,138	
	06_07	0,6	17	31	-	03_07	2,0	35	37	-	
	13_07	0,6	17	31	-	37_08	2,0	35	37	1,804	
	16_07	0,6	17	31	-	07_05	2,1	36	38	0,675	
	08_08	0,6	17	31	0,069	20_08	2,1	36	38	1,342	
	17_08	0,6	17	31	0,074	VI	24_08	2,1	36	38	1,168
	25_08	0,6	17	31	0,167	32_08	2,2	36	38	1,562	
	29_05	0,7	19	31	0,048	33_08	2,2	36	38	1,364	
	04_07	0,7	19	31	-	02_07	2,3	36	39	-	
	05_07	0,7	19	34	-	09_08	2,3	36	39	1,886	
	07_07	0,7	19	31	-	36_08	2,4	37	40	1,804	
	09_07	0,7	19	34	-	26_08	2,5	37	40	2,086	
	14_07	0,7	19	31	-	30_08	2,5	37	40	2,147	
	18_07	0,7	19	31	-	31_08	2,6	38	40	2,215	
	01_08	0,7	19	31	0,130	58_08	2,6	38	40	3,379	
04_08	0,7	19	31	0,111	19_08	2,8	39	41	2,714		

Tabela 1 - Identificação dos embriões coletados, comprimento em centímetros, idade estimada e peso – São Paulo, (conclusão) 2009

III	15_08	0,7	19	31	0,089		23_08	2,8	39	41	2,596	
	10_07	0,8	21	32	-			59_08	2,9	39	41	4,319
	14_08	0,8	21	32	0,107	VII	32_05	3,1	41	42	4,317	
	39_08	0,8	21	32	0,096		56_08	3,3	43	43	5,551	
	10_08	0,9	22	32	0,182		34_05	3,4	44	44	4,398	
	20_05	1,0	23	33	0,288		47_08	3,5	45	44	4,688	
	IV	02_08	1,0	23	33	0,278	VIII	53_08	3,5	45	44	7,727
		22_08	1,1	24	33	0,352		46_08	3,8	46	45	4,652
27_05		1,2	26	34	0,820	IX	55_08	3,8	46	45	7,167	
08_07		1,2	26	34	-		11_05	4,2	49	48	6,198	
03_08		1,2	26	34	0,418		48_08	4,2	49	48	6,516	
05_08		1,2	26	34	0,275		57_08	4,4	50	49	12,970	
42_08		1,2	26	34	0,274	X	51_08	4,5	51	49	25,930	
17_07		1,3	26	34	-		50_08	4,7	52	50	9,737	
12_08		1,3	26	34	0,303		36_05	4,8	53	50	15,077	
13_08		1,3	26	34	0,352		34_05	5,0	54	51	8,858	
V		41_08	1,3	26	34	0,316		21_05	5,1	55	51	7,800
		15_07	1,4	28	35	-		09_05	5,2	56	52	9,128
	11_08	1,4	28	35	0,427	54_08		5,2	56	52	19,532	
	01_07	1,5	30	35	-	34_08		5,3	57	52	9,370	
	27_08	1,5	30	35	0,636	22_05		5,4	58	53	9,555	
	40_08	1,5	30	35	0,496	49_08		5,4	58	53	17,366	
	28_05	1,6	32	35	0,534	52_08		5,5	59	54	21,608	
	28_08	1,6	31	36	0,640	60_08		6,0	60	55	31,268	
35_08	1,6	31	36	0,668	61_08	6,2	<60	56	28,492			
	07_08	1,7	32	36	0,671							

## 5.1 Características macroscópicas

Para facilitar a visualização das características macroscópicas e também para fácil entendimento do crescimento e evolução da embriogênese os animais foram divididos em grupos, relacionados com a estimativa de sua idade gestacional.

### 5.1.1 GRUPO I

Embriões entre 10 e 15 dias de gestação, representados na tabela 1 como Grupo I apresentam em média de 0,3 a 0,5cm de CR, podem ser encontrados no terço médio do corno uterino gestante que não apresenta características externas que denunciem uma gestação. O corno uterino não gestante não possui sequer alongamentos de córion que aparecem somente com a evolução gestacional. Já o corno uterino gestante possui filamentos de córion muito fino e longo que corre por todo o comprimento do mesmo.

Possuem âmnion partindo da porção média do celoma, com pouco líquido em seu interior, contornando o embrião e adquirindo seu formato e com sua porção caudal mais larga que a cranial. O saco vitelino é longilíneo em formato de “T” com cada uma de suas extremidades medindo cerca de 4 cm e sua porção central, muitas vezes sendo maior ou equivale ao tamanho total do embrião.

Embriões com tamanho inferior a 0,3cm (10 dias de gestação) só podem ser identificados com auxílio de lupas, e mesmo com o uso de tais instrumentos só conseguimos identificar uma linha fina e retilínea, com distinção das regiões cranial e caudal apenas pela detecção das membranas alantoidea, amniótica e vitelina. É comum que esses exemplares apresentem o alantóide em formato de “rabo de baleia” o que identifica sua porção caudal (Figura 3). Nota-se ainda a abertura completa do tubo neural nos mesmos.

Animais com 0,3cm apresentam macroscopicamente definidos apenas o formato alongado, duas esferas representam coração e fígado respectivamente e encontram-se fora da cavidade celomática (Figura 3). Animais com 0,5cm já

possuem formato em letra C, apresentam três depressões que sugerem os arcos branquiais, e à divisão do intestino em porções cranial, média e caudal (Figura 4).

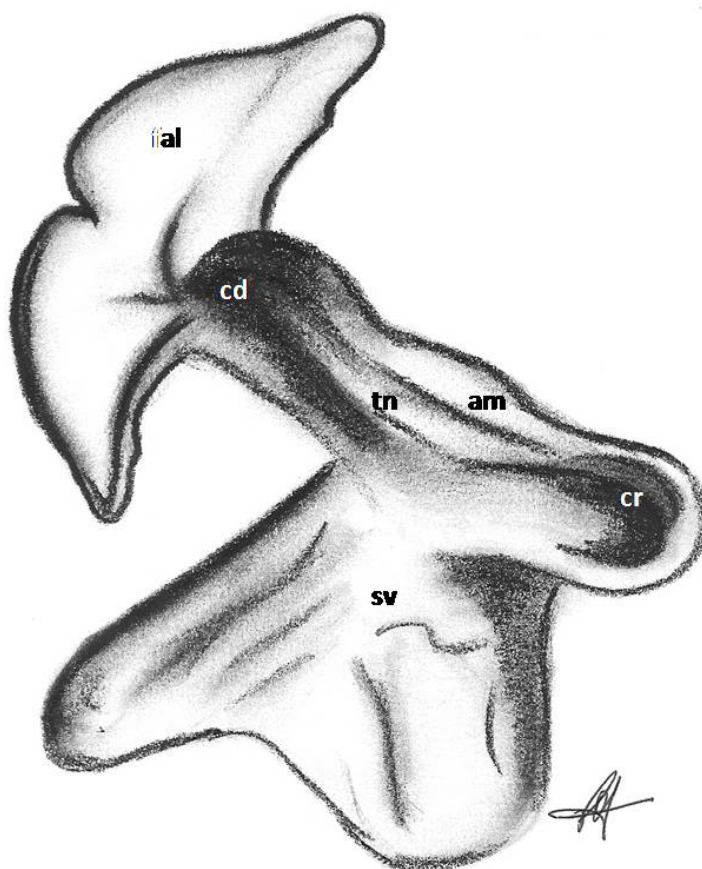
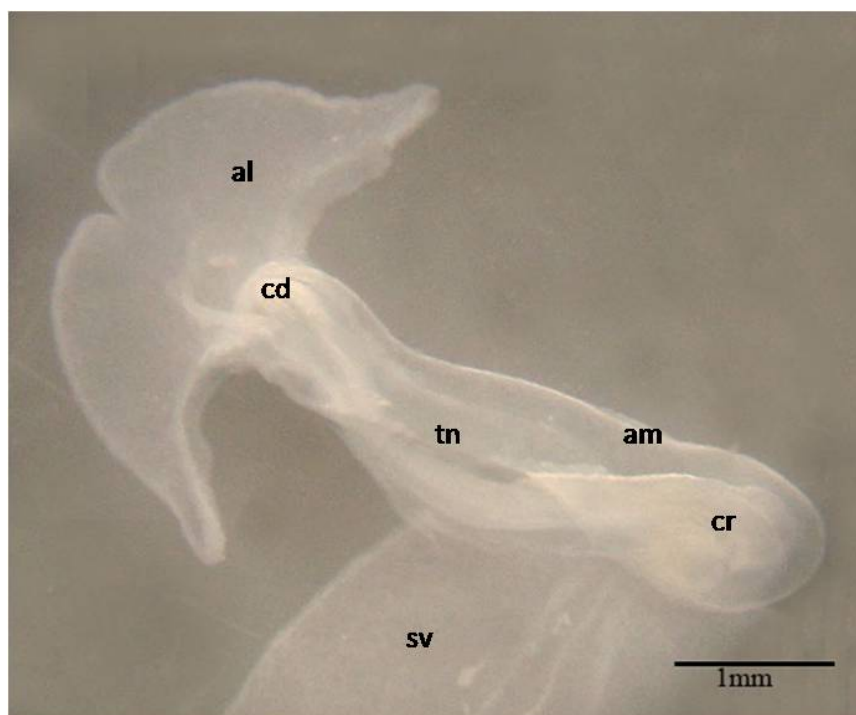


Figura 3 – Fotografia e desenho esquemático correspondente ao embrião do GI de 12 dias de gestação (CR>0,3cm). Am, âmnion; cd, caudal; cranial, tn, tubo neural; al, alantóide; sv, saco vitelino; Cr, cranial

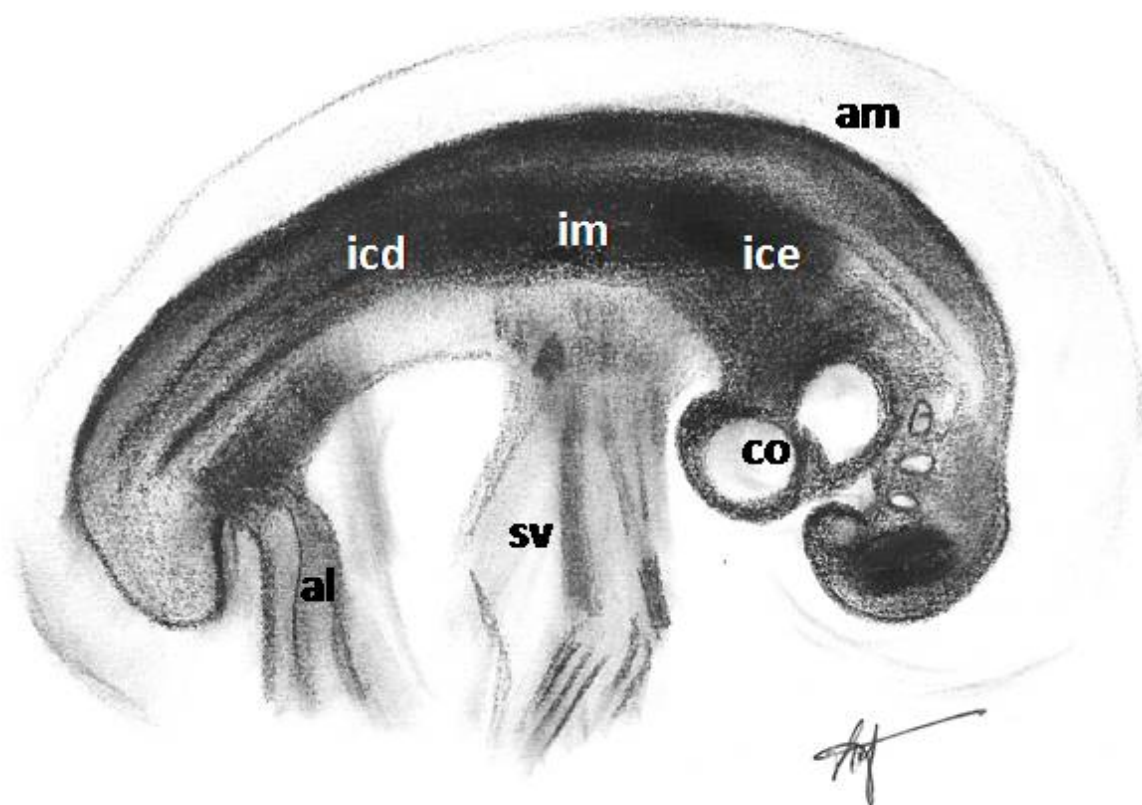
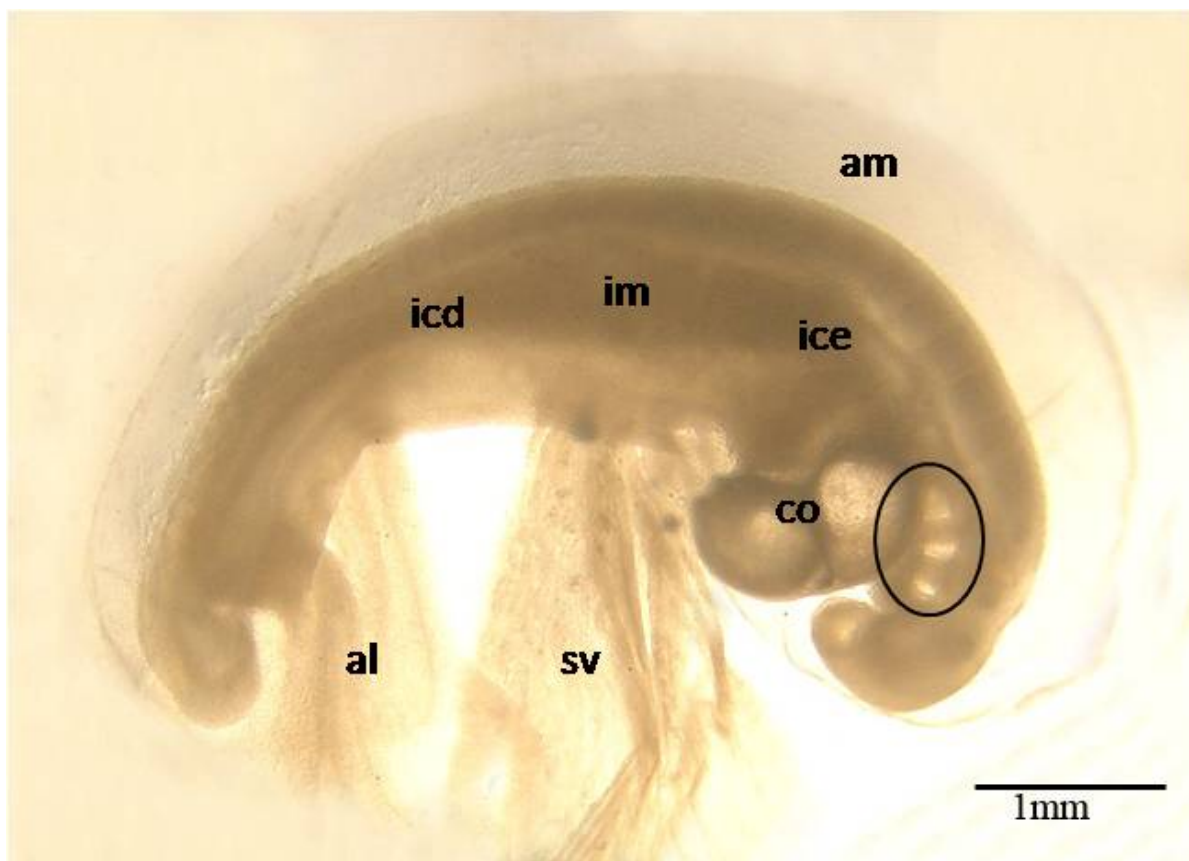


Figura 4 – Fotografia e desenho esquemático correspondente ao embrião do GI de 15 dias de gestação (CR=0,5cm). Círculo - arcos branquiais; am, âmniot; co, coração; ice, intestino cranial; im, intestino médio; icd, intestino caudal; sv, saco vitelino; al, alantóide



### 5.1.2 GRUPO II

Embriões pertencentes ao Grupo II com idade gestacional entre 16 e 20 dias apresentam 0,6 a 0,7cm de CR, também possuem o formato em “C”. Quatro depressões transparentes formam os arcos branquiais. Pode-se visualizar o coração dividido em duas câmaras. O fígado e intestino primitivo apresentam suas divisões, cervical, média e caudal partindo da região do fígado e contornando toda a região dorsal do corpo do embrião afinando na área da crista mesonéfrica. A crista mesonéfrica parte justaposta a porção ventral do embrião, próxima ao pedículo vitelino. É notada a ausência de brotos de membros, ou somente indício do brotamento dos membros torácicos. A presença da aorta dorsal e início de suas ramificações dá origem à vascularização da cabeça. Existe uma ampla distribuição dos vasos circulatórios, uma depressão transparente do local denominado placódio óptico despigmentado e visualização do tubo neural (Figura 5).

Quanto às membranas fetais, nesse período o saco gestacional ainda encontra-se em apenas circunscrito à um dos cornos uterinos tomando apenas o terço médio do corno uterino e projetando alongamentos muito finos dirigidos à extremidade do corno uterino. Não há sinal de implantação nem tampouco formação de cotilédones na região de córion; o alantóide possui quantidade relevante de líquido, porém ainda encontra-se separado do córion. O âmnion segue o contorno do embrião e o saco vitelino possui duas extremidades, menos alongadas e uma porção central avantajada (Figura 7).

À microscopia eletrônica de varredura observamos a presença de quatro arcos branquiais, sendo dois deles divididos por um largo sulco branquial; ainda visualizamos a silhueta cardíaca, também com um sulco que delimita a divisão entre átrio e ventrículo em um de seus processos de rotação para divisão das câmaras. O fígado é bem destacado e proeminente nessa fase e há a nítida diferença de superfície epitelial do encéfalo em sua porção cranial. Não há presença dos brotos dos membros torácico e pélvico (Figura 6).

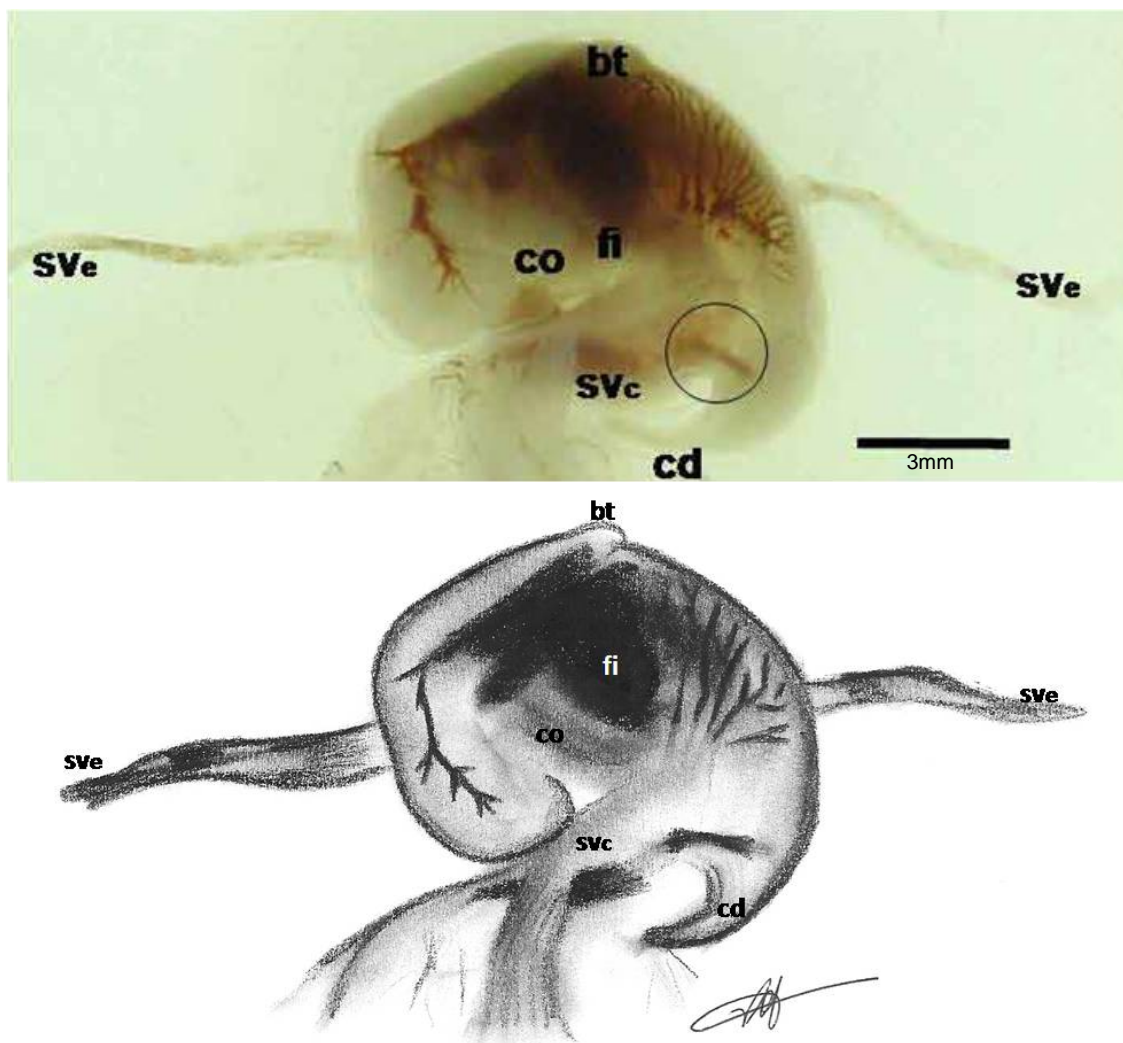


Figura 5 – Fotografia e desenho esquemático correspondente ao embrião do GII de 19 dias de gestação (CR=0,7cm). Círculo – pedículo vitelino; bt, broto do membro torácico; cd, cauda; co, coração; fi, fígado; svc, saco vitelino porção central; sve, saco vitelino extremidade

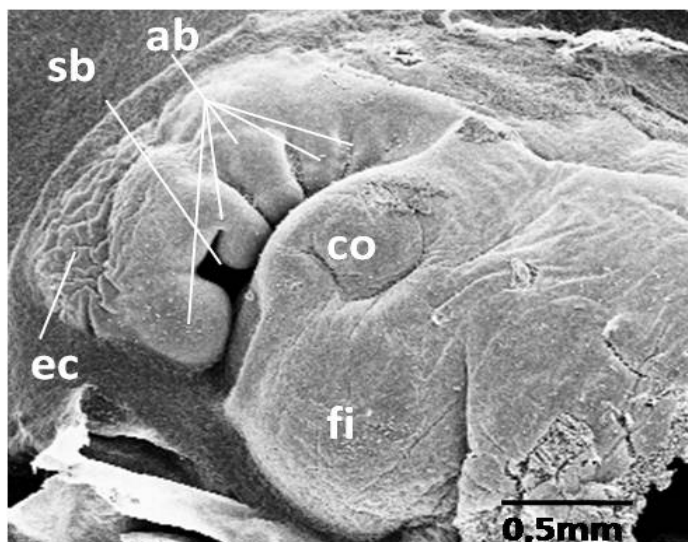


Figura 6 – Fotografia do embrião do GII de 19 dias de gestação (CR=0,7cm). ab, arcos branquiais; sb, sulcos branquiais; co, coração; fi, fígado; ec, encéfalo cranial

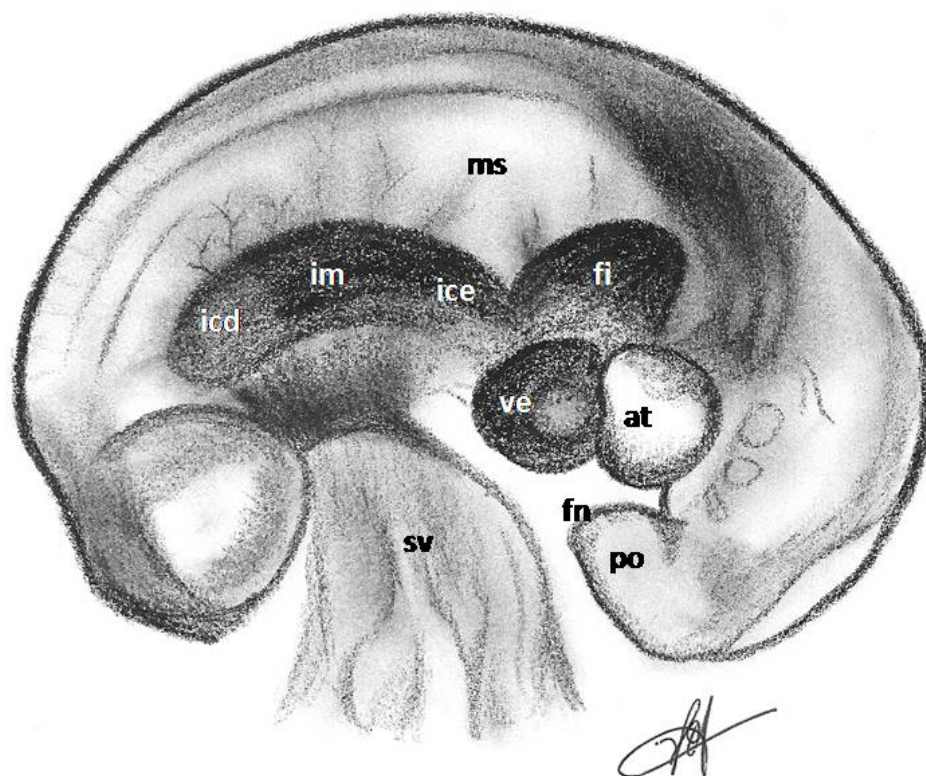
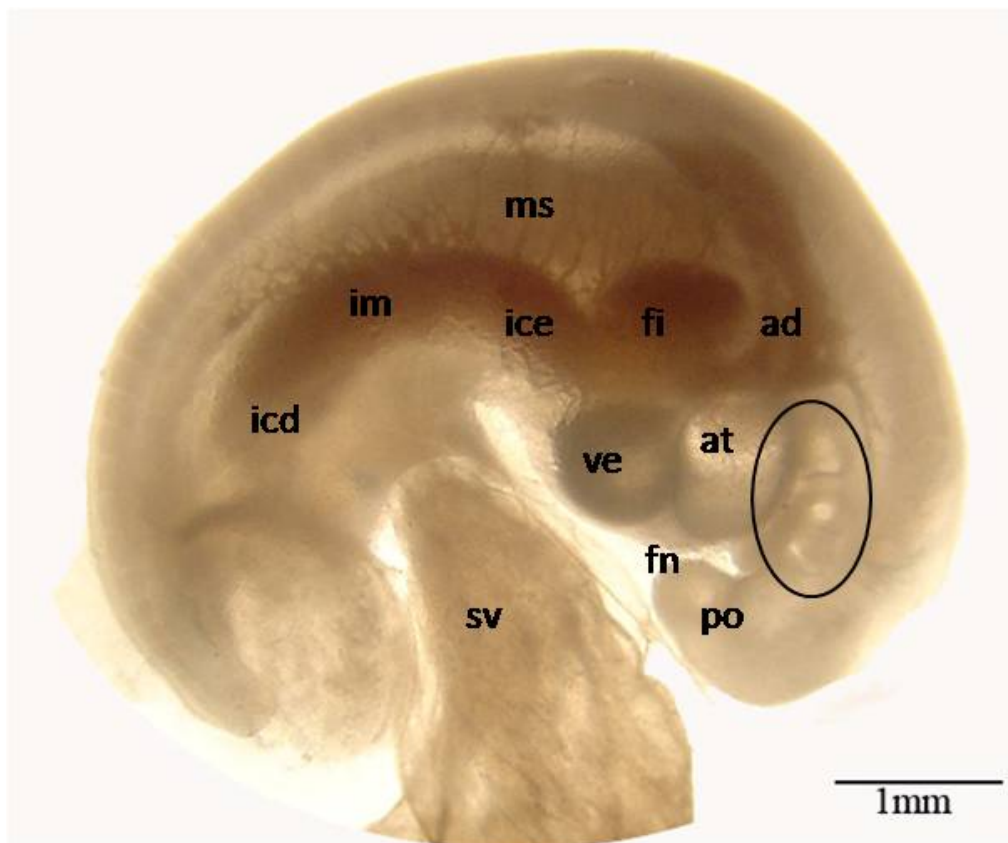


Figura 7 – Fotografia e desenho esquemático correspondente ao embrião do GII de 19 dias de gestação (CR=0,7cm). Círculo: arcos branquiais; ad, aorta dorsal; ve, ventrículo; at, âtrio; fi, fígado; ice, intestino cervical; icd, intestino caudal; im, intestino médio; ms, mesonefro; sv, saco vitelino; po, placódio óptico; fn, fosseta nasal

### 5.1.3 GRUPO III

Embriões com idades compreendidas entre 21 a 25 dias de gestação possuem de 0,8 a 1,1cm de CR. Nesta fase é possível visualizar os somitos caudais e craniais. Se contados chegam a 22 pares. Os brotos torácico e pélvico se apresentam em grau de desenvolvimento equivalentes, sendo o torácico sutilmente mais desenvolvido (Figura 9). A região cefálica é bem proeminente e são visíveis coração, fígado, intestino e rins primitivo, além da aorta.

Na microscopia eletrônica de varredura, além das mesmas estruturas visíveis macroscopicamente, é possível identificar os arcos faríngeos mandibular, maxilar e oral, e os placódios óptico e ótico (Figura 8).

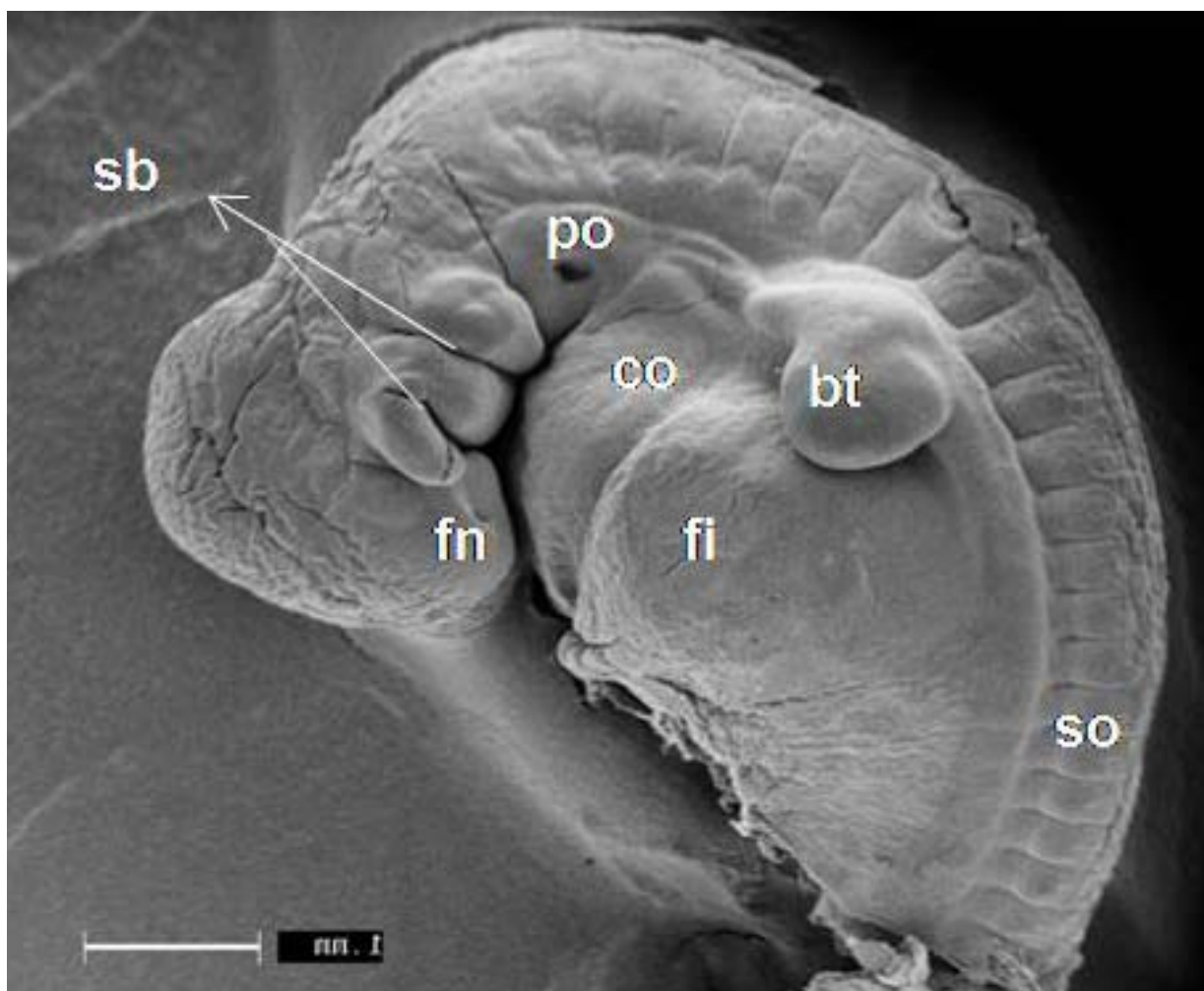


Figura 8 – Fotografia do embrião do GIII de 23 dias de gestação (CR=1,0cm). bt, broto do membro torácico; bp, broto do membro pélvico; cc, curvatura cervical; cd, cauda; co, coração; fi, fígado; fn, fosseta nasal; po, placódio óptico; sb, sulcos branquiais; so, somitos. Barra= 1mm

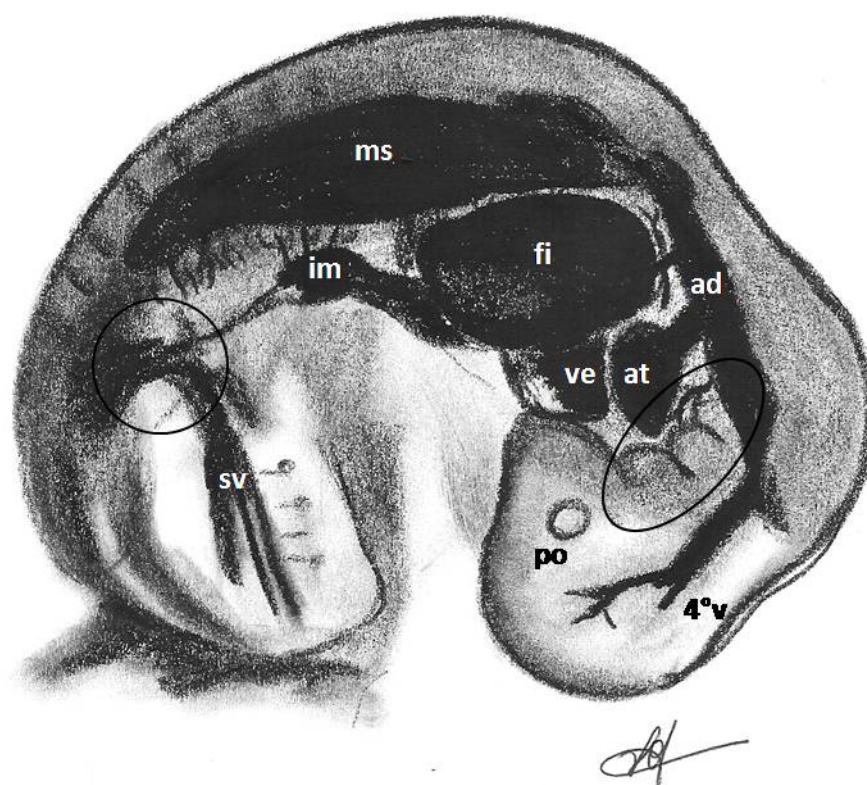
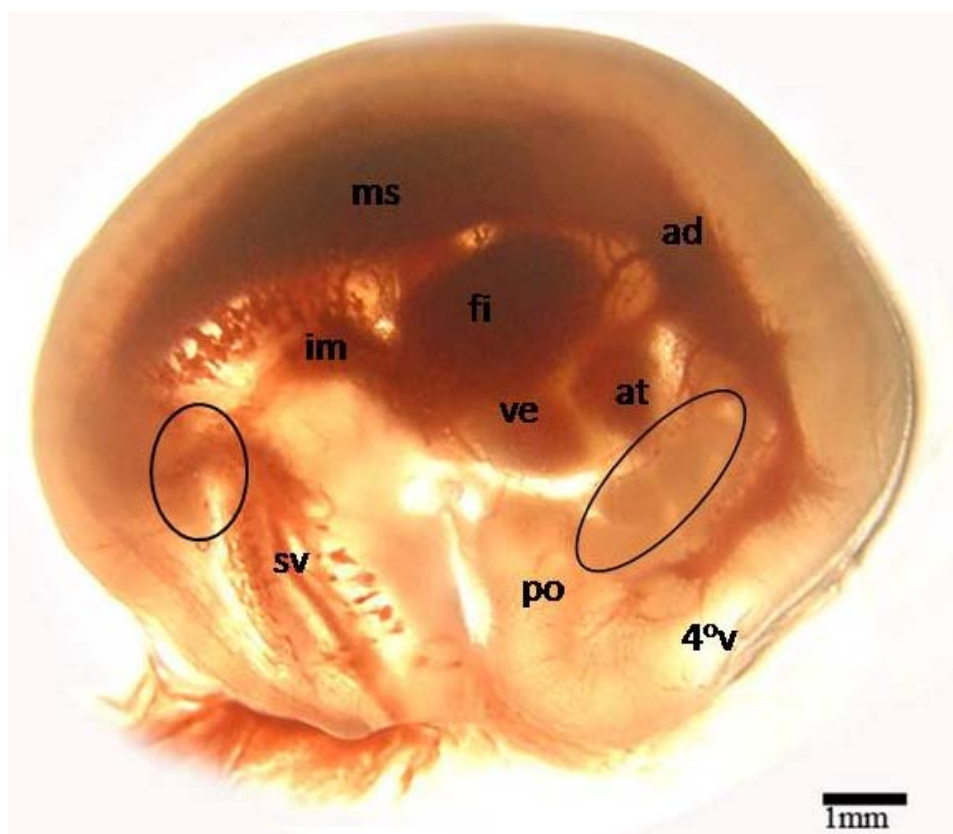


Figura 9 – Fotografia e desenho esquemático correspondente ao embrião GIII (de 23 dias de gestação CR=1,0 cm). Círculo maior, arcos branquiais; círculo menor, pedículo vitelino; 4°v, quarto ventrículo; at, átrio; ve, ventrículo; fi, fígado; po, placódio óptico; sv, saco vitelino; im, intestino; ms, mesonefro; ad, aorta dorsal

#### 5.1.4 GRUPO IV

Animais com 1,2 a 1,5 cm de CR possuem aproximados 26 a 30 dias de gestação. Nesses, vemos o placódio óptico levemente pigmentado, neuróporo cranial aberto expondo o chamado 4º ventrículo, neuróporo caudal fechado, membro torácico em estágio de desenvolvimento avançado, broto do membro pélvico ainda em crescimento e fígado volumoso, preenchendo praticamente toda a cavidade abdominal (Figura 10).

Também são constatados coração menor que o fígado, porém também visível e avantajado já no interior da cavidade celomática, onde é nítida uma numerosa quantidade de vasos, os quais formam uma congruência próxima à área da crista mesonéfrica. Trata-se do pedículo vitelino onde vasos se fundem. Dando origem à um grande vaso que caminha para fora do embrião, definindo conexão existente entre o intestino primitivo e a membrana vitelina. Os três arcos branquiais, e a fosseta nasal, bem como o encéfalo médio e a curvatura cervical são notados. A cauda está bem definida e longa. Observa-se o âmnion em formato arredondando envolvendo o embrião e sendo nutrido por vasos do alantóide (Figura 10).

A microscopia eletrônica de varredura denuncia um pedículo umbilical pronunciado, presença dos brotos torácico e pélvico em formato de pá; fígado ainda de tamanho avantajado, não há definição entre coração e fígado e os arcos branquiais agora em numero de três nessa fase ainda possuem sulcos fortemente marcados (Figura 11).

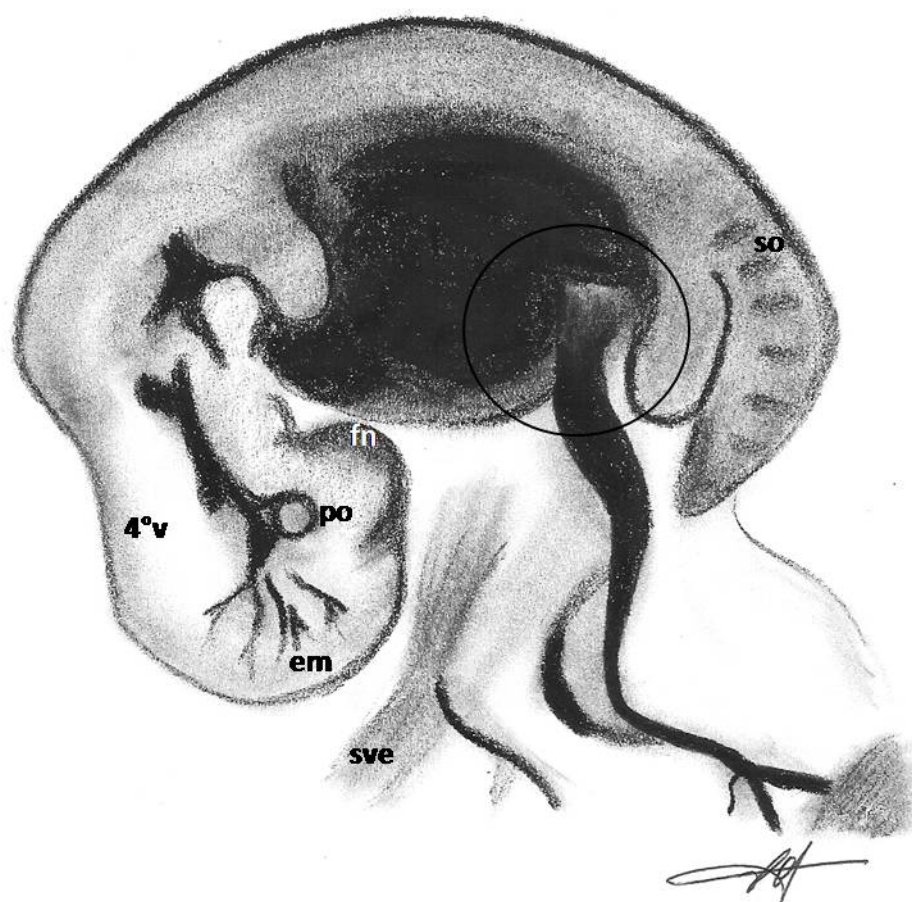
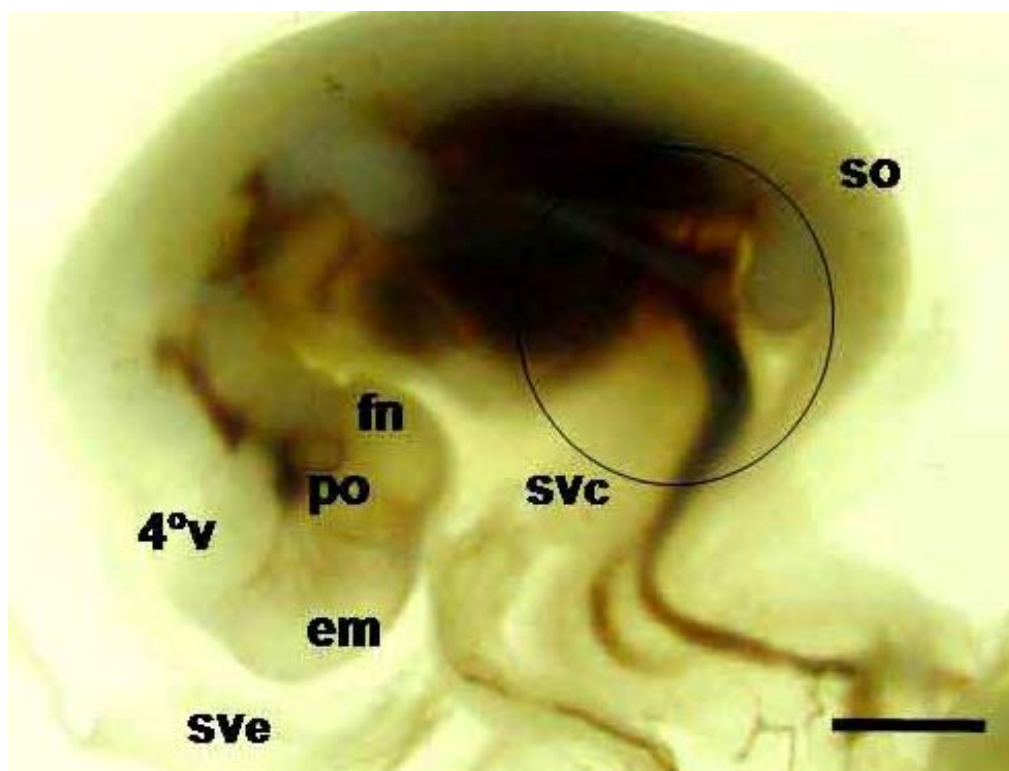


Figura 10 – Fotografia e desenho esquemático correspondente ao embrião do IV de 30 dias de gestação (CR=1,5cm). Círculo: pedículo vitelino; 4°v, quarto ventrículo encefálico; em, encéfalo médio; fn, fosseta nasal; po, placódio óptico; so, somitos; svc, saco vitelino porção central; sve, saco vitelino extremidade. Barra= 3mm

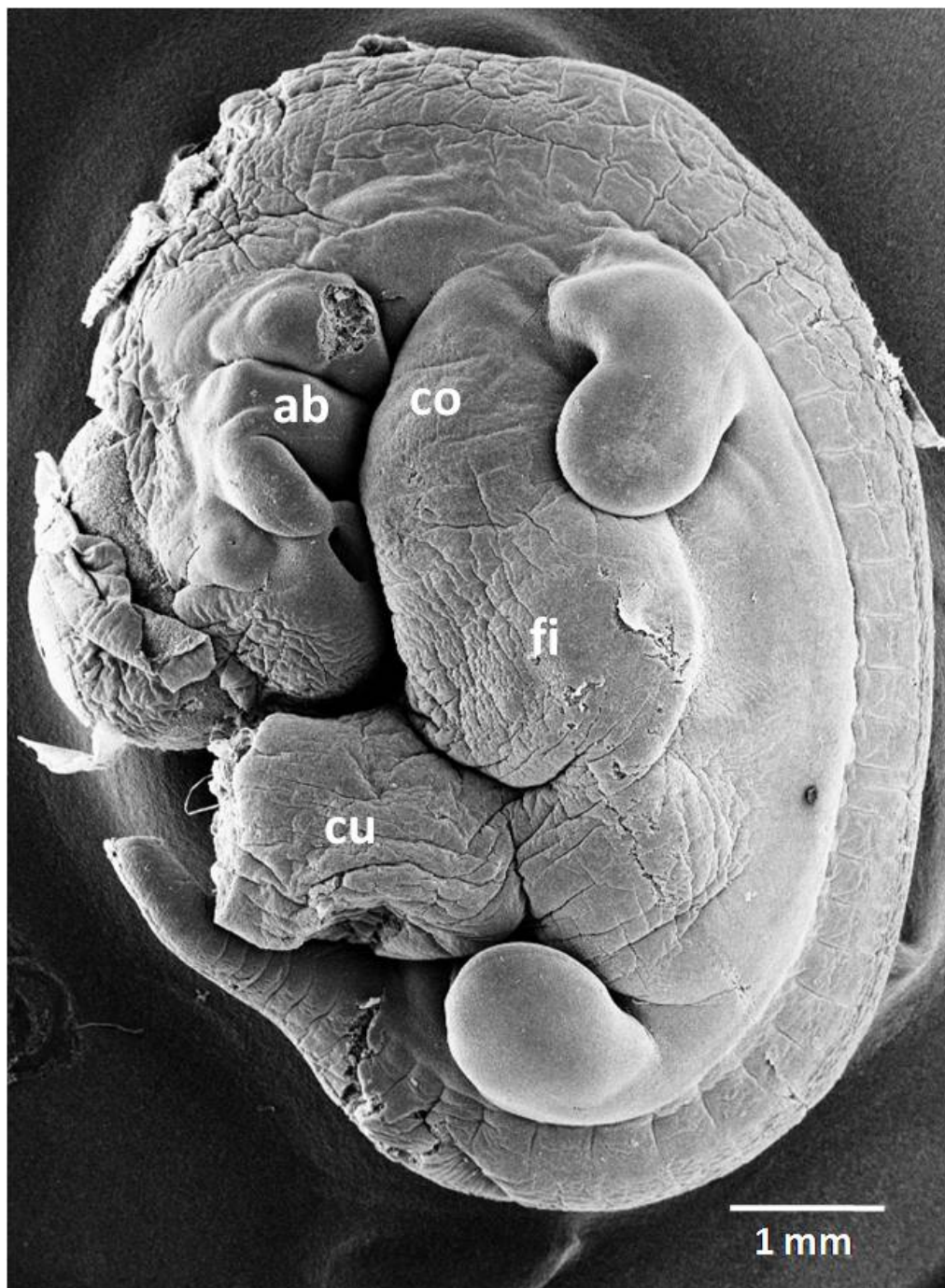


Figura 11 – Fotografia do embrião do IV de 30 dias de gestação (CR=1,5cm) obtida através do microscópio eletrônico de varredura. Ab, arcos branquiais; co, coração; fi, fígado; cu, cordão umbilical. Barra= 1mm



### 5.1.5 GRUPO V

Animais com curvatura cervical pronunciada, 1,6 a 2,0 cm de CR e cerca de 31 a 35 dias de gestação, representam o Grupo V. Estes possuem neuróporo cranial em fechamento deixando visível uma pequena porção do 4º ventrículo, placódio óptico ou vesícula óptica já com pigmentação da retina; fosseta nasal aparente assim como região de encéfalo médio destacado; fígado pronunciado, coração visível no celoma; broto pélvico desenvolvido e torácico ainda mais definido que o pélvico (Figura 12).

Na microscopia eletrônica de varredura observamos o olho bem marcado, ausência de arcos branquiais, já se observa a orelha externa. Não há mais a saliência abdominal que revela um fígado proeminente, nem tampouco a silhueta cardíaca, os somitos também não estão divididos e a cauda representa 1/4 do comprimento do embrião (Figura 13).

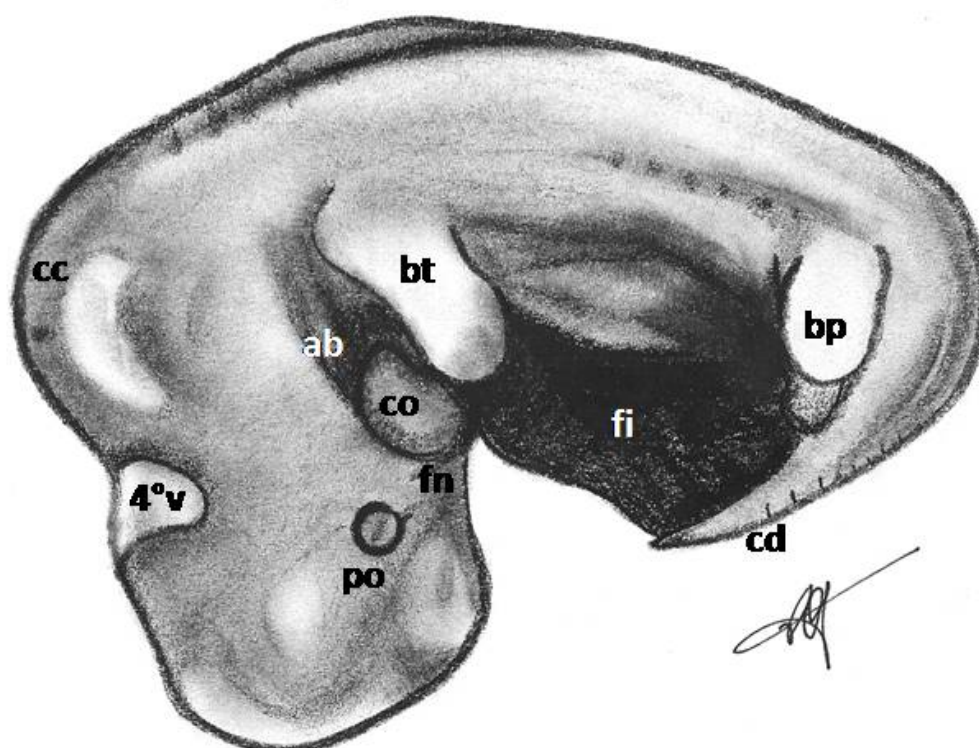
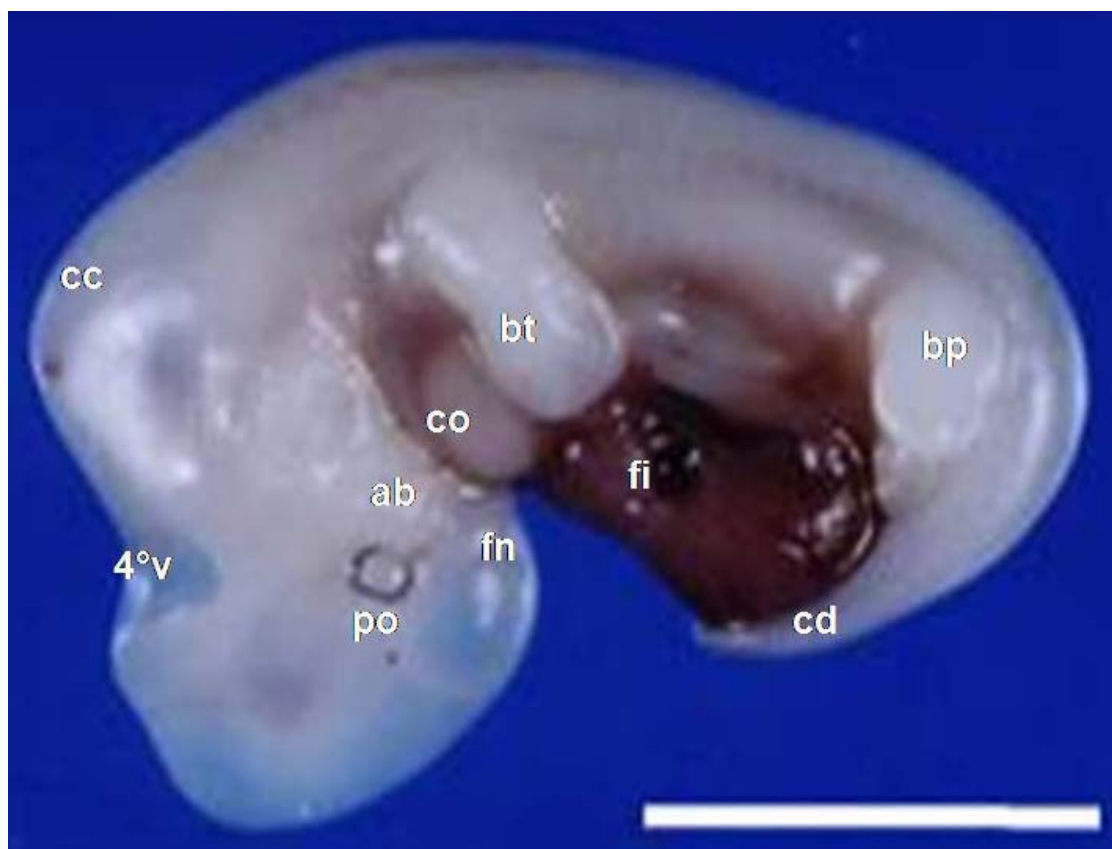


Figura 12 – Fotografia e desenho esquemático correspondente ao embrião do GV de 31 dias de gestação (CR=1,6cm). 4°v, quarto ventrículo encefálico; ab, arcos branquiais; bt, broto do membro torácico; bp, broto do membro pélvico; cc, curvatura cervical; cd, cauda; co, coração; fi, fígado; fn, fosseta nasal; po, placódio óptico. Barra= 10mm

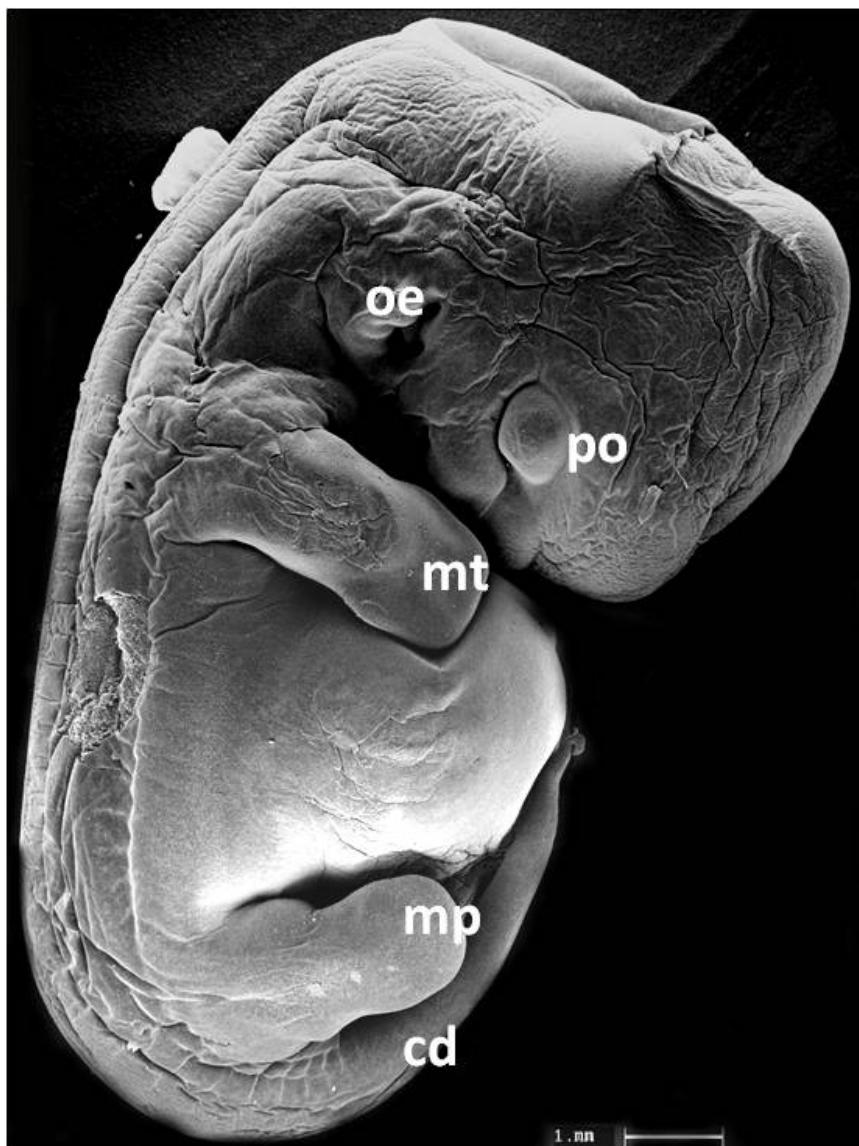


Figura 13 – Fotografia do embrião do GVI de 36 dias de gestação (CR=2,1cm) obtida através do microscópio eletrônico de varredura. mt, membro torácico; mp, membro pélvico; oe, orelha externa; cd, cauda; po, placóidio óptico

### 5.1.6 GRUPO VI

Animais do Grupo VI, com 2,1 a 3 cm de CR e cerca de 36 a 40 dias gestacionais têm curvatura cervical bem pronunciada, já apresentam neuróporo cranial quase totalmente fechado deixando visível uma mínima porção dos 3° e 4° ventrículos encefálicos. O placóidio óptico ou vesícula óptica já apresenta forte pigmentação da retina; fosseta nasal aparente assim como região de encéfalo médio bem destacada; fígado bem pronunciado, coração visível no celoma; broto pélvico

bem desenvolvido e torácico ainda mais definido que o pélvico, cordão umbilical com vasos fortemente marcados e visíveis (Figura 14).

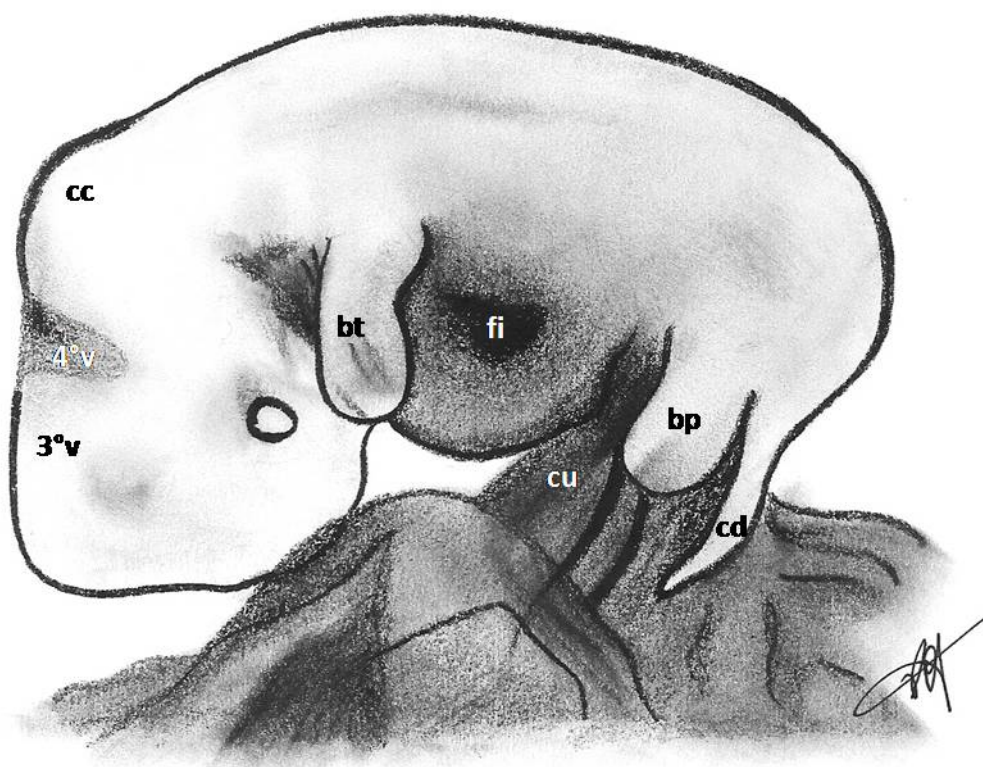
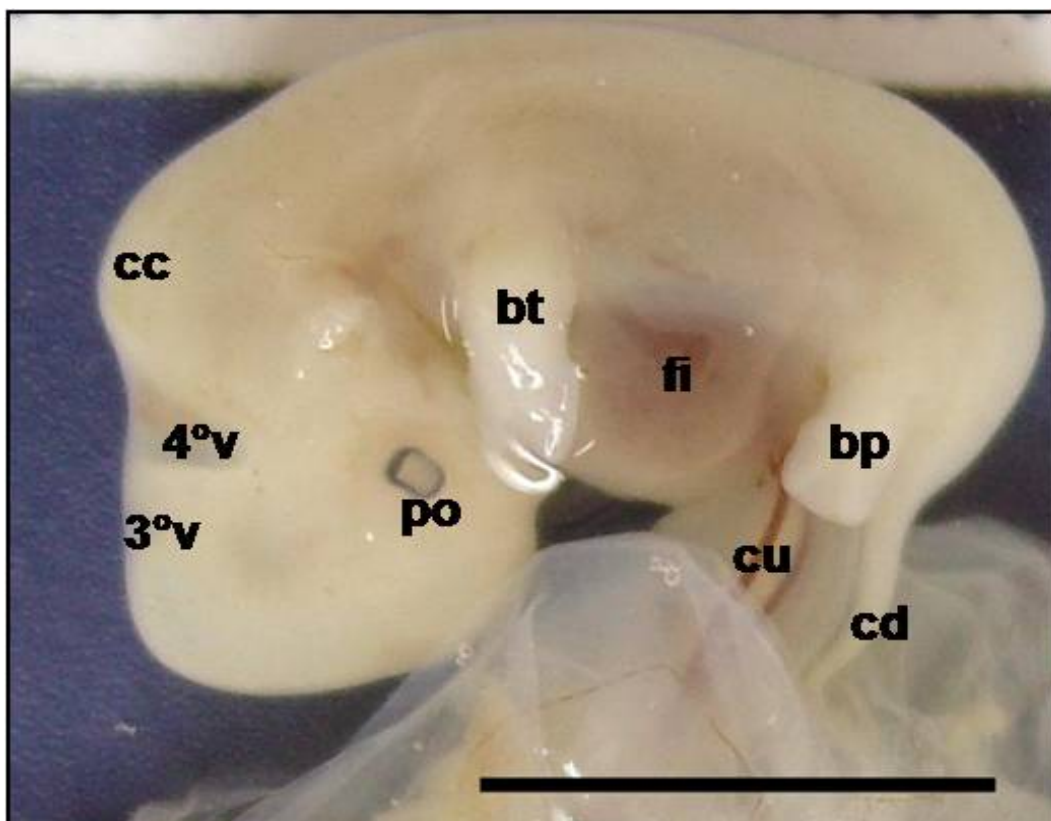


Figura 14 – Fotografia e desenho esquemático correspondente ao embrião do GVI de 36 dias de gestação (CR=2,1cm). 4°v, quarto ventrículo encefálico; 3°v, terceiro ventrículo encefálico; bt, broto do membro torácico; bp, broto do membro pélvico; cc, curvatura cervical; cd, cauda; fi, fígado; po, placódio óptico. Barra= 10mm

### 5.1.7 GRUPO VII

Já consideramos animais do Grupo VII, com 3,1 a 3,5cm e idade estimada de 41 a 45 dias como fetos e não mais embriões. Os fetos desse grupo possuem membros torácico e pélvico totalmente formados, o que inclui a bipartição dos dígitos, características dos ruminantes (animais ungulados). Também já estão presentes os resquícios dos dígitos rudimentares em ambos os membros. Nessa fase constatamos o olho recoberto por uma película de proteção; as cavidades oral e nasal já se encontram delimitadas externamente podendo ser identificados lábio inferior e a porção nasal do focinho que nos ruminantes apresenta constituição nasolabial. Também verificamos o crescimento do pavilhão auricular bem como o início do crescimento da orelha externa; a cabeça já se divide em regiões frontal, cefálica e cervical. Já estão formadas e visíveis as costelas e cauda é bem proeminente. Nessa fase devido à transparência da derme podemos observar os grandes vasos dos membros e da face como a veia safena, maxilar e facial (Figura 15).

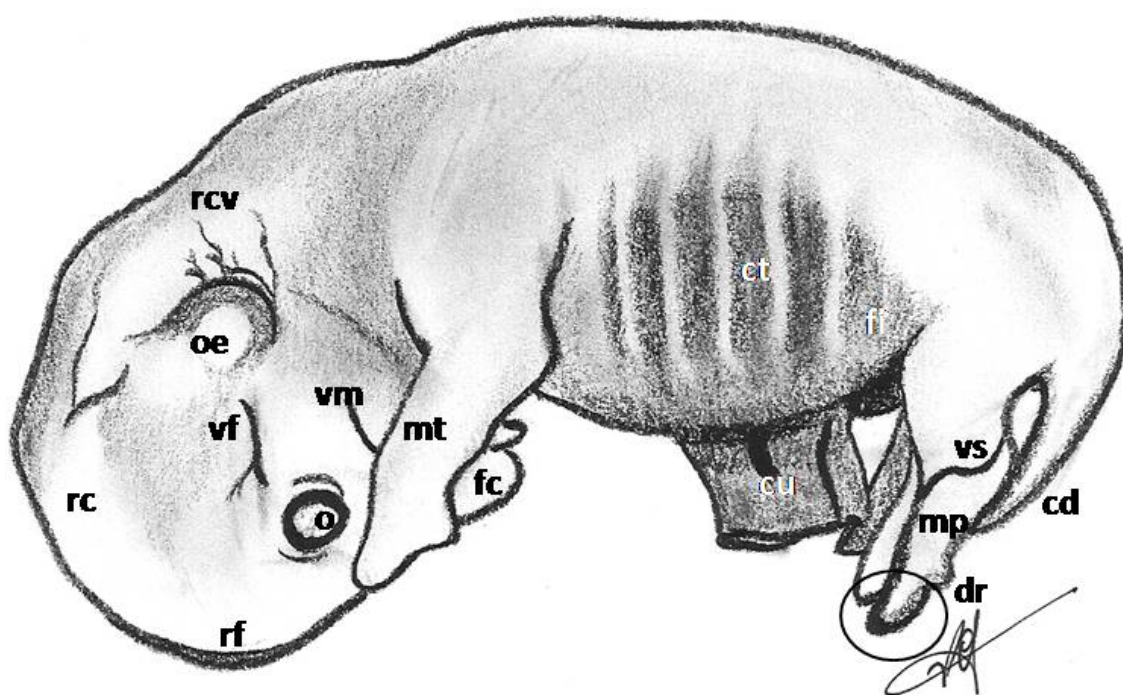
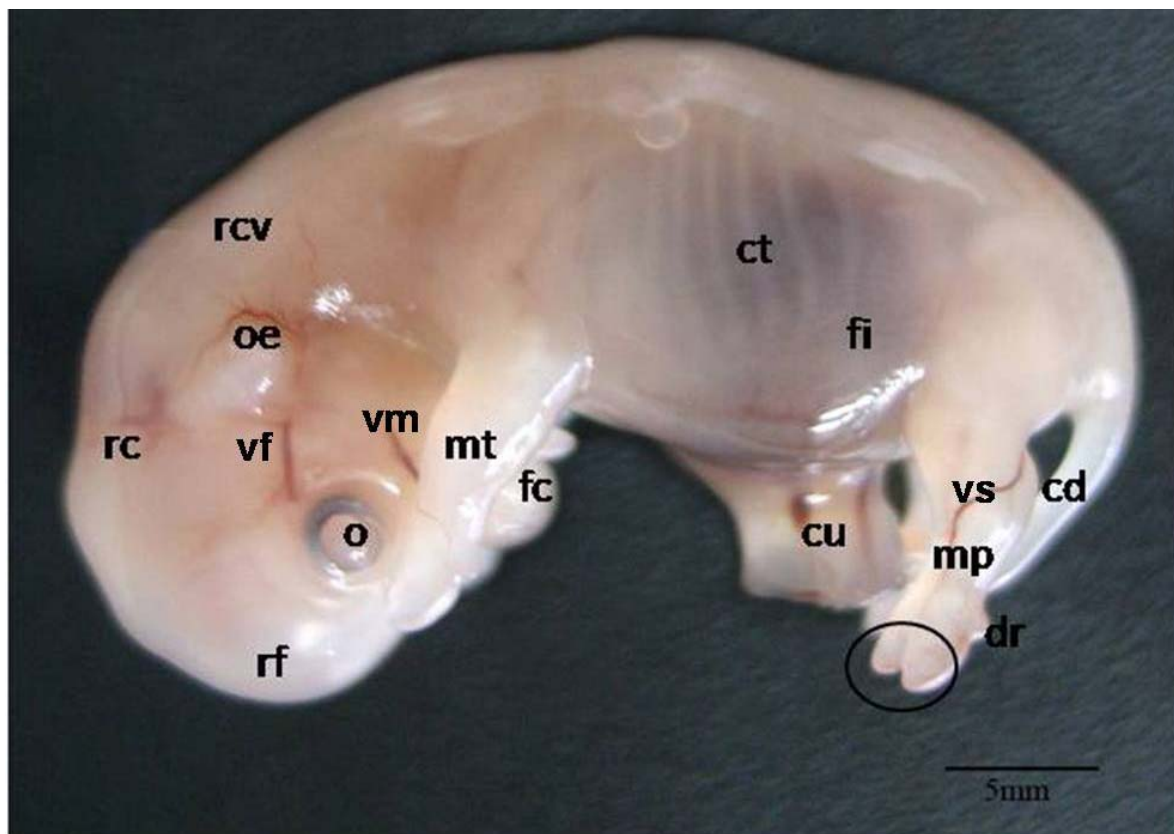


Figura 15 – Fotografia e desenho esquemático correspondente ao embrião do GVII de 45 dias de gestação (CR=3,5cm). Círculo, dígitos; rf, região frontal; o, olho; rc, região cefálica; oe, orelha; rcv, região cervical; mt, membro torácico; fc, focinho; ct, costelas; fi, fígado; cu, cordão umbilical; mp, membro pélvico; cd, cauda; dr, dígito rudimentar; vf, veia facial; vm, veia maxilar; vs, veia safena

### 5.1.8 GRUPO VIII

Fetos com comprimento entre 3,6 a 4,4cm sugerem idade gestacional entre 46 a 50 dias. Nesses exemplares podemos constatar o alongamento do pescoço e focinho, bem como diferenciamos facilmente regiões anatômicas de adultos como a região caudal, esternal, abdominal, torácica, femoral, cervical, cranial e frontal, dentre outras; o espessamento da derme inviabiliza a visualização das costelas em alguns exemplares, por outro lado, podemos ver bem definidas a vascularização superficial das regiões cervical, facial e frontal, assim como as veias jugular externa e occipital. A orelha externa continua em fase de crescimento e notamos a presença do botão genital na pelve dos fetos (Figura 16).

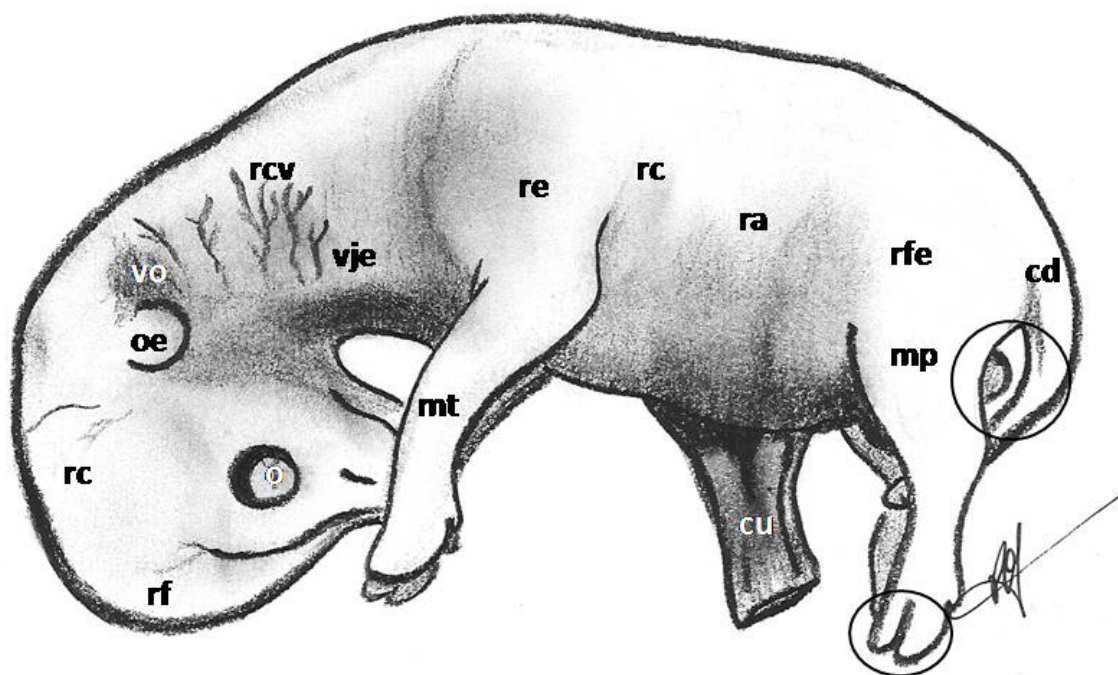
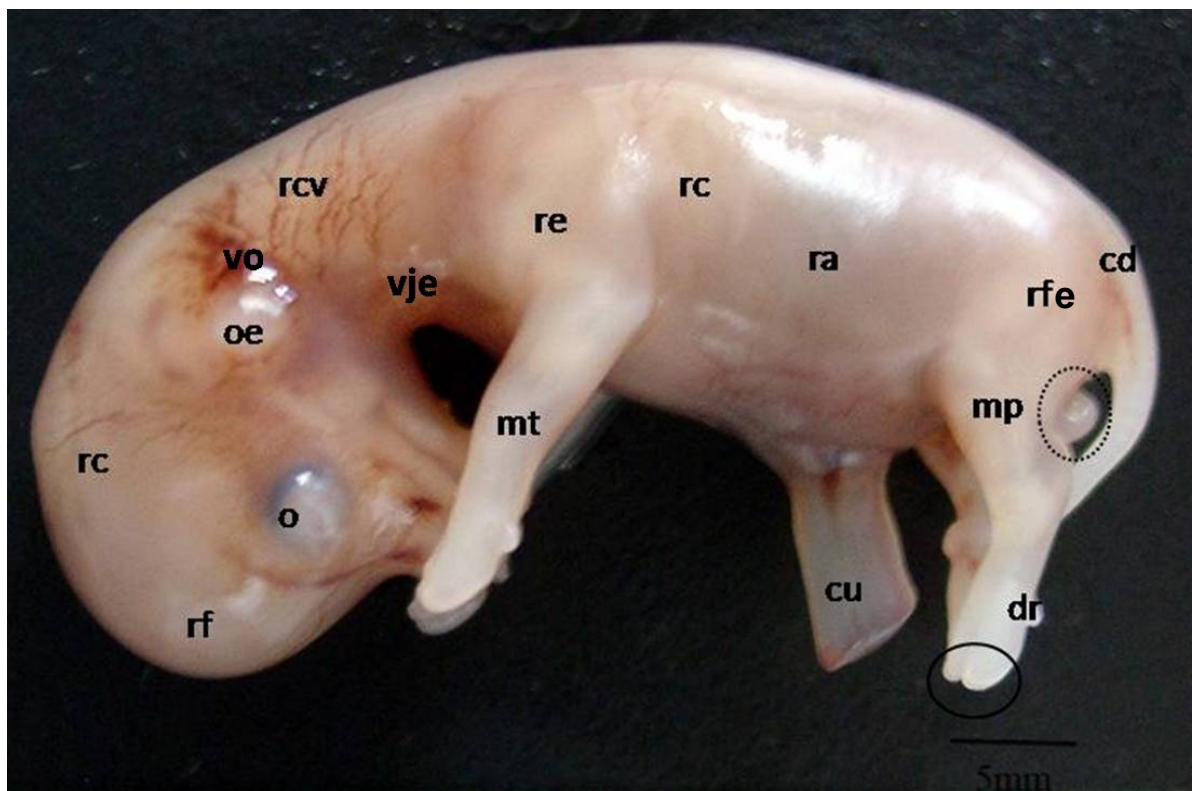


Figura 16 – Fotografia e desenho esquemático correspondente ao embrião do G XVIII de 49 dias de gestação (CR=4,2cm). Círculo, dígitos; círculo pontilhado, botão genital; rf, região frontal; o, olho; rc, região cefálica; oe, orelha; rcv, região cervical; mt, membro torácico; re, região escapular; rc, região costal; Ra, região abdominal; cu, cordão umbilical; mp, membro pélvico; cd, cauda; rfe, região femoral; dr, dígito rudimentar; vje, veia jugular externa; vo, veio occipital



### 5.1.9 GRUPO IX E GRUPO X

Animais pertencentes aos Grupos IX e X, possuem entre 4,5 a 5,1cm, 51 a 55 dias de gestação e 5,2 a 6,2cm com 56 a 60 dias de gestação respectivamente. Não há diferenças macroscópicas importantes entre os dois grupos a não ser o tamanho do feto, a partir da idade fetal são poucas as alterações da organogênese que ocorrem no concepto, no entanto verificamos que a orelha externa não obteve seu formato final ainda e continua a crescer, os olhos continuam protegidos pela película transparente que os cobre, e o botão genital ainda não revela o sexo do concepto (Figura 17).

Utilizando a técnica de Alizarina verificamos que animais pertencentes ao grupo IX ainda não possuem ossificação em seu esqueleto, tendo apenas tecido cartilaginoso corado em azul pela técnica, já animais pertencentes ao grupo X apresentam regiões ossificadas marcadas com alizarina destacadas em vermelho. Ossos longos como rádio, tibia e fêmur já possuem diáfises calcificadas, assim como as costelas e falanges distais também apresentam ossificação, o esterno se mantém cartilágneo. Mesmas as vértebras caudais possuem nessa fase sua porção média ossificada, enquanto que as extremidades, cranial e caudal, mantêm-se cartilaginosas (Figura 18)

Ao explorar a topografia dos órgãos de fetos nas idades mencionadas acima notamos o tamanho ainda avantajado do fígado ocupando 2/3 da cavidade abdominal e sua íntima relação com o cordão umbilical por meio do ligamento hepático. Ao remover o fígado podemos notar a presença das quatro câmaras gástricas distintas e comuns a todos os ruminantes, bem como as alças intestinais dando continuidade ao trato gastrointestinal. Ao remover o aparelho gastrointestinal notamos a presença das duas estruturas renais definitivas recostadas a superfície dorsal da cavidade abdominal do embrião, laterais à coluna vertebral. Na cavidade torácica destaca-se o conjunto cardio-respiratório, coração-pulmões, muito semelhante ao dos animais adultos, ambas as cavidades já se encontram divididas pelo diafragma sendo esse ainda uma película fina de musculatura (Figura 19)

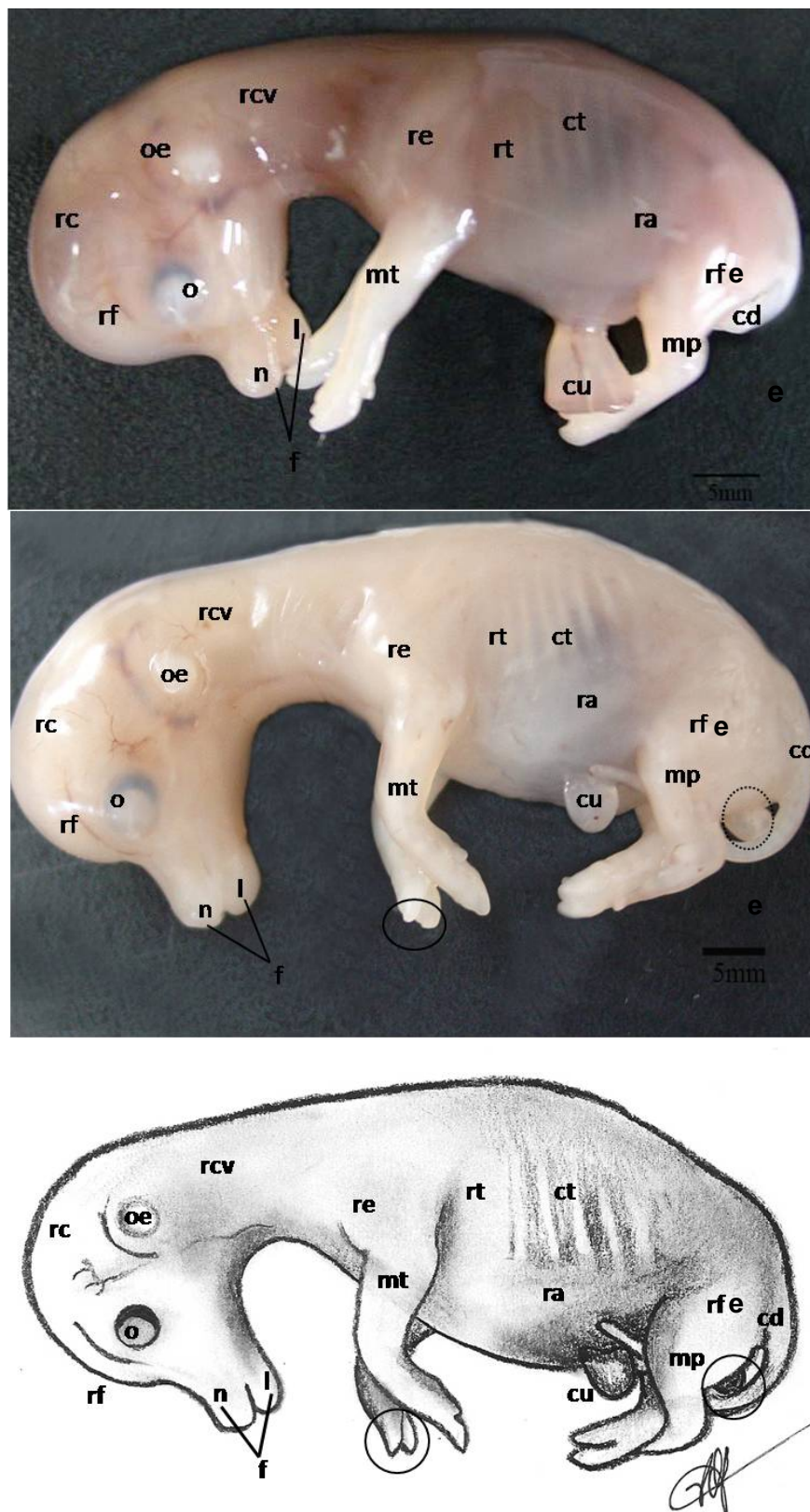


Figura 17 – Fotografias e desenho esquemático correspondente aos embriões representantes dos grupos IX e X de 52 e 57 dias de gestação (CR=4,7cm e 5,3cm) respectivamente. Círculo, dígitos; círculo pontilhado, botão genital; n, narina; l, lábio; f, focinho; rf, região frontal; o, olho; rc, região cefálica; oe, orelha; rcv, região cervical; mt, membro torácico; re, região escapular; rt, região torácica; ct, costelas; ra, região abdominal; cu, cordão umbilical; mp, membro pélvico; cd, cauda; rfe, região femoral

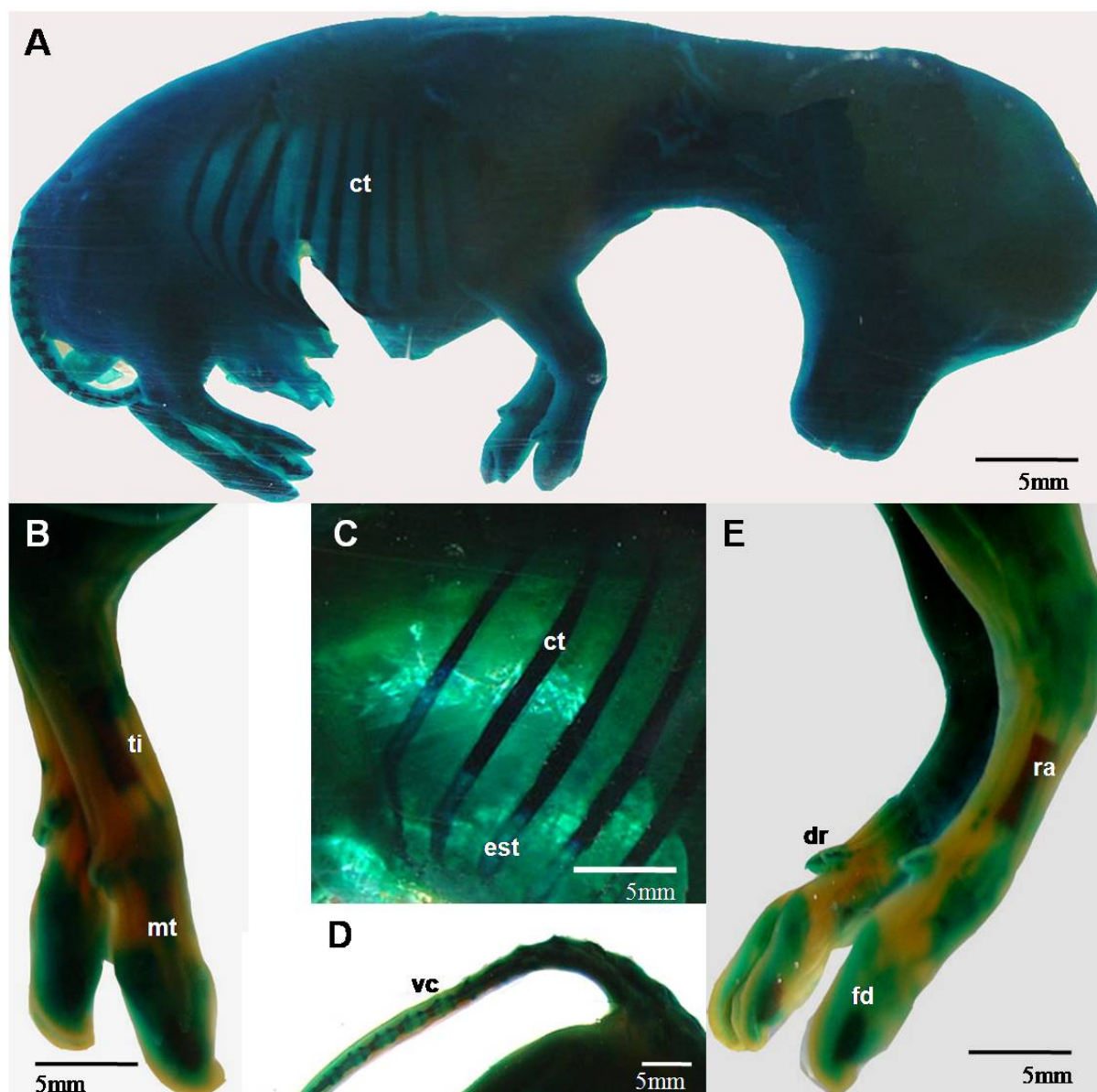


Figura 18: Embriões submetidos a técnica de Alizarina modificada. A: Embrião do GVIII com 4,4cm de CR ( $\pm 50$  dias de gestação), B-D: Embrião GX com 6,2cm de CR ( $>60$  dias de gestação). B: membro pélvico. C: costelas. D: cauda. E: membro torácico. Áreas coradas em vermelho indicam que tecido ósseo está presente, áreas em verde ou azul representam tecido cartilágneo. **Legenda:** vc, vértebra caudal; fd, falange distal; mt, metatarso; ra, rádio; ct, costelas; dr, dígito rudimentar; est, esterno; ti, tibia

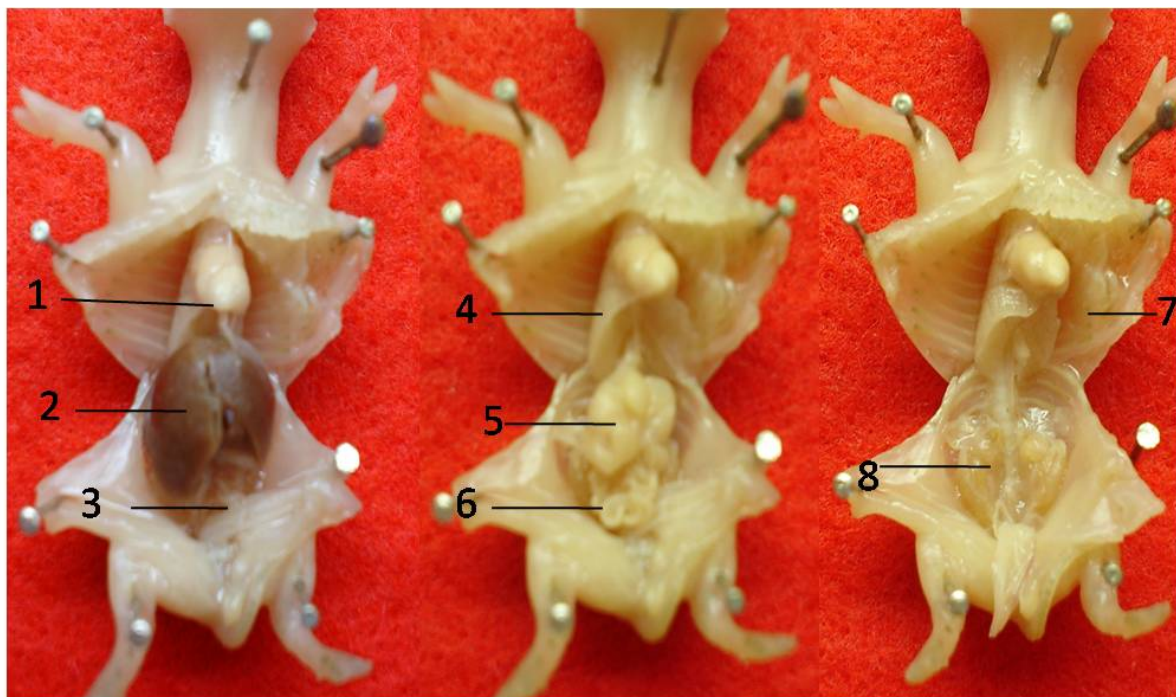


Figura 19: Embriões pertencentes ao Grupo V, CR = 1,6cm idade estimada de 32 dias. 1. Coração 2. Fígado 3. Cordão umbilical 4. Pulmão 5. Câmaras gástricas. 6. Alças intestinais 7. Diafragma. 8. Rim

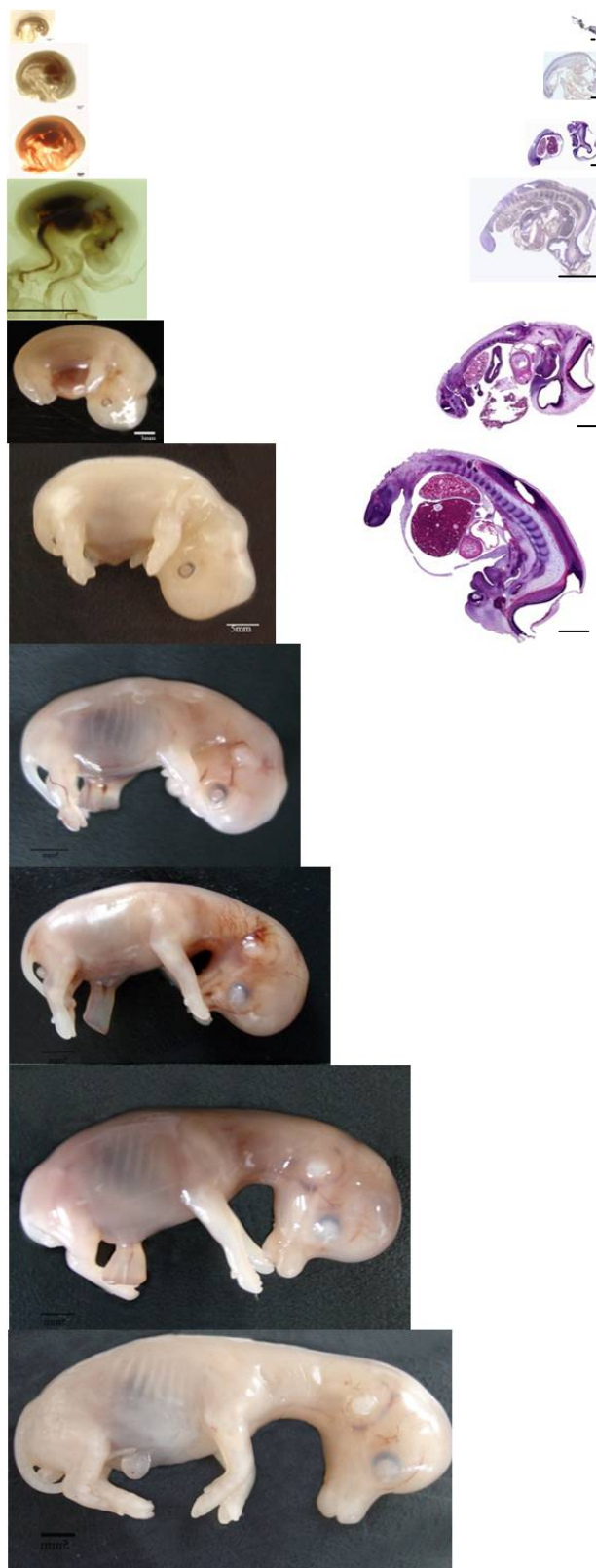


Figura 20: Fotografias de embriões representantes de todos os grupos estudados (canto esquerdo) e fotomicrografias de cortes transversal (primeiro corte) e longitudinal (demais cortes) de representantes dos embriões dos grupos estudados até o presente momento (canto direito) ambas representam tamanho comparativo real entre os embriões, porém tamanho aumentado em relação ao natural, para tal foram utilizadas barras cuja maior equivale a 5mm

## 5.2 Características microscópicas

Para melhor entendimento da descrição das características microscópicas, daremos enfoque aos órgãos de maior destaque nos embriões de modo geral, e sem dúvida também aqueles que mais se modificam conforme a evolução da gestação.

Em se tratando de embriões do grupo I poucas são as especializações teciduais que encontramos nessa fase. A maior parte dos órgãos é constituída de considerável quantidade de mesênquima, com suas células estreladas e substância basal amorfa (Figura 21H). Conforme a evolução da gestação e o crescimento do concepto o tecido mesenquimal é substituído por células epiteliais e especializadas de cada órgão.

### 5.2.1 Sistema Músculo - Esquelético

O sistema músculo esquelético forma-se a partir dos somitos, que são formações semelhantes a botões de tecido epitelial condensado (Figura 21 e 22). Estas estruturas são importantes determinantes da idade embrionária humana, de camundongos, ratos e galinhas onde o estudo da embriologia já está bem compreendido.

Somitos possuem sua topografia lateral ao tubo neural, os mesmos podem ser vistos em animais dos grupos GI ao GVI (Figura 21 e 22). Em embriões do GII já é possível diferenciar os blocos mesenquimais. Conforme há o crescimento desses blocos cada porção caudal se unirá a cranial do subsequente formando corpos vertebrais cartilagosos (Figura 21C). No GII são bem distintos os somitos craniais dos caudais, sendo que os primeiros já possuem forma mais similar a um corpo de vértebra enquanto que os caudais ainda possuem forma alongada (Figura 21D). Em animais do GIII já existe a nítida diferenciação celular de áreas dos somitos denominadas de esclerótomo (ventromedial) e dermomiótomo (dorsolateral) (Figura 21 E e F). Animais GIV já possuem somitos tanto da região cranial quanto caudal com formato cubóide similar a corpos vertebrais (Figura 22A).

Ao efetuar imunohistoquímica em animais do GIV nota-se a marcação positiva em agrupamentos celulares nas extremidades dos somitos e em suas bordas laterais, indicando a alta atividade proliferativa de células indiferenciadas e em crescimento nesta região (Figura 22B).

A partir das células mesenquimais são formados fibroblastos, condroblastos ou osteoblastos. Animais do GV já apresentam alguns pontos de diferenciação dos somitos em estruturas cartilagíneas, ou seja, futuros corpos vertebrais cartilagosos (Figura 22C e D). Típicos condroblastos já são visualizados em animais do GVI nos brotos dos membros em desenvolvimento e mesmo em vértebras em formação (Figura 22E e F).

Os ossos da face têm origem nos arcos faríngeos; animais do GII possuem os arcos faríngeos distinguíveis sendo que o primeiro par de arcos origina o processo maxilar e sua porção ventral forma o processo mandibular que dá origem a mandíbula (Figura 25B).

Os membros têm sua origem do brotamento da parede corporal ventrolateral em embriões do GII já são vistos brotos do membro torácico; no broto a região central é mesenquimal derivada do mesoderma da placa lateral e coberta por células cubóides do ectoderma.

A ossificação endocondral pode ser vista a partir do período fetal GX, quando a maioria das diáfises dos ossos longos já possuem ossificação enquanto que as epífises são ainda cartilagíneas (Figura 18).

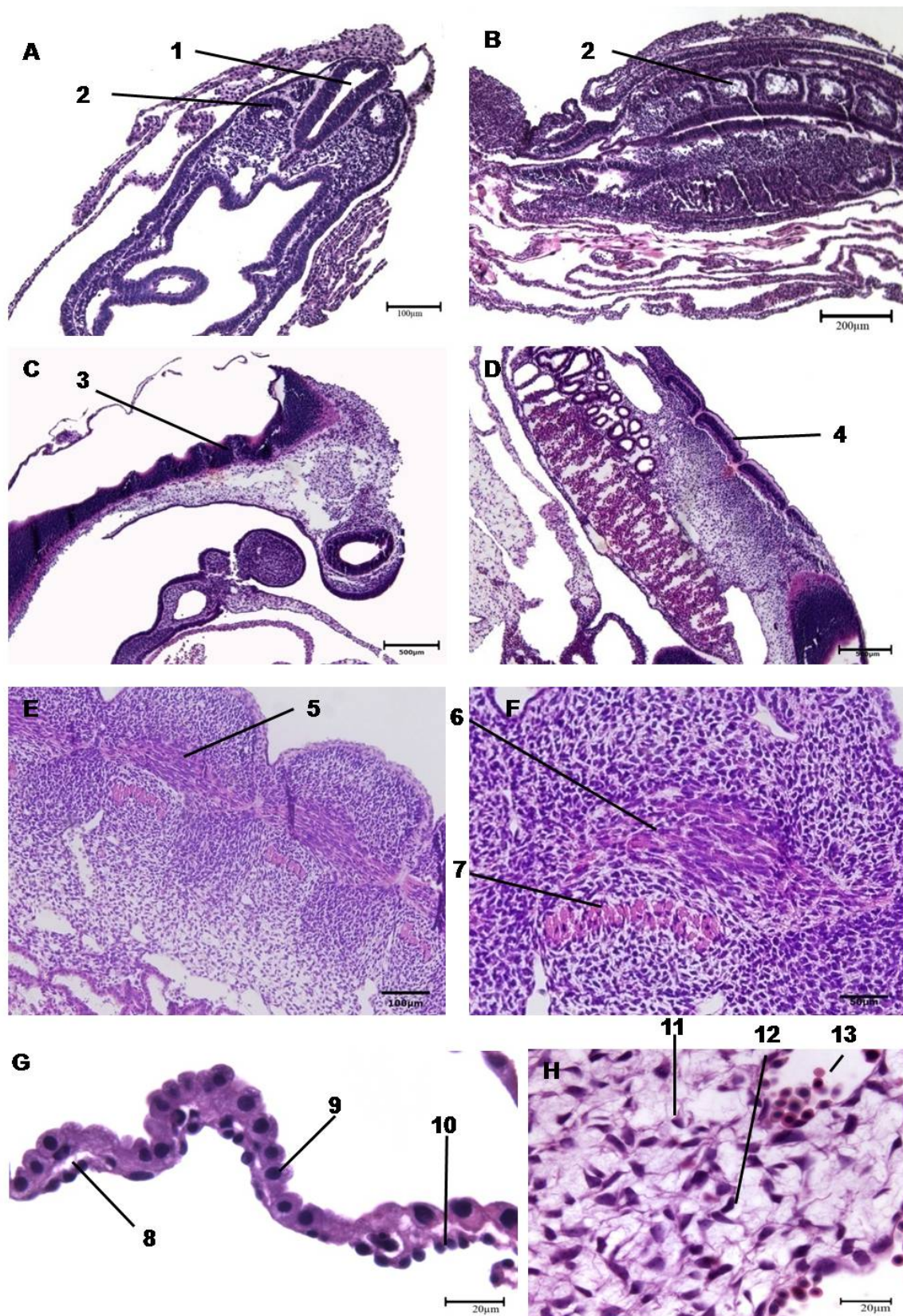


Figura 21: Cortes transversais de embrião pertencente ao Grupo I (A, B e G). Cortes longitudinais de embriões pertencentes aos GII (C e D), e GIII (E, F e H). Coloração HE. Legenda: 1. Tubo neural 2. Somito 3. Somitos cranial 4. Somitos caudais 5. e 6. Dermomiótomo 7. Esclerótomo. 8. Ilha eritoblástica. 9. Hemangioblasto. 10. Célula endotelial de vaso. 11. Células mesenquimais. 12. Capilar sanguíneo. 13. Vaso sanguíneo



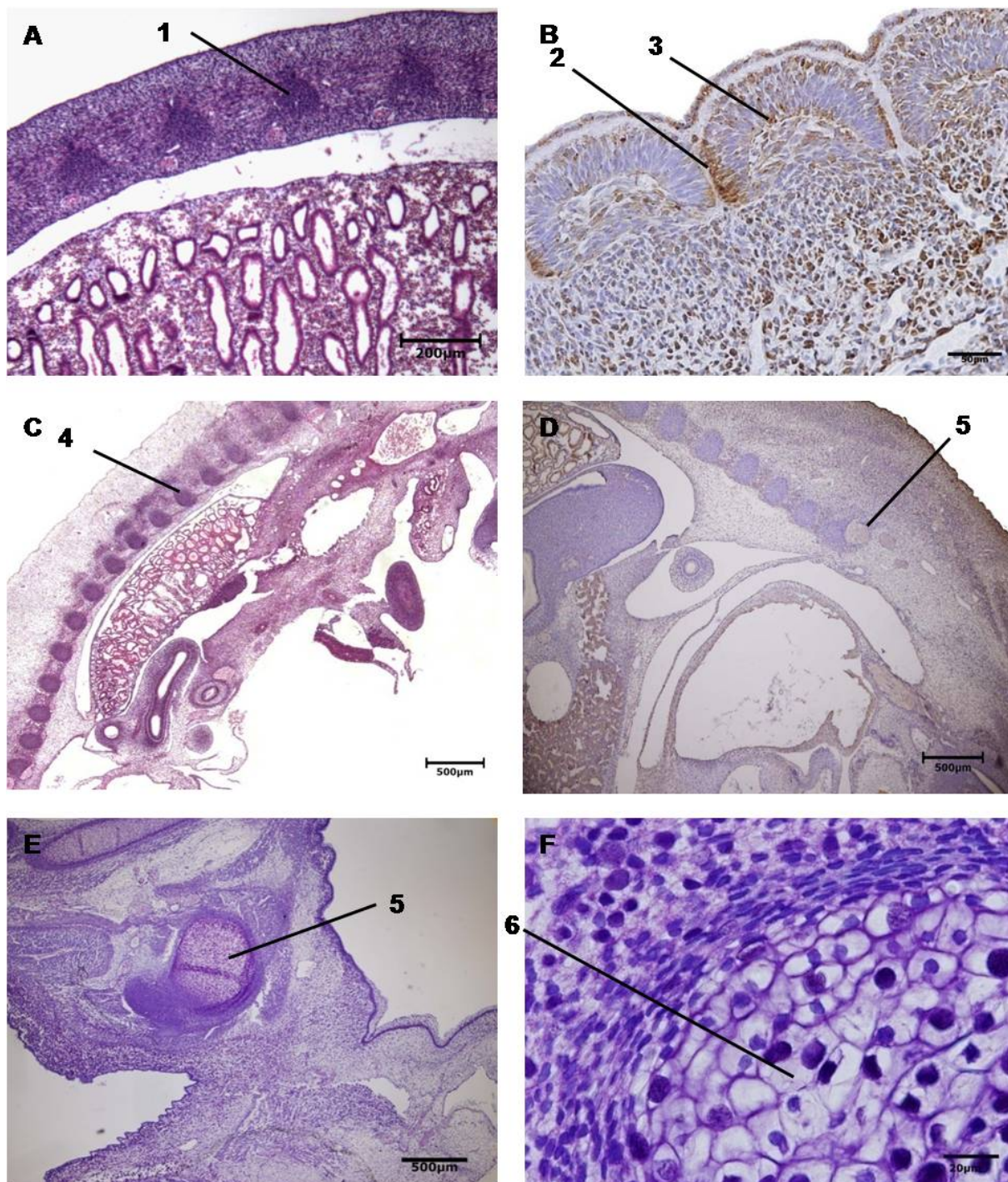


Figura 22: Cortes longitudinais de embriões pertencentes aos GIV (A e B), GV (C e D) e GVI (E e F). Coloração HE (A, C-F) e Imunohistoquímica para Oct4 (B e D). Legenda: 1. Somito 2. Porção cranioventral do somito positiva para Oct4; 3. Porção medial do somito negativa para Oct4 4. Somito 5. Cartilagem 6. Condroblastos

### 5.2.2 Sistema cardiovascular

O coração é, juntamente com o tubo neural e a notocorda, uma das primeiras estruturas a adquirir forma e iniciar suas funções no embrião. Nos animais do Grupo I observamos apenas os locais onde serão os futuros átrio e ventrículo, bem como o mesentério cardíaco que irá se expandir, e, após inúmeras dobras e voltas, formará as quatro cavidades cardíacas tão importantes (Figura 30 A).

No grupo II é possível a visualização de duas câmaras, a atrial e a ventricular. Estas se divergem pela forma e espessura de suas paredes; as posições nessa fase revelam o ápice cardíaco voltado para a porção ventral do embrião, a câmara atrial em posição crânio-dorsal à região cranial do embrião e a câmara ventricular apontado para o exterior do embrião, ventro-caudal ao átrio (Figura 24A).

A cavidade ventricular possui grande quantidade de cardiomioblastos agrupados de maneira a dar início a formação trabecular. São inúmeras as formações cordonais nessa fase embrionária (Figura 24 B).

Cercando toda a cavidade celômica encontra-se uma fina camada de mesenquima, uma pequena porção dessa camada, próxima ao coração irá se diferenciar em pericárdio futuramente (Figura 23 E).

Em reações imunohistoquímicas alguns cardiomioblastos apresentaram reações de positividade tanto para Oct4, PCNA e vimentina em embriões do grupo II (Figura 24 C, D, E e F).

Em animais do Grupo IV a topografia cardíaca está modificada. A câmara atrial encontra-se disposta cranialmente a câmara ventricular. Ela é bem menor em questões dimensionais e apresenta inúmeras divisões em seu interior formadas pelo arranjo cordonal dos cardiomioblastos. Dependendo do corte são visíveis até cinco divisões da câmara atrial (Figura 23A e F).

A câmara ventricular em animais desse grupo possui arranjo definido, densa camada de cardiomioblastos e formação do canal bulbo ventricular (Figura 23A).

Em animais do Grupo V e VI são visíveis as formações das artérias pulmonar e aorta e veias pulmonares e cavas (Figura 23 B e 29C). No grupo V distinguimos nitidamente o ventrículo direito do esquerdo pela espessura das paredes ventriculares claramente maior no esquerdo (Figura 23B).

Cabe agora uma observação com relação aos eritroblastos: no início do desenvolvimento embrionário eles apresentam formato fusiforme com núcleo central e conforme a idade embrionária avança essas células passam a adquirir formato circular e com núcleo periférico (Figura 24 B e 45F e G).

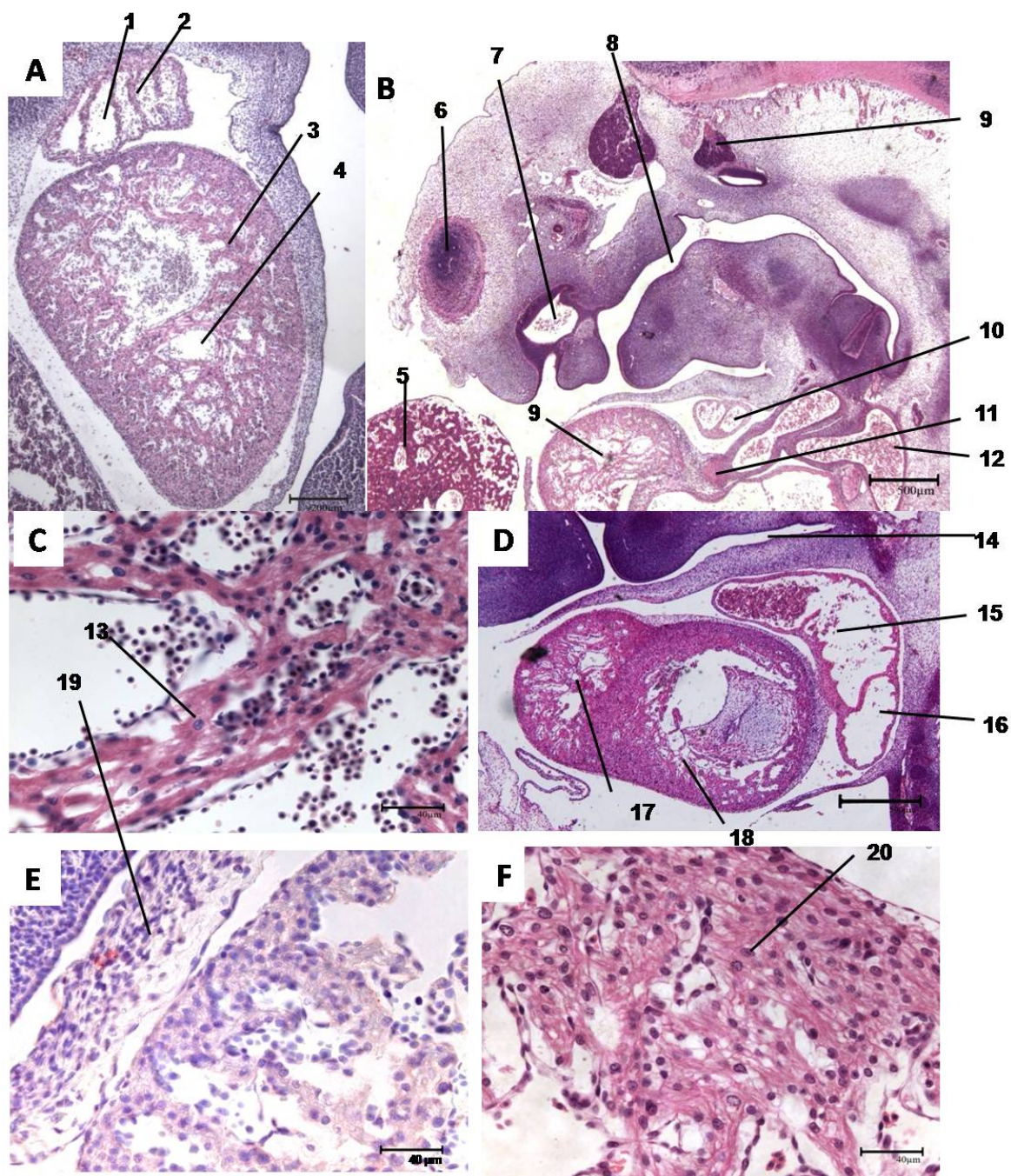


Figura 23: Cortes longitudinais de coração de embriões pertencentes ao Grupo IV (A, C e E), Grupo V (B, D e F). Coloração HE. Legenda: 1. Lúmen atrial 2. Parede atrial 3. Parede trabecular da câmara ventricular comum do coração, futuro ventrículo 4. Canal bulbo ventricular. 5. Fígado 6. Vesícula telencefálica 7. Canal óptico 8. Cavidade oral 9. Hipófise 10. Átrio Cardíaco 11. Aorta 12. Ventrículo Cardíaco 13. Cardiomioblastos 14. Limites da cavidade celomática 15. Câmara atrial 16. Lúmen atrial 17. Ventrículo 18. Parede trabecular da câmara ventricular 19. Mesênquima 20. Cardiomioblasto

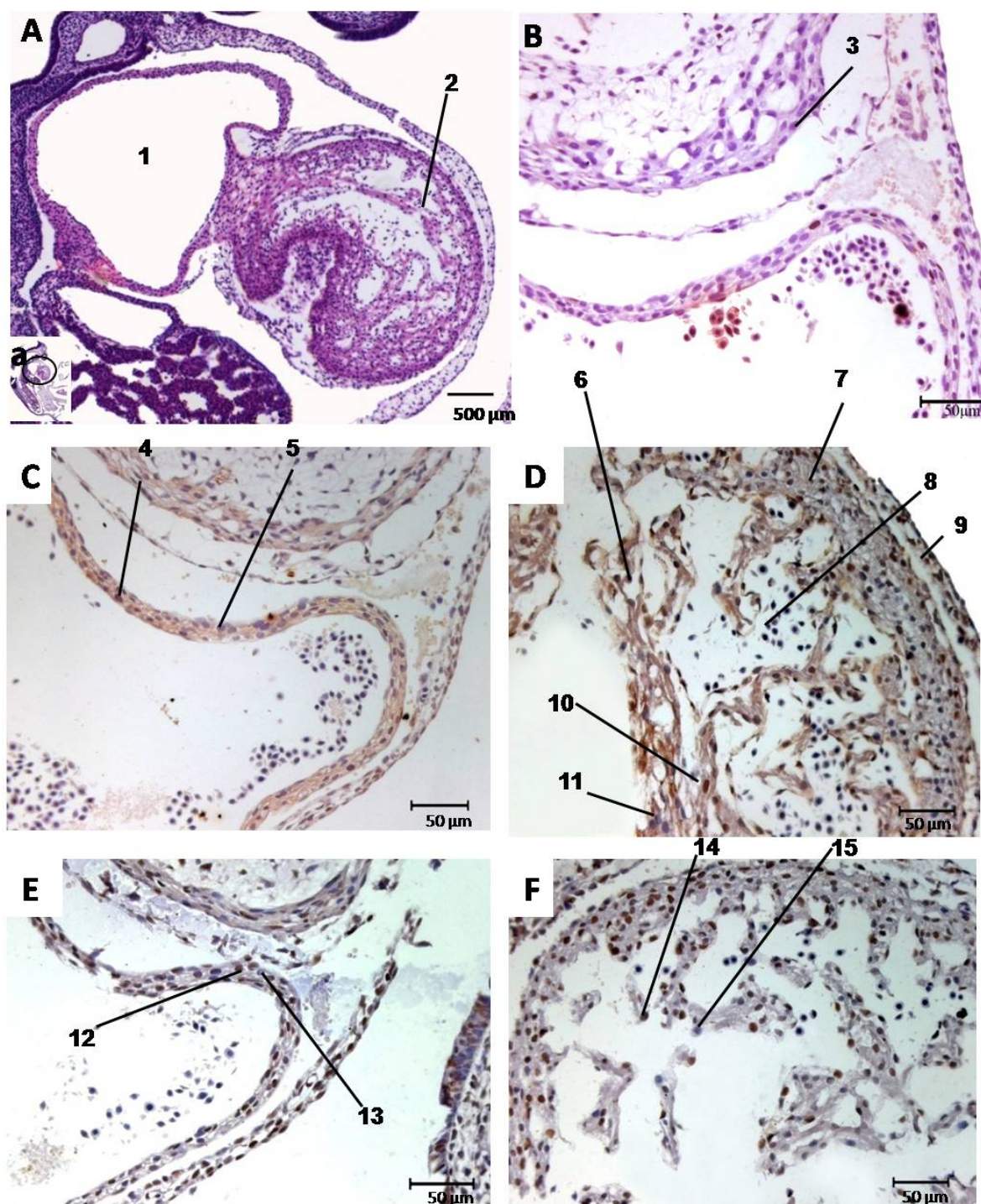


Figura 24: Cortes longitudinais do coração de embriões pertencentes ao Grupo II. Coloração HE (A e B) e Imunohistoquímica Oct 4 (C e D), PCNA (F) e vimentina (C). Legenda: 1. Cavidade atrial 2. Cavidade ventricular 3. Parede ventricular – epitélio cardíaco. 4. Marcação positiva em cardiomioblasto pra Oct4. 5 Marcação negativa em cardiomioblasto pra Oct4. 6. Cardiomioblastos 7. Parede ventricular 8. Eritroblastos 9. Mesenquima 10. Marcação positiva em cardiomioblasto pra Oct4 11. Marcação negativa em cardiomioblasto pra Oct4 12. Marcação positiva em cardiomioblasto pra PCNA 13. Marcação negativa em cardiomioblasto pra PCNA 14. Marcação positiva em cardiomioblasto pra PCNA 15. Marcação negativa em cardiomioblasto pra PCNA.

### 5.2.3 Sistema respiratório

Os pulmões têm sua origem de uma evaginação da parede ventral do intestino primitivo em sua porção cranial. Animais do GI não demonstraram presença do broto pulmonar, porém a partir do segundo grupo já notamos a presença de tecido pulmonar (Figura 25A)

O broto pulmonar (Figura 25A) se expande no sentido caudal e longitudinal. A comunicação do broto pulmonar com a faringe é mantida pelo orifício laríngeo. A laringe é formada por tecidos do quarto e sexto arcos faríngeos (Figura 25B).

Brotos brônquicos surgem em animais do GII (Figura 25A), esses brotos se dilatam formando os brônquios principais evidentes em animais do GIII e demais grupos subsequentes (Figura 25C-F), os brotos secundários surgem em decorrência do crescimento desses brônquios e se expandem pelo celoma em animais do GV (Figura 25E e F).

A partir dos brônquios secundários formam-se os subsequentes denominados terciários ou segmentares, esses somente podem ser vistos a partir do grupo VI (Figura 26D). Os pulmões nessa fase fetal já se apresentam com inúmeras ramificações a partir do brônquio principal e se caracteriza como pseudoglandular (Figura 26E e F).

Os brônquios constituem formações tubulares com paredes de epitélio revestidas por mesenquima condensado e apresentam-se normalmente circundados por vasos sanguíneos (Figura 28B).

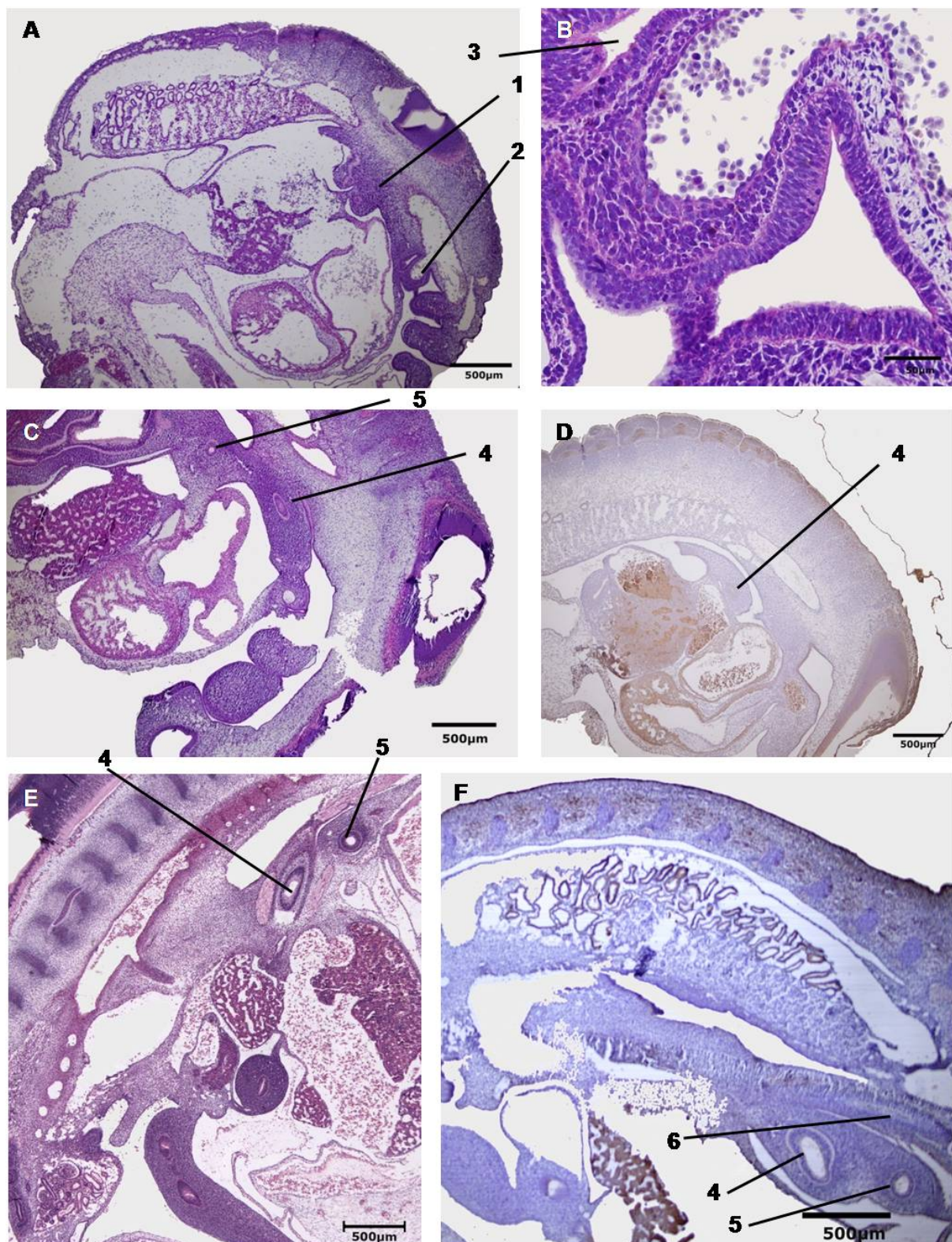


Figura 25: Cortes longitudinais de embriões pertencentes aos GII (A e B), GIII (C e D), e GIV (E e F). Coloração HE (A, C, E e F) Imunohistoquímica para Oct4 (D). Legenda: 1. Broto pulmonar 2. Quarto ventrículo 3. Orofaringe 4. Broto principal 5. Broto pulmonar secundário. 6. Traquéia

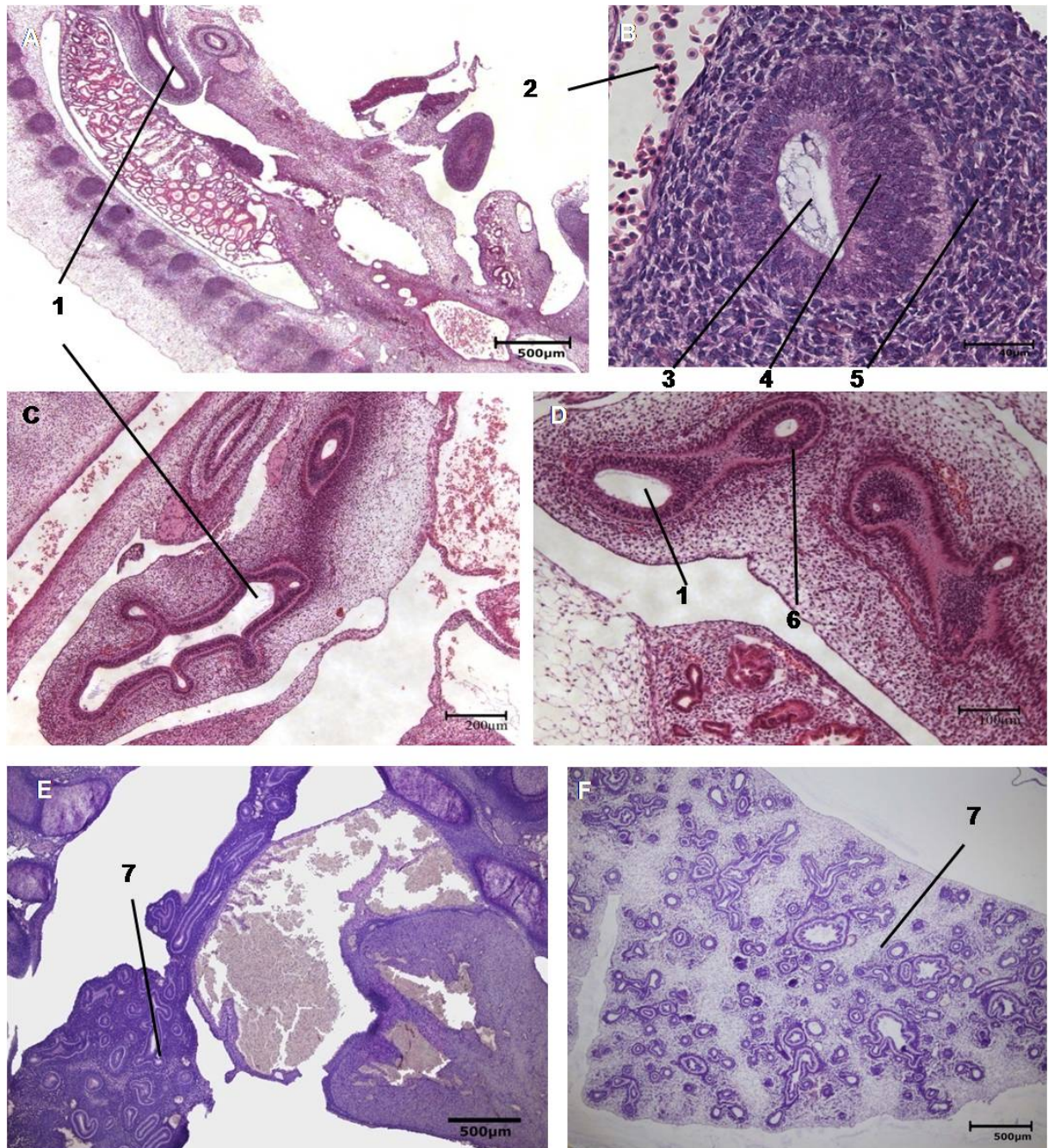


Figura 26: Cortes longitudinais de embriões pertencentes aos grupos GV (A e B), GVI (C e D), GVI (E) e GVII (F) Coloração HE. Legenda: 1. Bronquio pulmonar principal 2. Vaso sanguíneo 3. Luz do brônquio 4. epitélio 5. Mesenquima denso 6. Brônquios secundários 7. Pulmão pseudoglandular



#### 5.2.4 Sistema digestório

O intestino primitivo consiste desde a membrana bucofaríngea até a cloacal. Devido a toda sua extensão divide-se em cranial, médio e caudal. O cranial origina esôfago, traquéia, brotos pulmonares, estômagos, duodeno proximal, fígado, pâncreas e aparelho biliar.

O intestino primitivo inicia sua diferenciação a partir de animais do grupo II, quando origina o broto pulmonar e subseqüentes. A presença de estruturas do sistema digestivo, tais como estômago primitivo, são visualizadas em animais do grupo IV (Figura 25 E). Em fetos dos grupos IX e X, macroscopicamente já é possível a distinção entre rúmen, retículo, omaso e abomaso. Em fetos mais novos, dos grupos VII e VIII, em microscopia, podemos visualizar os compartimentos estomacais, porém sem distinção entre os mesmos (Figura 29 D e E). O estômago primitivo consiste em uma grande dilatação do tubo de intestino primitivo e localiza caudal ao fígado (Figura 27 D).

Alças intestinais ainda primitivas surgem como inúmeras secções tubulares na cavidade abdominal de fetos a partir do GVI. Animais do GIV apresentam a íntima relação entre saco vitelino e intestino primitivo quando o primeiro adentra ao celoma para incorporar o intestino, nessa fase podemos observar alças intestinais contidas no pedículo umbilical (Figura 36 A e B).

O fígado embrionário é o maior órgão em proporções se comparado ao tamanho total do embrião. O órgão surge a partir de um brotamento do tubo intestinal primitivo na porção média do embrião, a princípio ele não possui lobação, nos embriões do grupo I, não sendo possível localizar o broto hepático.

Embriões do grupo II apresentam hepatoblastos (células precursoras dos hepatócitos) ainda desorganizados e circundados por inúmeras células precursoras sanguíneas denominadas eritroblastos. Estas células são futuras hemácias, porém nessa fase possuem núcleo (Figura 28B e D). Podemos descrever o fígado de embriões bubalinos entre 16 e 20 dias de idade gestacional como um grande aglomerado de hepatoblastos literalmente banhados em sangue (eritroblastos) e cercados por uma fina camada serosa (Figura 28 A, a e b).

Se observados em maior aumento os hepatoblastos são células com núcleo grande basofílico e pouco citoplasma. Estes estão circundados por inúmeros

capilares sanguíneos (Figura 29 B, 27 C e D, 23 A e 27B). Os capilares somente são distintos em fotomicrografia de 20 $\mu$ m quando podemos identificar a presença de duas ou mais células endoteliais circundando um micro vaso. Na idade supracitada os hepatoblastos são menores em tamanho que os próprios eritroblastos. (Figura 28 D).

Em se tratando das reações imunohistoquímicas foram testados três tipos de marcadores celulares para embriões do grupo II. Ao utilizarmos o PCNA indicador de atividade proliferativa, verificamos uma enorme quantidade de hepatoblastos fortemente corados pelo marcador. Fato semelhante ocorreu ao utilizarmos outro marcador de células mesenquimais, a vimentina. Este marcador também denuncia a presença de pluripotencialidade assim como o Oct4 e os hepatoblastos também responderam positivamente a essa reação (Figura 28, C, E e F).

Amostras do grupo III demonstram uma maior organização dos hepatoblastos, os quais nesta idade apresentam maior volume citoplasmático e núcleo duas a três vezes maior que os eritroblastos que os circundam. A luz e quantidade dos capilares sanguíneos que os circundam também diminuem à medida que a idade gestacional e o desenvolvimento do órgão ocorre (Figura 29 B).

A partir do grupo IV são distintos os cordões de hepatócitos e os capilares sinusóides limitados pelos inúmeros cordões de hepatócitos que confluem para as chamadas veias centrais. Dependendo da altura do corte longitudinal podemos distinguir vários ramos da veia porta e a própria veia porta hepática (Figura 29 A, C, D, E e F)

Animais do grupo IV responderam positivamente ao Oct4 marcando apenas o citoplasma dos hepatoblastos se comparados aos cortes controle (Figura 47 H).

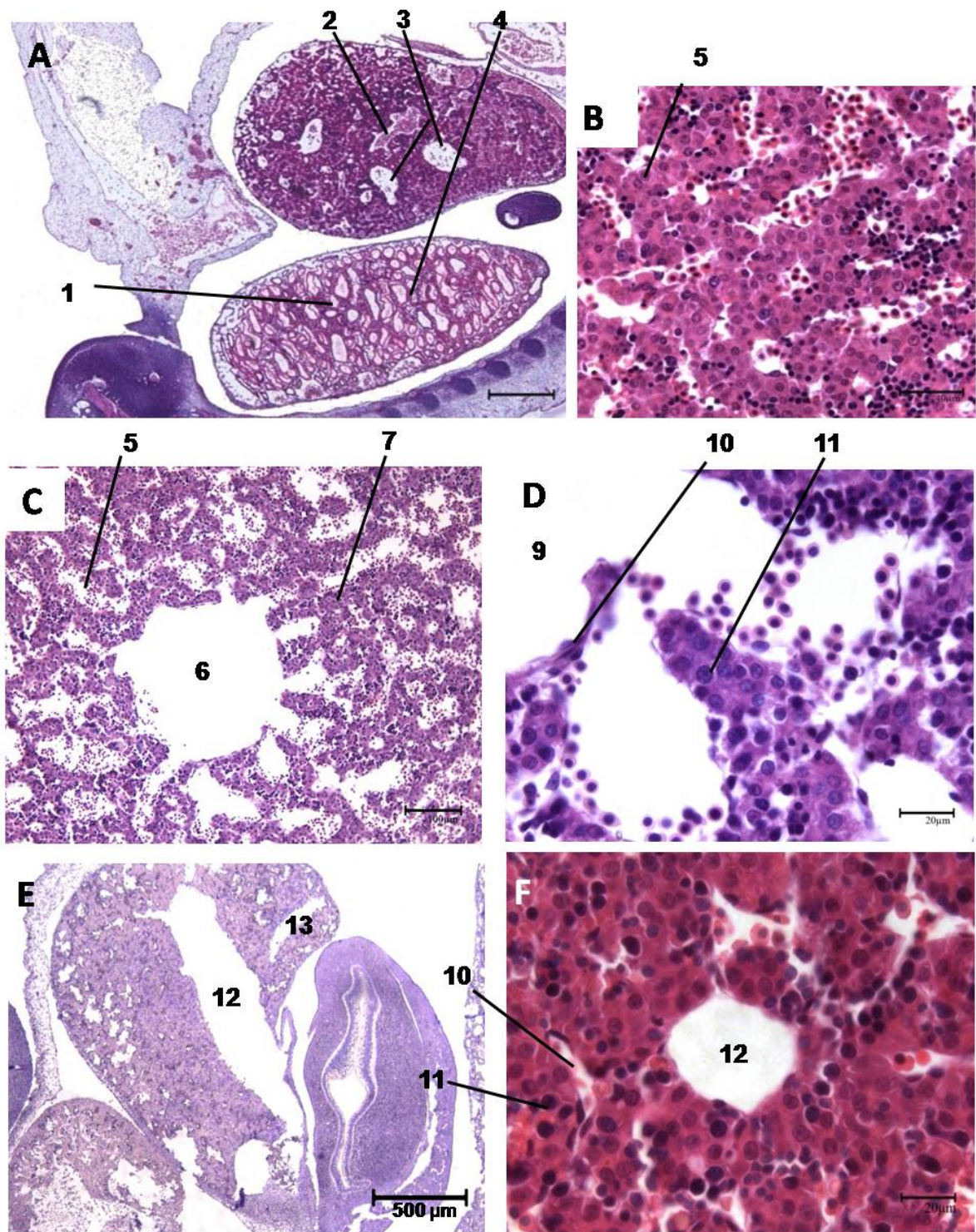


Figura 27: Cortes longitudinais de embrião pertencente ao Grupo IV (A, C, D e E) e grupo V (B) e grupo VI (F). Coloração HE Legenda: 1 Ducto mesonéfrico. 2. Veia central. 3. Ramos da veia porta. 4. Mesonéfron 5. Sinusóide 6. Veia central 7. Cordões de hepatoblastos 9 veia central. 10. Célula endotelial de vaso 11. Hepatoblasto 12. Veia porta 13. Ramo da veia porta

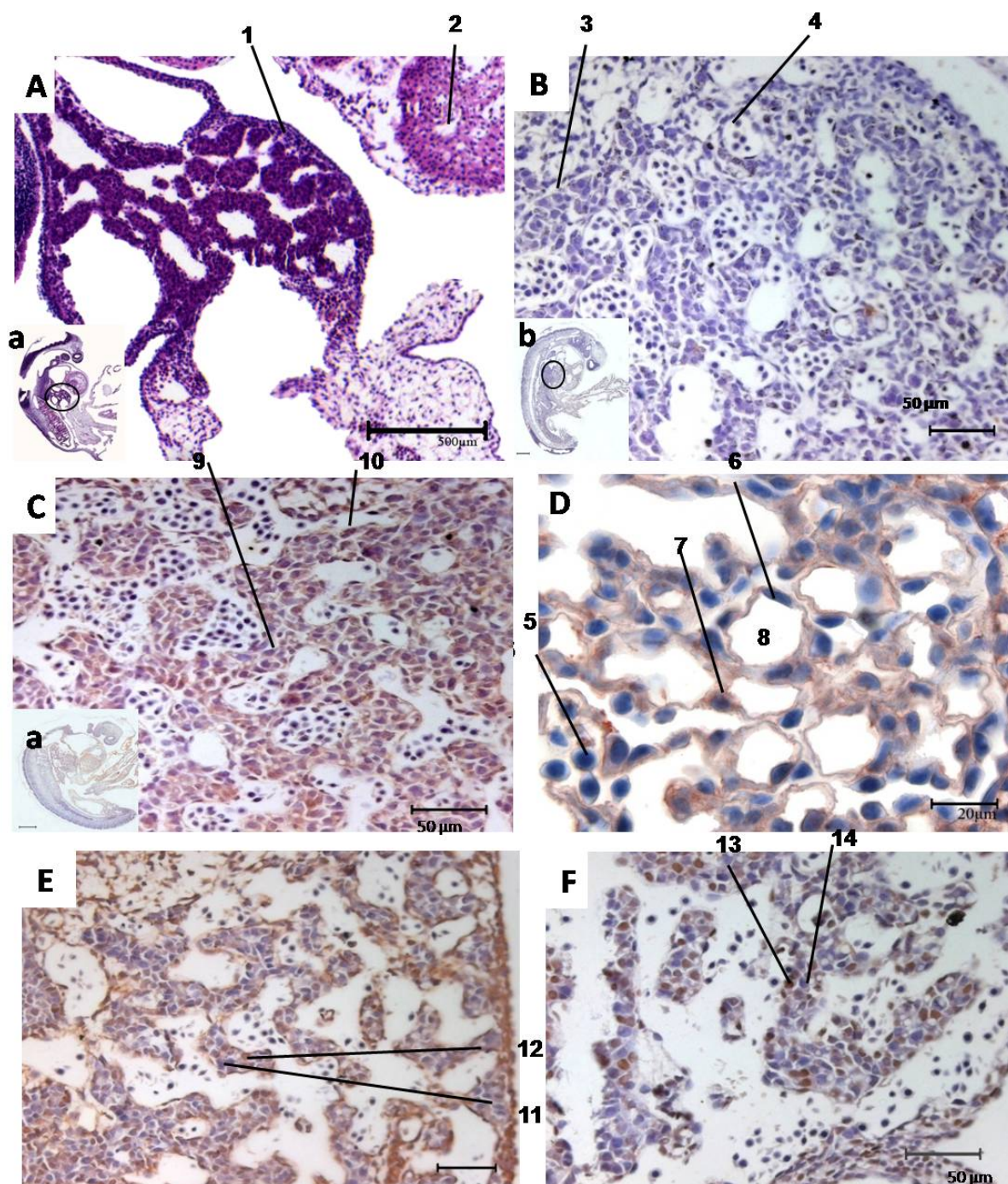


Figura 28: Cortes longitudinais de embrião pertencente ao Grupo II. Coloração HE (A, B e D) Imunohistoquímica Oct 4 (C), PCNA (E) e vimentina (F). Legenda: 1. Fígado 2. Coração 3. Cordões de hepatoblastos 4. Vaso sanguíneo 5. Eritroblasto 6. Célula endotelial de vaso 7. Hepatoblasto 8. Veia hepática 9. Marcação positiva em hepatoblastos para Oct4 10. Marcação negativa em hepatoblastos para Oct4 11. Marcação positiva em hepatoblastos para PCNA 12. Marcação negativa em hepatoblastos para PCNA 13. Marcação positiva em hepatoblastos para Vimentina 14. Marcação negativa em hepatoblastos para Vimentina

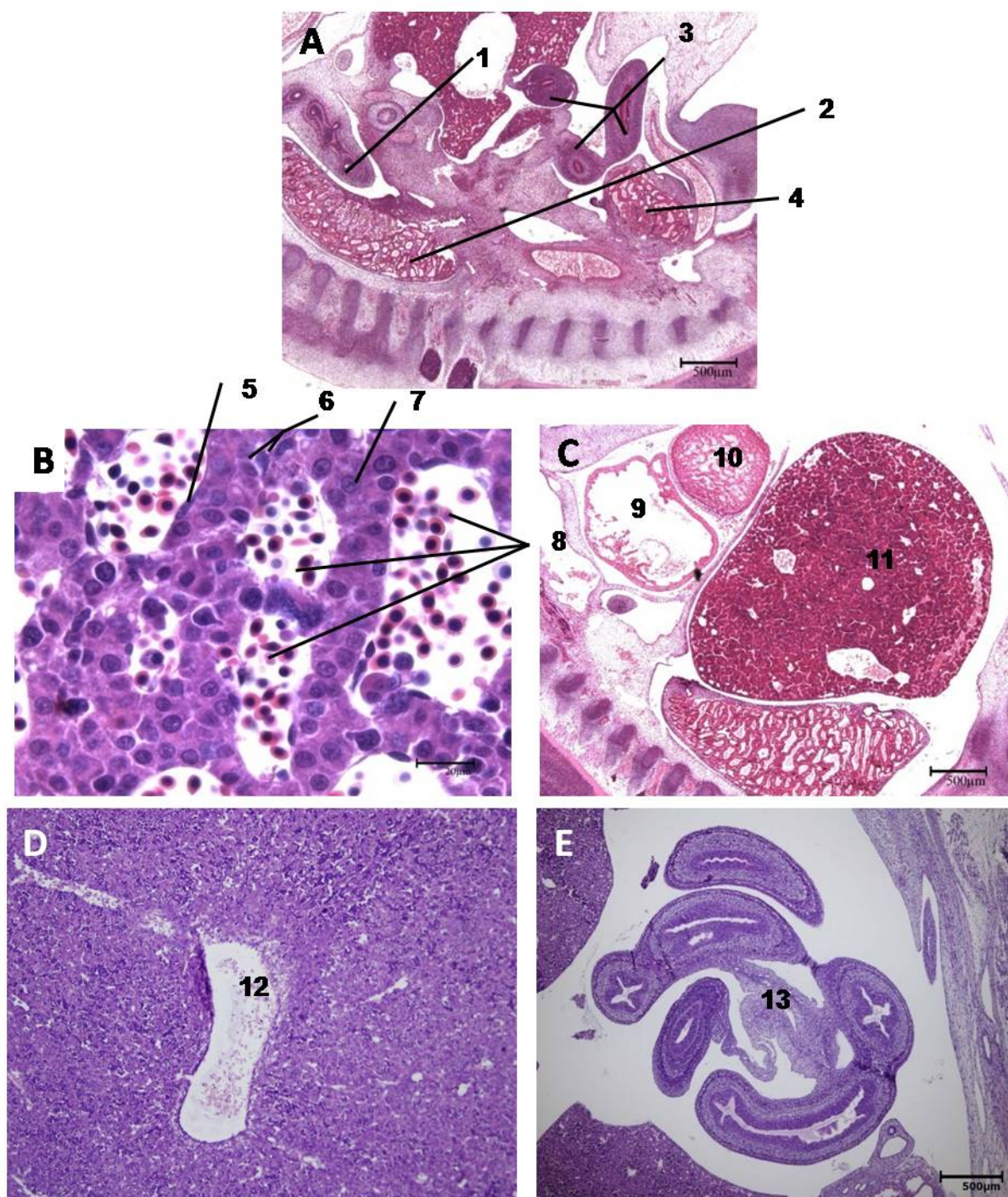


Figura 29: Cortes longitudinais de embrião pertencente ao Grupo III (B) Grupo VI (A e C), grupo VII (D), grupo VIII (E). Coloração HE Legenda: 1. Pulmão 2. Mesonefron 3. Cortes de intestino primitivo e tubo gástrico 4. Gônada primitiva 5. Célula endotelial 6. Células de Kupfer 7. Hepatoblasto 8. Sinusóides hepáticos 9. Atrio cardíaco 10. Ventrículo cardíaco 11. Fígado embrionário. 12. Veia central hepática. 13. Compartimentos gástricos

### 5.2.5 Sistema urogenital

Em embriões do grupo I não foram visualizadas estruturas que indicassem primórdios renais. Nos embriões do grupo II é comum visualizarmos os rins primitivos partindo da região média do embrião e se prolongando até região caudal do mesmo (Figura 30a). Nessa fase são chamados de mesonefro, ou rins intermediários, no entanto já notamos a presença de tecido metanefrico, ou rim definitivo na porção caudal do órgão em formação em animais dos grupos subjacentes III, IV, V e VI (Figura 30 D, 31 A, 32 A e 29 A)

Menos comum é a visualização dos prônefrons, ou rins cefálicos. Embriões do Grupo II apresentam os mesmos, porém já em fase de apoptose e regreção tecidual (Figura 28a).

Os rins primitivos possuem inúmeras formações tubulares que originarão os túbulos coletores. Estes túbulos primordiais são também bem maiores em proporção que os definitivos em um animal adulto (Figura 30 E 31 A e 32B). São constituídos por células epiteliais que formam um epitélio simples cúbico em torno da luz da estrutura, porém apresentam a borda voltada para a luz do túbulo com aspecto de escova (Figura 30B e C, 30 E, 31B, 32B e D).

Além dos túbulos mesonéfricos descritos também verificamos a presença de estruturas mais organizadas, de formato regular, arredondado, células cubóides sem borda em escova e quantidade inferior de citoplasma em comparação aos túbulos. Neste caso, devido à menor quantidade de citoplasma essas estruturas tornam-se mais coradas pela hematoxilina demonstrando seu maior conteúdo basofílico. À estas estruturas dá-se o nome de ductos mesonéfricos (Figura 30, B e C, 30 E e 31B).

A quantidade e localização dos túbulos mesonefricos e dos ductos varia conforme a idade embrionária; notamos que animais mais jovens, Grupos II e III, possuem uma maior quantidade de túbulos que de ductos e ambos encontram-se espalhados por toda a região mesonéfrica de forma desorganizada envolvidos por inúmeros vasos sanguíneos e cercados por uma fina camada serosa que os protege (Figura 30 B e 31 B).

Animais mais desenvolvidos, Grupo IV e V, têm uma maior distribuição dos túbulos na porção central do mesonefro, enquanto que os ductos se distribuem mais

na periferia do órgão (31A e 32A). A proporção do número de ductos e túbulos ainda é maior para os túbulos, porém caminha para a equivalência das estruturas. Animais do Grupo V foram os primeiros a apresentar formação glomerular entre os túbulos, o que denuncia a transformação do tecido mesonéfrico em metanéfrico, ou do rim definitivo (Figura 32D).

Embriões do grupo VI ainda apresentam rins alongados, com presença de tecido mesonéfrico. No entanto o número de ductos ultrapassa o de túbulos e há forte presença de tecido mesenquimal entre os túbulos, que denuncia a degeneração, apoptose e substituição do tecido mesonéfrico. O número de glomérulos também é maior, ao final do estágio relativos ao grupo VI e VII, e subsequentes já podemos distinguir um rim definitivo, com toda a sua estrutura e em forma de feijão, nele podemos definir o seio renal, córtex e medula, túbulos e glomérulos e todas as demais estruturas de um rim adulto (Figura 33 A, B e E).

Nos animais deste grupo é possível notar a formação caudal de um novo órgão com tecido bem semelhante ao renal, que originará as gônadas, feminina ou masculina, nesse caso chamamos de gônada primitiva. Trata-se de uma formação também glandular com inúmeros túbulos (Figura 33 C). Ao final do estágio do grupo VI já podem ser visualizados na gônada primitiva os chamados cordões testiculares (Figura 33 D a F).

Em se tratando de reações imunohistoquímicas no local, o uso do marcador de pluripotencialidade Oct4 não demonstrou marcação positiva no núcleo das células cubóides dos túbulos ou ductos mesonéfricos. Apenas o citoplasma das mesmas apresentou marcação positiva para o Oct4 se comparada aos cortes controle (Figura 31C).

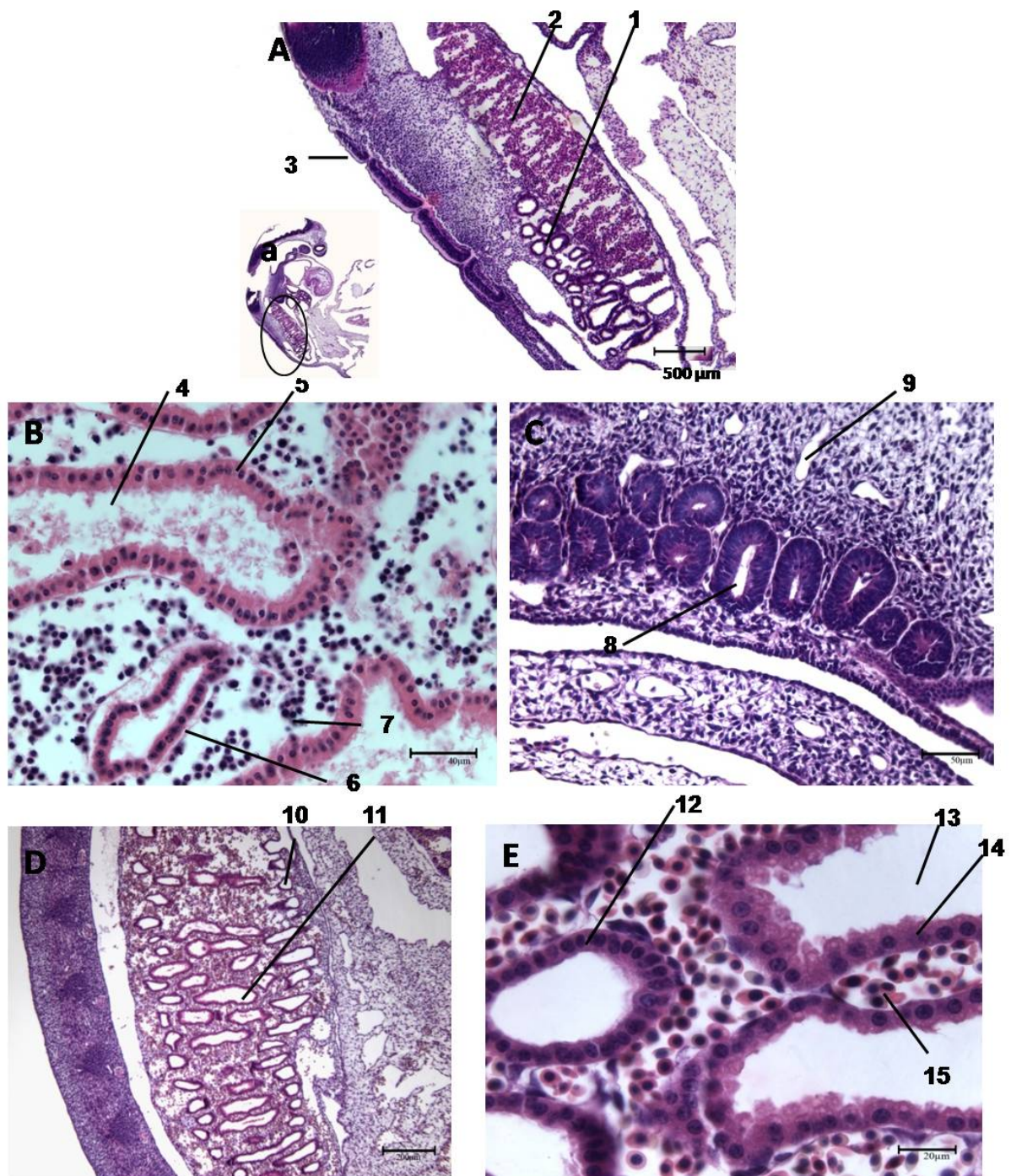


Figura 30: Cortes longitudinais de rim de embrião pertencente ao Grupo II, Legenda: 1. Metanefron, rim definitivo 2. Mesonefron 3. Somito 4. Lúmen do túbulo mesonéfrico 5. Células endodérmicas renais com borda em escova 6. Células endodérmicas renais – epitélio simples cúbico 7. Células precursoras da linhagem vermelha sanguínea – eritroblastos 8. Ducto mesonéfrico 9. Veia renal 10. Ducto mesonéfrico 11. Túbulo mesonéfrico 12. Células endodérmicas do ducto mesonéfrico 13. Luz do túbulo mesonéfrico 14. Células endodérmicas com borda em escova dos túbulos mesonéfricos 15. Eritroblastos



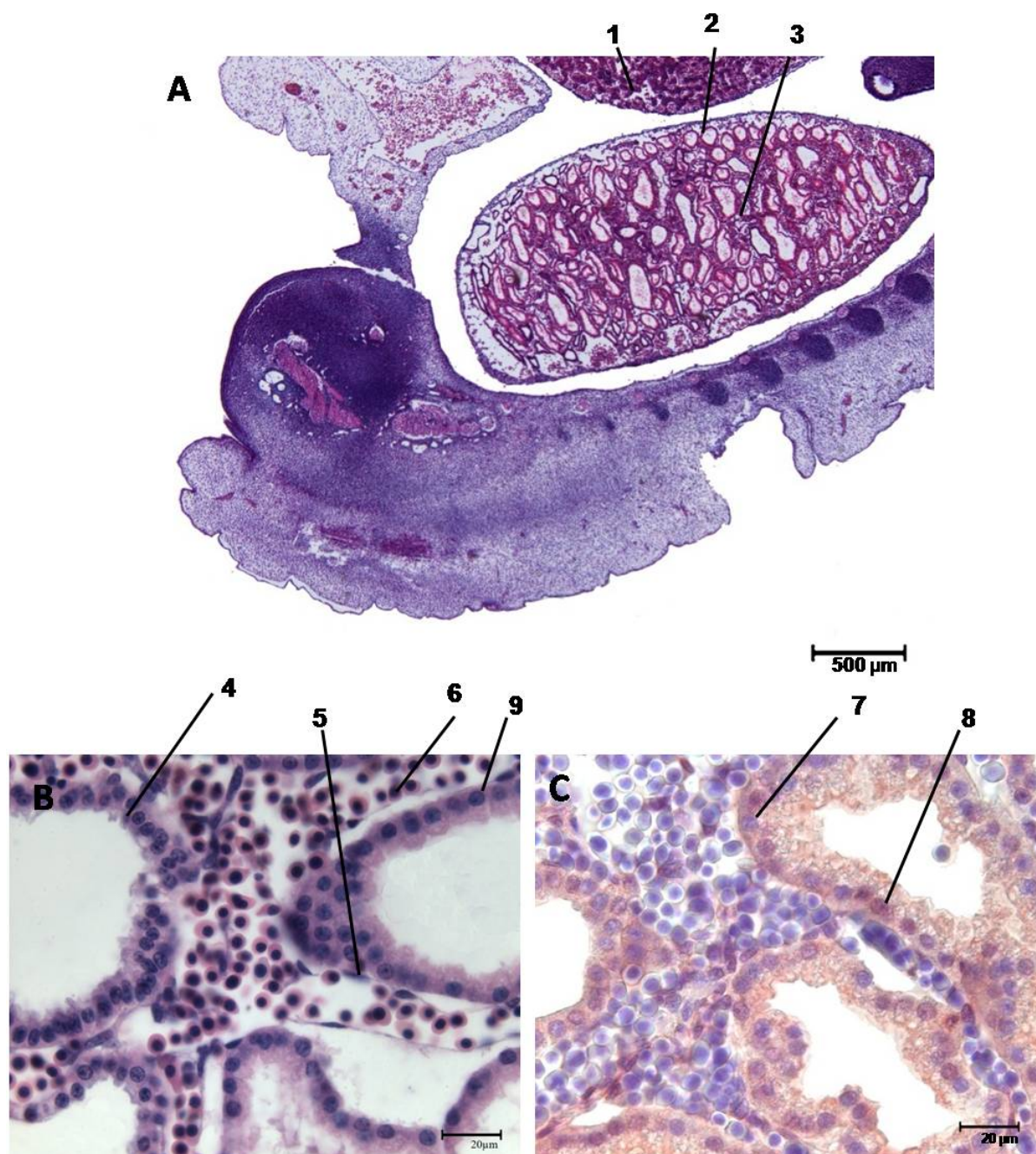


Figura 31: Cortes longitudinais de embrião pertencente ao Grupo IV. Coloração HE (A e B) e imunohistoquímica Oct4. Legenda: 1. Fígado 2. Ducto mesonéfrico 3. Túbulo mesonéfrico 4. Células endodermais com borda em escova dos túbulos mesonéfricos 5. Célula endotelial de vaso – capilar sanguíneo 6. Eritroblastos 7. Células do epitélio tubular mesonéfrico negativas para Oct4 8. Células do epitélio tubular mesonéfrico positivas para Oct4

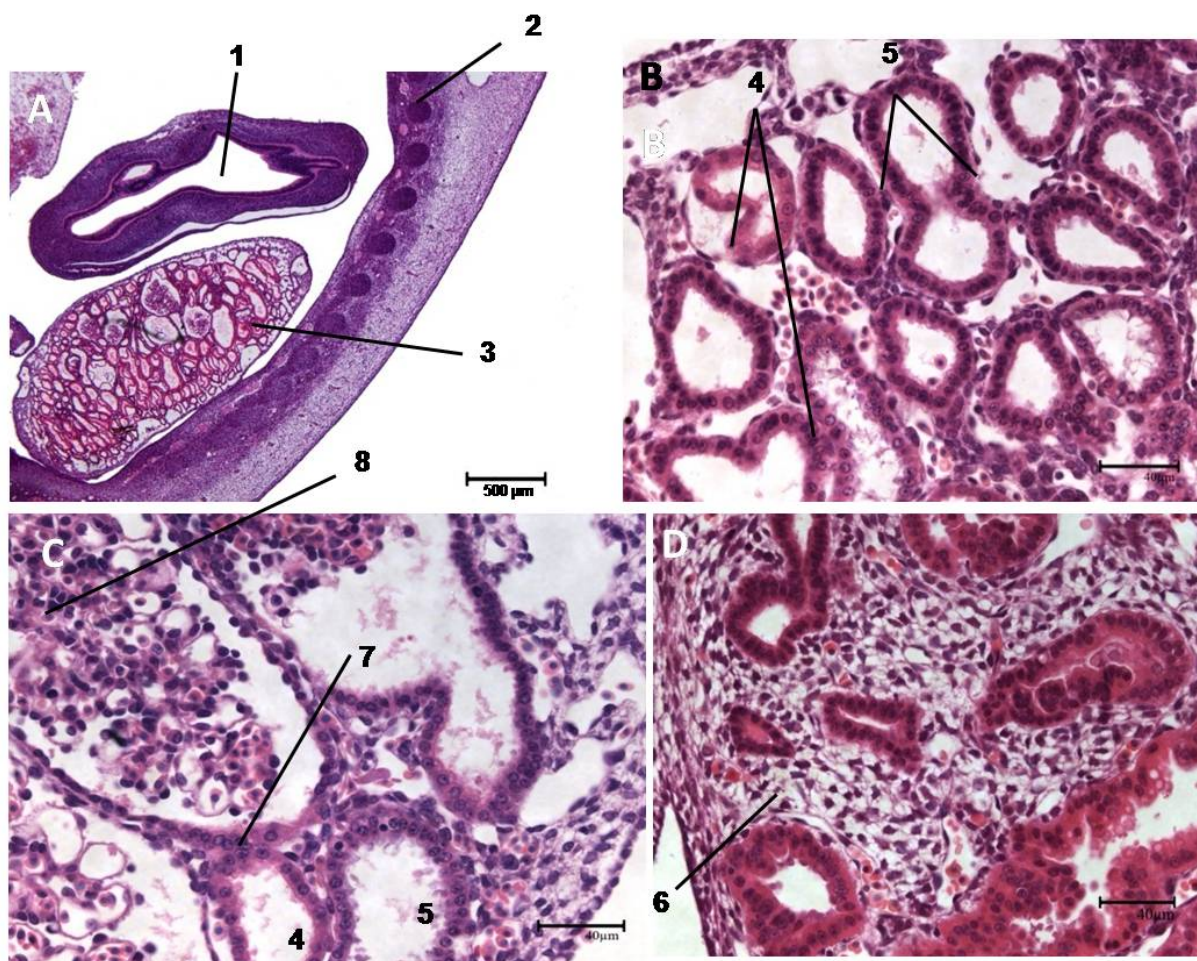


Figura 32: Cortes longitudinais de rins de embrião pertencente ao Grupo V, CR = 1,6cm idade estimada de 32 dias. Coloração HE Legenda: 1. Luz do tubo digestivo primitivo 2. Somito 3. Mesonéfron transição pra metanefron 4. Túbulos contorcidos proximais 5. Túbulos contorcidos distais 6. Túbulo mesonéfrico em processo de degeneração 7. Mácula densa 8. Glomérulo

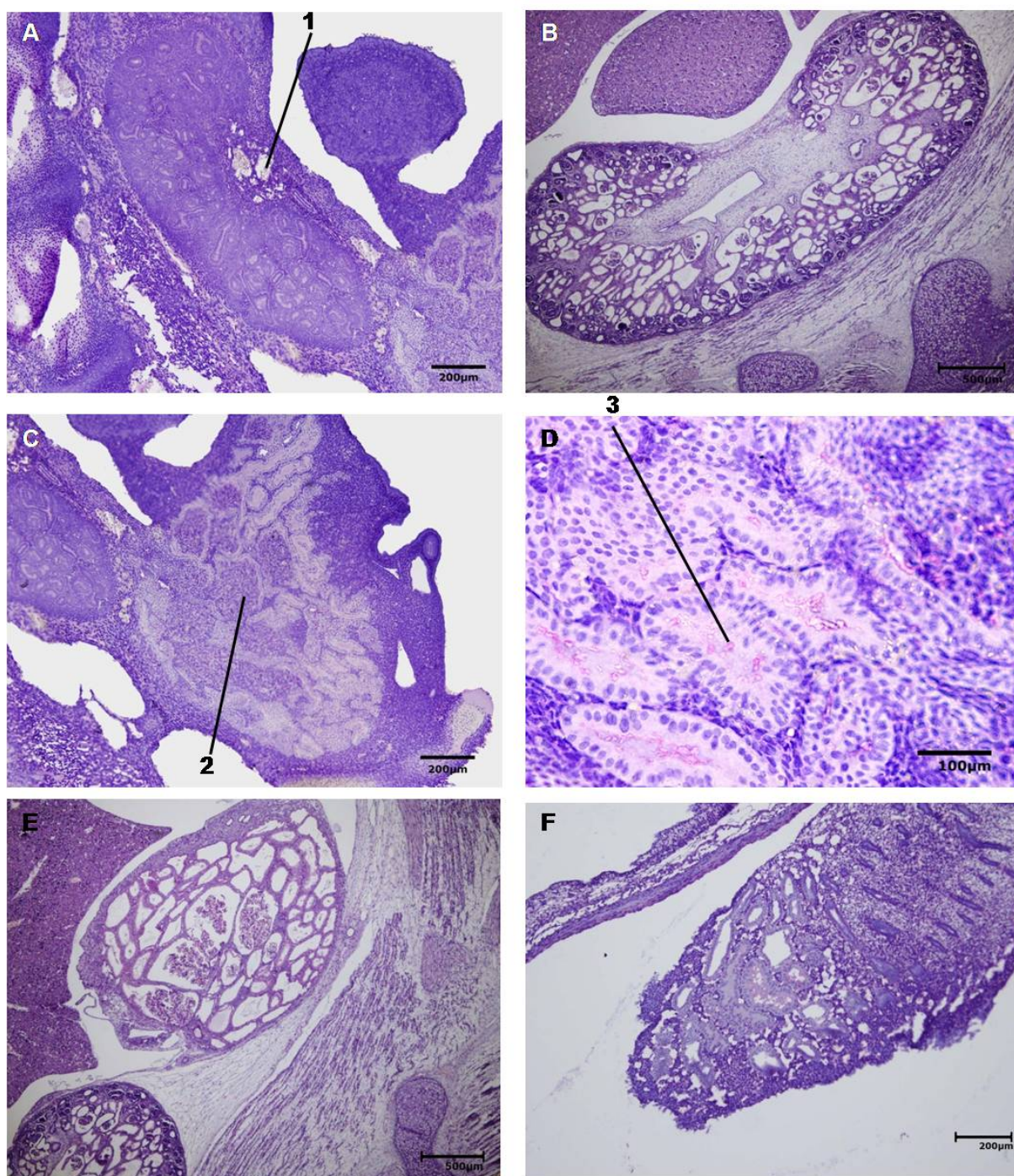


Figura 33: Cortes longitudinais de embrião do Grupo VI. Coloração HE. Nesta fase os rins continuam com formato alongado (1), sendo que ao final dos estágios VI e VII, os rins já apresentam sua arquitetura padrão para um ruminante. Notar ainda a formação da gônada primitiva (2), com formação glandular contendo inúmeros túbulos. Em D e F: destaque para a formação dos cordões testiculares (3)

### 5.2.6 Sistema nervoso

O início do desenvolvimento do sistema nervoso em embriões dá-se pela placa neural e posteriormente o tubo neural (Figura 21 A) de origem ectodérmica. Com o avançar da gestação três vesículas encefálicas tornam-se nítidas no embrião, são elas prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo.

A medula espinhal também foi identificada em embriões a partir do grupo III, sendo constituída de neuroepitélio e revestida por tecido conjuntivo frouxo. Caudal a medula observamos o início da diferenciação de somitos em corpos vertebrais para a futura formação da coluna vertebral e a também a presença de inúmeros vasos circundando essa área (Figura 46 C e D).

A partir do grupo VI podemos observar a diferenciação tecidual no interior do prosencéfalo, e já é possível distinguir massa encefálica nesses fetos. Conforme evoluir da idade gestacional a massa tende a aumentar preenchendo assim todo o mesencéfalo (Figura 34 A).

Os olhos surgem a partir das chamadas vesículas ópticas de cada um dos lados do prosencéfalo, antes disso são apenas sulcos rasos na mesma região.

Essas vesículas em contato com o ectoderma superficial induzem a formação do cristalino; o placódio do cristalino evagina-se e forma a vesícula do cristalino à partir do momento em que a vesícula óptica invagina-se para formar as camadas pigmentada e neural da retina (Figura 48 G e H).

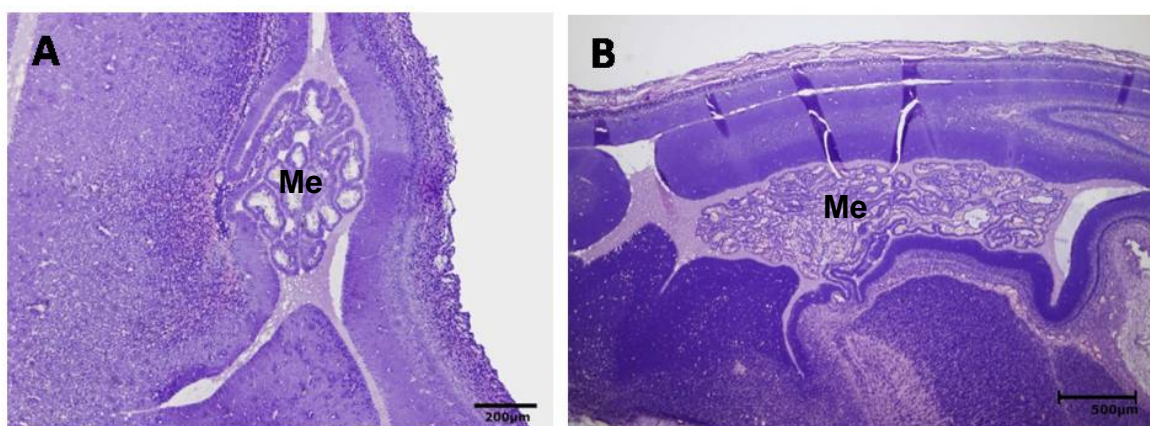


Figura 34: Cortes longitudinais do sistema nervoso de embriões bubalinos do grupo VI, CR = 2,6 cm, idade estimada de 38 dias. Coloração HE. Notar a diferenciação tecidual no interior do prosencéfalo, sendo possível distinguir a massa encefálica. Me, massa encefálica

## 5.2.7 Membranas fetais

Todas as membranas fetais foram estudadas e seus resultados seguem separadamente abaixo

### 5.2.7.1 *Saco vitelino*

O saco vitelino dos bubalinos é composto por três tipos celulares diferentes, formando três camadas distintas, o mesotélio, o endoderma e o mesênquima (Figura 35).

O endoderma situa-se na porção voltada para a chamada cavidade celomática. O mesmo é composto por grandes células esféricas com núcleos redondos e basofílicos, a essas células dá-se o nome de hemangioblastos (Figura 21 G).

A camada de endoderma apóia-se sobre o mesênquima, camada esta que é constituída por células com núcleos amorfos. Dispersas sobre uma matriz extracelular. Uma grande quantidade de vasos sanguíneos encontra-se na matriz, e no interior destes vasos estão presentes células eritroblásticas. À essas estruturas dá-se o nome de ilhas eritroblásticas (Figura.35 A)

A última camada encontrada na membrana vitelina é o mesotélio. Este se encontra voltado para a cavidade vitelina. É formado por um epitélio simples pavimentoso de células delgadas e de núcleo achatado (Figura. 35 B).

Embriões do grupo I apresentaram saco vitelino com poucas ilhas eritroblásticas e maior conteúdo endodermal. Quase não foi visto mesenquima neste grupo as células do mesotélio ainda não possuíam características delgadas de núcleo achatado, também tinham formato arredondado tanto do núcleo quanto do citoplasma (Figura 21 G).

As células endodérmicas do saco vitelino são fortemente marcadas em animais do Grupo II por reações imunohistoquímicas para Oct4, PCNA e vimentina. Esta marcação positiva para Oct4 permanece até em animais mais velhos do Grupo IV (Figura 35 C e D e 36 C).

Nos embriões do Grupo II a quantidade de mesenquima e de ilhas eritroblásticas é consideravelmente maior que no grupo anterior. Este volume tende a aumentar até os o Grupo IV. Também nesta fase podemos observar a conexão do saco vitelino com o intestino primitivo (Figura 36 A e B).

A microscopia eletrônica de varredura podemos observar uma enormidade de estruturas na superfície da membrana vitelina, dentre ela destacam-se as hemáceas e a descamação epitelial bem nítida. Também podemos visualizar o íntimo contato entre cordão umbilical e membrana vitelina (Figura 37).

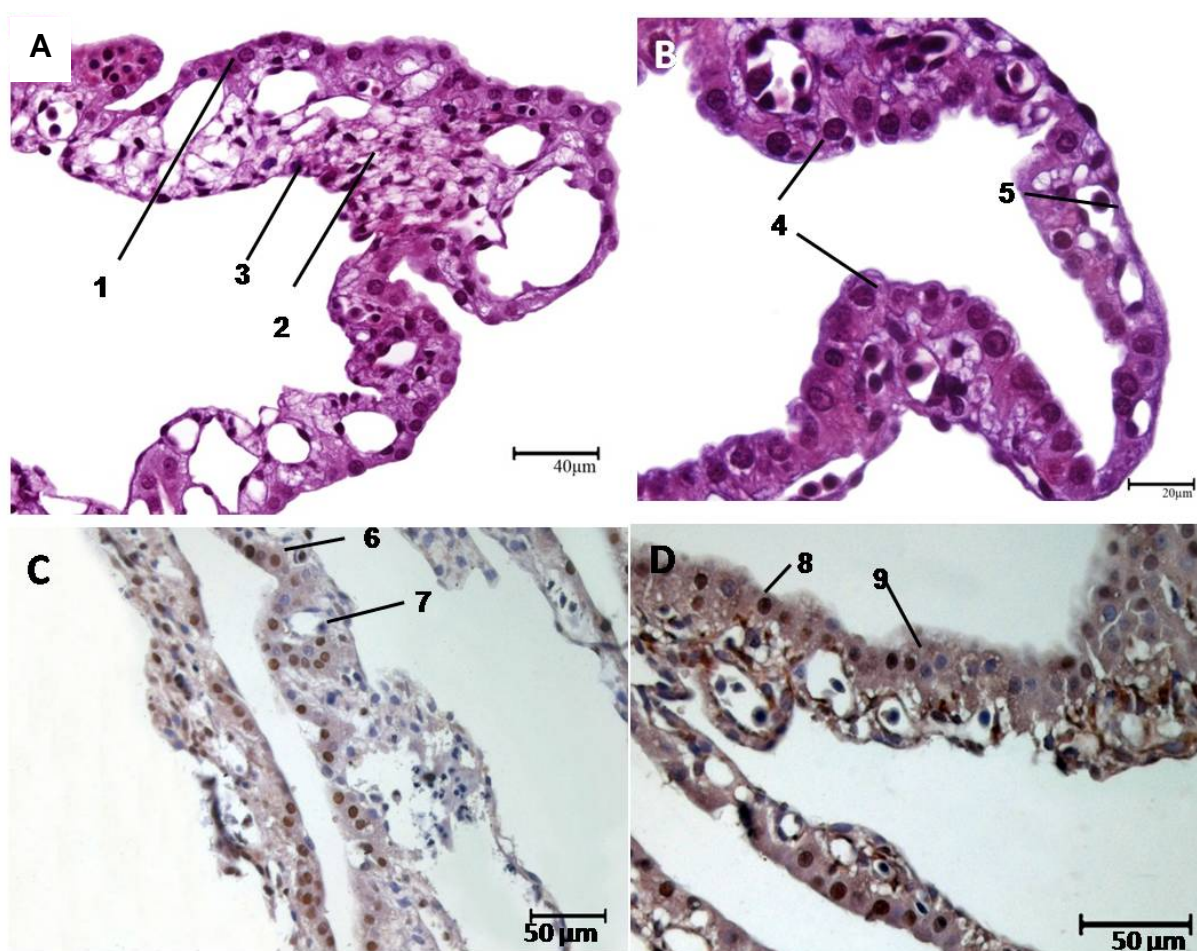


Figura 35: Cortes longitudinais de saco vitelino de embriões pertencentes ao Grupo II, Coloração Picrosírius (A e B). Imunohistoquímica, PCNA (C) e vimentina (D). Legenda: 1. Ilhotas vitelinas 2. Mesênquima 3. Mesotélio 4. Endoderma - hemangioblasto 5. Eritroblasto 6. Marcação positiva em hemangioblastos para PCNA 7. Marcação negativa em hemangioblastos para PCNA 8. Marcação positiva em hemangioblastos para vimentina 9. Marcação negativa em hemangioblastos para vimentina

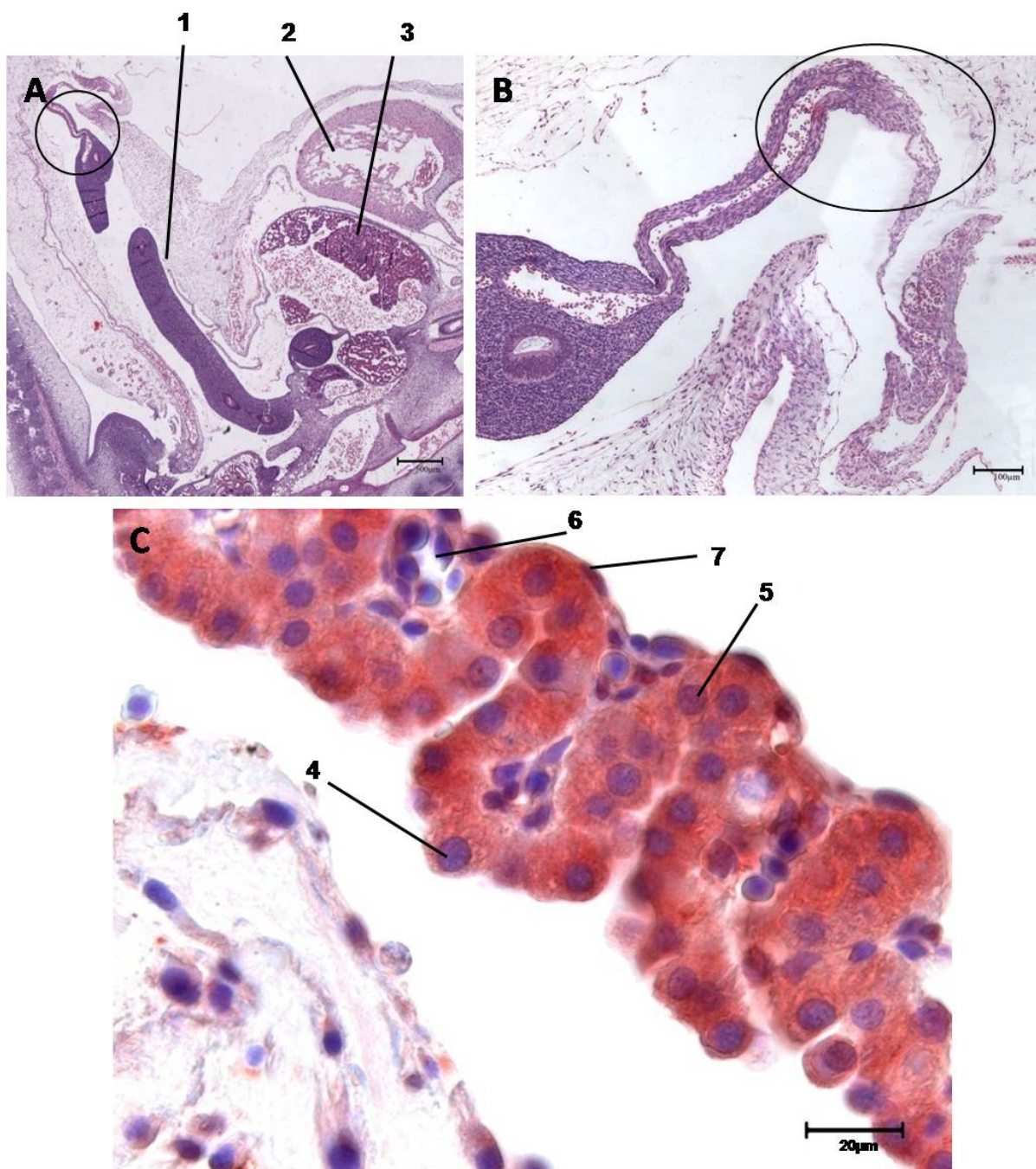


Figura 36: Cortes longitudinais de saco vitelino de embriões pertencentes ao Grupo IV, CR 1,5cm e idade estimada de 30 dias. Coloração HE (A e B) e imunohistoquímica para detecção de Oct4 (C) Legenda: 1. Projeção fisiológica do tubo intestinal primitivo 2. Ventrículo cardíaco 3. Fígado primitivo 4. Hemangioblasto negativo para Oct 4 5. Hemangioblasto positivo para Oct4 6. Illhotas vitelinas 7. Mesotélio

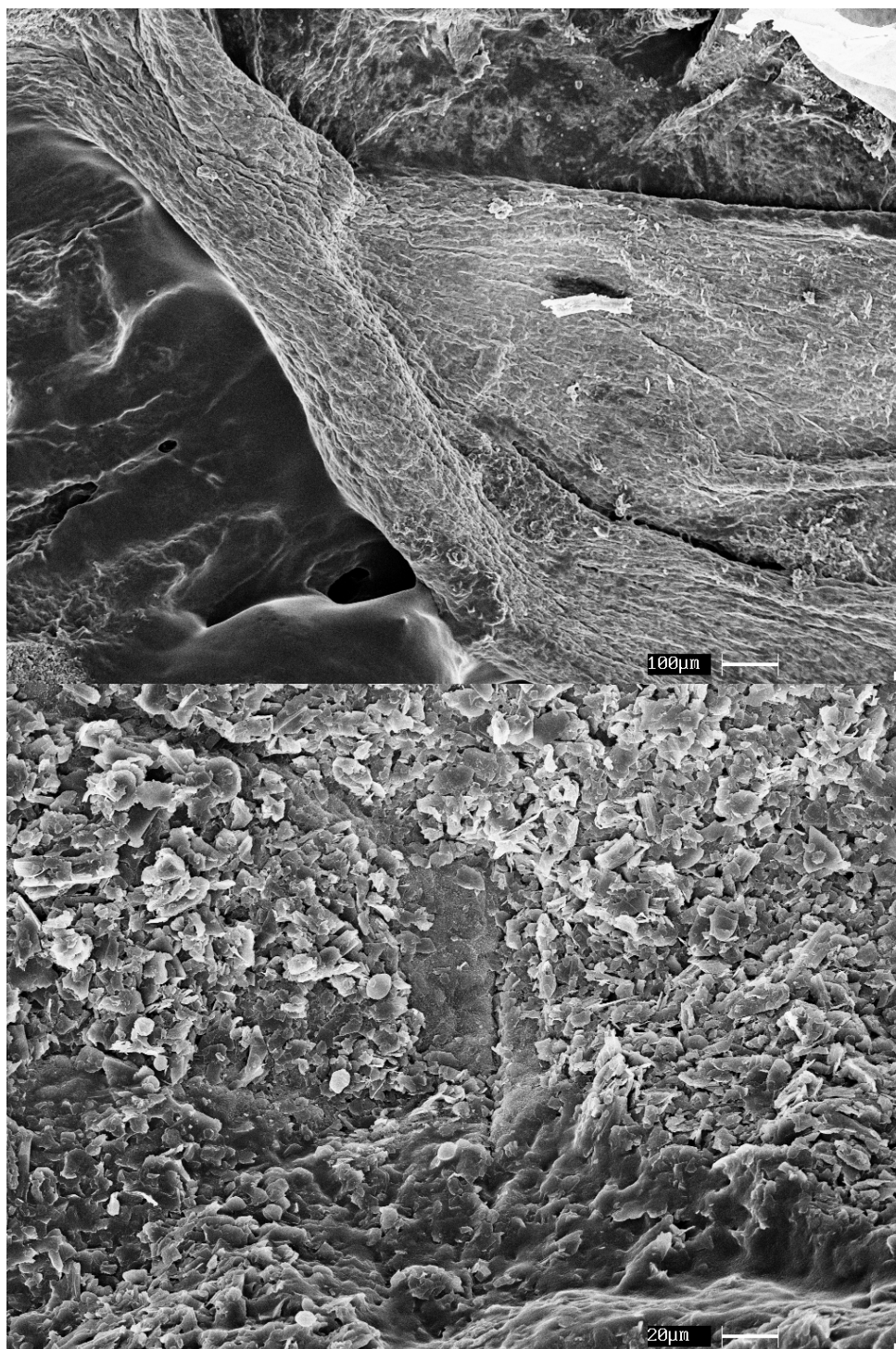


Figura 37: Embrião pertencente ao Grupo V, CR = 1,6cm idade estimada de 32 dias. MEV. Acima ligação do funículo umbilical e do saco vitelino; abaixo em maior aumento notamos a descamação do tecido vitelino e a abundância de hemáceas, face interna do tecido vitelino



### 5.2.7.2 Córion

O córion é constituído por uma camada de células arredondadas, dispostas em formato linear de maneira muito regular e homogênea, aspecto esse semelhante a um epitélio simples cúbico.

Geralmente apresenta uma camada simples de células, mas pode apresentar mais de uma camada (Figura. 38B). Estas células, as quais, de modo geral, são marcadas fortemente pelas diferentes colorações, são cubóides, grandes, e globosas, com núcleo grande e material genético bem visível (Figura. 38B); a elas dá-se o nome de células trofoblásticas; muitas são possuidoras de um núcleo globoso e repleto de grânulos, porém, nota-se também a presença de várias células de mesma origem, com dois ou mais núcleos fundidos, o que as torna maiores do que as anteriores e as caracteriza como células trofoblásticas gigantes (Figura. 38A e B).

Notamos, na maioria de nossas amostras a fusão do córion com a membrana seguinte, o alantóide, denominando a fusão de corioalantóide (Figura. 38C), principalmente em animais a partir do grupo VI. No entanto também visualizamos áreas onde as mesmas não se fundiram ou ao que parece estavam em processo de fusão em embriões dos Grupos IV e V (Figura. 38 A e B).

Com a utilização da microscopia eletrônica de transmissão pudemos observar no citoplasma, a presença de uma grande quantidade de cisternas de retículo endoplasmático (Figura 39). Eram visíveis muitas vesículas no citoplasma das células (Figura 39). Foi possível analisar delicadas vilosidades presentes na região apical da célula, estas eram alongadas e possivelmente são formações dos cotilédones, onde haverá a junção com as carúnculas uterinas, em embriões do Grupo III a formação cotiledonária só é visível em MET (Figura 39 F e G).

Encontramos uma grande quantidade de células trofoblásticas gigantes com dois ou mais núcleos (Figura 39 A a C, F e G). Pode-se notar que os núcleos destas células são bem globosos e que contêm áreas nas quais a cromatina se encontra mais densa e onde ela se encontra mais frouxa (Figura 39 A a C, F e G).

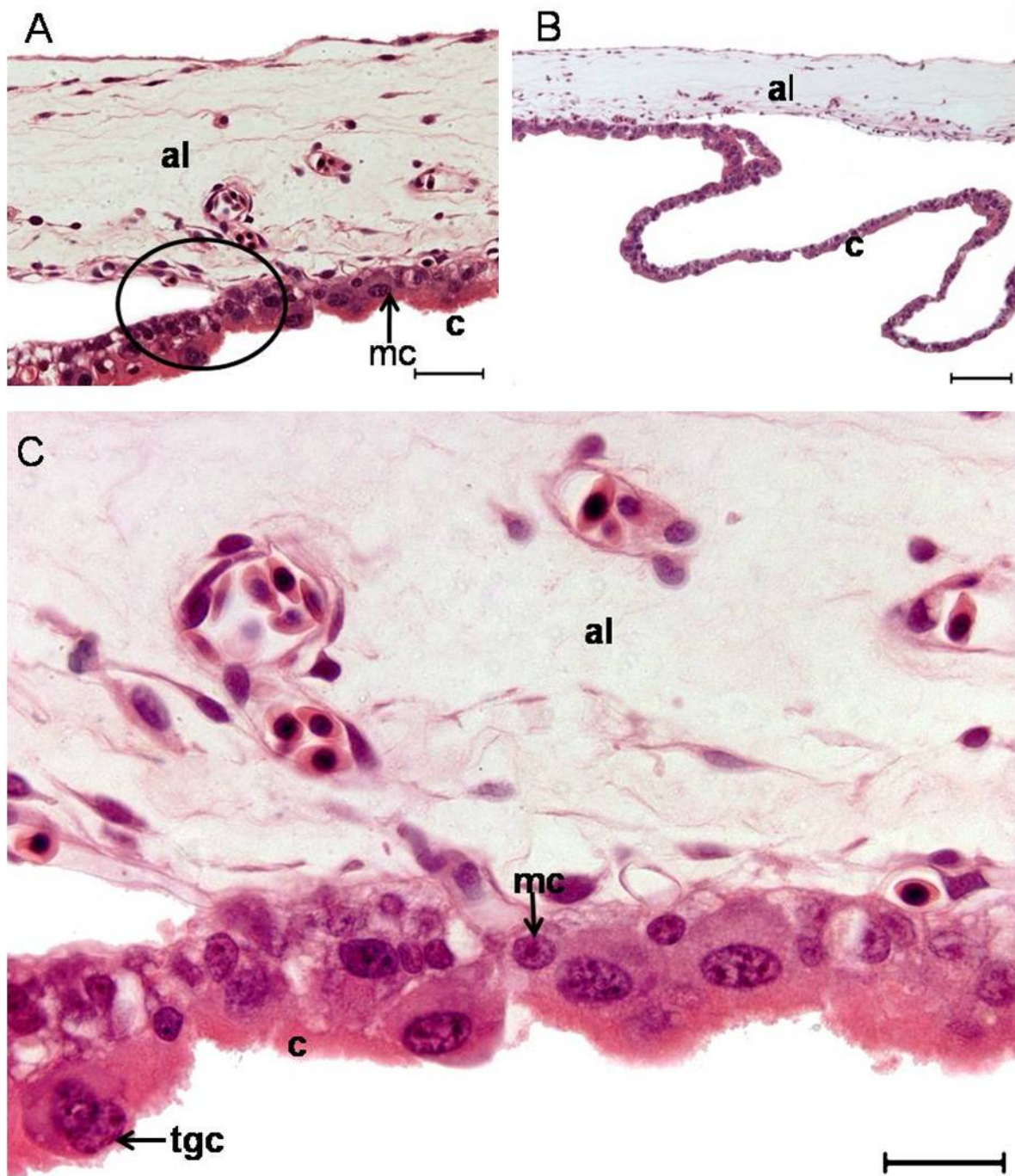


Figura 38- Fotomicrografia de corioalantóide. Embrião com Crown Rump (CR) de 1,5 cm, idade estimada de 30 dias (A-C) al - membrana alantoideana; c- membrana coriônica; mc – célula trofoblástica mononucleada; Notar a possível zona de junção do córion com o alantóide na área circulado (A). tgc – Célula trofoblástica gigante; A – 40  $\mu$ m, HE; B - 100  $\mu$ m, HE; C 20  $\mu$ m, HE

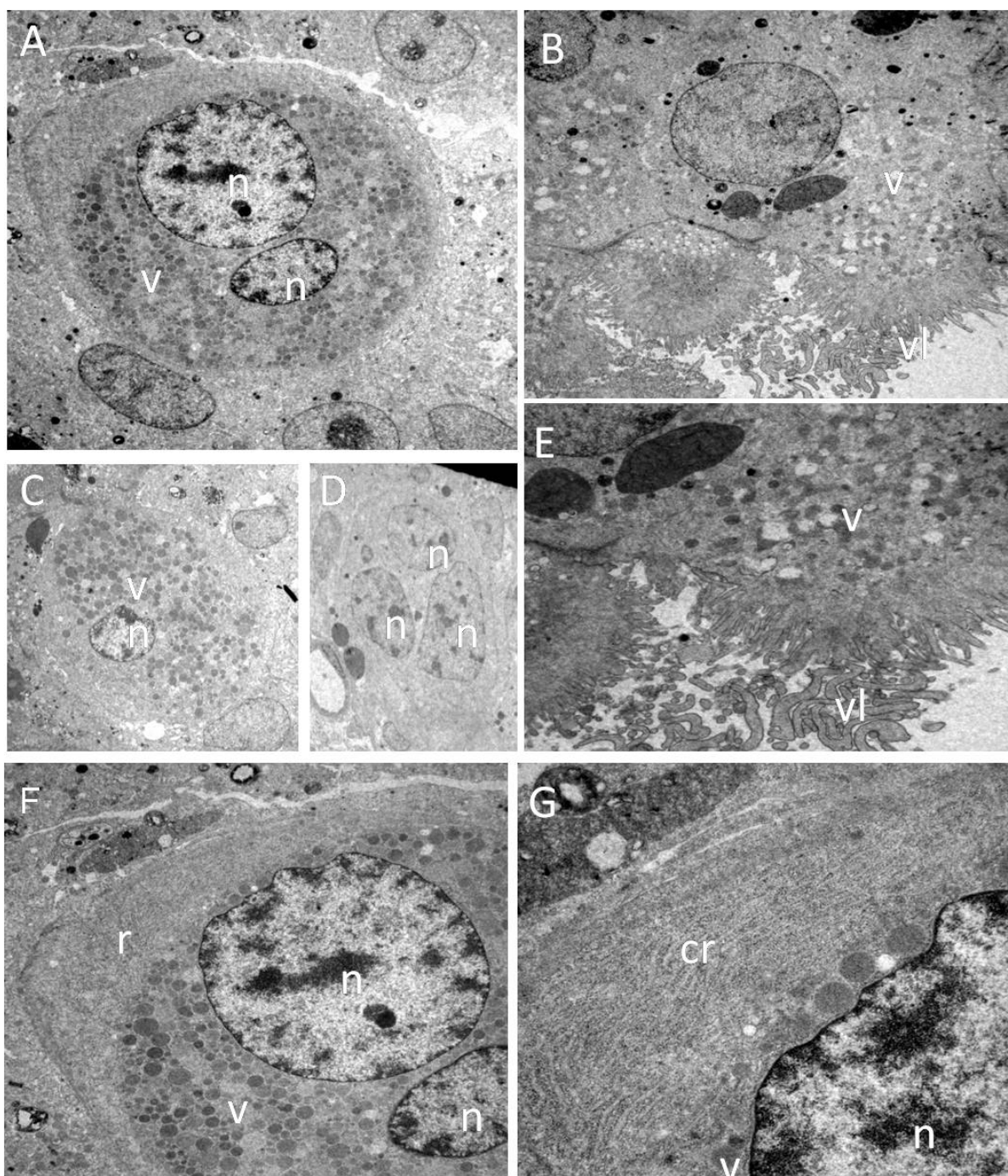


Figura 39: Eletromicrografia de células trofoblásticas do corionalantóide do embrião bubalino. Embrião com CR de 1,0 cm, idade estimada 23 dias. Notar as células com um (C), dois (A) e três (D) núcleos(n). Notar também presença de muitas vesículas em A, B (vl). A – Aumento de 2500 vezes. C – Aumento de 2500 vezes. D – Aumento de 1500 vezes. Notar presença de microvilosidades (vl) na região apical da célula e de muitas vesículas no citoplasma (v). B – Aumento de 5000 vezes. E – Aumento de 7500 vezes. Célula trofoblástica gigante. Notar em F a presença de dois núcleos (n), de retículo endoplasmático na região apical da célula (r) e de uma grande quantidade de vesículas no citoplasma (v). Observar em G as cisternas do retículo endoplasmático (cr). F – Aumento de 7500 vezes. G – Aumento de 15000 vezes

### 5.2.7.3 *Alantóide*

O alantóide de embriões dos Grupos IV e V é caracterizada por uma membrana pouco celularizada. Possui em suas extremidades uma fina camada de epitélio simples pavimentoso, onde as células em sua maioria têm formato alongado. No entanto em placenta de animais do Grupo II estas tendem a se tornar achatadas (Figura. 40 C). Abaixo do epitélio, observamos uma generosa quantidade de mesênquima, cuja distribuição depende da idade gestacional, sendo maior em casos de gestações mais avançadas (Figura. 40B). No mesênquima observa-se uma pequena quantidade de células arredondadas com um arranjo frouxo entre elas. Há também presença de vasos repletos de eritroblastos (Figura. 40 A). Em geral, observam-se nessas células que proporcionalmente o núcleo é mais desenvolvido quando comparado ao citoplasma.

À microscopia eletrônica de transmissão, animais do Grupo III mostram vasos distribuídos em diversos locais e a presença de um mesênquima pouco celularizado, com quantidade razoável de tecido conjuntivo amorfo. Observa-se uma célula endotelial com núcleo achatado recobrindo todos os vasos, dentro dos quais, pode-se observar células sanguíneas, os eritrócitos (Figura. 41).

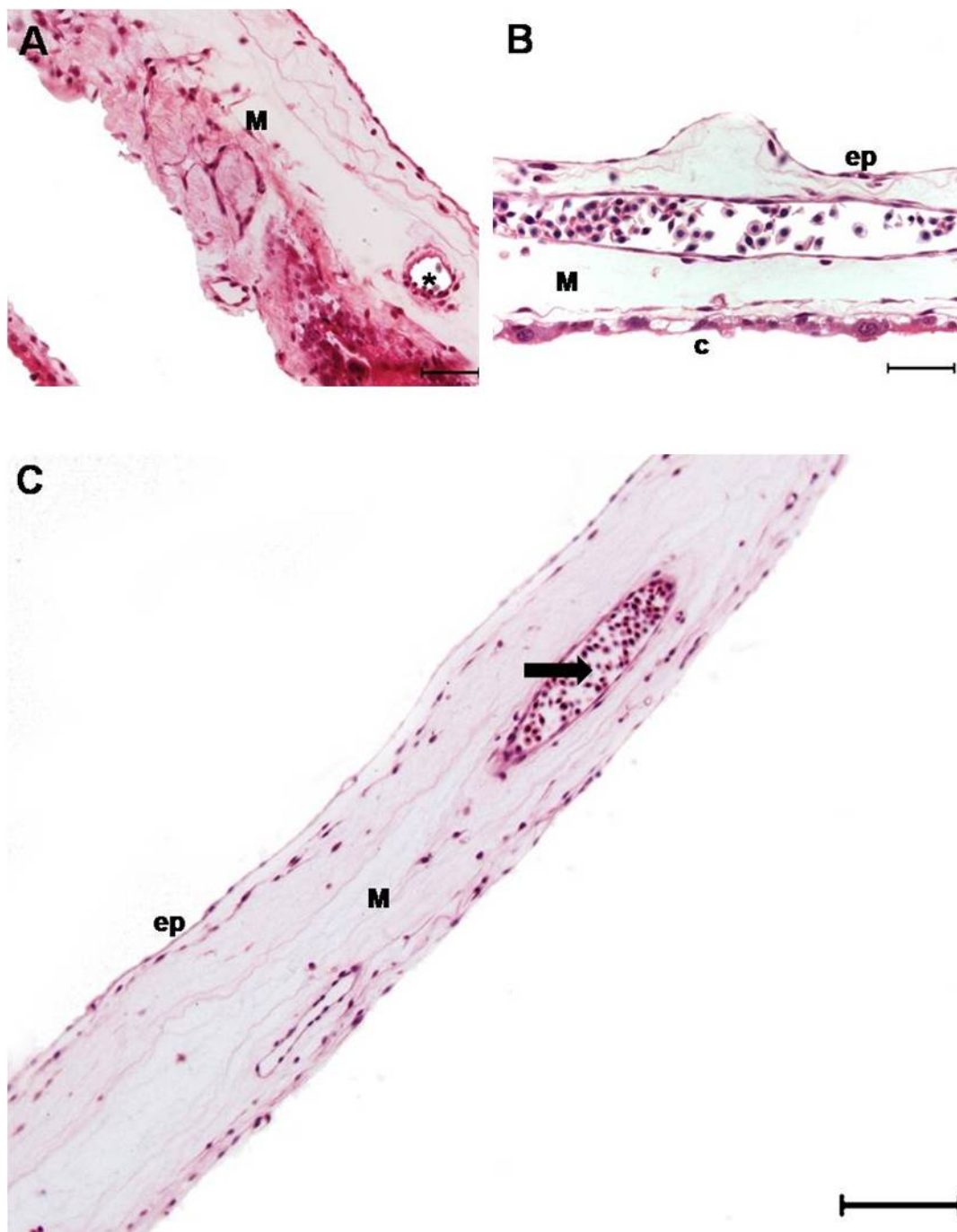


Figura 40 - Fotomicrografia de alantóide. Embrião com Crown Rump (CR) de 1,0 cm, idade estimada de 23 dias (A); Embrião com CR de 0,7cm, idade aproximada: 19 dias (B); Embrião com Crown Rump (CR) de 1,5 cm, idade estimada de 30 dias (C); c- membrana coriônica; M – mesênquima; ep – epitélio pavimentoso; \* - precursor do vaso sanguíneo; seta – células eritoblásticas. A – 50  $\mu$ m, HE; B - 40  $\mu$ m,HE; C 100  $\mu$ m, HE.

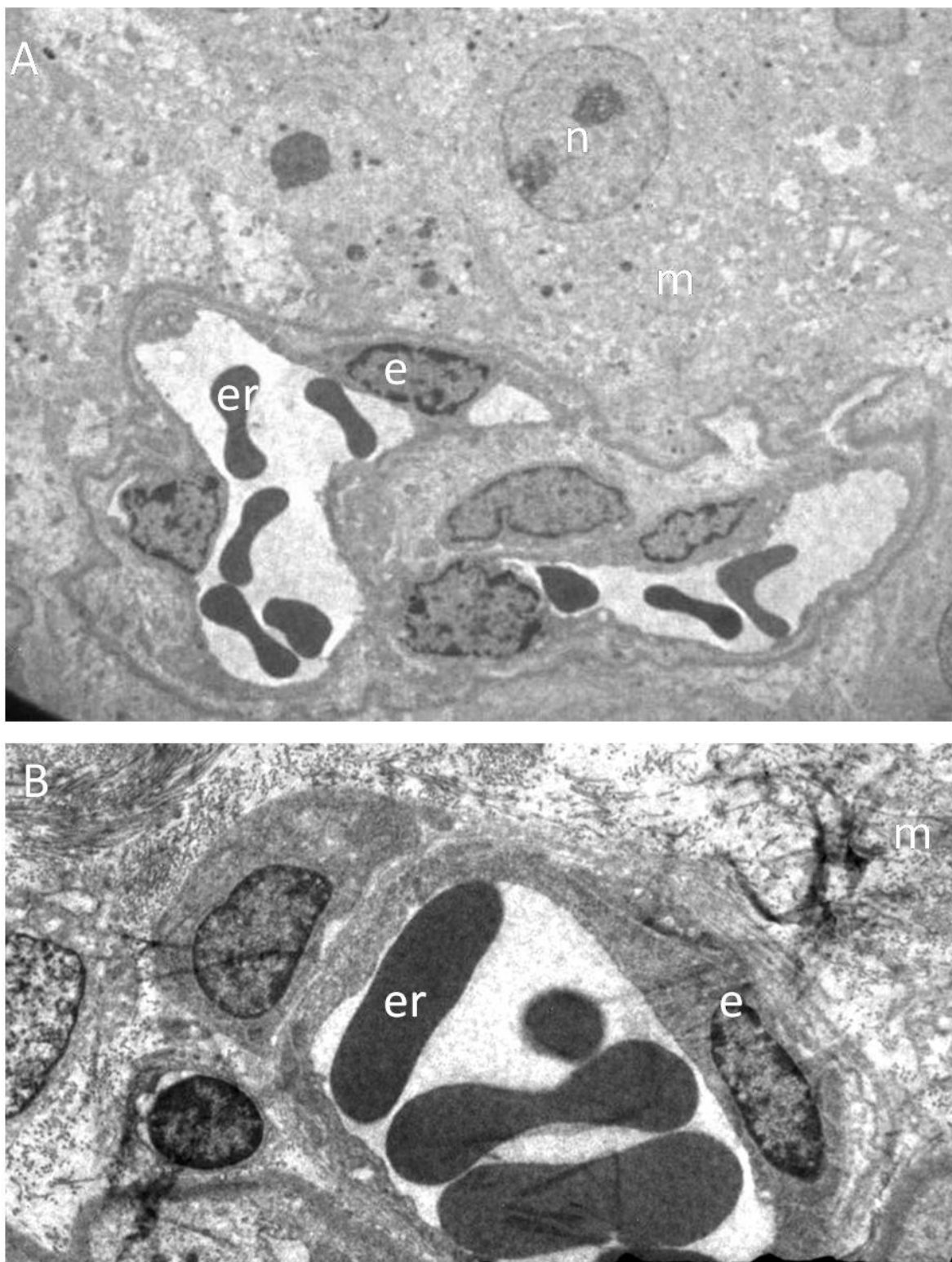


Figura 41– Eletromicrografia dos vasos do alantóide de embrião bubalino. Embrião com CR de 1,0 cm, idade estimada 23 dias. Notar eritrócitos (er) dentro dos vasos, células endoteliais (e) dos vasos e mesênquima com substância amorfa e poucas células (m). Notar em A célula com núcleo grande e dois nucléolos bem definidos (n). A – Aumento de 1500 vezes. B – Aumento de 4000 vezes

#### 5.2.7.4 *Âmnion*

Da mesma forma que o alantóide, a membrana amniótica é composta por duas camadas distintas. A primeira destas é constituída por uma fina e única camada de células achatadas, epitélio simples pavimentoso (Figura. 42A-B).

Na maioria das vezes, nos animais de todos os grupos estudados e representados por fotomicrografias dos grupos II, III, IV e VI, forma-se uma camada simples e contínua de células organizadas (Figura. 42C). Esta membrana, apesar de ser morfológicamente semelhante ao alantóide, não apresenta as típicas estruturas precursoras dos vasos sanguíneos, nem tampouco a fina camada de epitélio pavimentoso em contato com a extremidade que faz aposição ao embrião.

Assim como no alantóide, o mesênquima é uma camada constituída de substância amorfa onde é observada pouca quantidade de células. Este não se distribui de forma regular ao longo de toda membrana amniótica de forma que em algumas regiões nota-se diferença na sua espessura (Figura. 42A-C).

À microscopia eletrônica de varredura notamos a disposição em colméia das células dessa membrana sendo algumas delas dotadas de microvilos e outras de superfície lisa (Figura 43).

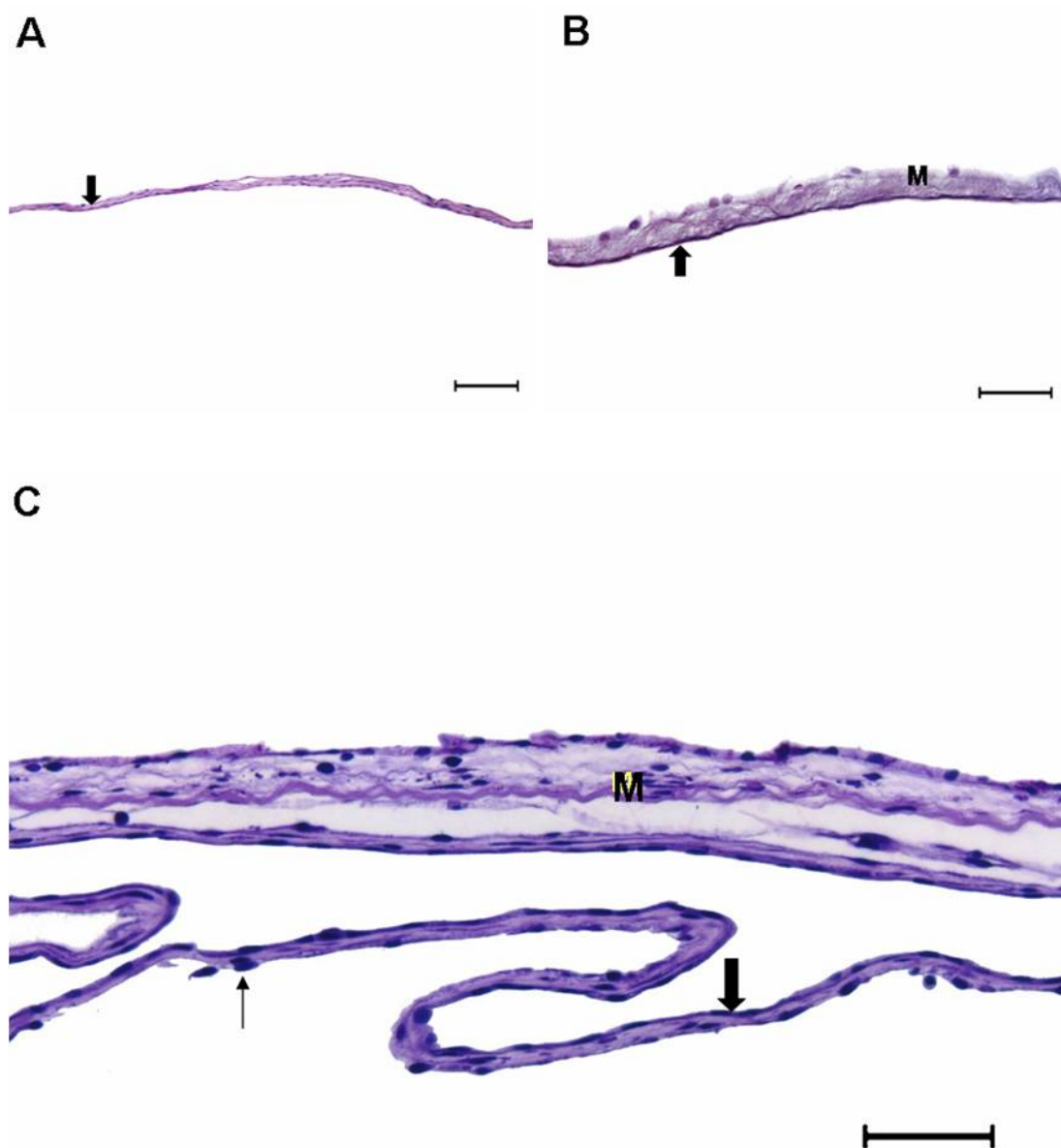


Figura 42 - Fotomicrografia de âmnion. Embrião com Crown Rump (CR) de 1,3 cm, idade estimada de 26 dias (A); Embrião com CR de 1,4cm, idade aproximada: 28 dias (B); Embrião com Crown Rump (CR) de 2,6 cm, idade estimada de 36 dias (C);M – mesênquima; seta – epitélio pavimentoso simples. A – 50  $\mu$ m, Azul de Toluidina; B - 40  $\mu$ m,Azul de Toluidina; C - 100  $\mu$ m, PAS.



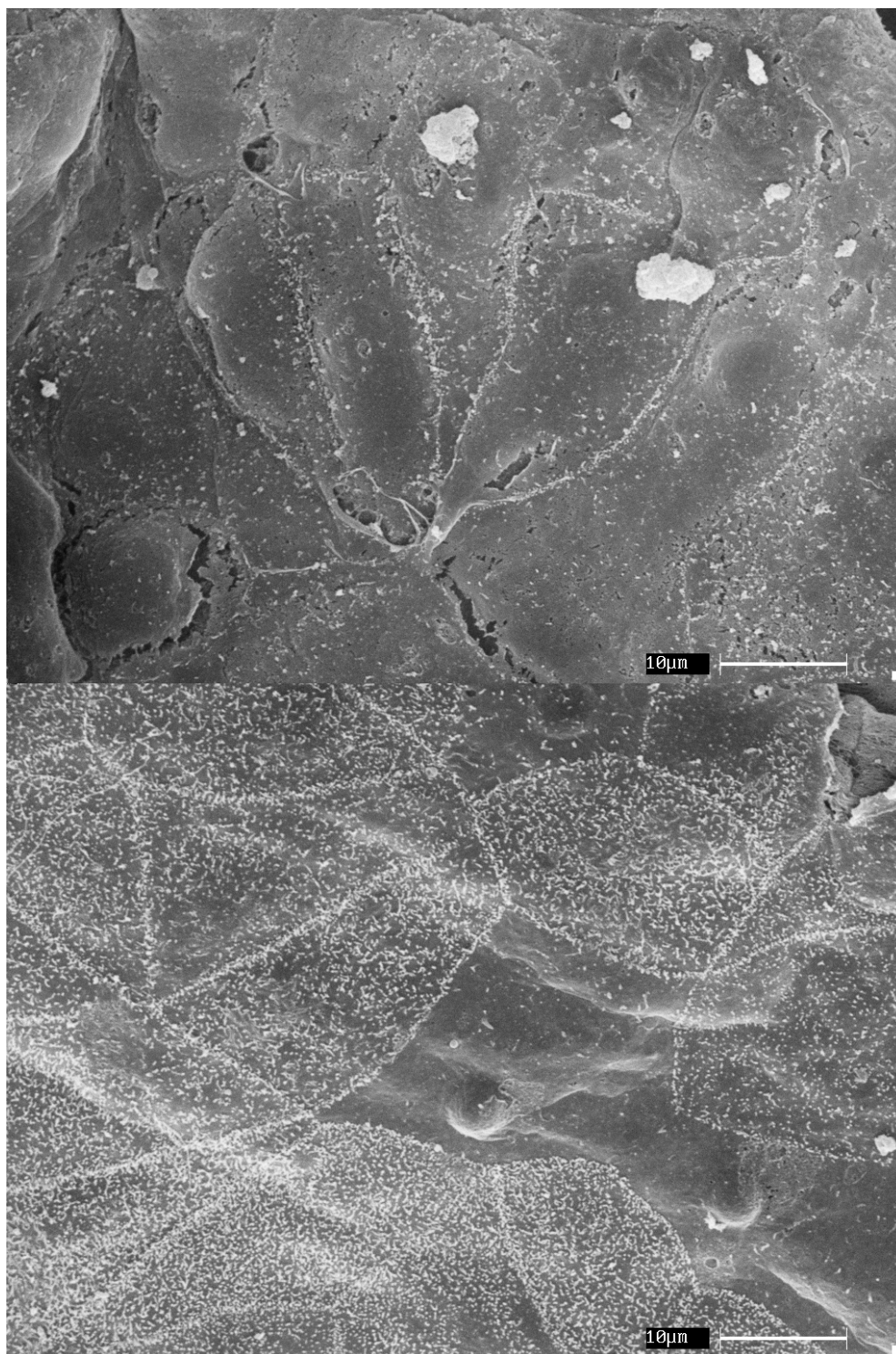


Figura 43 - Fotomicrografia do âmnion. Embrião com Crown Rump (CR) de 2,3 cm, idade estimada de 36 dias; notar a divisão celular acima de maneira desorganizada na superfície interna de contato com o embrião e a disposição nitidamente em colméia das células da superfície externa da mesma membrana, observar o grande número de microvilosidades em muitas das células do âmnion e a ausência dos mesmos em outras células da mesma membrana

### 5.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

Ao realizarmos a reação de imunohistoquímica para detecção da expressão do anticorpo Oct 4 nos animais dos grupos de II a VI observamos os resultados expressos na tabela 2 que segue. As figuras 44 a 48 indicam as reações observadas.

Tabela 2: Identificação das imunopositividade para detecção da expressão do anticorpo Oct4 dos embriões coletados – São Paulo – 2009

Estrutura/órgão/região	GII	GIII	GIV	GV	GVI
Somitos	+	++	+	-	-
Coração	+	++	+	-	-
Pulmões	-	-	-	-	-
Fígado	++	+	+	+	-
Estomago	-	-	-	-	-
Rim	+	++	++	+	-
Sistema nervoso	-	-	+	+	-
Saco vitelino	++	++	++	+	/
Âmnion	+	+	/	/	-
Mesênquima	+	+	+	-	-
Células sanguíneas	-	++	-	-	-
Olho/prosencéfalo	-	-	-	-	-

++, marcação fortemente positiva; +, marcação positiva; -, marcação negativa; / não foi avaliado

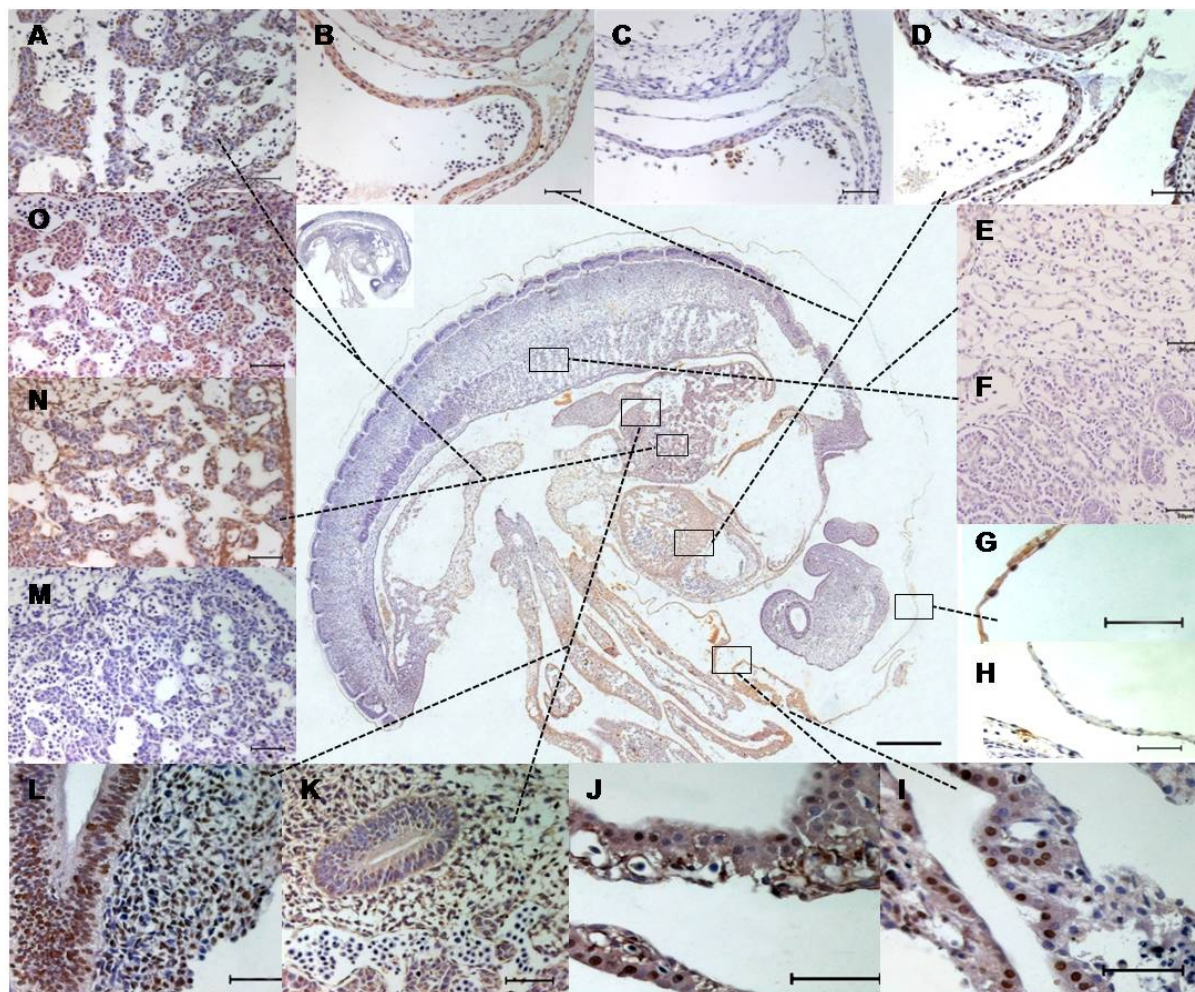


Figura 44: Cortes longitudinais de embrião do grupo G II, os quais foram submetidos a marcação por imunohistoquímica para detecção do Oct4, PCNA e vimentina. Reações positivas para Oct4: Fig. B, parede do coração; F, mesonefron; G, âmnion; K, broto pulmonar; O, fígado; Reações positivas para PCNA: I, saco vitelino; A, fígado; D, coração. Reações positivas para vimentina: Fig J, saco vitelino; L, tubo gástrico; N, fígado; Reações negativas: C, paredes do coração; E, rim; H, amnion e M, fígado

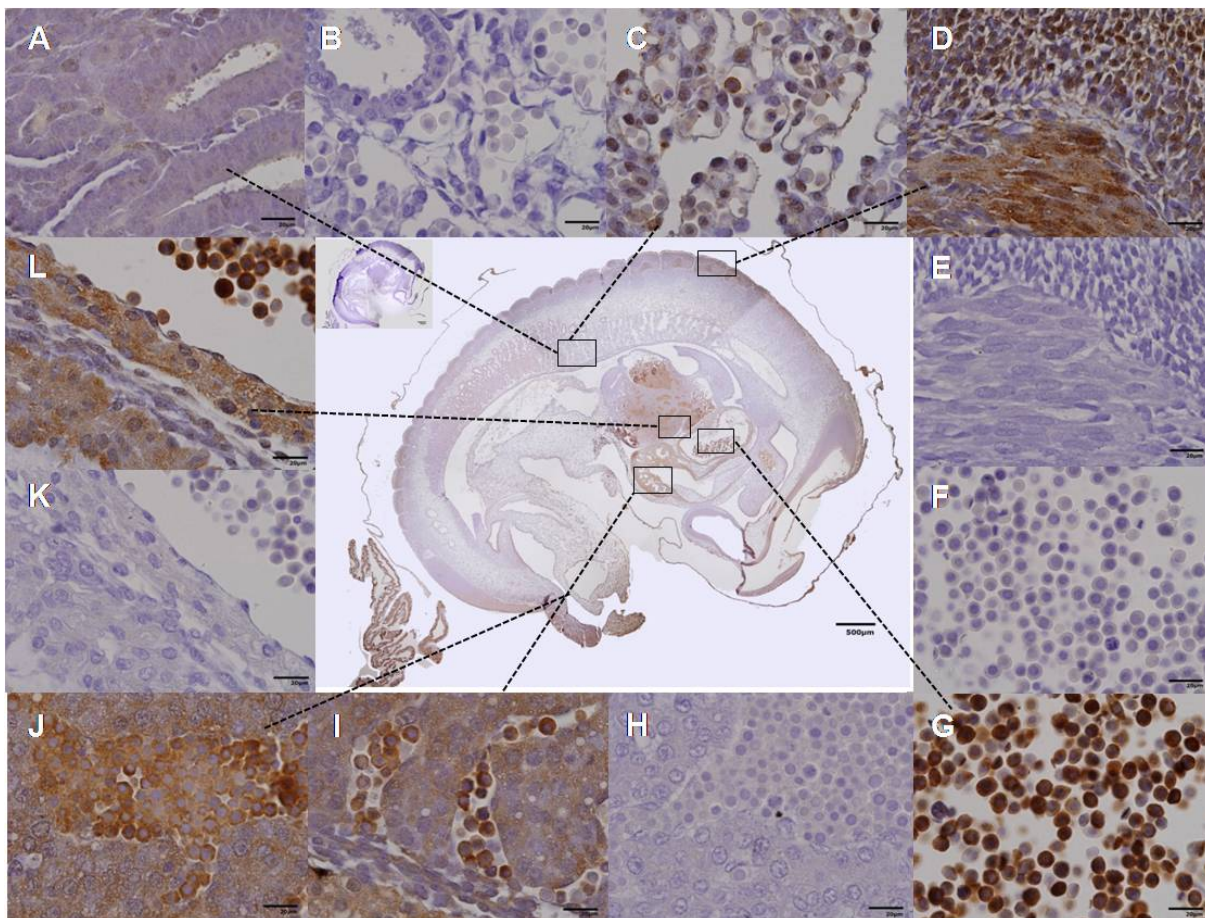


Figura 45: Cortes longitudinais de embrião do grupo G III, os quais foram submetidos a marcação por imunohistoquímica para detecção do Oct4. Reações positivas: A e C, rim; D, somito; G, células sanguíneas; I e J, hepatoblastos e L, parede ventricular. Reações negativas: B, rim; E, somito; F, células sanguíneas, K, parede ventricular e H, hepatoblastos

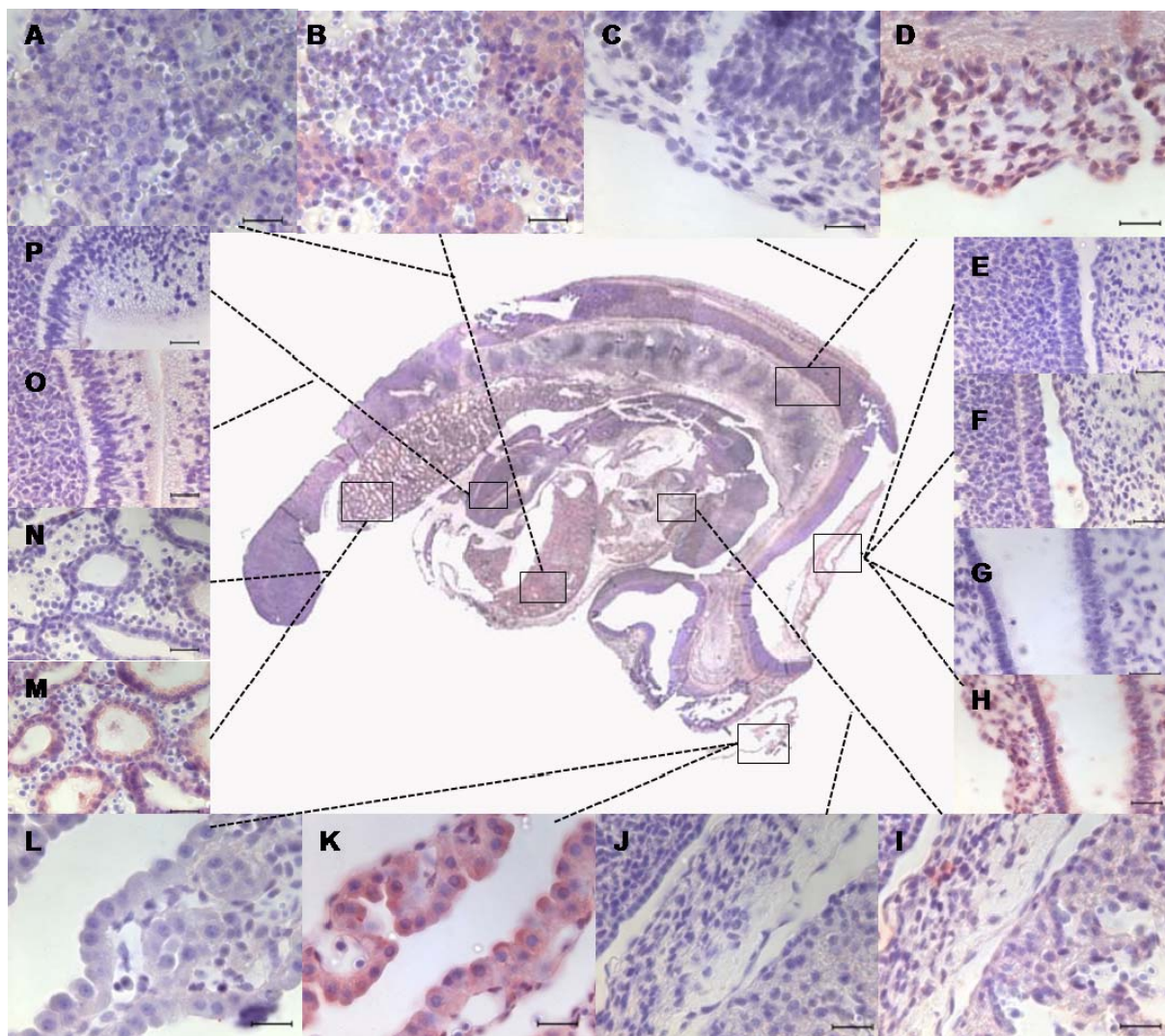


Figura 46: Cortes longitudinais de embrião do grupo G IV, os quais foram submetidos a marcação por imunohistoquímica para detecção do Oct4. Reações positivas: B, fígado; D, medula; F e H, sistema nervoso; I, mesênquima cardíaco; K, saco vitelino; M, rim; O, intestino primitivo. Reações negativas: A, fígado; C, medula; E e G, sistema nervoso; J, mesênquima cardíaco; L, saco vitelino; N, rim e P, intestino primitivo

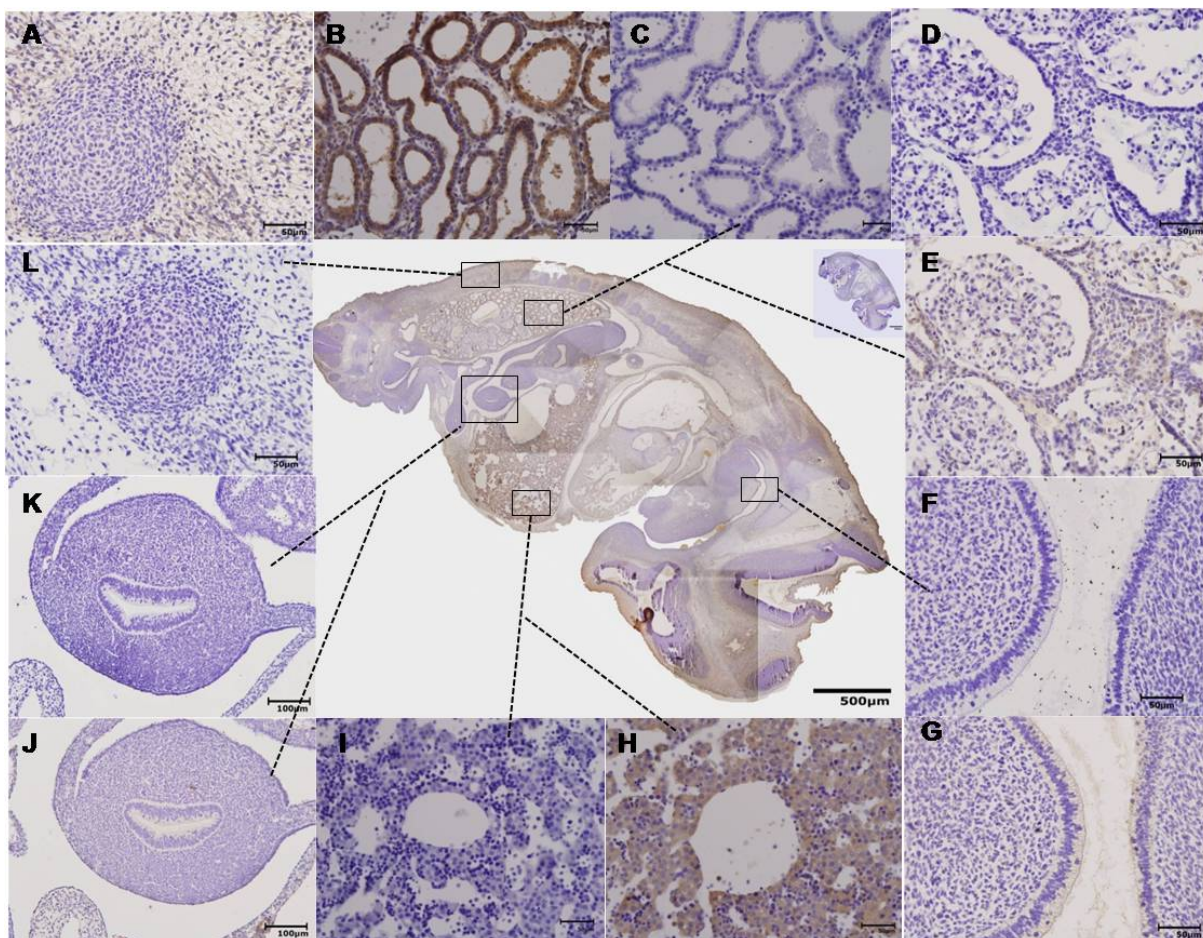


Figura 47: Cortes longitudinais de embrião do grupo G V, os quais foram submetidos a marcação por imunohistoquímica para detecção do Oct4. Reações positivas: A, somito; B e E, rim; G, cavidade oral; H, fígado; J, tubo gastico. Reações negativas: C e D, rim; F, mesênquima; I, fígado; K, estômago e L, somito

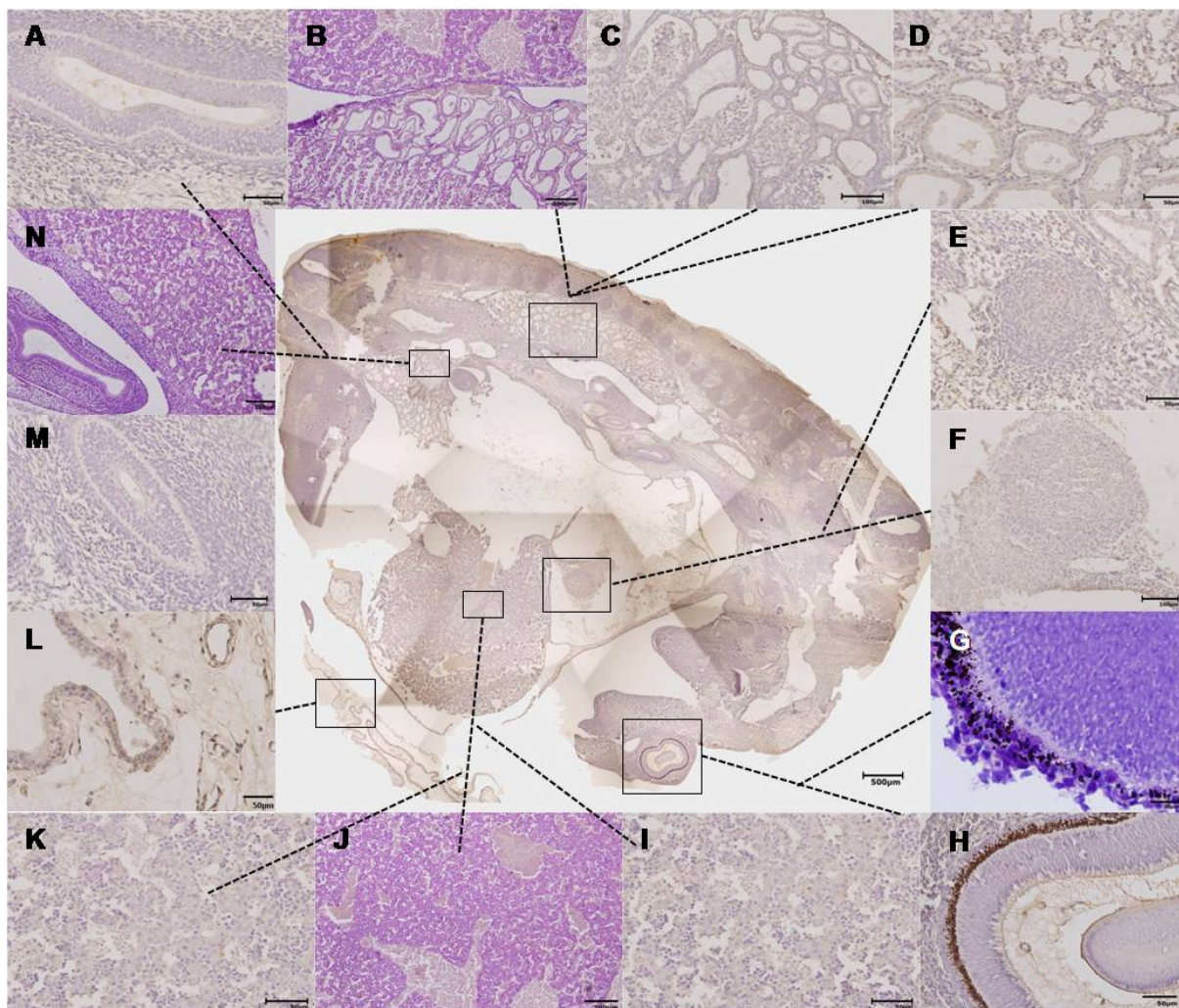


Figura 48: Cortes longitudinais de embrião do grupo G VI, os quais foram submetidos a marcação por imunohistoquímica para detecção do Oct4. Nesta fase do desenvolvimento embrionário não houve mais marcação positiva para Oct-4. A, M e N, estômago; B, C e D, rim; E e F, coração; G e H, placódio óptico; I, J, e K, fígado e L, âmnion

## 6 DISCUSSÃO

Muitas vezes na ausência de dados expressivos passíveis de comparação provenientes de uma mesma espécie, a pesquisa permite que se busquem dados de outras espécies passíveis de comparação para que se possa dar maior qualidade ao estudo. A seguir nossos resultados sobre o desenvolvimento embrionário de búfalos foram comparados aos dados já descritos na literatura para embriões humanos, bovinos e camundongos.

### 6.1 Características macroscópicas

A tabela inicial contendo o Crow-Rump (CR) dos embriões coletados apresenta as idades estimadas dos animais baseada em duas pesquisas importantes; Evans e Sack (1973) e Abdel-Raouf e El Nagar (1969); iniciam suas estimativas em 40 e 30 dias respectivamente. No entanto, Evans e Sack (1973) nos permite continuar seguindo a curva de sua tabela na tentativa de determinar idades inferiores aos 40 dias precisos contidos na tabela. Vale lembrar que seus dados foram obtidos através de fetos bovinos.

Abdel-Raouf e El Nagar (1969) afirmaram que seus cálculos só são válidos para búfalos com idade superior a 30 dias. Esta afirmação foi testada com animais com idade supostamente inferior à indicada, e a aplicação da fórmula teve como resultado idades não condizentes ao tamanho dos animais. Isto nos permite confirmar que tais fórmulas só são passíveis de aplicação para animais com comprimento superior a 5 cm, conforme visualizado na própria tabela 1, onde verificamos que os dados passam a ficar próximos aos estimados por Evans e Sack (1973).

Diante disso não indicamos Abdel-Raouf e El Nagar (1969) para determinar idade embrionária e sim fetal.

Um dos desafios desse estudo é o de estimar a idade dos embriões com a maior precisão possível, sem ter conhecimento da data de fecundação. Para isso foi confeccionado um gráfico baseado no de Evans e Sack (1973). O gráfico 1 contido



na página 52 poderá auxiliar em estudos futuros para análise de idade embrionária e respectivas características de cada fase embrionária de bubalinos.

Portanto, de acordo com este estudo, embriões bubalinos com tamanho inferior a 5mm tem idade estimada entre 10 e 15 dias de gestação. Estes dados não puderam ser comparados com os de outros pesquisadores já que não foram encontradas referências a respeito de comprimento embrionário em idade tão jovem.

Embriões com CR entre 6 e 7mm possuem idade gestacional entre 16 e 20 dias de gestação. Esta afirmação coincide parcialmente com os valores apresentados para bovinos por Assis Neto (2005). Em seu estudo o mesmo afirma que embriões bovinos possuem  $0,71 \pm 0,17$  cm de CR nesse período gestacional, entre 16 e 20 dias. A provável justificativa da diferença entre os tamanhos e idades deve-se ao fato do período gestacional do mesmo ser 30 dias mais curto que o dos bubalinos. Esta diferença de milímetros ainda pode ser considerada aceitável ao admitirmos que a precisão do paquímetro seja feita por mais ou menos pressão manual, portanto, Assis Neto (2005) pode ter efetuado maior ou menor pressão na utilização do paquímetro.

Assis Neto, (2005) também afirmou em seus estudos que embriões de 20 a 30 dias de gestação possuem  $1,23 \pm 0,13$  cm. Em nossos estudos subdividimos esta variação e encontramos que bubalinos com 8mm a 1,1cm de CR possuem entre 21 e 25 dias de gestação, e aqueles com CR entre 1,2 e 1,5cm têm entre 26 e 30 dias de gestação. Tal afirmação feita pelo autor coincide em alguns pontos com nossos dados o que nos deixa confiantes em nossos resultados por tratar-se de espécies com muitas semelhanças anatômicas e fisiológicas.

Bubalinos com 1,6 a 2 cm de CR possuem em nossos estudos 31 a 35 dias de gestação. Mais uma vez nossos dados são muito próximos aos de Assis Neto que afirmou que embriões bovinos entre 30 e 40 dias demonstram  $1,90 \pm 0,27$  cm de CR. Embriões de búfalas com CR entre 2,1 a 3 cm possuem de 36 a 40 dias de gestação esses valores ultrapassamos limites estimados por Assis Neto (2005).

Embriões bovinos de acordo com Assis Neto (2005) com 40 a 50 dias de gestação têm em média  $2,79 \pm 0,19$  cm, no caso da curva aplicada por Evans e Sack (1973) em embriões bubalinos esses valores ultrapassam novamente chegando entre 3,1 a 3,5cm para idade de 41 a 45 dias e 3,7 a 4,4 cm para 46 a 50 dias. Nesta fase os valores ficam mais próximos aos de Abdel-Raouf e El Nagar (1969) variando um a dois dias de gestação apenas.

Finalmente, para Assis Neto (2005), bovinos de idades gestacionais entre 50 a 60 dias, já devem ser considerados fetos e apresentam cerca de  $3,76 \pm 0,52$  cm de CR. Concordamos com o autor ao caracterizar os mesmos como fetos e não mais embriões, porém novamente nossos valores ficam acima dos estabelecidos pelo autor. Afirmamos em nosso estudo que fetos bubalinos com CR entre 4,5 e 5,1cm tem idades entre 51 e 55 dias e aqueles com 5,2 a 6,8cm de comprimento tem de 56 a 60 dias de gestação.

Verificamos, portanto que as idades coincidentes entre todos os autores pesquisados são muito semelhantes apenas em embriões entre 35 e 45 dias de gestação, antes, ou a partir desta data os valores excedem sempre para números maiores ou menores que os estimados.

O leitor pode se perguntar, diante dos argumentos expostos, por que fazer tantas observações e detalhar variações de 1 mm a despeito do comprimento embrionário. No entanto, talvez estes dados sejam para a aplicação prática os de maior valor imediato, se considerarmos, por exemplo, profissionais que se utilizam de equipamentos ultrasonográficos para diagnosticar e estimar as idades gestacionais, bem como as condições da gestação de bubalinos, os mesmos terão uma grande contribuição por meio da tabela confeccionada nesse estudo. Por meio desse artifício eles saberão a idade, se for desconhecida e, melhor ainda, saberão se o conceito está se desenvolvendo de acordo com o esperado para a sua idade embrionária.

### **6.1.1 Grupo I**

Embriões entre 10 e 15 dias de gestação, podem ser encontrados no terço médio do corno uterino gestante, o qual não apresenta características externas que denunciem uma gestação. O corno uterino não gestante não possui sequer alongamentos de córion os quais aparecem somente com a evolução gestacional. Observações complementares importantes foram encontradas por Guillomot e Guay (1982) que relataram que ultraestruturalmente (SEM) o epitélio uterino de bovinos gestantes do 7° ao 16° dia de gestação é similar ao de animais não gestantes que estejam ciclando, ou seja, se à microscopia eletrônica de varredura os autores não

encontraram diferenças, macroscopicamente e a olho nu não se percebe a gestação simplesmente analisando o útero externamente.

Já o corno gestante possui filamentos de córion muito fino e longo que percorre todo o comprimento do corno uterino, achados adicionados aos de Winters, Green e Comstock (1942) que afirmaram que aos 12 dias e 15 horas, em embriões bovinos, o córion em seu estágio inicial de alongamento mede 4,1 x 1,65 mm e o embrião provavelmente perde sua área de implantação ao ser lavado do útero com solução salina. Este último incidente relatado pelos autores realmente ocorreu em nossos estudos durante o procedimento de coleta. Mesmo após detecção da gestação e fechamento do corno, transporte do mesmo fechado e abertura apenas em laboratório a área de implantação foi perdida. Tal fato como afirmado pelos pesquisadores ocorre devido à fragilidade das membranas responsáveis pela implantação do concepto, por muitos autores consideram apenas uma justaposição ou aposição (LEISER, 1975)

A implantação em bovinos, segundo Winters, Green e Comstock (1942) esta mais para um contato superfície-superfície, como ocorre em ovelhas e coelhos, tal afirmativa também é aplicável a embriões bubalinos.

Embriões com tamanho inferior a 0,3cm só é possível a visualização com auxílio de lupa de uma linha reta, assim como relatou Hafez (2004). O autor descreveu que no 13º dia de gestação o concepto tem formato esférico, porém no 17º dia o embrião bovino tem uma forma filamentosa que mede 25 cm. Ainda são possíveis a distinção das regiões cranial e caudal e detecção das membranas alantoidea, amniótica e vitelina. O formato do alantóide em de “rabo de baleia” não foi descrito por nenhum outro pesquisador de nosso conhecimento, no entanto, esse formato é comprovado por meio de fotografia no item resultados (Figura 3). O alantóide em questão segundo Sadler (2005) é um divertículo formado a partir do saco vitelino na região da membrana cloacal, da extremidade caudal do disco embrionário, e sua função, é deposição de produtos de excreção do sistema.

Ao nos depararmos com animais com 0.3cm, de formato igualmente alongado, porém com coração e fígado distintos, ou ainda embriões com 0,5cm e formato em letra “C”, com aparentes depressões dos arcos branquiais e divisão do tubo intestinal primitivo em porções, permitimo-nos concordar com Sadler (2005) que diz em suas pesquisas que o embrião se desenvolve no sentido craniocaudal.

### 6.1.2 Grupo II

Nesse período o saco gestacional ainda encontra-se em apenas um dos cornos uterinos tomando apenas o terço médio do corno e projetando alongamentos muito finas para a extremidade do corno uterino. Segundo Winters, Green e Comstock (1942) no embrião bovino com 14 dias e 14 horas já há córion preenchendo dois terços do corno uterino gestante, já embriões com 17 dias o corno gestante é todo tomado por córion.

Não há sinal de implantação nem tampouco formação de cotilédones na região de córion. Esta descrição não está de acordo com os relatos de Guillomot e Guay (1982) que afirmam que no 20º dia, a porção do concepto localizada no corno contralateral ao gestante (aquele que contém o corpo lúteo) ainda não se encontra aderido, assim como para Winters, Green e Comstock (1942) que relatam que aos 19 dias e 14 horas o córion já inicia sua invasão ao corno não gestante.

### 6.1.3 Grupo III

Embriões com 21 a 25 dias de gestação possuem a região cefálica bem definida, assim com os primeiros arcos branquiais, vesícula óptica e ótica; a proeminência cardíaca distinta e assim como relatado por Winters, Green e Comstock (1942). Nesta fase é possível visualizar os somitos caudais e craniais. De acordo com Sadler em humanos, estes são em número de 5 a 12, já em bovinos Winters, Green e Comstock (1942) afirmam ser de 18 a 19 pares em nossos estudos pudemos contar até 21 pares.

Evans e Sack (1973) afirmam que em embriões bovinos com 23 dias há presença das vesículas óptica e ótica. Tal observação não pode ser constatada macroscopicamente em nossas amostras, porém ultraestruturalmente verificamos ambas as vesículas denominando-as placódio óptico e fosseta nasal. Segundo Sadler (2005) em 24 a 25 dias de gestação embriões humanos tem formadas as vesículas e placódios ópticos, e seus somitos já são em número de 13 a 20.

Embriões bubalinos entre 21 e 25 dias apresentam visíveis o 4º ventrículo cefálico, porém o broto do membro torácico só é visível à MEV; Evans e Sack, (1973) relatam que, em bovinos, no vigésimo quarto dia as três primeiras vesículas cerebrais já estão visíveis, o segundo arco branquial está presente e aparece o broto do membro anterior, e no vigésimo quinto dia a forma do embrião é em “C” e o terceiro arco branquial está presente. Nossos embriões do Grupo II sem exceção possuíam formato em letra “C”.

#### **6.1.4 Grupo IV**

Animais com aproximados 26 a 30 dias de gestação trazem o placódio óptico levemente pigmentado, fato também notado por Sadler (2005) em humanos que afirma nesta fase conter vesícula óptica e cristalino (placódio), Winters, Green e Comstock (1942) os chamam de otocisto e relatam seu surgimento aos 26 dias em bovinos.

Também são vistos neuróporo cranial aberto expondo o 4º ventrículo, neuróporo caudal fechado. Segundo Sadler, (2005) ele se fecha entre o 26º e 27º dias em embriões humanos. O membro torácico encontra-se em estágio de desenvolvimento avançado e o broto do membro pélvico ainda em crescimento. Neste caso Sadler (2005) relata que o membro torácico apresenta broto assim como Winters, Green e Comstock (1942), não descrevendo o membro pélvico ainda. Evans e Sack afirmam que os brotos do membro posterior surgem em bovinos aos 26 dias de gestação.

Em embriões entre 26 e 30 dias de gestação o fígado é volumoso e preenchendo praticamente toda a cavidade abdominal assim como descrito por Winters, Green e Comstock (1942). O coração, e região mesonéfrica são fortemente distintos. Todos os pares de somitos estão formados e os membros torácicos começam a aparecer. Todas as observações dos autores são confirmadas por fotografias no item resultados.

No trigésimo dia já é nítida a formação da fossa olfatória, os olhos já possuem pigmentação e os dígitos do membro torácico já são evidentes nos bovinos (EVANS; SACK, 1973). Em nossas amostras os dígitos ainda são muito rudimentares e a

divisão sutil inicia-se em animais entre 31 e 35 dias de gestação. Da mesma forma o pigmento óptico e a fossa olfatória encontram-se sutis nessa idade.

#### **6.1.5 Grupo V**

De acordo com Sadler (2005) embriões humanos de mesma idade do Grupo V possuem o membro torácico em formato de “pá” e a cavidade nasal formada; Evans e Sack (1973) afirmaram que embriões bovinos aos 34 dias de gestação possuem fossa olfatória profunda. Em nossos estudos apenas destaca-se a fosseta nasal. Quanto à característica dos membros descrita, Evans e Sack (1973) revelam que já há formação do sulco entre os dígitos do membro pélvico; em nossas amostras existe o sulco interno, porém, uma fina membrana transparente ainda mantém a divisão interdigital, de ambos os membros, pélvico e torácico. Os autores relatam que a divisão dos torácicos só ocorre aos 38 dias.

Winters, Green e Comstock (1942) descreveram que os membros neste estágio já se encontram mais especializados; e relatam que o estágio em que o embrião se encontra já é o de embrião tardio ou início do estágio fetal. Concordamos com os autores no conceito de embrião tardio, no entanto acreditamos ser precipitado chamá-los de fetos, mesmo que em fase inicial. Muitas características externas e internas ainda sofrerão grandes mudanças em embriões bubalinos de mesma faixa etária.

#### **6.1.6 Grupo VI**

Embriões humanos com idade entre 36 e 40 dias de gestação segundo Sadler (2005) já possuíam herniação umbilical; em nossos exemplares também nessa fase são visíveis os vasos do cordão umbilical devido a sua transparência. Sadler (2005) ainda afirma que nessa idade ocorre o início da formação da orelha externa e dos raios digitais nas mãos e nos pés humanos. Em nossos bubalinos nenhuma das características ocorre nessa idade, conseguimos sim visualizar a orelha externa,

mas a mesma tem mais semelhança com uma fossa do que proeminência; já os dígitos de ambos os membros só aparecem no grupo seguinte com idade entre 41 e 45 dias de gestação.

Sadler (2005) também descreve uma forte proeminência cefálica em humanos nessa fase, assim como em nossos exemplares onde a curvatura cervical é bem pronunciada; Winters, Green e Comstock (1942) também relatam que em bovinos a proeminência cefálica sofre um aumento de tamanho, no entanto os mesmos afirmam que a flexura cervical não é mais distinta e por esse motivo chamam suas amostras de embriões tardios. Em nossos exemplares o 4º ventrículo ainda é visível e coberto por uma membrana transparente, portanto o que os autores chamam de flexura cervical. Em embriões bubalinos de mesma idade gestacional que bovinos por eles descritos, também é nítida.

#### **6.1.7 Grupo VII**

Segundo Evans e Sack (1973) aos 40 dias de gestação embriões bovinos possuem a extremidade da orelha cobrindo parte do meato acústico. Bubalinos não apresentam essas características, existe sim a proeminência da orelha externa, porém ela ainda não é suficiente para recobrir o meato acústico. Os autores ainda afirmam que aos 45 dias, folículos táteis surgem acima dos lábios e dos olhos, e a língua já é visível, não há folículos táteis em embriões bubalinos de mesma idade, porém os dígitos distais se separam completamente como descrito previamente pelos autores. Já consideramos animais do Grupo VII, como fetos e não mais embriões. Estes já possuem membros com bipartição dos dígitos, características dos ruminantes que são animais ungulados, também já estão presentes os resquícios dos dígitos rudimentares em ambos os membros; Evans e Sack (1973) relatam que aos 38 dias surge a separação digital.

#### **6.1.8 Grupo VIII**

Winters, Green e Comstock (1942) descrevem juntos os fetos representantes das idades de 45, 49, 54 e 59 dias. Neles as características marcantes foram à redução gradativa do tamanho da proeminência cefálica, recesso da flexura cervical, formação das feições da face, o invólucro dos olhos feito por tampões, o alongamento do pescoço; também constatamos em nossas amostras de 46 a 50 dias o alongamento do pescoço, no entanto as demais observações não foram tão marcantes quanto às relatadas pelos autores, exceto o tampão dos olhos. Nestes estão presentes no mesmo período gestacional descrito pelos autores. Sadler (2005) descreve poucas alterações nesta fase, que incluem pigmentação da retina, raios digitais, mamilos, pálpebras, lábio superior e herniação umbilical proeminente. De todas as observações feitas pelo autor constatamos apenas os raios digitais e pigmentação da retina, que já haviam surgido no estágio anterior. Somente nessa fase observamos o aparecimento do botão genital. Evans e Sack (1973) afirmam que o tubérculo genital surge em bovinos aos 38 dias de gestação.

#### **6.1.9 Grupo IX e Grupo X**

Não há diferenças macroscópicas importantes entre os fetos dos grupos IX e X, a não ser o tamanho. A partir da idade fetal são poucas as alterações da organogênese que ocorrem no concepto, talvez por esse motivo Winters, Green e Comstock (1942) descrevem juntos fetos de 45 a 59 dias. Evans e Sack (1973) relatam que aos 56 dias a genitália externa já se encontra diferenciada, no entanto discordamos de tal afirmação. Não se sabe se o que existe na região pélvica pode ser definido como testículos ou vulva e não há pênis próximo a região umbilical o que não possibilita a sexagem do concepto.

Sadler (2005) afirma que entre 50 e 56 dias já existem articulações do joelho e cotovelo humanos dobradas. Nos bubalinos as articulações umeroradioulnar e femurtibiopatelar são visíveis e articuláveis também. Winters, Green e Comstock (1942) relataram membros sofrerem uma mudança drástica de fracos, finos e curtos para longos e fortes e ainda afirmam que algumas diferenças em proporções corporais continuam até os 70 dias e após esta data não são mais tão radicais.



Não acompanhamos animais com idade superior a 60 dias, no entanto concordamos com o fato de haver poucas modificações proporcionais a partir dos 60 dias. Após esses primeiros três meses de gestação o búfalo está praticamente formado e tende apenas a ganhar massa, crescer e receber o chamado acabamento, que consiste na pelagem, cascos e cornos.

De acordo com Kaufmann (1992) o melhor método para se obter a visualização perfita das estruturas ósseas e cartilaginosas de fetos de camundongo é por meio da técnica de alizarina; de acordo com o autor utilizando essa técnica conseguimos visualizar pontos de ossificação em fetos facilitando achados de deformidade óssea ou alterações no crescimento. Seguindo os conselhos do autor também realizamos a técnica de alizarina em nossos fetos e obtivemos resultados positivos quanto a visualização de pontos de ossificação e pontos cartilaginosos principalmente em se tratando de fetos aos 60 dias de gestação. Animais mais jovens, como esperado, apresentaram apenas a coloração azul indicativa de tecido cartilaginoso.

## **6.2 Características microscópicas**

Em se tratando de mesênquima as características de celularidade estrelada e substância basal amorfa, são as mesmas relatadas por Bacha (2000) e Junqueira e Carneiro (2004) que complementa a descrição ao afirmar que estas células estão envoltas por uma substância com característica gelatinosa e amorfa que acumula fibras ao longo do desenvolvimento embrionário.

### **6.2.1 Sistema músculo-esquelético**

Segundo Sadler (2005) os somitos, formações semelhantes a botões de tecido epitelial condensado, originarão miótomo (tecido muscular), esclerótomo (tecido cartilágneo e ósseo) e o dermatomo (tecido subcutâneo). As vértebras protegerão a medula espinhal do animal, por essa razão se explicam a condensação de células

epiteliais no local. Estas serão substituídas por cartilagem e depois por tecido ósseo ao final da gestação.

Nota-se, portanto conforme a idade embrionária avança há uma maior condensação do tecido epitelial. Winters, Green e Comstock (1942) descrevem essa condensação aos 37 dias em bovinos, apesar de os mesmos também afirmarem que aos 32 dias seus embriões bovinos já possuíam vértebras mais organizadas. É certo que em embriões bubalinos os somitos são substituídos por tecido cada vez mais condensado e passando de formato alongado para quadrangular muito semelhante às vértebras.

Sadler (2005) descreve que em embriões humanos, por volta do 28º dia, células das paredes ventral e medial dos somitos perdem sua organização compacta, passam a ser polimórficas e circundam o notocórdio formando o mesênquima. Este circundará a medula espinhal e o notocórdio e formará a coluna vertebral.

Winters, Green e Comstock (1942) em seus estudos chegaram a uma observação muito importante. Notaram que mesmo embriões com idades semelhantes apresentam características de desenvolvimento diferentes, e ainda afirmam que o desenvolvimento e aparecimento dos somitos ocorre de maneira extremamente veloz, fato confirmado pela presença dos mesmos apenas 5 horas após não haver nenhum par.

### **6.2.2 Sistema cardiovascular**

Segundo Sadler (2005) o coração é formado a partir do mesoderma, que também dá origem a artérias, veias, vasos linfáticos, todas as células constituintes do sangue e da linfa, rins, gônadas e seus ductos, baço e córtex das supra-renais. Winters, Green e Comstock (1942) seccionaram um embrião bovino de 22 dias visualizaram bulbo, ventrículo, aortas dorsais, primeira volta do arco aórtico; a região caudal do coração, veias umbilicais, vitelinas, e cardinais. Em nossos embriões bubalinos com idade inferior a de 22 dias, já é possível a visualização de duas câmaras, a atrial e a ventricular, distintas pela forma e espessura de suas paredes; ápice cardíaco voltado para a porção ventral do embrião, câmara atrial em posição

crânio-dorsal à região cranial do embrião e a câmara ventricular apontando para o exterior do embrião, ventro-caudal ao átrio.

A cavidade ventricular possui grande quantidade de cardiomioblastos em formações cordonais. Nesta fase embrionária e cercado toda a cavidade celômica a fina camada de mesenquima irá se diferenciar em pericárdio.

Em reações imunohistoquímicas os cardiomioblastos apresentaram reações de positividade tanto para Oct4, PCNA e vimentina, demonstrando sua origem mesenquimal, sua alta capacidade proliferativa e a presença de células ainda em fase pluripotente com características tronco.

A célula em destaque com núcleo grande vagando entre a parede ventricular e o mesoderma que cerca o abdômen obteve marcação positiva para Oct4 e é a que mais se identifica com as descrições morfológicas de células tronco.

A alteração no formato dos eritroblastos ocorre provavelmente devido ao processo de maturação que os mesmo sofrem. A mudança de formato fusiforme para arredondada é a primeira das alterações. Com o evoluir da idade gestacional essas células passarão a não ter núcleos e terão no centro de seu citoplasma a concavidade típica de hemácias adultas.

### **6.2.3 Sistema respiratório**

O início da formação do aparelho respiratório inferior ocorre em embriões humanos no 28º dia de gestação (MOORE, PERSAUD, 2004) e aos 20º/21º dias em bovinos segundo Alberto (2006). Foi possível localizar o broto pulmonar em búfalos com idade semelhante a bovinos, ao final do intervalo em que se distribui o grupo II (19 dias), animais com idade inferior a essa não apresentaram formação pulmonar perceptível.

A formação do brônquio traqueal característico dos ruminantes, bem como a divisão brônquica em brotos segmentares e subsegmentares ocorre a partir dos 28 dias de gestação. Estas afirmações podem justificar o fato de termos encontrados em nossos embriões de 36 a 40 dias os primeiros brotos pulmonares secundários. Topograficamente os pulmões localizam-se nessa fase ventralmente ao mesonefro, dorsalmente ao fígado, e dorso caudalmente ao coração do embrião. A formação

pulmonar descrita como de com luz disforme e variada ocorre devido ao órgão nessa fase ainda estar em sua fase pseudoglandular.

A expansão do broto pulmonar no sentido sentido caudal e longitudinal concorda com a descrita em humanos por Sadler (2005), da mesma maneira que conocrdamos com a formação da laringe ocorrer por tecidos do quarto e sexto arcos faríngeos conforme demonstrado em fotomicrografia no item resultados..

A descrição feita por Alberto (2006) em bovinos e Franciulli (2007) em pacas revela a constituição do tecido pulmonar dos primeiros brotos como sendo um tubo epitelial com várias camadas epiteliais, revestido de mesenquima inicialmente condensado, e nas regiões mais afastadas do tubo o mesenquima torna-se frouxo. Em nossos achados encontramos formações tubulares com paredes de epitélio revestidas por mesenquima condensado e apresentam-se normalmente circundados por vasos sanguíneos. Para Alberto (2006) o mesenquima condensado será responsável por originam a cartilagem brônquica e o músculo liso, enquanto que o frouxo dará forma ao órgão.

A presença de vasos sanguíneos revela, segundo Alberto (2006),que apesar do pulmões inda encontrarem-se em fase pseudoglandular com brônquios e bronquíolos terminais, assim como a descrita em humanos por (MOORE, PERSAUD, 2004), os pulmões dos bovinos iniciam seu processo de vascularização antecedendo a fase canalicular. Assim como Alberto (2006) nossos achado em bubalinos condizem com o adiantamento da vascularização ainda ocorrendo na fase pseudoglandular no caso.

#### **6.2.4 Sistema digestório**

A divisão do intestino primitivo estabelecida por (MOORE, PERSAUD, 2004) e Sadler (2005) também ocorre em embriões bovinos (LIMA 2007) e pacas (FRANCIOLLI, 2007), porém, por razões de nomenclatura adequada, embriões animais possuem se intestino primitivo divididos em porções cranial, média e caudal, e não posterior, média e anterior como descrita por ambos os autores.

Devido a extensão do intestino primitivo o mesmo origina inúmero órgão tais como esôfago, traquéia, brotos pulmonares, estômagos, duodeno proximal, fígado,

pâncreas e aparelho biliar. Isso explica a semelhança encontrada entre as formações tubulares nas fases embrionárias dos grupos II e III, onde diferenciamos brotos pulmonares de dilatações do intestino primitivo que formarão estômago e alças intestinais apenas pela posição em que se encontram no celoma.

O fígado embrionário, segundo Sadler (2005), é proveniente do endoderma, e de acordo com Junqueira e Carneiro (2004) é o segundo maior órgão do corpo humano adulto; em nosso caso, em embriões ele pode ser chamado de maior órgão em proporções se comparado ao tamanho total do embrião. Winters et al. (1942) em bovinos descreveu o órgão como destacado do corpo na 4ª semana de gestação; concordamos com os autores nos dois sentidos da palavra destacado; o órgão nessa fase destaca-se do corpo por aparentar estar externo a cavidade e também se destaca de todos os demais pelo seu tamanho majestoso; segundo Moore e Persaud (2004) esse órgão cresce rapidamente desde a 5ª até a 10ª semana em embriões humanos sendo que ao final da 10ª semana representa 1/10 do peso fetal. Acreditamos que seu peso deve-se principalmente a sua função de hematopoiese que ocorre desde o 2º até o 7º meses de gestação.

Apenas algumas observações comuns entre todos os autores foram encontradas sobre a descrição da morfologia hepática embrionária. Moore e Persaud (2004) e Noden e de Lahunta (1990) indicam cordões entrelaçados de células hepáticas e pequenos sinusóides com células sanguíneas em seu interior. Essa descrição também foi feita em embriões bovinos com 20, 29 e 34 dias de idade gestacional (9,5mm) por Lima (2007).

Aos 29 dias o mesmo autor observou o duodeno partindo caudalmente ao estômago e constituindo parte do cordão umbilical conectado à vesícula vitelina. Também encontramos esse prolongamento, porém acreditamos que uma melhor discussão do achado deva ser contemplada no sub item de saco vitelino.

Lima (2007) descreve em exemplares com 23 mm de CR a presença de espaços subendoteliais, os chamados “espaços de Disse”. Não encontramos esse espaço em nosso laminário, porém demos maior ênfase a estruturas como veia central, veia porta hepática, dentre outros itens não mencionados pela literatura pesquisada.

A provável ausência do broto hepático em embriões bubalinos do grupo I pode estar associada a pouca idade destes animais. Nesta idade os mesmos apresentam apenas o tubo intestinal primitivo de onde irá surgir o broto hepático.

Notamos nitidamente com o evoluir do desenvolvimento embrionário uma maior organização dos hepatoblastos em disposição, número e volume celular. Em animais mais velhos é possível constatar a substituição de tecido mesenquimal e do grande número de vasos por pequenos capilares sinusóides e muitas células hepáticas especializadas. Por outro lado grandes vasos como as veias centrais e a veia porta surgem também em animais mais velhos sendo que as veias centrais podem ser resultados da união dos vários capilares que existiam anteriormente e foram pressionados pelos cordões de hepatoblastos em expansão.

Lima (2007) relata o surgimento do estomago em embriões bovinos aos 20 dias de gestação, e o descreve como uma estrutura tubular simples na porção caudal do intestino caudal ligada a porção cranial pelo mesentério; a mesma descrição ocorre em embriões humanos (MOORE; PERSAUD, 2004; e NODEN; DE LAHUNTA, 1990). Em nossos achados o estomago propriamente dito cuja identificação é dada pela topografia do órfão, caudal ao fígado, só pode mesmo ser confirmada aos 30 dias de gestação, antes disso o que temos é um estomago primitivo, indiferenciado e muito semelhante a outras estruturas derivadas do intestino primitivo como brotos pulmonares por exemplo.

Animais dos grupos IX e X já apresentam as divisões do estomago nos típicos compartimentos dos ruminantes, sendo eles rúmen, reticulo, omaso e abomaso; tais achados condizem com os de Lima (2007).

Quanto às reações imunohistoquímicas pudemos constatar diante das marcações positivas a alta atividade proliferativa do fígado de embriões com idades entre 16 e 20 dias. Por outro lado exemplares com idade entre 26 e 30 dias já não demonstraram uma marcação positiva tão forte para Oct4, o que ressalta a perda da pluripotencialidade celular do órgão com o evoluir da gestação. O fato de não mais haverem células com núcleo fortemente marcado nesses embriões pode estar associado à migração das células germinativas para as futuras gônadas.

#### **6.2.5 Sistema urogenital**

Cagnoto (2007) em seus estudos afirmou não haver literatura descrevendo a cronologia do desenvolvimento renal em embriões bovinos e não é do nosso

conhecimento descrições semelhantes em bubalinos. Também não encontramos lobação nos rins de nossas amostras, assim como Cagnoto (2007). Porém Dyce et al. (2004) descreveu que rins bovinos adultos mantêm a formação fetal; a provável justificativa para não termos encontrado a lobação descrita é que esta deve ser formada em período superior ao estudado de 60 dias no caso dos bubalinos e superior a 46 dias para amostras de Cagnoto (2007).

Apesar do autor supracitado relatar a semelhança dos rins bovinos adultos aos de fetos da mesma espécie, não podemos deixar de apontar uma estrutura encontrada em fetos dos grupos VI em diante muito semelhante a pelve renal, no entanto, é sabido que bovinos não possuem tal estrutura em seus rins definitivos e estando os bubalinos tão próximo as características dessa espécie o esperado seria não possuir pelve também, porém, diante da visualização apenas podemos crer que o rim fetal se assemelha ao adulto não sendo exatamente igual ao mesmo e possuindo estruturas que durante seu desenvolvimento também irão regredir dando lugar ao conhecido seio renal.

As descrições de Junqueira e Carneiro (2004) para os túbulos contorcidos proximais e distais coincidem com nossas descrições de túbulos mesonéfricos e ductos mesonéfricos respectivamente. Isto pode estar relacionado ao fato de que os ductos futuramente originarão os túbulos dos rins definitivos, já que esses são os únicos sobreviventes da degeneração mesonéfrica descrita por Browder et al. (1991).

A descrição de Moore e Persaud (2004) na qual os mesmos relatam que o pronefro é apenas um acúmulo de células e estruturas tubulares e tortuosas na região do pescoço do embrião pode ser aplicada à porção mesonéfrica cranial conforme o mesonefro se degenera e dá lugar ao metanefro; a única diferença no caso seria sua localização já que o mesonefro não se encontra mais na “região do pescoço” a qual preferimos denominar de cervical.

Cagnoto (2007) não conseguiu visualizar o pronefro em bovinos com CR de 3mm (14 a 15 dias); assim como em nossos embriões também não foi possível essa visualização, porém acreditamos não tratar-se de um desenvolvimento mais precoce das espécies bubalina e bovina e sim da ausência do mesmos nos cortes avaliados pela microscopia.

O mesonefro bovino nos relatos de Cagnoto (2007) encontrou-se dorsal ao coração e fígado, com túbulos de epitélio simples cúbico e aspecto retorcido. Nos

bubalinos desde o Grupo II encontramos formações tubulares com borda em escova e simples, diferenciando túbulos de ductos; talvez o autor esteja se referindo aos dois tipos distintos quando reconhece aos 18/19 dias de gestação túbulos mesonéfricos com borda uniforme em alguns ductos e não uniforme em outros.

Assim como Cagnoto (2007) também encontramos mesênquima frouxo ao redor das formações tubulares. Com o desenvolvimento gestacional o tecido foi substituído por mais formações tubulares gerando uma organogênese complexa.

A topografia dos embriões bovinos de Cagnoto (2007) com CR 10mm (25 a 28dias) coincide com a dos bubalinos, o que já se esperava pela grande semelhança entre as espécies.

No entanto, o que Cagnoto (2007) chama de aglomerado de células mesenquimais, envolvido por células sanguíneas e cercado por túbulos mesonéfricos. Também esta estrutura foi encontrada em bubalinos a partir do 31º dias de gestação. Optamos por chamá-lo de glomérulo, já que, em nosso entendimento trata-se de uma formação organizada e funcional semelhante à encontrada em atlas como o de Junqueira e Carneiro (2004).

Ainda nos embriões e fetos bubalinos houve a perda de arranjo tubular e desorganização mesonéfrica com substituição gradual de seus tecidos pelo metanefro, porém não conseguimos definir até o presente momento onde se inicia o metanefro e termina o mesonefro como Cagnoto (2007) fez em bovinos.

Winters, Green e Comstock (1942), relatam pela primeira vez estruturas mesonéfricas em um exemplar bovino de 37 dias de gestação, porém não se sabe se os autores somente viram estas estruturas nessa fase ou enfatizaram outros órgãos e se esqueceram de comentar a respeito dos rins em embriões mais jovens. O fato é que em nossos estudos encontramos tecido renal em amostras de idade bem inferior a que os autores relataram.

Em bovinos com 26 dias de gestação Winters, Green e Comstock (1942) descreveram o mesonefro como órgão de longa extensão, e relação entre as várias estruturas gastrointestinais. Nossos exemplares com maiores proporções, ou seja largas extensões mesonéfricas, foram os dos grupo II e III.

Além dos túbulos mesonéfricos descritos também verificamos estruturas mais organizadas, de formato regular, arredondado, células cubóides sem borda em escova e quantidade inferior de citoplasma em comparação aos túbulos. Neste caso, devido à menor quantidade de citoplasma estas estruturas tornam-se mais coradas



pela hematoxilina demonstrando seu maior conteúdo basofílico. À essas estruturas dá-se o nome de ductos mesonéfricos. Winters, Green e Comstock (1942) seccionaram um embrião bovino de 22 dias e 16 horas de gestação e visualizaram em seus cortes a presença do mesonefro e dos ductos mesonéfricos, no entanto, os autores não relatam a morfologia do órgão. Não se sabe se o que os autores chamam de ductos na verdade são os túbulos, já que não há fotomicrografias da região que possibilitem sua identificação.

Winters, Green e Comstock (1942) relataram em um embrião bovino de 40 dias o desenvolvimento das gônadas e do metanéfron em dois níveis (WINTERS; GREEN; COMSTOCK, 1942). Em bubalinos do grupo VI, ou seja, mesma idade dos bovinos descritos foi possível notar a formação caudal das gônadas primitivas, também glandular e com inúmeros túbulos; também verificamos, degeneração, apoptose e substituição do tecido mesonéfrico, além de grande número de glomérulos o que denuncia a presença do rim definitivo.

A presença da gônada primitiva nos animais a partir do final do grupo VI (aproximadamente 39 dias de gestação) não revela ainda o sexo do animal, apesar de Kaufmann (1992) relatar que a presença de túbulos seminíferos já descarta a possibilidade do animal ser fêmea em camundongos com 13,5 dias de gestação. Martins (2006) também relatou a gônada primitiva em embriões caninos de 23 e 25 dias de gestação, e não afirmou o sexo desses embriões se atendo apenas a descrição dos cordões testiculares e da imunopositividade de algumas das células para o anticorpo Oct4. Assim como Martins (2006) a presença dos cordões testiculares em nossas amostras não possibilitou a diferenciação sexual em embriões, porém em fetos segundo Ali (2004) a posição do tubérculo genital é indicativa para a sexagem de fetos/embriões bovinos em ultrassonografia. Segundo Ali (2004) quando visualizamos o tubérculo genital caudal ao cordão umbilical, porém muito próximo a este, trata-se de um macho, e quando detectamos o tubérculo também caudal ao cordão, porém dirigindo-se a região de períneo, próximo a base da cauda do animal, trata-se de uma fêmea.

#### **6.2.6 Sistema nervoso**

Segundo Sadler (2005) o tubo neural surge em embriões humanos por volta da segunda semana. Devemos concordar que tal dado é muito vago e nos permite uma janela entre 15 e 21 dias de gestação; nos embriões bubalinos o tubo neural foi detectado desde a primeira amostra analisada, ou seja, com idade estimada de 15 dias de gestação.

As três vesículas encefálicas, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo originam o encéfalo, no entanto cada uma é responsável pelo desenvolvimento de algumas estruturas distintas. Em nossos achados detectamos o crescimento de tecido encefálico no interior do prosencéfalo em animais a partir dos 35 dias de gestação.

### **6.2.7 Membranas fetais**

Cada uma das membranas fetais será discutida em separado.

#### **6.2.7.1 Saco vitelino**

As três camadas que compõem o saco vitelino também foram descritas por Assis Neto (2007). Björkman (1986) descreve o saco vitelínico se desenvolvendo a partir de partes anexas ao intestino delgado e constituído das camadas de epitélio ectodérmico acompanhadas pelo mesênquima fetal vascularizado. Entretanto o autor afirma que a membrana não participa da troca materno-fetal. Em nossos embriões do Grupo IV pudemos observar a conexão do saco vitelino com o intestino primitivo justificando sua origem de partes anexas ao intestino delgado.

Segundo Sadler (2005) células tronco hematopoiéticas humanas originam-se dos hemangioblastos centrais, localizados em ilhotas de células mesodérmicas, ao redor da parede do saco vitelino, induzidas pelo fator de crescimento de fibroblastos (FGF) 2; os hemangioblastos periféricos formam angioblastos. Tal fato é comprovado pela marcação positiva das células endodérmicas do saco vitelino em animais do Grupo II por reações imunohistoquímicas para Oct4, PCNA e vimentina.

Esta marcação positiva para Oct4 permanece até em animais com idade gestacional mais avançada do Grupo IV.

Descrição semelhante à de nossos achados para o grupo I de idade entre 10 e 15 dias não foram encontradas em nossos levantamentos bibliográficos.

O aumento gradativo de ilhas sanguíneas, bem como de seu conteúdo, também foi descrito por Mançanares (2007). No entanto o autor não faz menção à deposição mesenquimal. A fase em que ocorre este aumento coincide com a fase de aumento do fígado, e é de conhecimento geral que ambos os órgãos contribuem para a eritropoiese. O saco vitelino é o primeiro a fazer tal papel e ao regredir suas funções são assumidas pelo fígado. Aos 30 dias deve ocorrer o pico de migração das células eritropoiéticas, germinativas e outras mais de características pluripotentes, para então ocorrer o início de sua degeneração.

A conexão do saco vitelino com o intestino primitivo encontrada em nossos estudos também é descrita por Sadler (2005) que afirma que o endoderma origina os intestinos anterior, médio e posterior. Para o autor o intestino médio comunica-se em certo período com o saco vitelino pelo ducto vitelino, o qual muito mais tarde é obliterado.

Mançanares (2007) descreveu a transição entre o saco vitelino e o intestino médio em embriões bovinos com idade gestacional entre 24 e 50 dias. O autor relatou a mesma conformação do saco vitelino em três camadas descrita por Assis Neto (2005) e em nossos achados. O fato de Kathleen (2005) ter afirmado a presença de apenas duas camadas deve ter sido devido ao mesotélio ser uma delgada camada de células alongadas, a qual provavelmente se confundiu com as células mesenquimais.

Uma projeção da alça duodenal por meio do divertículo umbilical permite ao intestino primitivo médio sua exteriorização e posterior retorno; durante essa fase há uma conexão entre o saco vitelino e o intestino primitivo por meio da alça duodenal. Estas observações foram feitas por Mançanares (2007) em bovinos e também puderam ser visualizadas em embriões bubalinos de 30 dias. Em nosso estudo observamos que em búfalos o tamanho do saco vitelínico diminui conforme houve o crescimento do embrião. Segundo Mossman (1987); Latshaw (1987); Noden; Lahunta (1990) esta membrana involui em um curto período de tempo.

Animais com tamanho variando entre 0,6 e 0,8 cm de CR (aproximadamente 17 a 21 dias), possuem o saco vitelino maior em comprimento e espessura em

relação ao embrião. Animais com 1,5 cm de CR (aproximadamente 30 dias) possuem a mesma membrana resumida a dois pequenos filamentos prolongados, de comprimento inferior ao do embrião. Entretanto, Barone (1986) descreve que o saco vitelino de outras espécies ruminantes é reduzido a um grupo sólido de células com poucos vasos sanguíneos na terceira semana de gestação, enquanto que Marshall (1952) e Bryden (1972) observaram que isso ocorre nas ovelhas ao redor do 25º dia de prenhes. Nossas observações nesse estudo confirmam um saco vitelino ativo até, pelo menos, 30 dias de gestação.

#### 6.2.7.2 *Córion*

Durante a idade gestacional pesquisada não foram observados placentônios nem qualquer tipo de conexão entre o endométrio e o córion, porém foram encontrados pequenos botões que darão origem as vilosidades com o decorrer da gestação.

Hafez (1954), em estudo histológico, descreveu que delicados vilos aparecem na superfície da membrana coriônica em oposição às carúnculas maternas formando uma íntima conexão entre as vilosidades fetais e o endométrio em búfalos e camelos, no entanto o autor estudou idades gestacionais mais avançadas que aquelas contempladas por esse estudo.

No período gestacional estudado, não é nítida a presença de vasos provenientes do alantóide na membrana coriônica, porém percebe-se um contato entre essas membranas em diversos locais. Kaufman e Burton (1994) relatam, em seu trabalho sobre a fisiologia geral da placenta em diversos mamíferos, que o córion é um tecido intrinsecamente avascular, sendo vascularizado por vasos do alantóide. Esses resultados indicam uma semelhança entre búfalos e as demais espécies de mamíferos já estudadas.

Foi possível identificar em nosso estudo que a membrana coriônica é constituída por uma camada simples de células dispostas em formato linear. Estas células são arredondadas, e com núcleo grande. Quando a célula é mononucleada, é designada de célula trofoblástica, quando existe mais de um núcleo, identificamos como trofoblástica gigante. Kathiresan et al. (1972) caracterizaram o epitélio

trofoblástico do córion em búfalas como sendo formado por uma camada simples de células cubóides marcadas fortemente, podendo apresentar duas ou mais camadas em alguns lugares. Assis Neto (2005) descreveu a membrana coriônica em bovinos e identificou que as células trofoblásticas estão entremeadas entre as trofoblásticas gigantes, ambas as células são globosas com citoplasmas claros e granulares. Carvalho et al. (2006) e Winsatt (1986) observaram que as células binucleadas do córion em diferentes espécies são semelhantes entre si. Estas características morfológicas das células trofoblásticas mononucleadas e das células gigantes indicam uma semelhança entre a membrana coriônica de bubalinos e de outras espécies de ruminantes.

Em nosso estudo à microscopia eletrônica de transmissão, foi possível encontrar no citoplasma uma grande quantidade de vesículas e de retículo endoplasmático rugoso (RER) o que indica que as células trofoblásticas gigantes têm grande atividade secretora. Carvalho et al. (2006), descreve em seu trabalho uma grande quantidade de estruturas capazes de produzir e estocar proteínas, indicando a semelhança entre os resultados obtidos, pois estas estruturas citadas por Carvalho et al. (2006) são exatamente as vesículas e o RER encontrados nesse estudo.

A membrana citoplasmática da célula trofoblástica coriônica apresentou delicados vilos de forma alongada na região apical da célula. Estes provavelmente entrarão em contato com a carúncula uterina para a formação dos placentônios responsáveis pela grande maioria das trocas fisiológicas entre mãe e feto. Hafez (1954) também descreve os vilos como sendo delicados e localizados em oposição às carúnculas maternas.

Em relação ao núcleo das células do córion, foram encontradas células com até 3 núcleos. Winsatt (1980) descreve em ruminantes que encontrou células com até 7 núcleos. A abrangência de espécies e as diferentes fases estudadas por Winsatt (1980) podem ter sido a razão da diferença de números de núcleos encontrados entre os dois estudos.

### 6.2.7.3 *Alantóide*

As paredes do alantóide em embriões bubalinos com menos de 0,8 cm de CR (aproximadamente 21 dias de gestação) são finas e translúcidas, com um leve tom esbranquiçado e nelas não é possível detectar a presença de vasos concordando com os relatos de Barone (1986) e Marshall (1952). Estes descreveram que, em outras espécies de ruminantes, estas estruturas apresentam paredes delgadas e transparentes.

O alantóide bufalino é muito semelhante ao bovino, assim como descreveu Assis Neto (2005). Trata-se de uma membrana de camada de células achatadas e pavimentosas em sua parte externa, sustentadas pela membrana basal e pelo mesênquima extra-embrionário.

O alantóide apresentou grande quantidade de vasos, assim como relatados por Assis Neto (2005) e Bjorkman (1986) apoiados sobre o mesenquima com eritrócitos em seu interior. O mesênquima alantoideano era formado por tecido conjuntivo amorfo e poucas células.

À microscopia eletrônica de varredura, pudemos observar nesta fase gestacional que o alantóide tem apenas um tipo celular predominante delimitado por regiões mais densas. Assis Neto (2005) descreveu a superfície do alantóide constituída por dois tipos celulares. O primeiro, que é predominante, contém microvilos sobre toda a superfície da célula. O segundo tipo celular ele descreve como entremeado entre o primeiro tipo e com projeções microvilares menores na região central.

#### 6.2.7.4 *Âmnion*

Pelo fato do âmnion ser uma membrana intimamente ligada ao embrião, não existem vasos na mesma, estas características também são demonstradas nos estudos feitos por Barone, (1976), Noden e Lahunta, (1990) e Schwarze, (1972).

Quanto ao formato da membrana amniótica, notamos uma pequena alteração descritiva variando do oval para arredondado, apresentando assim características próprias de acordo com a posição e tamanho do concepto, afirmações muito semelhantes foram feitas por Schwarze (1972).

O âmnion é formado por duas camadas celulares distintas. A primeira trata-se de um epitélio pavimentoso contínuo e simples mais regular, a segunda é o mesênquima, responsável pela sustentação do âmnion e formado por tecido conjuntivo, concordando com os estudos anteriores em bovinos de Assis Neto (2005) e Steven et al. (1972).

## 7 CONCLUSÕES

- 1 Os dados morfométricos gerados por Evans e Sack (1973) para bovinos (*Bos taurus*) podem ser utilizados como método para estimativa da idade embrionária e fetal de bubalinos, porém com cautela, outros dados como características externas devem ser considerados antes de estipular a idade gestacional dos mesmos. Dados gerados por este estudo (Gráfico 1), apesar de não serem precisos, são confiáveis para serem aplicados a estudos na espécie bubalina. Resultados gerados por meio da fórmula criada por Abdel-Raouf e El Nagar (1969) só são aplicáveis em animais com idade superior a 30 dias de gestação.
- 2 Os somitos são responsáveis pela formação do sistema músculo-esquelético, trata-se de botões de tecido epitelial condensado que se especializam e se subdividem com o avançar da idade gestacional e se encontram inicialmente laterais ao tubo neural.
- 3 O coração é uma das primeiras estruturas a adquirir forma e função no embrião sendo detectados desde os 15 dias de gestação em bubalinos. Devido às inúmeras voltas cardíacas que o mesmo necessita para se transformar de um simples tubo a quatro câmaras diferenciadas sua topografia se modifica com o evoluir da gestação.
- 4 O primeiro broto pulmonar surge, em bubalinos, em animais entre 18 e 19 dias de gestação; este se expande originando brotos pulmonares principais e secundários que começam a surgir até por fim originar uma extensa rede de brônquios circundada por inúmeros vasos ainda na fase pseudoglandular do órgão.
- 5 O intestino primitivo origina inúmeras estruturas diferentes por meio de evaginações e prolongamentos que partem a partir de sua formação tubular inicial. Fetos entre 50 e 60 dias de gestação já possuem as quatro câmaras gástricas (rúmen, retículo, omaso e abomaso) caracterizadas no interior da cavidade abdominal.
- 6 O fígado é o maior órgão em proporções encontrado na cavidade celomática de embriões a partir dos 20 dias de gestação.
- 7 O sistema urogenital tem sua formação inicial a partir do pronefron, aos 20 dias de gestação uma enorme cadeia de túbulos e tecido renal se apresenta desde a porção cranial do embrião até a caudal, localizadas topograficamente ventrais aos somitos. Com o avançar da gestação grande parte desse tecido renal



- primitivo se degenera por processo de apoptose restando apenas o rim definitivo, ou metanefro.
- 8 O início do sistema nervoso dá-se pela placa neural e posteriormente o tubo neural de origem ectodérmica, o tubo neural já é visto em embriões aos 15 dias de gestação. Com o avançar da gestação três vesículas encefálicas tornam-se nítidas no embrião, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Aos 40 dias de gestação já é possível visualizar massa encefálica no interior do prosencéfalo.
  - 9 É possível a identificação de células pluripotentes em diferentes idades gestacionais e em diferentes regiões dos embriões bubalinos e das membranas fetais. Durante a gestação o número de células imunopositivas declina significativamente, mas não desaparece por completo, até os 40 dias de gestação.
  - 10 Hemangioblastos, em jovens embriões de búfalos podem ser considerados células pluripotentes, parte dessas células migram para o embrião por meio do intestino primitivo e se depositam nos órgãos genitais e em algumas outras poucas colônias distribuídas por todo o embrião.
  - 11 O córion é uma membrana especializada na produção e na secreção de proteínas, além de estar intimamente ligada ao alantóide desde as fases iniciais de gestação, sendo o alantóide a membrana responsável pela vascularização do córion.
  - 12 O âmnio e o alantóide são membranas com características morfológicas semelhantes. O âmnio, através de seu líquido, é responsável pela proteção mecânica do embrião. O saco vitelínico é a membrana responsável pela produção das primeiras células sanguíneas do conceito, persistindo por todo o período estudado neste trabalho. As membranas fetais bubalinas são muito semelhantes quando comparadas às membranas fetais bovinas.
  - 13 Os dados gerados pelo estudo indicam as mais importantes alterações macroscópicas e microscópicas em bubalinos, para avaliação do desenvolvimento embrionário e fetal dos mesmos, estimativa das idades gestacionais e contribuição a outras técnicas que fazem uso da morfologia como suporte para diagnósticos.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, M.; EL-NAGGAR, M. A.; The biometry of the Gravid Uterus in Egyptian Buffalo Cows. **Zentralb Veterinarmed A**, v. 16, p. 838-854, 1969.
- ABD-ELNAEIM, M. M. M.; MIGLINO, M. A.; PFARRER, C.; LEISER, R. Microvascular architecture of the fetal cotyledons in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of pregnancy. **Annals of Anatomy**, v. 185, p. 325-334, 2003.
- AINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. *In*: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6.ed. São Paulo: Manole, 1995, p. 217-240.
- 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) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ALI, A. Effect of gestational age and fetal position on the possibility and accuracy of ultrasonographic fetal gender determination in dairy cattle. **Reproduction Domestic Animal** v. 39, p. 190–194, 2004.
- ALLEN, N.D.; BARTON, S.C.; HILTON, K.; NORRIS, M.L.; SURANI, M.A. A function analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells. **Development** v. 120, p.1473–1482, 2004.
- AMIT, M.; CARPENTER, M.K.; INOKUMA, M.S.; CHIU, C.P.; HARRIS, C.P.; WAKNITZ, M.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; THOMSON, J.A. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. **Developmental Biology**, v. 227, p.271–278, 2000.
- AMOROSO, E. C. Structural and functional aspects of the placenta: Comparative anatomy of the placenta. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 75, p. 855–872, 1959.
- ASSIS NETO, A. C. **Desenvolvimento placentário em bovinos obtidos por gestações naturais e por fecundação *in vitro***. 2005, 223f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BACHA, W. J.; BACHA, L. M. **Color atlas of veterinary histology** 2. Ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000
- BARONE, R. **Anatomie comparée des mammifères domestiques: Splanchnologie**. Paris: Vigot Frères, 1986. v.2 p. 579-605.
- BARUSELLI, P. S.; OLIVEIRA, J. F. S.; MENDES, M. L. M.; JORGE, A. M.; FUJII, T.; PALAZZO, J. P. C. Diagnóstico da bubalinocultura no Vale do Ribeira. **Documento Técnico CATI**, Campinas, n. 94, p. 1, 1993.

- BJÖRKMAN, N. Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. **Anatomical Records**, v. 163 p. 17-30, 1969.
- BJÖRKMAN, N. Placentation. In: DELLMAN, H. D.; BROWN, E. M. **Textbook of veterinary histology**. Philadelphia, US: Lea & Febger, 1986. p. 351-369.
- BOEDIONO, A.; SUZUKI, T.; LI, L. Y.; GODKE, R. A. Offspring born from chimeras reconstructed from parthenogenetic and *in vitro* fertilized bovine embryos. **Molecular Reproductive Development**, v. 53, p.159–170, 1991.
- BOIANI, M.; ECKARDT, S.; SCHOLER, H. R.; MCLAUGHLIN, K. J. Oct4 distribution and level in mouse clones: Consequences for pluripotency. **Genes Development**, v. 16, p.1209–1219, 2002.
- BROWDER, L. W.; ERICKSON, C. A.; JEFFERY, W. R. **Developmental biology**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1991. p. 300-303.
- BRYDEN, M. M.; EVANS, H. E.; BINNS, W. **Embriology of the sheep: extraembryonic membranes and the development of body form**. v. 138, n.2, p.169-185, 1972.
- BUTTERY, L. D.; BOURNE, S.; XYNOS, J. D.; WOOD, H.; HUGHES, F. J.; HUGHES, S. P.; EPISKOPOU, V.; POLAK, J.M. Differentiation of osteoblasts and *in vitro* bone formation from murine embryonic stem cells. **Tissue Engineering**, v. 7, p.89–99, 2001.
- CAGNOTO, D. G. **Estudo do desenvolvimento dos Sistemas Renais em embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 50 dias**. 2007. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- CALL, L.M.; MOORE, C.S.; STETTEN, G.; GEARHART, J.D. A cre-lox recombination system for the targeted integration of circular yeast artificial chromosomes into embryonic stem cells. **Human Molecular Genetics**, v. 9, p.1745–1751, 2000.
- CAMPANILE, G.; NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; GALIERO, G.; PRANDI, A.; DI PALO, R.; D'OCCHIO, M. J.; ZICARELLI, L. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. **Theriogenology**, v. 63, p. 2334-2340, 2005.
- CARTER, A. M.; ENDERS, A. C.; KÜNZLE, H.; ODUOR-OKELO, D.; VOGEL, P. Placentation in species of phylogenetic importance: the Afrotheria. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 35-48, 2004.
- CARVALHO, A. F. **Caracterização da célula binucleada na placenta de búfalos**. Dissertação (mestrado) 2000. – Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- CARVALHO, A. F.; KLISCH, K.; MIGLINO, M. A.; PEREIRA, F. T. V.; BELAVILACQUA, E. Binucleated Trophoblast Giant Cells in the Water Buffalo (*Bubalis Bubalis*). **Journal of Morphology**, v. 267 p. 50-56, 2006.

CAUFFMAN, G.; VAN DE VELDEH, A.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, p.173–181, 2005.

CIBELLI, J.B.; GRANT, K.A.; CHAPMAN, K.B.; CUNNIFF, K.; WORST, T.; GREEN, H.L.; WALKER, S.J.; GUTIN, P.H.; VILNER, L.; TABAR, V.; DOMINKO, T.; KANE, J.; WETTSTEIN, P.J.; LANZA, R.P.; STUDER, L.; VRANA, K.E.; WEST, M.D. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. **Science**, v. 295, p.819–820, 2002.

CSERJESI, P.; BROWN, D.; LIGON, K.L.; LYONS, G.E.; COPELAND, N.G.; GILBERT, D.J.; JENKINS, N.A.; OLSON, E.N. Scleraxis: A basic helix-loop-helix protein that pre-figures skeletal formation during mouse embryogenesis. **Development**, v.121, p.1099–1110, 1995.

DANIELS, R.; HALL, V.; TROUNSON, A.O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. **Biology Reproduction**, v.63, p.1034–1040, 2000.

DE FELICI, M. Regulation of primordial germ cell development in the mouse. **International Journal of Developmental Biology**, v. 44, p. 575-580, 2000.

DEREN, J. J.; PADYKULA, H. A.; WILSON, T. H. Development of structure and function in the mammalian yolk sac: The development of amino acid transport by rabbit yolk sac. **Developmental Biology**, v.13, p. 370-384, 1966.

DOETSCHMAN, T.; WILLIAMS, P.; MAEDA, N. N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. **Developmental Biology**, v.127, p.224– 227, 1988.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997. 663 p.

ENDERS, A. C.; CARTER, A. M. Comparative placentation: some modifications for histotrophic nutrition – A review. **Placenta**, v. 27, p.11-17, 2006.

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

EVANS, M.J.; KAUFMAN, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, p.154–156.

EZASHI, T.; GHOSH, D.; ROBERTS, R. M. Repression of Ets-2-induced transactivation of the tau interferon promoter by Oct-4. **Molecular Cell Biology** v.21, p.7883–7891, 2001.

FRANCIOLLI, A. L. R. **Desenvolvimento embriológico e fetal em pacas (*Agouti paca*, Linnaeus 1766): estabelecimento do modelo experimental análogo murino para detecção de linhagens “Germ cells”**. 2007. 99f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FUKUDA, T.; HEDINGER, C.; GROSCURTH, P. Ultrastructure of developing germ cells in fetal human testis. **Cell Tissue Reserch**, v. 161, p. 55-70, 1975.

GASKELL, T. L.; ESNAL, A.; ROBINSON, L. L.,L.; ANDERSON, R. A. PHILIPPA, T.K. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: Identification of three subpopulation. **Biology of Reproduction**. v. 71, p. 2012-2021, 2004.

GINSBURG, M.; SONW, M.H.L.; McLAREN, A. primordial germ cell in the mouse embryo during gastrulation. **Development**, v. 110, p. 521-528, 1990.

GREENSTEIN, J.S.; MURRAY, R.W.; FOLEY, R.C. Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine pre-attachment placenta between 16 and 33 days of gestation. **The Anatomical Record**, v. 204, p. 321-341, 1958

GRUNERT, E.; BIRGEL E. H., e VALE, W. G., **Patologia e Clínica da Reprodução dos Animais Mamíferos Domésticos**. Varela: São Paulo, 2005.

GUILLOMOT, M.; GUAY, P. Ultrastructural features of the cell surfaces of uterine and trophoblastic epithelia during embryo attachment in the cow. **The Anatomical Record**, v. 204, p. 315-322, 1982.

HAAR, J. L.; ACKERMAN, G. A. A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. **Anatomical Record**, v.170, p.199-223, 1971.

HAFEZ, E. S. E. Foetal-Maternal Attachments in Buffalo and Camel. **Anatomical Researches**, v. 25, pt. 2, p. 109–115, 1954.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Manole: São Paulo, 2004.

HANSIS, C.; GRIFO, J. A.; KREY, L. C. Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, p.999–1004, 2000.

HATHAITIP SRITANAUDOMCHAI, H.; PAVASUTHIPAISIT, K.; KITIYANANT, Y.; KUPRADINUN, P.; MITALIPOV, S.; KUSAMRAN, T. Characterization and Multilineage Differentiation of Embryonic Stem Cells Derived From a Buffalo Parthenogenetic Embryo. **Molecular reproduction and development**, v. 74, p.1295–1302, 2007.

HEGERT, C.; KRAMER, J.; HARGUS, G.; MULLER, J.; GUAN, K.; WOBUS, A. M.; MULLER, P. K.; ROHWEDEL, J. 2002. Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. **Journal Cell Science**, v. 115, p.4617–4628, 2002.

HOLSTEIN, A.; SCHUTTE, B.; BECKER, H.; HARTMANN, M. morphology of normal and malignat germ cells. **International Journal of Andrology**, v. 10, p. 1-18, 1978.

HORI, Y.; RULIFSON, I.C.; TSAI, B. C.; HEIT, J. J.; CAHOY, J. D.; KIM, SK..Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. **Proceedings Natural Academic Science**, v. 99. P-16105–16110, 2002.

HUANG, B.; XIE, T.; SHI, D.; LI, T.; WNAG, X.; MO, Y.; WANG, Z.; LI, M. Isolation and characterization of EG-like cells from Chinese swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) **Cell Biology International**, v 31, p. 1079-1088, 2007.

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

KATHIRESAN, R.; RAJASUNDARAM, R. C.; PATTABIRAMAN, S. R. Histological and histochemical changes in the endometrium and placenta during different stages of gestation in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Indian Veterinary Journal**. v. 69, p. 326-328, 1992.

KATHLEEN, E.; MCGRATH, P.H.D. JAMES PALIS M. D. Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. **Experimental Hematology**. v. 33, p. 1021 – 1028, 2005.

KAUFMANN, P.; BURTON, G. Anatomy and genesis of the placenta. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven, 1994. v. 1, p. 441-484.

KEHLER, J.; TOLKUNOVA, E.; KOSCHORZ, B.; PESCE, M., GENTILE, L.; BOIANI, M.; LOMELI, H.; NAGY, A. K.; HANS, R. J.; LER, S.; TOMILIN, A. Oct4 is required for primordial germ cell survival. **EMBO Reports**,. v. 5, p. 1078-1083, 2004.

KIRCHHOF N.; CARNWATH, J.W, LEMME, E.; ANASTASSIADIS, K.; SCHOLER, H.; NIEMANN, H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. **Biology of Reproduction**, v. 63, p.1698–1705, 2000.

KUROSAKA, S.; ECKARDT, S.; MCLAUGHLIN, J. K. Pluripotent lineage definition in bovine embryos by oct4 transcript localization. **Biology of reproduction**, v. 71, p: 1578–1582, 2004.

KURSCHSTEIN, R.; SKIRBOLL, L. R. **Stem Cells**: Scientific progress and future research directions. National Institute of health, Departament of health and human services, Apendice B1-B11, 2001

LATSHAW, W. K. **Extraembryonic membranes and placentation**. In: **Veterinary developmental anatomy – A clinical developmental**. Toronto: Becker,1987. p. 49-74.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure in a comparative aspect. **Experimental Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 122-134, 1994.

LEISER, R.; PFARRER, C.; ABD-ELNACIM, M. M. M.; DANTZER, V. Feto-maternal anchorage in epitheliochorial and endotheliochorial placental types studied by histology and microvascular corrosion casts. **Trophoblast Research**, v.. 12, p. 21-39, 1998.

LIMA, E. B. **Estudo do desenvolvimento do aparelho digestório de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 60 dias.** 2007. 73 p. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.– Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

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. 115 p. Tese (doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

MARSHALL, M. A. **Marshall's physiology of reproduction.** London: A. S. Parkes, Longman's Green, 1952. P.189-211

MARTIN G. R.. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by tecamundongocarcinoma stem cells. **Proceedings Natural Academic Science** v.78. p.:7634–7638, 1981

MARTINS, D.S. **Caracterização de células tronco germinativa caninas para o tratamento da distrofia do Golden Retriever (GRMD).**2006. 105f.Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo. 2006.

MELTON, A.A.; BERRY, R.O.; BUTLER, O.D. The interval between the time of ovulation and attachment of the bovine embryo. **Journal of Animal Science**, v. 10, p. 993-1000, 1951.

METSARANTA, M.; TOMAN, D.; DE CROMBRUGGHE, B.; VUORIO, E. Mouse type II collagen gene. Complete nucleotide sequence, exon structure, and alternative splicing. **Journal of Biology Chemistry**, v. 266:16862–16869. 1991.

MITALIPOV, S. M.; KUO, H. C.; HENNEBOLD, J. D.; WOLF, D. P. OCT-4 Expression in pluripotent cells of the Rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1785-1792, 2003.

MITALIPOVA, M.; BEYHAN, Z.; FIRST, N. L. Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos. **Cloning**, v. 3: p 59–67, 2001.

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

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes.** New Brunswick: Rutgers University Press, 1987, 383 p.

NAKATSUJI, N.; SUEMORI H. Embryonic stem cell lines of nonhuman primates. **Scientific World Journal**, v. 26, p.1762–1773 2002.

NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHOLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95, p.379–391,1998.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. G.; Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation, or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics**, v.24, p.372–376, 2000.

NODEN, D.; M.; LAHUNTA, A. de. *Embriologia de los animales domésticos*. Zaragoza: Acribia, 1990.

NORDHOFF, V.; HUBNER, K.; BAUER, A.; ORLOVA, I.; MALAPESTA, A.; SCHOLER, H. R. Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. **Mammalian Genome**, v. 12, p.309–317, 2001

OHNEDA, O.; OHNEDA, K.; ARAI, F.; LEE, J.; MIYAMOTO T, FUKUSHIMA Y, DOWBENKO D, LASKY LA, SUDA T. 2001. ALCAM (CD166): Its role in hematopoietic and endothelial development. **Blood**, v. 98, p. 2134–2142, 2001.

OKAMOTO, K.; OKAZAWA, H.; OKUDA, A.; SAKAI, M. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. **Cell**. V. 60, p. 461-472, 1990.

OLIVEIRA, C. A.; BOMBONATO, P. P.; BARUSELLI, P. S.; OLIVEIRA, J. F. S. Pelvimetria e pelvilogia em búfalas mestiças (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal Research and Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 114-121, 2001.

OLIVEIRA, M. F.; CARTER, A. M.; BONATELLI, M.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Placentation in the rock cavy, *Kerodon rupestris* (Wied). **Placenta (Eastbourne)**, Reino Unido, v. 27, n. 1, p. 87-97, 2006.

PAIN, B.; CLARK, M. E.; SHEN, M.; NAKAZAWA, H.; SAKURAI, M.; SAMARUT, J.; ETCHES, R.J. Long-term *in vitro* culture and characterization of avian embryonic stem cell with multiple morphogenetic potentialities. **Development**, v. 22, p. :2339–2348, 1996.

PALMIERI SL, PETER W, HESS H, SCHOLER HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. **Developmental Biology** 1994; 166:259–267.

PERALTA, O.; HUCKLE, W.; MARTINEZ, M.; CORREA, J.; GATICA, R.; EYESTONE, W. Tissue-specific analysis of prion expression in early bovine fetuses. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 18, n. 1-2, 2006.

PEREIRA, F. T. V. **Desenvolvimento do placentônio em búfalos (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) 2000**. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.– Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000.

PESCE, M.; GROSS, M. K.; SCHÖLER, H. R. In line with our ancestors : OCT-4 and the mammalian germ. **Bioessays**, v. 20, p. 722-732, 1998.

PESCE, M.; SCHÖLER, H.R. OCT-4: Control of totipotency and germ line determination. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 452-457, 2000.



PESCE, M.; SCHÖLER, H. R. OCT-4: Gatekeeper in the beginning of mammalian development. **Stem Cells**, v.19, p. 271-278, 2001.

POTTEN, C. S. **Stem cells**. London: Academic Press, 1997. Cap. 9. p. 283-313.

RAM, R.; CHANDRA, G. Macroscopic studies on the placenta of buffalo (*Bubalus bubalis*). **Indian Veterinary Journal**. v. 61, p. 458-462, 1984.

REEVES, J. T.; DAOUD, F. S.; GENTRY, M.; EASTIN, C. Changes in urinary flow in bovine fetuses during late gestation: composition of amniotic and fetal body fluids. **American Journal of Veterinary Research**, v.33, p. 2159-2167, 1972.

REUBINOFF, B. E.; PERA, M. F.; FONG, C.Y.; TROUNSON, A.; BONGSO, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. **Nature Biotechnology**, v.18, p. 399–404. 2000.

RIBAS, T. Pesquisa identifica problemas e busca soluções para a criação de búfalos no Brasil. Disponível em: <http://www4.usp.br/index.php/ciencias/15060-pesquisa-identifica-problemas-e-busca-solucoes-para-a-criacao-de-bufalos-no-brasil>. Acesso em 5 ago 2009.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999.

ROSSANT, J. Stem cells from the mammalian blastocyst. **Stem Cells**, v. 19, p. 477-482, 2001

RÜSSE, I.; SINOWATZ, F.; RITCHER, L.; LEHMANN, M.; SCHALLENBERGER, E. Die Entwicklung des Dottersackes beim Wiederkäuer (Schaf und Rind). **Anatomy Histology Embryology**, v. 21, p. 324-347, 1992.

SADLER, T. W. **Langman Embriologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9. ed., p.3 – 77. 2005.

SAITO, S.; UGAI, H.; SAWAI, K.; YAMAMOTO, Y.; MINAMIHASHI, A.; KUROSAKA, K.; KOBAYASHI, Y.; MURATA, T.; OBATA, Y.; YOKOYAMA, K. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation *in vitro*. **FEBS Lett**, v. 531, p.389–396. 2002.

SCHIMDT, S.; GERBER, D.; SOLEY, J. T.; AIRE, T. A.; BOOS, A. Histo-morphology of the Uterus and Early Placenta of the African Buffalo (*Syncerus caffer*) and Comparative Placentome Morphology of the African Buffalo and Cattle (*Bos Taurus*). **Placenta**, v. 27, n. 1, , p 899-911, 2006.

SCHLAFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal Reproduction Science**, v 60–61, p. 145–160, 2000.

SCHÖLER H R.; OCTAMANIA: the POU factors in murine development. **Trends Genetics**, v.7, p. :323–329, 1991.

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

SINGH, A.; AHUJA, S. P. Individual variation in the composition of colostrum and absorption of colostrum antibodies by the precolostral buffalo calf. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1148-1156, 1993.

SLADE, B. S. An attempt to visualize protein transmission across the rabbit visceral yolk-sac. **Journal of Anatomy**, v. 107, p. 531-545, 1970.

SRITANAUDOMCHAI, H.; PAVASUTHIPAISIT, K.; KITIYANANT, Y.; KUPRADINUN, P.; MITALIPOV, S.; KUSAMRAN, T. Characterization and Multilineage Differentiation of Embryonic Stem Cells Derived From a Buffalo Parthenogenetic Embryo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p.1295–1302, 2007.

STEVEN, D. H. Placentation in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**. v.31, p. 41-55, 1982. Supplement.

SUKOYAN, M. A.; VATOLIN, S. Y.; GOLUBITSA, A. N.; ZHELEZOVA, A. I.; SEMENOVA, L. A.; SEROV, O. L. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: Comparisons of their pluripotencies. **Molecular Reproductive Development**, v. 36, p.148–158, 1993.

SURANI, M. A.; KOTHARY, R.; ALLEN, N. D.; SINGH, P. B.; FUNDELE, R.; FERGUSON-SMITH, A. C.; BARTON, S. C. Genomic imprinting and development in the mouse. **Development Supplement**, p. 89–98. 1990. Supplement.

THOMPSON, J. G.; PETERSON, A. J. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequence. **Human Reproduction**, v. 15, p. 59-67, 2000. Supplemento, 5.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, p.1145–1147, 1998.

THOMSON, J. A.; KALISHMAN, J.; GOLOS, T. G.; DURNING, M.; HARRIS, C. P.; BECKER RA, HEARN JP. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proc Natl Acad Sci**, v. 92, p. 7844–7848, 1996

THOMSON, J. A.; KALISHMAN, J.; GOLOS, T. G.; DURNING, M.; HARRIS, C. P.; HEARN, J. P. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. **Biology of Reproduction**, v.55, p.254–259, 1996.

TIEDEMANN, K. The bovine allantoic and amniotic epithelia. SEM and TEM studies. **Anatomy and embryology**, v. 163, p. 403-416, 1986.

TURNPENNY, L.; BRICKWOOD, S.; SPALLUTO, C. M.; PIPER, K.; CAMERON, I. T.; WILSON, D. I.; HANLEY, N. A. Derivation of human embryonic germ cells: An alternative source of pluripotent stem cells. **Stem Cells** v. 2, p.598–609, 2003.

VAN EIJK, M. J. T.; VAN ROOIJEN, M. A.; MODINA, S.; SCESI, L.; FOLKERS, G.; VAN TOL, H. T. A.; BEVERS, M. M.; FISHER, S. R.; LEWIN, H. A.; RAKACOLLI, D.; GALLI, C.; DE VAUREIX, C.; TROUNSON, A. O.; MUMMERY, C. L.; GANDOLFI, F. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1093–1103. 1999.

VEJSTED, M.; OFFENBERG, H.; MADDOX-HYTTEL, P. Identification of primordial germ cells in porcine embryos from the primitive streak stage. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 1-2, 2006.

VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M. A.. Transcription factor expression patterns in bovine *in vitro*-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. **Biology of Reproduction**; v. 70, p. 1701–1709, 2004

WATENBERG, H. Differentiation and development of testis. **The testis**, 2 ed, Nova York: Raven. 1981, p. 39-81.

WEIMANN, A. **Die Continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung**, Jena: Fischer-Verlag, 1885.

WHEELER, M. B. Development and validation of swine embryonic stem cells. **Reproduction Fertility Development**, v. 6, p.563–568, 1994..

WINSATT, W. A. Observations on the morphogenesis, cytochemistry and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. **The American Journal of Anatomy**, v. 159, n. 2, p. 209-243, 1980.

WINTERS, L. M.; GREEN, W. W.; COMSTOCK, R. E. Prenatal development of the bovine. **Minnesota Technical Bulletin**, v.151, p. 3-50, 1942.

WOLF, E.; BAUERSACHS, G. J. A.; BEIER, H. M.; BLUM, H.; EINSPANIER, R.; FROHLICH, T.; HERRLER, A.; HIENDLEDER, S.; KOLLE, S.; PRELLE, K.; REICHENBACH, H. D.; STOJKOVIC, M.; WENIGERKIND, H.; SINOWATZ, F. Embryo-maternal communication in bovine – strategies for deciphering a complex cross talk. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 38, p. 276-289, 2003.

WOODING, F. B. P. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusion and hormone production. **Placenta**, V. 13, p. 101-113, 1992.

WOODING, F. B. P. Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. **The American Journal of Anatomy**, v. 170, p. 233-250, 1984.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. Placentation. In: LAMMING, G. E. **Marshall's Physiology of Reproduction**. 4. ed London: Chapman and Hall, 1994. v. 3, p. 233-429.

YEOM, Y. II.; FUHRMANN, G.; OVITT, C. E.; BREHM, A.; Germline regulatory element of OCT-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. **Development**. V.122, p. 881-894, 1996.

YEOM YI, HA HS, BALLING R, SCHOLER HR, ARTZT K. Structure, expression, and chromosomal location of the Oct-4 gene. **Mechanism Development**, v. 35, p. 171–179. 1991

ZVETKOVA, I.; APEDAILE, A.; RAMSAHOYE, B.; MERMOUD, J. E.; CROMPTON, L. A.; JOHN, R.; FEIL, R.; BROCKDORFF, N. Global hypomethylation of the genome in XX embryonic stem cells. **Nature Genetics**, v. 37, p. 1274–1279. 2005.