MÍRYAN LANÇA VILIA ALBERTO

**Organogênese do aparelho respiratório e sistema cardiovascular de embriões
bovinos provenientes de transferência nuclear e fertilização *in vitro***

São Paulo
2010

MÍRYAN LANÇA VILIA ALBERTO

Organogênese do aparelho respiratório e sistema cardiovascular de embriões bovinos provenientes de transferência nuclear e fertilização *in vitro*

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
2010

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2370
FMVZ

Alberto, Míryan Lança Vília
Organogênese do aparelho respiratório e sistema cardiovascular de
embriões bovinos provenientes de transferência nuclear e fertilização *in vitro*
/ Míryan Lança Vília Alberto. -- 2010.
212 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

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. Fertilização *in vitro*. 2. Clonagem. 3. Aparelho respiratório. 4. Sistema
cardiovascular. 5. Embrião bovino. I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Organogênese do aparelho respiratório e sistema cardiovascular de embriões bovinos provenientes de transferência nuclear e fertilização *in vitro*", protocolado sob o nº1711/2009, utilizando vísceras de bovinos, 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 do dia 14/10/09.

(We certify that the Research "Organogenesis of the respiratory tract and cardiovascular system of coming bovine embryos of nuclear transfer and fiv", protocol number 1711/2009, under the responsibility 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 day 10/14/09)

São Paulo, 15 de outubro de 2009

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALBERTO, Míryan Lança Vilia

Título: Organogênese do aparelho respiratório e sistema cardiovascular de embriões bovinos provenientes de transferência nuclear e fertilização *in vitro*

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: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai amado,

Seus braços se abrem quando preciso de um abraço, o coração compreende quando preciso das tuas palavras amigas e das forças para continuar seguindo, mesmo quando o caminho torna-se longo e o sonho distante de ser alcançado.

Teus olhos sensíveis se endureciam quando precisava de uma lição, porém teu amor e tua proteção e teus sábios ensinamentos me dirigiam pela vida, dando as asas e a coragem que eu precisava para voar.

Pai, guardei que mentira nada constrói, que a liberdade é preciosa, que nossa maior herança é o conhecimento e que os mais velhos carregam consigo o tesouro da vida.

Muito obrigada por tudo!

Pra mim, você é o MELHOR PAI DO MUNDO!

EU TE AMO!

A minha Mãe querida,

O amor, paciência, cuidado, dedicação sem medida e carinho que sempre deu às suas filhas guiaram nossos caminhos sempre nos conduzindo para o bem.

Tudo o que sou devo à bela mulher que és e atribuo todos meus sucessos ao ensino moral, intelectual e físico que recebi de ti.

...Enfim...

Eu tenho tanto pra lhe falar, mas com palavras não sei dizer, COMO É GRANDE O MEU AMOR POR VOCÊ.

E não há nada pra comparar, para poder lhe explicar, COMO É GRANDE O MEU AMOR POR VOCÊ.

Nem mesmo o céu, nem as estrelas, nem mesmo o mar e o infinito não é maior que o meu amor, nem mais bonito... me desespero a procurar alguma forma de lhe falar, COMO É GRANDE O MEU AMOR POR VOCÊ.

Minha Maryna,

Quando eu era criança sentia que algo faltava na minha vida, precisava de uma amiga, uma companheira fiel e sei que a mãe fez uma reunião com Deus, que conseguiu enganar o pai e encaminhou você pra mim, só pra mim.

Perto ou longe sinto que estamos sempre juntas, temos momentos perfeitos, pois você é aquela que se faz inesquecível na minha vida sendo mais importante a cada dia.

Irmã que entende quando nem mesmo eu me entendo, me ajuda sempre que preciso e até me chama atenção ao presenciar uma atitude não aceita. A gente se dá bem, a gente se entende, e eu TE AMO MUITO.

Você também faz parte das minhas conquistas, foi pra você que muitas vezes chorei, liguei, reclamei... e foi você que levantou meu astral, me colocou de pé e me deu forças pra continuar sempre seguindo.

Obrigada minha irmã... você é o meu maior presente!

A minha Vó Zica,

Deus não podia cuidar, distrair e consolar todas as crianças do mundo pessoalmente, por isso, para ser ajudado nessa tarefa criou as avós.

Vó, a Srª carrega consigo a grande experiência da vida, da qual pôde nos transmitir muitos dos seus ensinamentos.

Devo a Srª todo meu respeito, admiração e agradecimento.

Quando você conseguir superar
graves problemas de relacionamento,
não se detenha na lembrança dos momentos difíceis,
mas na alegria de haver atravessado
mais essa prova em sua vida.

Quando sair de um longo tratamento de saúde,
não pense no sofrimento
que foi necessário enfrentar,
mas na bênção de Deus
que permitiu a cura.

Leve na sua memória, para o resto da vida,
as coisas boas que surgiram nas dificuldades.
Elas serão uma prova de sua capacidade,
e lhe darão confiança diante de qualquer obstáculo.

Uns queriam um emprego melhor;
outros, só um emprego.
Uns queriam uma refeição mais farta;
outros, só uma refeição.
Uns queriam uma vida mais amena;
outros, apenas viver.
Uns queriam pais mais esclarecidos;
outros, ter pais.

Uns queriam ter olhos claros;
outros, enxergar.
Uns queriam ter voz bonita;
outros, falar.
Uns queriam silêncio;
outros, ouvir.
Uns queriam sapato novo;
outros, ter pés.
Uns queriam um carro;
outros, andar.
Uns queriam o supérfluo;
outros, apenas o necessário.

Há dois tipos de sabedoria:
a inferior e a superior.
A sabedoria inferior é dada pelo quanto uma pessoa sabe
e a superior é dada pelo quanto ela tem consciência de que não sabe.
Tenha a sabedoria superior. Seja um eterno aprendiz na escola da vida.

A sabedoria superior tolera;
a inferior, julga;
a superior, alivia;
a inferior, culpa;
a superior, perdoa;
a inferior, condena.

*Tem coisas que o coração só fala
para quem sabe escutar!*

Agradecimentos

A Deus. Ainda que eu atravessasse o vale escuro, nada temerei, pois o Sr está comigo. (Salmo 22/23). Obrigada por permitir a realização dos meus sonhos, construindo minha história.

*A Profª Drª Maria Angélica Miglino,
Mestre é aquele que caminha com o tempo, propondo paz, fazendo comunhão, despertando sabedoria, estendendo a mão iniciando o diálogo que encaminha para aventura da vida. Obrigada pelas oportunidades!*

Tenner, pra você guardei o amor que aprendi vendo meus pais, o amor que tive e recebi e hoje posso dar livre feliz. Você é muito importante na minha vida, e faz-se necessário para minhas conquistas futuras.

Avelã, anjo sem asa... Tudo foi mais fácil pra mim com você do meu lado.

Licinha, a amizade é o conforto indescritível de nos sentirmos seguros com uma pessoa, sem ser preciso pesar o que se pensa, nem medir o que se diz.

Pessoa especial, amiga sem igual... Quantas viagens, quantas risadas, quantas horas de conversa ao final da tarde, quantos medos, alegrias e tristezas. Você, minha amiga, foi muito importante durante este período, sempre trazendo suas palavras sábias aos finais de tarde para me consolar, colocar pra cima e crer tudo daria certo sim, e que no final teria alguém capaz de reconhecer todo esforço, trabalho e dedicação.

Pessoas igual a você são raras no mundo, e felizes daqueles capazes de reconhecer e ter uma amigairmã como você. Obrigada por tudo!

...Entenda que amigos vão e vem, mas nunca abra mão de uns poucos e bons (Pedro Bial)...

Álvaro Galdos, meu hermanito para sempre.

A Fapesp, por ter contribuído para o desenvolvimento deste trabalho (processo nº 51/508-3).

Ao Prof. Dr. Flávio Meirelles pela contribuição na produção dos embriões.

Ao Prof. Dr. José Manoel dos Santos, pelos ensinamentos e transferência de conhecimento.

A Fazenda Vale Formoso (Redenção – Pará), pela grande contribuição na produção dos embriões IATF.

Aos técnicos: Sandra, Ronaldo, Diogo e Maise, pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais.

Aos secretários: Maicon, Índio, Jack, Tati e Cláudia.

Aos colegas da Pós-graduação (FMVZ-USP/SP).

A BIO, pela confiança e oportunidade.

RESUMO

ALBERTO, M. L. V. **Organogênese do aparelho respiratório e sistema cardiovascular de embriões bovinos provenientes de transferência nuclear e fertilização *in vitro***. [Organogenesis of the respiratory and cardiovascular system of bovine embryos derived from nuclear transfer and IVF]. 2010. 212 f. Tese. Doutorado em Ciências – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Alterações morfogênicas do aparelho cardiorespiratório de bovinos provenientes de fecundação *in vitro* e transferência nuclear são um dos principais fatores responsáveis pela alta incidência de mortalidade embrionária, fetal e pós-natal. Utilizamos técnicas empregadas em microscopia de luz para estudar o desenvolvimento do coração e pulmão nestes animais. Verificamos que em embriões provenientes de fecundação *in vitro*, aos 28 dias de gestação, aparece o tubo laringotraqueal e sua septação através da prega traqueoesofágica. Neste mesmo período os embriões apresentaram cavidade pericárdica, átrio dividido em direito e esquerdo, cone cardíaco, seio venoso, camada de miocárdio e epicárdio. O brônquio traqueal foi observado em embriões com idade gestacional de 36 dias a partir de um brotamento na porção lateral direita da traquéia, cranial a sua bifurcação. Aos 44 dias de gestação os brotos pulmonares dos embriões apresentaram brônquios principais originando brotamentos de brônquios segmentares. O mesênquima de sustentação em diferenciação continha vasos sangüíneos dispersos, diferentemente de embriões provenientes de TN, que com 68 dias de gestação apresentou pulmão em fase pseudoglandular contendo brotos de bronquíolos e poucos vasos sangüíneos nos cortes obtidos e analisados. Com 70 dias, o coração do feto apresentava ventrículo significativamente grande, pequeno átrio e pulmão não desenvolvido. A partir dos nossos resultados, concluímos que alterações genéticas, incompletas informações e comunicações celulares e modificação no metabolismo celular são os prováveis responsáveis pelas anomalias presentes nas técnicas de manipulação de embrião, causando um desenvolvimento mais lento e falho quando comparados com embriões *in vivo*, explicando o alto índice de perda gestacional.

Palavras-chave: Fertilização *in vitro*. Clonagem. Aparelho respiratório. Sistema cardiovascular. Embrião bovino.

ABSTRACT

ALBERTO, M. L. V. **Organogenesis of the respiratory and cardiovascular system of bovine embryos from nuclear transfer and IVF.** [Organogênese do aparelho respiratório e sistema cardiovascular de embriões bovinos provenientes de transferência nuclear e fertilização *in vitro*]. 2010. 212 f. Tese. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Morphogenetic changes of cardio-respiratory system of bovine from in vitro fertilization and nuclear transfer is a major factor responsible for high incidence of both periods embryonic, fetal and postnatal mortality. We used techniques of light microscopy to study the development of heart and lung in these animals. We found that in embryos derived from in vitro fertilization, at 28 days of gestation, appears the laryngotracheal tube and its fold through tracheoesophageal septation. In the same period the embryos showed pericardial cavity, atrium divided into left and right, cardiac cone, venous sinus, layer of myocardium and epicardium. In embryos with 36 days of gestational age was observed the tracheal bronchus from a bud in the right lateral portion of the trachea, cranial to its bifurcation. At 44 days of gestation, the lung buds of the embryos showed main bronchi giving rise to budding of segmental bronchi. The sustentation mesenchyme in differentiation contained scattered blood vessels, unlike embryos from TN, which with 68 days of gestation showed lung in pseudoglandular stage, containing bronchioles buds and few blood vessels in histological sections obtained and analyzed. With 70 days, the fetal heart ventricle had significantly large, small atrium and lungs not developed. From our results we conclude that genetic alterations, incomplete information in cellular communications and change in cellular metabolism are likely responsible for the anomalies in the techniques of embryo manipulation, causing a slower and flawed development when compared to embryos in vivo, explaining the high rate of pregnancy loss.

Keywords: In vitro fertilization. Cloning. Respiratory system. Cardiovascular system. Bovine embryo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 25 dias (CR de 6,1 mm)	63
Figura 2 -	Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 25 dias (CR de 6,1 mm)	64
Figura 3 -	Fotografia de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 25 dias (CR de 7,0 mm)	65
Figura 4 -	Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 25 dias (CR de 7,2 mm)	66
Figura 5 -	Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 27 dias (CR de 9,1 mm)	68
Figura 6 -	Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 29 dias (CR de 10,0 mm)	69
Figura 7 -	Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 30 dias (CR de 10,0 mm)	71
Figura 8 -	Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)	72
Figura 9 -	Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)	73
Figura 10 -	Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)	74
Figura 11 -	Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 40 dias (CR de 25,0 mm)	76
Figura 12 -	Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 45 dias (CR de 26,0 mm)	78
Figura 13 -	Fotografia de embrião bovino (fiv) em vista lateral esquerda. Idade gestacional de 24 dias (A, CR de 8,0 mm e B, CR de 7,6 mm)	80
Figura 14 -	Fotografias de embrião bovino (fiv) em vista lateral. Idade gestacional de 28 dias (A, B, C, D: CR de 8,5 mm e P = 0,0912 g)	82
Figura 15 -	Fotografias de embrião bovino (fiv) em vista lateral. Idade gestacional de 28 dias (A, B, C: CR de 10,0 mm e P = 0,0930 g)	83

Figura 16 - Fotografias de embrião bovino (fiv) em vista lateral. Idade gestacional de 32 dias (A, B, C, D: CR de 12,5 mm e P = 0,1672 g).....	85
Figura 17 - Fotografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 36 dias (A, B, C: CR de 18,3 mm e P = 0,6663 g).....	86
Figura 18 - Fotografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 36 dias (A, B, C: CR de 18,3 mm e P = 0,7834 g).....	87
Figura 19 - Fotografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias (A, B: CR de 23,3 mm e P = 1,626 g).	89
Figura 20 - Fotografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias (A, B, C, D: CR de 21,4 mm e P= 1,5205 g)	90
Figura 21 - Fotografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (A, B: CR de 30,3 mm e P= 2,283 g)	92
Figura 22 - Fotografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (A, B: CR de 30,5 mm e P= 2,556 g)	93
Figura 23 - Fotografias de embrião bovino (clone) em vista lateral. Idade gestacional de 28 dias (CR de 6,8 mm)	95
Figura 24 - Fotografias de embrião bovino (clone) em vista lateral. Idade gestacional de 28 dias (CR de 8,2 mm)	96
Figura 25 - Fotografias de embrião bovino (clone) em vista lateral. Idade gestacional de 32 dias (CR de 13,0 mm)	98
Figura 26 - Fotografias de embrião bovino (clone) em vista lateral. Idade gestacional de 32 dias (CR de 13,0 mm)	99
Figura 27- Fotografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 36 dias (CR de 14,0 mm)	101
Figura 28 - Fotografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 36 dias (CR de 17,3 mm)	102
Figura 29 - Fotografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 40 dias (A, B: CR de 7,5 mm e P= 0,0774 g)	104
Figura 30 - Fotografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 40 dias (CR de 23,5 mm)	106
Figura 31 - Fotografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 43 dias (CR de 27,5 mm)	107

Figura 32 - Fotografias de feto bovino (clone). Idade gestacional de 50 dias (CR de 35,4 mm)	109
Figura 33 - Fotografias de feto bovino (clone). Idade gestacional de 68 dias (A, B: CR de 53,3 mm e P= 9,548 g).....	111
Figura 34 - Fotografia de feto bovino (clone). Idade gestacional e 70 dias (A: CR de 13,0 mm e P= 0,167 g).....	113
Figura 35 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 25 dias e CR de 6,1 mm.....	119
Figura 36 - Fotografia e fotomicrografia de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 25 dias e CR de 7,0 mm.....	120
Figura 37 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 27 dias e CR de 9,1 mm.....	121
Figura 38 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 30 dias e CR de 11,0 mm.....	123
Figura 39 - Fotomicrografia de embrião bovino (latf) em corte sagital, vista lateral direita. Idade gestacional de 35 dias e CR de 18,5 mm.	124
Figura 40 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 40 dias: CR de 25,0 mm (A, B, C) e CR de 24,0 mm (D, E, F).....	126
Figura 41 - Fotografias Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 45 dias e CR de 26,0 mm	127
Figura 42 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 24 dias e CR de 8,0 mm	129
Figura 43 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 28 dias e CR de 8,5 mm.....	131
Figura 44 - Fotomicrografias do tubo laringotraqueal de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 28 dias e CR de 8,5 mm.....	132
Figura 45 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 32 dias e CR de 12,5 mm	134
Figura 46 - Fotomicrografias de formação de pulmão de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 32 dias e CR de 12,5 mm.....	135
Figura 47 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 36 dias e CR de 18,3 mm.....	137

Figura 48 - Fotografia e fotomicrografia de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias e CR de 23,3 mm.....	139
Figura 49 - Fotomicrografias de pulmão e coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias e CR de 23,3 mm.....	140
Figura 50 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias e CR de 30,3 mm	142
Figura 51 - Fotomicrografias de pulmão e brônquio de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias e CR de 30,3 mm.....	143
Figura 52 - Fotografia e fotomicrografia de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 28 dias e CR de 8,2 mm.....	145
Figura 53 - Fotografia e fotomicrografia de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 32 dias e CR de 13,0 mm.....	146
Figura 54 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 36 dias e CR de 14,0 mm.....	148
Figura 55 - Fotografia e fotomicrografia de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 40 dias e CR de 7,5 mm	150
Figura 56 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 40 dias e CR de 23,5 mm.....	152
Figura 57 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 43 dias e CR de 27,5 mm.....	153
Figura 58 - Fotografia e fotomicrografias de coração, traquéia e pulmão de feto bovino (clone). Idade gestacional de 68 dias e CR de 53,3 mm	155
Figura 59 - Fotografia e fotomicrografia de feto bovino (clone). Idade gestacional de 70 dias e CR de 13,0 mm.....	157
Figura 60 - Eletromicrografias do pericárdio de coração de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)	159
Figura 61 - Eletromicrografias do pericárdio de coração de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)	160
Figura 62 - Eletromicrografias do coração de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)	161
Figura 63 - Eletromicrografias do pulmão de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)	162

Figura 64 - Eletromicrografias do pulmão de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)	163
Figura 65 - Eletromicrografias do coração de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 35 dias (CR de 15,6 mm)	165
Figura 66 - Eletromicrografias do pulmão de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 35 dias (CR de 15,6 mm)	166
Figura 67 - Eletromicrografias de embriões bovinos (fiv). Idade estacional de A - 24 dias e CR de 7,6 mm, e B – 28 dias e CR de 10,0 mm	168
Figura 68 - Eletromicrografias de embrião bovino (fiv) evidenciando área cardíaca. Idade gestacional de 28 dias e CR de 10,0 mm	169
Figura 69 - Eletromicrografias de ventrículo esquerdo do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 36 dias (CR de 18,3 mm / Peso - 0,7834 g).....	171
Figura 70 - Eletromicrografia de ventrículo esquerdo do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 36 dias (CR de 18,3 mm / peso - 0,7834 g)	172
Figura 71 - Eletromicrografias de ventrículo esquerdo do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 36 dias (CR de 18,3 mm / Peso - 0,7834 g)	173
Figura 72 - Eletromicrografias de pulmão de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias (CR de 21,4 mm / Peso - 1,5205 g)	175
Figura 73 - Eletromicrografias de ventrículo direito do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias (CR de 21,4 mm / Peso - 1,5205 g).....	177
Figura 74 - Eletromicrografia de ventrículo esquerdo do coração do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias (CR de 21,4 mm / Peso - 1,5205 g).....	178
Figura 75 - Eletromicrografias de pulmão de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (CR de 30,5 mm / Peso - 2,556 g).	180
Figura 76 - Eletromicrografias de pulmão de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (CR de 30,5 mm / Peso - 2,556 g)	181
Figura 77 - Eletromicrografias de ventrículo esquerdo do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (CR de 30,5 mm / Peso - 2,556 g).....	183

Figura 78 - Eletromicrografias de ventrículo direito do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (CR de 30,5 mm / Peso - 2,556 g).....	184
Figura 79 - Eletromicrografias de ventrículo direito do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (CR de 30,5 mm / Peso - 2,556 g).....	185
Figura 80 - Eletromicrografias de átrio do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (CR de 30,5 mm / Peso - 2,556 g)	186
Figura 81 - Eletromicrografias de pulmão de feto bovino (clone). Idade gestacional de 68 dias (CR de 53,3 mm / Peso – 9,545 g)	188
Figura 82 - Eletromicrografias de pulmão de feto bovino (clone). Idade gestacional de 68 dias (CR de 53,3 mm / Peso – 9,545 g))	189

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Idade gestacional e Crown-rump de embriões bovinos coletados, provenientes de Inseminação Artificial em Tempo Fixo - São Paulo – 2010)	57
Tabela 2 -	Idade gestacional, receptoras prenhas, Crown-rump e peso dos embriões bovinos coletados, provenientes de fertilização <i>in vitro</i> - São Paulo – 2008)	58
Tabela 3 -	Idade gestacional e Crown-rump dos embriões bovinos coletados, provenientes de transferência de núcleo - São Paulo – 2010	59
Tabela 4 -	Idade Gestacional e descrições morfológicas dos embriões provenientes das técnicas de IATF, FIV, TN - São Paulo – 2010	115

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Crescimento e desenvolvimento (Crown Rump) X idade gestacional de embriões bovinos IATF114
- Gráfico 2 - Crescimento e desenvolvimento (Crown Rump) X idade gestacional de embriões bovinos IATF, FIV, TN117

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1 ^o CP	Primeiro Corpúsculo Polar
BSA	Albumina Sérica Bovina
CL	Corpo Lúteo
CGT	Células Gigantes Trofoblásticas
CR	Crown Rump
CRH	Receptoras de Clone com Hidroalantóide
CO ₂	Gás Carbônico
°C	grau Célcus
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	gramas
h	hora
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo fixo
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
LH	Hormônio Luteinizante
µl	microlitros
µg	microgramas
µm	micrômetros
mg	miligrama
ml	mililitros
mm	milímetros
M	Molar
MIV	Maturação In Vitro
MG	Minas Gerais
N ₂	Nitrogênio
O ₂	Oxigênio
PAGs	Glicoproteína Associada a Gestação

PBS	Phosphate buffered saline
PL	Lactogênio Placentário
PSP60	Proteína 60
%	porcentagem
SFB	Soro Fetal Bovino
SP	São Paulo
TN	Transferência Nuclear
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	REVISÃO DE LITERATURA	29
3.1	DO CONCEPTO À FORMAÇÃO DO EMBRIÃO	29
3.2	FASES DO PERÍODO GESTACIONAL	31
3.3	DESENVOLVIMENTO DO CORAÇÃO	33
3.4	DESENVOLVIMENTO DO APARELHO RESPIRATÓRIO	36
3.4.1	Maturação pulmonar	42
3.5	DISFUNÇÃO PLACENTÁRIA RELACIONADA À PRODUÇÃO DE EMBRIÕES	44
4	MATERIAL E MÉTODO	52
4.1	EMBRIÕES FECUNDADOS <i>IN VITRO</i>	52
4.1.1	Obtenção de amostras	52
4.1.2	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	52
4.2	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES: TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO	53
4.2.1	Maturação <i>in vitro</i>	53
4.2.1.1	Fibroblastos	54
4.2.1.2	Seleção do 1o Corpúsculo Polar e Enucleação de oócitos em metáfase II	54
4.2.1.3	Reconstrução, Ativação e Cultivo <i>in vitro</i>	55
4.2.1.4	Transferência dos embriões	56
4.3	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO	56
4.4	DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E MONITORAMENTO DA SOBREVIVÊNCIA EMBRIONÁRIA	56
4.5	ESTUDO MACROSCÓPICO: PARÂMETROS ANALISADOS	59
4.6	ESTUDO MICROSCÓPICO	60
4.6.1	Processamento Microscopia de Luz	60

4.6.2	Processamento Microscopia Eletrônica de Transmissão	60
4.6.3	Processamento Microscopia Eletrônica de Varredura	61
5	RESULTADOS	62
5.1	MACROSCÓPICO: EMBRIÕES PROVENIENTES DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)	62
5.2	MACROSCÓPICO: EMBRIÕES PROVENIENTES DE FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	79
5.3	MACROSCÓPICO: EMBRIÕES PROVENIENTES DE TRANSFERÊNCIA NUCLEAR	94
5.4	MICROSCÓPICOS	118
5.4.1	Microscopia de Luz: Embriões Provenientes de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)	118
5.4.2	Microscopia de Luz: Embriões Provenientes de Fertilização <i>In Vitro</i> (FIV)	128
5.4.3	Microscopia de Luz: Embriões Provenientes de Transferência Nuclear	144
5.4.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão: Embriões Provenientes de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)	158
5.4.5	Microscopia Eletrônica de Varredura: Embriões Provenientes de Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	167
5.4.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão: Embriões Provenientes de Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	170
5.4.7	Microscopia Eletrônica de Transmissão: Embriões Provenientes de Transferência Nuclear (TN)	187
6	DISCUSSÃO	190
7	CONCLUSÃO	199
	REFERÊNCIAS	200
	ANEXOS	211

1 INTRODUÇÃO

Em 1982 nasceu o primeiro bezerro resultante de fecundação *in vitro* (FIV) (STRINGFELLOW; SERDAL, 1999), acreditando-se então que a tecnologia havia evoluído de maneira a permitir uma produção em massa de bezerros a um custo mais baixo que os métodos estabelecidos com o uso de superovulação. No entanto, a taxa de mortalidade embrionária e fetal no terço inicial da gestação de bovinos tornou-se uma das maiores causas de perdas econômicas no aspecto relacionado à produção animal (REICHENBACH et al., 2003).

Alves, Rauber e Rubin (2003) afirma que a produção *in vitro* de embriões bovinos obteve avanços consideráveis nos últimos anos, e está sendo rapidamente incorporada aos projetos de produção. Estudos com animais oriundos de transferência nuclear vêm aumentando a cada dia, tendendo a elevar o sucesso dos grandes criadores, mas aproximadamente 50% dos embriões bovinos clonados (mórula compacta ou blastocisto) não estabelecem gestação depois da transferência (EDWARDS et al., 2003).

É aceito que embriões desenvolvidos de oócitos fecundados *in vitro* diferem morfológica e fisiologicamente de embriões fecundados *in vivo* (STRINGFELLOW; SERDAL, 1999). Estudos afirmam que em animais oriundos de clonagem ou outro procedimento de manipulação as anormalidades placentárias ocorrem com alta incidência tanto no período inicial como no final da gestação (YOUNG; SINCLAIR; WILMUT, 1998; HILL et al., 1999), além das anormalidades e retardamento do crescimento embrionário e fetal (BERTOLINI et al., 2004). As razões para a baixa eficiência da clonagem de células somáticas são atualmente desconhecidas, sendo um assunto de pesquisa extensiva no campo da reprogramação genômica.

Durante necropsia de um feto oriundo de transferência nuclear foi observado sinais de anormalidade cardiopulmonar crônica, sendo sugerido que tal alteração ocorre durante o desenvolvimento *in útero* (HILL et al., 1999). O processo de transferência nuclear vem sendo aprimorada, implantada e desenvolvida com os objetivos de modelo científico para diferentes estudos básicos, regeneração de raças/espécies em vias de extinção, melhoramento animal e suporte para animais transgênicos (RUMPF; DODE; FELICIANO SILVA, 2002).

Entende-se ainda que apesar do avanço que foi a produção de animais por

clonagem, há ainda muitas falhas no processo, que freqüentemente levam a perdas embrionárias ou ao nascimento de animais com deficiência imune ou respiratória, além de inúmeras disfunções placentárias. Atualmente sabe-se que grande parte destas falhas não ocorre por modificações diretamente no genoma, mas sim por alterações cromatínicas que levam à mudança do padrão de expressão dos genes (MEIRELLES et al., 2007).

Desta maneira, ao nos depararmos com tantas inovações tecnológicas no sentido de uma produção de qualidade e melhorias significativas que o processo de clonagem nos traz, acreditamos ser de grande necessidade um estudo aprofundado sobre a dinâmica da embriologia do desenvolvimento em bovinos oriundos de técnicas de transferência nuclear e fertilização *in vitro*. Mais especificamente do aparelho respiratório e sistema cardiovascular, uma vez que alterações morfogênicas destes são os principais fatores responsáveis pela alta incidência de mortalidade embrionária, fetal e pós-natal.

2 OBJETIVOS

Estudar embriões bovinos provenientes de Inseminação Artificial em Tempo Fixo, Fertilização *in vitro* e Transferência nuclear relacionando seu estágio de desenvolvimento e crescimento no período inicial de prenhes a sua idade gestacional.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter medidas de Crown-Rump e peso dos embriões, descrever seu desenvolvimento externo elucidando as alterações morfológicas quando presentes.
- Estudar a organogênese do Aparelho Cardiorespiratório dos embriões, caracterizando as etapas do desenvolvimento durante o período embrionário e verificando diferenças marcantes capazes de comprometer um desenvolvimento normal do embrião.
- Identificar as características microscópicas no processo de formação dos órgãos (mais especificamente pulmão e coração) dos embriões, juntamente de seus tecidos e constituição celular.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DO CONCEPTO À FORMAÇÃO DO EMBRIÃO

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

Arthur (1979); Junqueira e Carneiro (2004) e Moore e Persaud (2004) descrevem a formação do embrião e seus anexos a partir da fertilização do oócito na ampola da tuba uterina e formação do zigoto, sendo que sua segmentação ocorre a medida que ele se desloca passivamente em direção ao útero. Joshi (1988) complementa que a tuba uterina é um dos locais mais importantes nos processos reprodutivos, visto que nela ocorrem os eventos da capacitação e transporte do espermatozóide, o transporte do oócito, a fecundação e desenvolvimento dos primeiros estágios embrionários que antecedem a implantação. Seu fluido é proveniente da secreção das células mucosas do epitélio e do transudato seletivo sangüíneo (NAYAK; ELLIGTON, 1977; JOSHI, 1988).

Seguindo-se a fertilização, inicia-se a clivagem do zigoto com a formação dos blastômeros e, como resultado das contrações peristálticas e ciliares normais da tuba uterina, as células embrionárias são impulsionadas em direção do útero. Quando os blastômeros alcançam o útero, em três ou quatro dias nos bovinos (NODEN; DE LAHUNTA, 1990), a figura embrionária apresenta-se formada por dezesseis a trinta e duas células originadas por mitoses sucessivas, a mórula (HAFEZ; HAFEZ, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004).

Junqueira e Carneiro (2004) e Moore e Persaud (2004) complementam ainda que, o acúmulo gradual de líquido aparece na parte central da cavidade da mórula. Os blastômeros afastados pelo líquido passam a constituir uma camada periférica, o

trofoblasto; espessada num ponto onde permanece um aglomerado celular, o embrioblasto ou massa celular interna, que faz saliência para dentro da cavidade, constituindo o blastocisto.

Nos ruminantes (ovinos e bovinos) e nos não ruminantes as células do trofoblasto, durante e após a nidação no endométrio, secretam o hormônio gonadotrofina coriônica que prolongam o período de vida útil do corpo lúteo além do ciclo estral; este período é denominado de reconhecimento materno da prenhez (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Na fase de blastocisto, a zona pelúcida se adelgaça e se desfaz, permitindo que as células do trofoblasto que agora sofrem diferenciação para constituírem o sinciciotrofoblasto e o citotrofoblasto, por ação enzimática invadem a mucosa, fazendo com que o blastocisto fique implantado no endométrio. Nessa fase do desenvolvimento, a nutrição do blastocisto é histotrófica com a participação endometrial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004).

Após a implantação do embrião o endométrio modifica-se e passa a ser chamado de decídua, distinguindo-se em decídua basal localizada entre o embrião e o miométrio, decídua capsular entre o embrião e a luz do útero e decídua parietal, que é o restante da decídua (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004).

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

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

Do epiblasto surge o ectoderma que forma o âmnio, o embrião e as células da

linha primitiva que futuramente formará parte do mesoderma extra-embriônico, mesoderma do embrião, o processo notocordal e endoderma do embrião. O hipoblasto é responsável pela formação do endoderma que reveste o saco vitelino primitivo e de parte do mesoderma extra-embriônico (MOORE; PERSAUD, 2004).

Desta forma constituem-se as três camadas germinativas do embrião vertebrado: ectoderma, mesoderma e endoderma, das quais derivarão todos os tecidos de um animal adulto. A camada germinativa mesodérmica desempenhará um papel fundamental na organização dos eixos do corpo vertebrado, dando surgimento ao sistema esquelético, muscular e circulatório, dentre outras estruturas (WEINSTEIN, 2005).

Em bovinos, a maioria dos órgãos são formados entre a segunda e a sexta semana da gestação. Durante este período, o trato digestivo, os pulmões, o fígado e o pâncreas se desenvolvem a partir do intestino primitivo. No 21º dia da gestação o coração começa a funcionar e inicia-se a circulação (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

3.2 FASES DO PERÍODO GESTACIONAL

O período de zigoto culmina com a união inicial do blastocisto, porém anterior ao estabelecimento da circulação intra-embriônica. A duração da gestação é calculada como o intervalo entre o serviço fértil e o parto, e à medida que ela progride o útero aumenta gradativamente para permitir a expansão do feto, porém o miométrio permanece quiescente para prevenir uma expulsão prematura.

O período embrionário se estende de 15 a 45 dias de gestação na vaca. Neste período, ocorre um rápido crescimento e diferenciação, durante o qual os principais tecidos, órgãos e sistemas são estabelecidos e as principais características da forma externa do corpo são reconhecidas (WINTERS; GREEN; CONSTOCK, 1942; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Alexopoulos et al. (2005) sugerem ainda que o desenvolvimento da pré implantação nos bovinos ocorre até o 24º dia de gestação, antes da fixação e durante este período o embrião passa por significativo crescimento e diferenciação celular.

À medida que cresce, desde zigoto até o feto a termo, o embrião não apenas

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

Alexopoulos et al. (2005) e Maddox-Hyttel et al. (2003) realizaram um estudo ultraestrutural em embriões à partir do 9º dia gestação e verificaram que nesta fase apresentam-se desprovidos de zona pelúcida, as células do trofoblasto apresentam-se cubóides, exceto ao redor da massa celular interna. Células do hipoblasto foram observadas espalhadas individualmente no interior da massa, juntamente de suas organelas: mitocôndrias, polirribossomos, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. Aos 11 dias, o trofoblasto continha células cubóides e colunares, exceto ao redor da massa celular interna, regiões adjacentes estavam conectadas por apertadas junções e desmosomos e a matriz extracelular existente se estendeu entre o hipoblasto e a massa celular interna.

No 14º dia de gestação um disco embrionário pode ser identificado com comprimento médio de 5,0 mm, o epiblasto foi claramente perceptível formando um epitélio contínuo com o trofoblasto. A lâmina basal foi observada entre o trofoblasto, epiblasto e hipoblasto, dobras amnióticas foram formadas no trofoblasto adjacente do epiblasto (MADDOX-HYTTEL et al., 2003).

Evans e Sack (1973) relatam que aos 18 dias de gestação os embriões bovinos apresentam-se na fase de gástrula, com formação de âmnio e linha primitiva. A partir dos 19 dias surgem os primeiros somitos derivados do dobramento da placa neural. Maddox-Hyttel et al. (2003) estudou embriões com 21 dias de gestação, e descreveram ter uma linha primitiva estendida em direção ao pólo cranial, sem desenvolvimento do tubo neural. Até a borda do disco embrionário o mesoderma divide-se entre mesoderma somático, delineando o trofoblasto que reveste a cavidade amniótica, e o mesoderma splâncnico revestindo o hipoblasto.

Winters, Green e Constock (1942) afirmam que aos 22 dias e 16 horas de gestação no embrião bovino o canal neural estava completamente fechado e 19 pares de somitos estavam presentes, a região cefálica foi definida, 1º arco branquial, vesículas ópticas e óticas tinham aparecido, um coração proeminente foi distinguido e o saco vitelino havia se desenvolvido. No entanto, Evans e Sack (1973) afirma que o tubo neural se fecha aos 23 dias de gestação, aparece então o 1º arco branquial,

as vesículas ópticas e placódios óticos.

De 24 a 26 dias as três vesículas encefálicas tornam-se visíveis, presença do 2º ao 4º arco branquial, mamilos e brotos dos membros. Com 30 dias ocorre a formação das fossetas nasais, pigmentação da retina e placas dos membros torácicos já está presente. Entre 34 e 38 dias surge o meato acústico, fossetas nasais tornam-se salientes, ocorrendo formação das pálpebras e presença de genitais, raios digitais apresentam-se visíveis entre os dígitos. Já, a partir de 45 dias surgem os folículos pilosos acima dos olhos e lábios, meato acústico é recoberto e dígitos distais são separados. De 56 a 60 dias o palato e as pálpebras são fusionados, ocorre diferenciação dos genitais externos, formação de cascos e cornos (WINTERS; GREEN; CONSTOCK, 1942; EVANS; SACK, 1973).

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

3.3 DESENVOLVIMENTO DO CORAÇÃO

O Sistema Cardiovascular inicia seu desenvolvimento no final da terceira semana gestacional, poucos dias antes do início do surgimento do primórdio do respiratório. Células mesenquimais derivadas do mesoderma esplâncnico proliferam-se formando aglomerados celulares isolados, que logo darão origem a tubos endoteliais, que se unem formando o Sistema Cardiovascular primitivo (NODEN; DE LAHUNTA, 1990).

Nos humanos, Moore, Persaud e Shiota (2002) e Moore e Persaud (2004) afirmam que o primórdio do coração torna-se evidente aos 18 dias e começa a pulsar aos 22 ou 23 dias. Na área cardiogênica, células mesenquimais esplâncnicas se agregam e se dispõem de ambos os lados formando os cordões angioblásticos, os quais se canalizam formando os tubos cardíacos endocárdicos de paredes

delgadas. Quando ocorre o dobramento lateral do embrião, os tubos endocárdicos se aproximam um do outro e se fundem formando um único tubo endocárdico. Com a fusão dos tubos cardíacos, uma camada externa do coração embrionário – o miocárdio primitivo - forma-se do mesoderma esplâncnico.

Neste estágio, o coração em desenvolvimento é composto por um delgado tubo endotelial, separado de um tubo muscular espesso, o miocárdio primitivo, por tecido conjuntivo gelatinoso – a geléia cardíaca. Com o pregueamento da cabeça, o coração e a cavidade pericárdica passa a se situar ventralmente ao intestino anterior e caudalmente a membrana bucofaríngea. Quando o coração primitivo se dobra, o átrio e o seio venoso passam a situar-se dorsalmente ao tronco arterioso, ao bulbo cardíaco e ao ventrículo. Com isso, o seio venoso formou expansões laterais, os cornos do seio venoso direito e esquerdo (MOORE; PERSAUD; SHIOTA, 2002; MOORE; PERSAUD, 2004).

Montenegro e Rojas (2001) acrescentam que as almofadas endocárdicas são formadas por matriz extracelular coberta por endotélio. Estas almofadas se fusionam no centro do tubo cardíaco e dividem o fluxo sanguíneo nas futuras valvas mitral e tricúspide. Entre as camadas epiteliais de endocárdio e miocárdio se acumula a gelatina cardíaca, uma camada de matriz extracelular secretada pelo endocárdio. Logo, o endotélio das almofadas que reveste o lúmen, é ativado por um estímulo proveniente do miocárdio adjacente e as células endoteliais migram para a matriz extracelular subjacente. Na formação do tabique aórtico-pulmonar, durante a divisão do tronco arterioso com células derivadas da crista neural, também se produz uma troca de células epiteliais para mesenquimais.

Em ratos, os precursores do coração prematuro pode ser traçado por aproximadamente 50 células localizadas em ambos os lados da linha média do epiblasto, no início do estágio de gástrula. Durante a gastrulação, as células precursoras do coração são restritas na porção anterior medial da linha primitiva, e migram com outras células que irão formar o endoderma definitivo e a camada germinativa mesodérmica. As células miocárdicas irão originar-se a partir do mesoderma esplâncnico, onde células mesenquimais diferenciam-se em cardiomiócitos (ABU-ISSA; WALDO; KIRBY, 2004).

Gitler et al. (2003) relata que a formação dos coxins endocárdicos são os precursores das valvas do coração. O aparecimento destes em ratos ocorre no 9º dia de gestação e até este estágio o coração consiste de um simples tubo, composto

de células endoteliais separadas de células miocárdicas por uma camada de matriz extracelular denominada gelatina cardíaca. Em duas regiões distintas, entre o canal atrioventricular e o trato ventricular encontra-se a matriz extracelular se espessando para formar o primeiro coxin endocárdico. Células mesenquimais derivadas da crista neural proliferam-se e ocupam o coxin endocárdico.

Curran, Pierson e Ginther (1986) ao analisar o conceito bovino através de ultra-sonografia verificou que os batimentos cardíacos iniciam entre o 19º e 24º dia de gestação. Em embriões com 14,5 mm de Crown Rump a artéria carótida interna e os elementos venosos apresentavam-se individualizados dentro do tecido mesenquimal não diferenciado. As camadas vasculares eram formadas por endotélio unicelular contendo elementos nucleados. Já, embriões com 15,5 e 18 mm de comprimento a parede da artéria carótida interna tornou-se mais complexa, assemelhando-se as características de um adulto, no entanto apresentava-se cercada por uma coroa de células mesenquimais que promoveram a formação da camada adventícia, que mais tarde passou a se isolar do mesênquima ainda indiferenciado (TOBENAS-DUJARDIN et al., 2005).

Hammond (1978) relata que o surgimento dos vasos podem estar correlacionados com a divisão da porção pulmonar e aórtica do saco aórtico, onde o segundo arco formará a carótida externa e a porção central do saco torna-se parte do tronco aórtico.

Na espécie eqüina, Vitums (1981) acredita que anomalias congênitas do coração surgem no início da cardiogênese e são associadas com a divisão do canal atrioventricular. Descreve ainda os eventos morfogênicos da cardiogênese eqüina, onde o tubo cardíaco primitivo se forma no 21º dia de gestação. O coxin endocárdico no canal atrioventricular aparece entre os 22 e 25 dias de gestação. Com 28 dias ocorreu a fusão inicial do coxin endocárdico, septo atriopulmonar e aparecimento do primórdio das valvas semilunares pulmonares.

Entre 30 e 32 dias de gestação ocorre a fusão total do coxin endocárdico átrio ventricular, fechamento do I forâmen interatrial, completa separação do tronco aórtico e pulmonar e septação inicial do conus. Até o 49º dia de gestação ocorre o fechamento do II forâmen interventricular, incorporação do conus pulmonar entre ventrículo direito e absorção do conus aórtico entre ventrículo esquerdo. Coração assume então a posição pós-natal (VITUMS, 1981).

O processo de vasculogênese extra-embriônica em ovelhas pode ser

observada em embriões com idade gestacional de 15 dias (ou seis pares de somitos) (FIELD, 1977).

3.4 DESENVOLVIMENTO DO APARELHO RESPIRATÓRIO

Duplessis (1970); Moore e Persaud (2004); Moore, Persaud e Shiota (2002) e Pringle (1986) descrevem o desenvolvimento dos órgãos do Aparelho Respiratório inferior em humanos e consideram que o início do primórdio respiratório aparece aproximadamente no 28º dia como um sulco mediano na extremidade caudal da parede ventral da faringe primitiva: a fenda laringotraqueal. No final da quarta semana, a fenda já se invaginou para formar um divertículo respiratório saculiforme (broto pulmonar), localizado na região ventral da porção caudal do intestino anterior, quando o estomodeu e o intestino primitivo fundem-se e as membranas se desintegram (CRELIN, 1976). Gattone e Morse (1984); Larsen (1997) e Sadler (2005) complementam, afirmando que a quarta semana abrange três subdivisões do celoma entre: pleura, pericárdio e cavidade pericárdica. A primeira divisão é o septo transversal, o qual separa o celoma em cavidade pericárdica torácica primitiva e cavidade abdominal peritoneal.

Have-Opbroek (1981) afirma existir dois períodos de diferenciação anteriormente ao nascimento, sendo o primeiro o estabelecimento da porção brônquica e o segundo o desenvolvimento da porção respiratória.

No desenvolvimento embrionário das ovelhas o divertículo ventral origina o revestimento epitelial da laringe, traquéia e brônquios. A constituição mesodérmica destas estruturas derivam do mesoderma esplâncnico na superfície ventral do intestino primitivo e o divertículo respiratório é o primeiro a ser perceptível no embrião no 17º dia de gestação, se aprofundando nos embriões com 19 dias. Um pequeno sulco surge de cada lado da linha de junção caudal final do divertículo até o tempo indicado no primeiro aparecimento do broto pulmonar primitivo. Entre o 19º e 28º dia o sulco é consideravelmente aprofundado e internamente correspondem a uma elevação do revestimento endodérmico entre o divertículo respiratório e o intestino primitivo, marcando o aparecimento do tubo laringotraqueal. A divisão da porção caudal do divertículo respiratório forma os brotos bronco pulmonares, o qual

não ocorre por dicotomia, mas sim por ramificações colaterais (BRYDEN; EVANS; BINNS, 1972).

Ioannides et al. (2003) explica que existe um gene denominado Sonic Hedgehog (Shh) que desempenha um papel de regulação germinativa dos órgãos a partir do endoderma do intestino primitivo, tendo como exemplo a separação de traquéia e esôfago no início do desenvolvimento embrionário, ou ainda o brotamento pulmonar, o qual é positivo para o Shh mesmo após a septação traqueoesofágica, contribuindo para proliferação e ramificação morfogênica do pulmão. Os brotos pulmonares ramificados contêm mesênquima circundante seguido de expansão mesenquimal, a fim de formar os lobos segmentares (HISLOP, 2002).

Cardoso (1995) e Peters et al. (1994) ao descreverem sobre formação e desenvolvimento pulmonar, afirmam que o pulmão é originado de um broto epitelial do endoderma do intestino primitivo, sendo os túbulos epiteliais circundados por células mesodérmicas soltas que surgem em cada compartimento a fim de ser diferenciadas, mas na verdade são conhecidas para expressar genes específicos dos pulmões até o tempo prematuro. O estágio prematuro estende a proliferação destes tubos gerando um sistema de ramificação que logo estabelece o modelo do órgão maduro, estas ramificações e distintas células fenotípicas aparecem ao longo dos túbulos epiteliais associando componentes mesenquimais do desenvolvimento pulmonar.

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

Minoo e King (1994) e Deterding e Shannon (1995) realizaram um trabalho sobre interações epitélio mesenquimais do pulmão em desenvolvimento, verificando seu processo de formação. Constataram uma estrutura morfológicamente uniforme, emergindo do esôfago primitivo se desenvolvendo entre o tecido com diversidade celular significativa, a qual será passada para células filhas. Relatam ainda que, a

ramificação morfogênica é dependente de interações epitélio mesenquimais na matriz extracelular funcional, sendo os componentes essenciais desta, a Laminina (glicoproteína) detectada assim que ocorre a pré-implantação embrionária, presente em todos os estágios de desenvolvimento; a fibronectina produzida por uma variedade de células encontradas em todo tecido conjuntivo pulmonar e a tenascina (glicoproteína).

Caplan (1991) e Gilbert (1994) descrevem ser o mesênquima o responsável pela especificidade de indução no ectoderma e desenvolve-se de acordo com a região que o mesoderma ocupava. O mesênquima tem um papel instrutivo pelos genes em resposta as células e sua especificidade regional de indução é crítica durante o desenvolvimento do sistema respiratório, pois quando isolamos e cultivamos o epitélio respiratório de maneiras diferentes podemos observar grande maleabilidade, diferenciando-se de acordo com as instruções mesenquimais fornecidas, tratando-se de um elemento chave para um desenvolvimento normal.

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

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

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

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

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

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

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

Lobo (1966) ao descrever a goteira laringo-tráqueo-brônquica em embriões com 3 mm de Crown Rump verificou que o isolamento da traquéia e do esôfago decorre do aparecimento das goteiras tráqueo-esofagianas, látero longitudinalmente situadas em ambos os lados do intestino cefálico, entre o divertículo respiratório e o esôfago. Garcia, Jeckel Neto e Fernandez (1991) e Sadler (2005) complementam relatando que o divertículo respiratório se separa da faringe primitiva através do septo traqueoesofágico derivados da fusão das cristas traqueoesofágicas (que diferenciavam o intestino anterior do divertículo), o qual diferenciará completamente a porção respiratória da digestiva, com exceção do orifício de entrada da laringe, sendo seu mesênquima circundante derivado do quarto e sexto pares de arcos branquiais.

O revestimento endodérmico do divertículo laringotraqueal origina o epitélio e as glândulas da laringe, traquéia, brônquios, bronquíolos e o epitélio de revestimento pulmonar, sendo que o da laringe se desenvolve do endoderma da extremidade

cranial do tubo laringotraqueal. O broto traqueal que se desenvolve na extremidade caudal do divertículo respiratório durante a quarta semana, logo se divide em duas tumefações: os brotos brônquicos primitivos ou primários. Durante a quinta semana as conexões de cada broto com a traquéia crescem lateralmente nas paredes medianas dos canais pericardioperitoniais ou cavidades pleurais para formar o brônquio principal, sendo que a segunda geração de ramificações produz três brotos bronquiais secundários do lado direito e dois do lado esquerdo, os futuros primórdios dos lobos pulmonares. Os brotos bronquiais e suas bainhas de esplancopleura continuam a crescer e bifurcar-se, preenchendo gradualmente a cavidade pleural (GARCIA; JECKEL NETO; FERNANDEZ, 1991; LARSEN, 1997; MOORE; PERSAUD, 2004). Simultaneamente a organogênese pulmonar ocorre o desenvolvimento de conexões vasculares (BURRI, 1984). Até os 28 dias gestacionais, os grupos de células endoteliais estão fundidos ao redor do mesênquima no divertículo ventral. Aos 34 dias de gestação, o plexo capilar circunda os dois brotos pulmonares, estando em conexão com artérias e veias pulmonares (HISLOP, 2002).

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

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

Aos 11 dias o revestimento epitelial dos tubos brônquicos consiste de várias camadas de células, as quais não são alinhadas e ausentes de aparência cuboidal. As células mesenquimais são relativamente indiferenciadas, exceto em alguns centros hematopoiéticos dispersos (TADERERA, 1967).

Com 12 dias, ambos os pulmões podem apresentar crescimento em

comprimento, sem que haja ramificações, sendo dicotomizados mais tarde. São constituídos de muita fibra colágena na região de interface, protuberâncias epiteliais ou mesenquimais originam em uma seção de cruzamento exibindo íntimo contato celular e vacúolos densos predominando na extremidade basal das células epiteliais. A ausência da lâmina basal ao longo do crescimento distal é muito evidente no pulmão de 13 dias, o sistema de Golgi é visualizado no citoplasma apical, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias são encontrados por toda célula (BLUEMINK; MAURIK; LAWSON; 1976). Taderera (1967) relata ainda que nesta idade gestacional o revestimento epitelial consiste de mais de uma camada de células, iniciando uma orientação em caráter cuboidal. As células mesenquimais apresentam-se mais distantes e elementos vasculares são claramente observados.

Aos 15 dias o revestimento brônquico é composto por uma simples camada de células epiteliais cuboidais alinhadas, as células mesenquimais se diferenciam para formar os elementos vasculares e a camada de músculo liso circundante dos túbulos brônquicos (TADERERA, 1967).

Bucher e Lynner (1961) e Spooner e Wessells (1970) desenvolveram estudos a fim de estabelecer um processo de ramificação da porção intrasegmental da árvore brônquica até as diferentes fases da vida intra-uterina e a relação do desenvolvimento da cartilagem bronquial, uma vez que a cartilagem é formada de mesênquima em proliferação, alargamento e diferenciação dos condroblastos. Assim, puderam constatar que Hematoxilina e Eosina coram homogeneamente a matriz hialina observada entre os condroblastos, mostrando a inclusão de fibras colágenas.

Notaram ainda que provavelmente a matriz tenha uma secreção celular, composta de proteínas de grupos colágenos juntamente aos sulfatos de condroitina; a cartilagem continua a crescer após a ramificação bronquial estar completa e novas cartilagens surgem até a 25ª semana de gestação, sendo que até a 10ª semana as placas de cartilagem dos brônquios principais são desenvolvidas em zonas de pré-cartilagem, apresentando consistência e concentração de largas células, com núcleos redondos e escuros, e o citoplasma é eosinófilo e claro (BUCHER, LYNNER, 1961). Os descritos de Lobo (1966) acrescentam que, músculos e cartilagens originam-se de condensações mesenquimais derivadas do IV e do V par de arcos branquiais.

Na 16ª semana de gestação, todos os principais elementos estão formados,

exceto aqueles envolvidos nas trocas gasosas, pois a respiração não é possível, levando a óbito os fetos que nascem durante este período (MOORE; PERSAUD, 2004).

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

Langston et al. (1984) descreve que o pulmão imaturo (19-28 semanas gestacionais) apresenta um simples espaço de ar interno, composto de parede lisa, fundo cego e canal respiratório separado por tecido intersticial relativamente grosso. Estes canais são formados por epitélio cuboidal, de forma enrugada e capilar disperso no tecido intersticial.

Duplessis (1970) e Garcia, Jeckel Neto e Fernandez (1991) relatam que por volta da 24ª semana, os bronquíolos respiratórios já estão estabelecidos e, nas suas extremidades, desenvolveram-se alguns sacos terminais denominados alvéolos primitivos que apresentam parede epitelial delgada, e vascularização mais desenvolvida no tecido conjuntivo. Larsen (1997) e Sadler (2005) descrevem ainda que o pulmão é composto de tecido endodérmico e mesodérmico, sendo que o endoderma do broto pulmonar fornece a mucosa o revestimento dos brônquios e das células epiteliais dos alvéolos, o mesoderma que recobre a parte externa do pulmão desenvolve-se em pleura visceral e a camada mesodérmica somática, que recobre internamente a parede corporal torna-se a pleura parietal, sendo o espaço formado entre as pleuras denominado cavidade pleural. Entre a 36ª semana até o nascimento os alvéolos já amadureceram, no entanto, alvéolos adicionais continuam a ser produzidos durante a infância, até os oito anos de idade nos humanos (LARSEN, 1997).

3.4.1 Maturação pulmonar

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

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

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

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

venha a nascer prematuramente.

O período alveolar é o estágio final do desenvolvimento pulmonar, ocorre a partir do período fetal terminal até cerca de 8 anos de idade, quando os pulmões amadurecem aumentando bronquíolos respiratórios e alvéolos primitivos (MOORE; PERSAUD, 2004).

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

No cordeiro, a fase pseudoglandular estende-se de 85 a 90 dias de gestação, ou seja 59%; uma vez que o período de prenhes destes animais é aproximadamente 145 dias (PRINGLE, 1986).

3.5 DISFUNÇÃO PLACENTÁRIA RELACIONADA À PRODUÇÃO DE EMBRIÕES

A placenta é um órgão múltiplo, diretamente responsável pela mediação e modulação do ambiente materno para o desenvolvimento normal do feto. Trata-se de um órgão ativo, com capacidade de sintetizar e secretar uma gama de proteínas e hormônios esteróides, fatores de crescimento, e outras moléculas bioativas (ANTHONY et al., 1995; LUTHER et al., 2007). Exames macroscópicos e histopatológicos da placenta revelam uma redução na vascularização, particularmente até o ápice do processo viloso e perda de diferenciação do epitélio trofoblástico, sugerindo que a mortalidade em cordeiros clonados seja causada principalmente por anormalidades na placenta (LOI et al., 2006; RIBEIRO et al., 2008).

As perdas gestacionais em bovinos clonados ocorrem dentro dos primeiros

seis meses afetando cerca de 30% dos clones que se desenvolvem até o parto, e a baixa viabilidade dos embriões clonados é principalmente expressa pela redução na taxa de implantação, pelo aumento na taxa de mortalidade fetal e perinatal, e pelas diversas anomalias observadas nos animais recém-nascidos (BORDINGNON, 2003). Entre as complicações gestacionais placentárias provenientes de transferência de embriões manipulados (FIV e TN) constatou-se alterações na morfologia do placentônio e no contato materno-fetal, hidroalantóide (aumento do líquido alantóide), hidroâmnio (aumento líquido amniótico), vascularização reduzida, menor número de cotilédones, aumento da área interplacentomal e “Síndrome do Bezerra Macrossômico” (*offspring syndrome*), os quais tratam do fenômeno mais recente associado com embriões produzidos por FIV e transferência nuclear de células somáticas (TNCS).

Embriões, fetos, placenta e bezerra podem diferenciar-se substancialmente em relação à sua morfologia e desenvolvimento quando comparados com embriões *in vivo*, apresentando aumento no tempo gestacional, defeitos gastrointestinais, cardiopulmonares, malformação do esqueleto, mortalidade pré-natal, maior frequência de fetos machos, edema fetal, alteração no crescimento dos órgãos, incluindo coração, encéfalo, medula espinal e músculo esquelético, esteatose do fígado, além dos parâmetros bioquímicos anormais (BEHBOODI et al., 1995; GARY et al., 1996; WELLS; MISICA; TERVIT, 1999; SOUSA et al., 2001; BERTOLINI, ANDERSON, 2002; FARIN; FARIN; PIEDRAHITA, 2004; HOFFERT et al., 2005; CHAVATTE-PALMER et al., 2004; CHAVATTE-PALMER et al., 2006; FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006; DROST, 2007; LONERGAN et al., 2007; MATSUZAKI, SHIGA, 2002; OGURA et al., 2002; SAKAI et al., 2005; WAKAYAMA; YANAGIMACHI, 2002). Disfunções relacionadas a restrições protéicas são descritas por Perry et al. (1999); Murakami et al. (2006) e acreditam não causar alteração de peso no feto a termo, nas membranas e no número de cotilédones.

Hill et al. (2000); Hill et al. (2001); Batchelder et al. (2007) complementam que as placentas dos animais clonados apresentam desenvolvimento rudimentar, contendo epitélio trofoblástico cubóide, reduzida vascularização e pequena área cotiledonária com algumas partes hemorrágicas. Outros resultados demonstram que o terceiro trimestre de gestação de fetos clonados é caracterizado por uma alta incidência de retardo no desenvolvimento e insuficiência placentária, as quais não se associam às alterações cromossômicas (SOUSA et al., 2001).

Hashizume et al. (2002); Numabe et al. (2000); Miglino et al. (2004) e Hoffert-Goeres et al. (2007) afirmam que a alta incidência de edema placentário e hidroalantóide prejudicam o desenvolvimento dos vasos linfáticos, a circulação extra-embriônica, ou ainda que a permeabilidade dos vasos coriolantóides sejam alterados em muitas gestações provenientes do processo de clonagem.

Lanza et al. (2000) e Tveden-Nyborg et al. (2005) caracterizaram a morfologia de embriões ovinos derivados de TNCS, FIV e produção *in vivo*, marcando o 11º dia de gestação como o início da gastrulação para embriões produzidos *in vivo*, apesar de o período de gastrulação ter sido maior em embriões de TN. Embriões FIV e TNCS exibem atraso em relação à formação das membranas extra-embriônicas, principalmente âmnio e alantóide, as quais são cruciais para continuidade do desenvolvimento. Nas espécies domésticas o âmnio se forma a partir de um brotamento do trofoblasto em dobras coriônicas. Tal processo se iniciou nos embriões *in vivo* no 13º dia de gestação, enquanto que embriões FIV e clones não exibiram dobras amnióticas nessa idade, além do broto do alantóide mostrar-se maior em embriões *in vivo*.

Como já foi visto que a formação da placenta é um processo que exige sincronia entre os componentes embrionário (alantóide e vascularização) e materno (endométrio), um prejudicado desenvolvimento do alantóide seria a base das divergências da placenta, como observada em gestações de TNCS por Chavatte-Palmer (2004). Em conclusão, Tveden-Nyborg et al. (2005) dizem que embriões provenientes de FIV e TNCS apresentam desenvolvimento mais lento que embriões *in vivo*, e por isso podem prejudicar o fenômeno placentação e explicar a alta perda gestacional associada às técnicas de produção.

Além disso, a placenta de bovinos clonados não só apresenta poucos vilos coriônicos, mas também pobre desenvolvimento caruncular, além do desenvolvimento atípico do placentônio em forma e tamanho. O atraso no desenvolvimento do trofoblasto durante o estágio inicial da placentação em vacas de TN sugere que proteínas específicas da placenta, incluindo PLs, HPA e PAGs sejam indicadores fundamentais para aberrações da gestação e função placentária (HASHIZUME et al., 2002), uma vez que existem genes específicos que são responsáveis por parte da ativação endócrina através de sua duplicação (GOOTWINE, 2004).

A placentomegalia associada com TN não ocorre em resposta ao aumento

de peso fetal, nem com a finalidade de compensar o número reduzido de placentônios (CONSTANT et al., 2006). No entanto, estudos anteriores sugerem que a presença de placentônios aumentados em TN resulta em um mecanismo compensatório, sendo similar aos descritos em um trabalho sobre remoção cirúrgica de carúnculas em ovelhas (CIBELLE et al., 1998; HILL et al., 2000; BERTOLINI et al., 2004; LONERGAN et al., 2007). Constant et al. (2006) conclui seu trabalho afirmando ainda, que fatores de crescimento placentário e o metabolismo celular e não as estruturas histológicas é que são os responsáveis pelas anomalias placentárias.

Hill et al. (2001) e contradiz Constant et al. (2006) afirmando que ao analisar histologicamente a placenta, observou um epitélio hiperqueratinizado escamoso estratificado, com áreas de necrose sobre o tecido conectivo subepitelial, com vasos mineralizados, sendo que o foco de mineralização foi observado em um epitélio degenerativo.

Quanto aos clones, as taxas de mortalidade pré e pós-natal são significativamente maiores em comparação aos controles independentes das espécies. Wakayama et al. (1998) e Yanagimachi (2002) observaram altas taxas de implantação de embrião (57 – 71%), porém taxas fetais baixas (5 – 16%) e muito baixas no desenvolvimento a termo (2 – 3% ou menos) após a transferência nuclear usando células somáticas adultas. Ao utilizarem células embrionárias a incidência de aborto é alta ao 40º dia de gestação, acompanhado de pobre desenvolvimento dos placentomas (HILL et al., 1999). Edwards et al. (2003) comprova os achados de Hill et al. (1999) relatando que dos 30 aos 60 dias de prenhes a mortalidade pode ocorrer em 50 a 100% das gestações. Wells et al. (2004) complementa que a eficiência global da clonagem nessa espécie está limitada para 5 – 6% no máximo.

Wooding, Morgan e Adam (1997) e Sullivan et al. (2009) afirmam que a taxa de crescimento da placenta é afetado por variações da nutrição materna durante a gestação. A placenta exerce efeitos no crescimento fetal e no desenvolvimento por mecanismos endócrinos e metabólicos incluindo lactogênio placentário (PL), glicoproteínas associadas à gestação (bPAG) e glicoproteínas secretadas entre a circulação materna por células binucleadas da placenta.

Estas proteínas são responsáveis pela modulação do crescimento fetal através de estimulação dos nutrientes maternos para os fetos e suas concentrações na circulação materna são indicadores de desenvolvimento placentário (RAVELICH

et al., 2004; CHAVATTE-PALMER et al., 2006; MURAKAMI et al., 2006; SULIVAN et al., 2009). Já a transcrição de lactogênio placentário apresentou-se alterada na placenta de clone aos 30 dias de gestação, sugerindo uma irregular sinalização materno-fetal, podendo destruir o desenvolvimento continuado do conceito derivado de TN (HOFFERT et al., 2005).

Allen et al. (2002) explicam a existência de uma proteína específica na gestação, proteína 60 (PSP60), como sendo uma glicoproteína associada às células binucleadas trofoblásticas. Ao longo da gestação, as células binucleadas migram e fundem-se com as células uterinas para formar a massa do sincício, onde excretam produtos na circulação materna (ARNOLD et al., 2008). Vacas receptoras de clone com hidroalantóide (CRH) têm aumento significativo de PSP60 em níveis plasmáticos comparado com gestações controle e gestações de clone sem hidroalantóide. Talvez se deva à específica “super” expressão ou atividade sintética aumentada não específica das células, proliferação anormal de células binucleadas em conceitos de clone ou hipertrofia de placentônio associada à técnica de clonagem em bovinos (ALLEN et al., 2002; CONSTANT et al., 2003).

Em gestações provenientes de TNCS, Miglino et al. (2007) descrevem o cordão umbilical e áreas de membrana fetais edematosas, com fusão de placentônio comum, resultando em aumento do tamanho e diminuição em número. Maior número de microcotilédones funcionais ou acessórios (< 1 cm) estavam presentes na superfície materna das membranas fetais, extensas áreas de extravasamento de sangue nos placentônios e regiões interplacentomais. Os clones bovinos apresentavam cordão umbilical aumentado, caracterizado por um aumento no tamanho do ducto alantóide e das paredes dos vasos sanguíneos, em consequência de excessivo crescimento do tecido e edema.

Farin e Farin (1995) e Miles et al. (2004) descrevem que a porcentagem de placentônio na área de superfície é reduzida nos grupos FIV, além dos vilos fetais, densidade e volume de células binucleadas que são reduzidos nestes placentônios. No entanto, o volume dos vasos sanguíneos nas carúnculas maternas aumentaram, acreditando existir um mecanismo compensatório na rede vascular das placentas de embriões bovinos provenientes de FIV.

Arnold et al. (2008) afirmam que a maioria das prenhez por TNCS estabelecidas em bovinos é perdida entre o 30º e 90º dia de gestação, associado ao mal desenvolvimento dos placentônios. No primeiro trimestre, placentônios se

apresentam com formato anormal e em número reduzido. Quando mantidas as gestações, os placentônios freqüentemente se hipertrofiam. Miglino et al. (2003) em seu trabalho sobre arquitetura microvascular e estrutura concluiu que os placentônios de bovinos clonados exibiam alterações tanto no padrão vascular como nos núcleos das células trofoblásticas, alterações nucleares e no arranjo dos vilos maternos e fetais e em suas dimensões.

Durante os primeiros estágios da associação epitélio-corial a interface materno-fetal é caracterizada por progressivas invasões no endométrio por especializadas células gigantes binucleadas trofoblásticas (CGT). Acredita-se que as disfunções na placentação em gestações de TNCS resultem em aberrações nas expressões gênicas devido à necessidade de proliferação, diferenciação e função das células trofoblásticas (ARNOLD et al., 2006). As Células Trofoblásticas Binucleadas (CTB) são consideradas uma peça chave para o desenvolvimento da implantação, placentação e comunicação materno-fetal, e uma alteração na proliferação e diferenciação destas resulta em um defeito na transcrição de um determinado gene relacionado à gestação nos bovinos clonados (PATEL et al., 2004).

Wooding, Morgan e Adam (1996) encontrou células binucleadas nos cotilédones e regiões intercotiledonares. Tal fato indica a presença de regiões funcionalmente especializadas na placenta, enfatizando sua atividade multifuncional celular. Já Rici et al. (2008) ao avaliar o ciclo celular em placentas de bovinos normais e clonados pode observar que a proporção de células binucleadas em condições normais foi cerca de 20% de células tetraplóides na região central do placentônio e microplacentônio. O aumento de células tetraplóides em placentônios ou microplacentônio em gestações de clones talvez sejam mais um reflexo do crescimento compensatório do tecido ou atividade angiogênica para uma menor eficiência da placenta, devido ao aumento das células binucleadas.

Arnold et al. (2006) ao comparar a expressão desses fatores em embriões bovinos derivados de FIV, TNCS e IA pré-implantados, verificou que a proliferação celular foi abundante em embriões TNCS comparados com IA, a diferenciação celular foi maior em IA e FIV e a função não diferiu entre os grupos. Poucas CTG causam redução funcional celular, levando a incapacidade fetal para imunossupressores no ambiente materno, associando a perda gestacional à transferência nuclear.

Já em gestações pós-implantação, os cotilédones fetais de TNCS exibiram alta proliferação e diferenciação de tecidos quando comparados a IA e FIV. No entanto eram menores em número. Acredita-se que a crítica expressão genética para um desenvolvimento normal da placenta é alterada em embriões bovinos de TNCS, causando anormalidade na diferenciação do trofoblasto, contribuindo para as perdas gestacionais (BERTOLINI et al., 2002; ARNOLD et al., 2006).

Durante o desenvolvimento placentário, a proliferação celular e morte celular por apoptose apresentam processos inversamente proporcionais, sendo relevantes para o desenvolvimento normal do concepto (BOSS et al., 2003). Rici et al. (2008) detectou uma maior taxa celular apoptótica em placentônios e regiões interplacentomais. Barreto Filho e Marques Junior (1993) explicam a existência de um processo de eliminação de células desnecessárias, mantendo a homeostase dos tecidos, com papel funcional de maturação e não descolamento de placenta. O aumento no número de células em apoptose em pequeno espaço de tempo contribui para a desconexão materno-fetal da placenta. Placentônios ou microplacentônios contendo maior aumento de células binucleadas indicam um provável reflexo do crescimento compensatório do tecido ou atividade angiogênica para uma menor eficiência da placenta

Lee et al. (2004) acreditam que independente do número de placentônios o aumento de peso da placenta em clones é causado devido ao excessivo crescimento do útero. No entanto, o crescimento excessivo do feto não se trata de uma consequência do cultivo *in vitro*, onde cultivo e reprogramações incompletas do genoma doador são efeitos epigenéticos, capazes de anular certas características genéticas.

De acordo com Davies et al. (2004) e Carzeta et al. (2007) existe uma região específica de interface materno-fetal correspondente à zona arcada do placentônio em ovinos e caprinos. Em pequenos ruminantes esta área é também caracterizada por sangue materno extravasado (áreas hemófagas), o qual possibilita que o ferro seja transferido para o feto por eritrofagocitose trofoblástica nestas áreas.

Miglino et al. (2007) afirma que nas gestações de clones bovinos foram observadas áreas hemorrágicas localizadas sobre a superfície dos placentônios edemaciados. As árvores vilosas fetais apresentaram desorganização estrutural, estando inseridas nas criptas endometriais com menor densidade dos vilos nos chamados megacotilédones, somando-se ainda a estes fatos a deficiência na

ramificação vascular sobre a superfície das chamadas árvores vilosas, bem como as dilatações anormais das criptas endometriais onde esses vilos se inserem.

Nas gestações normais, com a finalidade de garantir o crescimento, o desenvolvimento e a sobrevivência intra-uterina, a placenta induz modificações circulatórias que acabam por direcionar ao útero maior volume de sangue. A boa adaptação materna à gestação compreende as modificações fisiológicas no perfil hemodinâmico do útero, que passa a demonstrar baixa resistência ao fluxo sanguíneo, baixa reatividade vasomotora e alta complacência vascular, favorecendo a oferta de substratos para o conceito. Tais modificações dependem de uma adequada interação entre miométrio e trofoblasto, constituído de células placentárias que apresentam antígenos maternos (LEISER et al., 1997a,b; KINGDOM et al., 2000; VILLAS BÔAS et al., 2008).

A adaptação vascular induzida pela placenta acontece em dois estágios, um no primeiro e outro no segundo trimestre de gestação, configurando a primeira e a segunda onda de invasão do trofoblasto. Na primeira, as arteríolas espiradas sofrem infiltração intersticial e endovascular das células trofoblásticas, com vasodilatação e progressiva substituição da camada íntima por material fibrinóide. Nesta etapa as alterações estão limitadas ao endotélio do segmento intradecidual. Na segunda onda, a invasão progride para segmentos mais profundos, na intimidade do miométrio. A camada músculo-elástica das arteríolas espiraladas é substituída por tecidos fibrinóide e fibroso, transformando-se nas artérias útero-placentárias (REYNOLDS; MILLAWAY; KIRSCH, 1990; VILLAS BOAS; MAESTÁ; CONSONNI; 2008).

A migração incompleta do trofoblasto explica a insuficiência placentária e a seqüência de eventos relacionados à má adaptação circulatória na gestação (ROBERTSON; BROSENS; DIXON, 1967). A insuficiência vascular placentária parece decorrer de inadequada interação entre trofoblasto e tecidos uterinos, provocando alterações qualitativas e quantitativas nas arteríolas espiraladas do leito placentário, não ocorrendo a segunda onda de invasão trofoblástica. Com isso, ocorre redução no total de vasos que irrigam o espaço interviloso, isquemia, liberação de citotoxinas, consolidando a agregação vasculare reduzindo o fluxo de troca materno-fetal no espaço interviloso e manutenção do perfil hemodinâmico presente antes da gestação (VILLAS BOAS; MAESTÁ; CONSONNI, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODO

O material refere-se à coleta de embriões provenientes de Inseminação Artificial em Tempo Fixo, Fertilização *in vitro* e Transferência Nuclear e metodologia aplicada aos estudos macroscópicos, morfométricos e procedimentos de microscopia de luz e microscopia eletrônica.

4.1 EMBRIÕES FECUNDADOS *IN VITRO*

Seguem as descrições dos procedimentos de obtenção e produção *in vitro* dos embriões bovinos

4.1.1 Obtenção de amostras

Foram utilizados 11 embriões oriundos da técnica de fecundação *in vitro*. Os blastocistos foram transferidos para as receptoras logo após o protocolo de sincronização do estro (BARUSELLI et al., 2003). As gestações foram interrompidas quando os embriões atingiram 24, 28, 32, 36, 40 e 44 dias de idade gestacional.

4.1.2 Produção *in vitro* de embriões bovinos

Os oócitos foram aspirados de ovários de vacas zebus ou mestiças, oriundas de abatedouro. Somente os oócitos de qualidade I, com *cumulus* compacto completo e citoplasma límpido e de aspecto homogêneo (finas granulações), foram selecionados para os experimentos. Os oócitos foram em seguida maturados em TCM199 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), piruvato (22 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml), 0,5 µg de FSH/ml,

50 µg de LH/ml e 1µg de estradiol/ml em microgotas de 100 µl de meio de maturação, cobertas com óleo mineral (30 oócitos/gota). A incubação foi a uma temperatura de 38,5°C e atmosfera gasosa de 5% CO₂ em ar, por 22 – 24 horas.

Após o período de maturação, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro*, em microgotas de 100 µl de meio TALP (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com heparina (10 µg/ml), piruvato (22 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml), BSA (Albumina Sérica Bovina) sem ácidos graxos (6 mg/ml) e solução de PHE (2 µM de penicilamina, 1 µM de hipotaurina e 0,25 µM de epinefrina). As palhetas de sêmen congelado de touro da Raça Nelore foram descongeladas em banho-maria a 34°C, durante 30 segundos, e seu conteúdo centrifugado em gradiente de Percoll (45 e 90) para obtenção dos espermatozóides móveis, além da remoção do diluído e do plasma seminal. A concentração espermática foi de 2×10^6 células/ml e, após 30 minutos de incubação dos espermatozóides, os oócitos foram transferidos para as micro gotas (30 oócitos/gota) onde permaneceram sob incubação em atmosfera com 5% de CO₂ em ar a 38,5°C durante 18 – 22 horas.

Após o processo de MIV e FIV, os zigotos tiveram as células do *cumulus* removidas e foram co-cultivadas *in vitro* em meio CR2 modificado, suplementado com 10% de SFB, em monocamada de células da granulosa (WATANABE, 1998). Decorridas 55 horas pós inseminação (hpi) foram avaliadas a taxa de clivagem e a renovação do meio de cultivo (*feeding*).

4.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES: TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO

Abaixo segue a descrição dos materiais e métodos para a produção de embriões pela técnica de transferência de núcleo.

4.2.1 Maturação *in vitro*

Os oócitos foram coletados mediante a aspiração de ovários, de vacas zebus ou azebuadas, oriundos de abatedouros localizados em Poços de Caldas - MG.

Após a aspiração dos ovários, somente os oócitos cuja camada de células do *cumulus oophorus* que estavam compactas, contendo citoplasma límpido e de aspecto homogêneo (finas granulações) foram utilizados no experimento. Os oócitos selecionados foram maturados em TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃ suplementado com 10% de SFB, piruvato (22 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) e 0,5 µg de FSH/ml, 50 µg de LH/ml e 1 µg de estradiol/ml em microgotas de 100 µl, cobertas com óleo mineral em incubadora a 38,5°C e 5% CO₂ em ar com máxima umidade, durante 22 - 24 horas.

4.2.1.1 Fibroblastos

As amostras dos fibroblastos foram lavadas 3 vezes em PBS e manipuladas, sob estereomicroscópio e fluxo laminar, para remoção da cartilagem e dos pêlos. Após este procedimento, a biópsia foi cortada em pequenos fragmentos de 2 a 3 mm, sendo cada fragmento colocado sob pressão no fundo de uma placa de Petri (35 mm) e coberto com 2 ml do meio de cultura (DMEM + 10% de SFB + piruvato + gentamicina). As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ e alta umidade por 4 dias, tomando-se o cuidado para não movimentá-las durante este período. No quarto dia de cultivo foi adicionado 1 ml do meio de cultura fresco em cada placa. As placas permaneceram em cultura até atingirem o estado próximo da confluência (8 a 15 dias), quando as células foram então repicadas e/ou congeladas.

4.2.1.2 Seleção do 1o Corpúsculo Polar e Enucleação de oócitos em metáfase II

Após 18h do início da maturação, os oócitos foram retirados das gotas de maturação e então as células do *cumulus oophorus* foram removidas mediante sucessivas pipetagens em solução de hialuronidase (0,1%) diluída em PBS. Em seguida os oócitos foram selecionados sob lupa estereomicroscópica em meio TCM199 com sais de Earle, glutamina, NaHCO₃ e tampão HEPES, suplementado com 10% de SFB, piruvato (22µg/ml), gentamicina (50µg/ml), quanto à presença do

1o corpúsculo Polar (1oCP). Somente os oócitos que apresentaram a extrusão do 1oCP e o citoplasma homogêneo foram utilizados. Após a seleção, os oócitos foram mantidos em grupos de quarenta em microgotas de meio CR2 suplementado com albumina sérica bovina (0,5 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL) até o momento da micromanipulação.

Com o auxílio de micropipetas montadas em um micromanipulador, às 21h do início da maturação *in vitro* os oócitos foram enucleados mediante a aspiração do 1oCP junto com cerca de 20% do citoplasma adjacente. Em seguida, um fibroblasto foi aspirado para o interior da micropipeta de injeção e inserido no espaço perivitelíneo do oócito. O procedimento foi realizado em todos os oócitos.

4.2.1.3 Reconstrução, Ativação e Cultivo *in vitro*

Para reconstrução embrionária, os oócitos com a célula somática foram previamente equilibrados durante 3 minutos em solução de Manitol (0,3M). Em seguida foram transferidos para a câmara de fusão com Manitol, posicionados entre dois eletrodos paralelos de platina (200 µm de espaço) e submetidos a uma descarga elétrica de 1V de corrente contínua durante 5s seguida de duas descargas elétricas de 1,75KV/cm por 45µs para promover a fusão das membranas do oócito e da célula somática.

Os oócitos foram então incubados novamente em meio CR2 e avaliados quanto a fusão uma hora depois. Os oócitos fundidos foram mantidos em meio CR2 e 26h após o início da maturação foram ativados pela exposição por 5 minutos a Ionomicina (5µM), seguida da incubação por 3h em 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) diluída em meio CR2. Após a ativação, os embriões foram cultivados *in vitro* por 7 dias em meio CR2 suplementado com albumina sérica bovina (0,5 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL) sob atmosfera com 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂.

4.2.1.4 Transferência dos embriões

De acordo com a classificação da Sociedade Internacional de Transferência de embriões (IETS), os embriões grau I foram transferidos em fêmeas nulíparas sincronizadas previamente. Para proporcionar uma divisão equitativa entre os grupos, as receptoras foram divididas em função do escore de condição corporal, classificadas de 1 a 9 segundos (RICHARDS et al., 1986) e em função da atividade ovariana, como fêmeas ciclando, com ovários com comprimento acima de 30 mm, macia com presença de CL ou útero com turgidez acentuada.

4.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

No dia dia 0 as fêmeas receberam o implante P4 auricular (Crestar ®, Intervet, Brasil) mais 2 ml, IM, de Benzoato de Estradiol (Ric Be ®, Sintex, Brasil). No dia 8 foram retirados os implantes e as fêmeas receberam 1, 5 ml, IM, de Ecg (Folligon ®, Intervet, Brasil) e 2,0 ml, IM, de D-Clorfostenol (Preloban®, Intervet, Brasil), no dia 9, 24 horas após a retirada do implante, mais 1 ml, IM, de Benzoato de Estradiol (Ric Be ®, Syntex, Brasil). A inseminação artificial foi realizada no dia 10, 56 horas após a retirada do implante auricular. O diagnóstico de gestação foi realizado 25 dias após a IA.

4.4 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E MONITORAMENTO DA SOBREVIVÊNCIA EMBRIONÁRIA

Após 24 dias da realização da transferência dos embriões para as receptoras foi realizado o diagnóstico de gestação mediante exame ultra-sonográfico transretal com utilização do aparelho ALOKA SSD 500 e um transdutor linear (7 MHz) para verificação da presença do conceito e batimento cardíaco. As receptoras foram abatidas no momento da retirada do embrião e a sua carcaça incinerada.

Foi utilizado um total de 42 receptoras para transferência dos embriões provenientes de fertilização *in vitro*. Após diagnóstico gestacional verificamos que 13 receptoras estavam prenhas (30,952%). (ANEXO A).

Para Inseminação artificial foram utilizadas até o presente momento 25 receptoras. Após diagnóstico gestacional verificamos que 11 estavam prenhas (44%).

Tabela 1- Idade gestacional e Crown-rump de embriões bovinos coletados, provenientes de Inseminação Artificial em Tempo Fixo - São Paulo – 2010

IDADE GESTACIONAL	Receptora	Crown-rump
25 dias	16	7,2 mm
25 dias	22	6,1 mm
25 dias	24	6,1mm
25 dias	25	7,0 mm
25 dias	27	7,2mm
27 dias	3307	9,1 mm
29 dias	2165	10,0 mm
30 dias	4325	10,0 mm
30 dias	11571	11,0 mm
30 dias	9773	11,0 mm
30 dias	4965	11,0 mm
35 dias	1783	15,6 mm
35 dias	4970	18,5 mm
40 dias	6424	25,0 mm
40 dias	6425	24,0 mm
40 dias	6418	25,3 mm
40 dias	6419	22,5 mm
45 dias (gemelar)	6413	29,0 mm
45 dias	6414	26,0 mm

Tabela 2 - Idade gestacional, receptoras prenhas, Crown-rump e peso dos embriões bovinos coletados, provenientes de fertilização *in vitro* - São Paulo – 2008

IDADE GESTACIONAL	Receptora A	Crown-rump / Peso	Receptora B	Crown-rump / Peso
24 dias	110	7,6 mm	158	8,0 mm
28 dias	53	10,0 mm / 0,0930 g	140	8,5 mm / 0,0912 g
32 dias	100	12,5 mm / 0,1672 g	-	-
36 dias	134	18,3 mm / 0,6663 g	148	18,3 mm / 0,7834 g
40 dias	153	21,4 mm / 1,5205 g	55	23,3 mm / 1,626 g
44 dias	154	30,3 mm / 2,283 g	149	30,5 mm / 2,556 g

Tabela 3- Idade gestacional e Crown-rump dos embriões bovinos coletados, provenientes de transferência de núcleo - São Paulo – 2010

IDADE GESTACIONAL	Receptora	Crown-rump
28 dias	MT1126	8,2 mm
28 dias	MT237	6,8 mm
32 dias	MT2604	13,0 mm
32 dias	MT9213	13,0 mm
36 dias	ML9665	14,0 mm
36 dias	ML2424	17,3 mm
40 dias	ML9994	23,5 mm
40 dias	-	7,5 mm
42 dias	-	20,0 mm
43dias	LO835	27,5 mm
50 dias	MT262	35,4 mm
68 dias	-	53,3 mm
70 dias	-	13,0 mm

4.5 ESTUDO MACROSCÓPICO: PARÂMETROS ANALISADOS

Foram avaliados os parâmetros relativos ao desenvolvimento externo e proporções de tamanho dos embriões. Com auxílio de um paquímetro inoxidável com divisões em milímetros (150 mm x 0.02 mm) realizamos as medidas de comprimento (crânio-caudal) e através de balança analítica obtivemos o peso (g) dos embriões.

Os embriões foram fotografados com câmera digital SONY - Cyber-Shot DSC H9 para posterior documentação e descrição.

4.6 ESTUDO MICROSCÓPICO

O estudo microscópico foi realizado através de técnicas de inclusão e cortes seriados.

4.6.1 Processamento Microscopia de Luz

Os embriões foram colocados em solução fixadora de Bouin e/ou Formol 10%, onde permaneceram embebidos por 24 horas, até sua completa fixação. Após este processo, o material foi desidratado em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 50 a 100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em paraplast®.

Foram realizados cortes consecutivos de 5µm de espessura, corados por métodos de rotina (Hematoxilina e Eosina) para posterior descrição e documentação.

4.6.2 Processamento Microscopia Eletrônica de Transmissão

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

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

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

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

4.6.3 Processamento Microscopia Eletrônica de Varredura

Os embriões foram previamente fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, PH 7,2. Após 48 horas de fixação, o material foi lavado 3 vezes em tampão fosfato 0,1 molar (pH 7,4) por 10 minutos, totalizando 30 minutos de imersão. Posteriormente o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio por 2 horas e novamente lavado 3 vezes em tampão fosfato a 0,1 molar (pH de 7,4) por 10 minutos.

Na desidratação foi imposta em baterias de 15 minutos de concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 80%, 90% e 95%) passando em seguida em álcool absoluto por 4 vezes de 15 minutos. O ponto crítico foi obtido através do aparelho (CPD 020 – BALZERS) UNION, onde todo o álcool foi retirado do material deixando-o totalmente seco para a metalização com ouro.

Como última etapa de processamento, as peças foram fixadas em “stubs” de alumínio com cola de carbono, deixadas em estufa por 12 horas para secagem e submetidas ao banho de ouro no metalizador (EMITECH – K 550). A análise e eletromicrografias foram realizadas ao microscópio eletrônico de varredura (LEO – 435 VP).

5 RESULTADOS

5.1 MACROSCÓPICO: EMBRIÕES PROVENIENTES DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)

Embriões com idade gestacional de 25 dias (CR de 6,1 mm, CR de 7,0 mm e CR de 7,2 mm) apresentaram pedículo embrionário, saco vitelino partindo da porção ventral, em forma de T, alongado e translúcido, com presença de vasos sanguíneos, além das estruturas externas notáveis macroscopicamente como saliência cardíaca, estomodeu, encéfalo anterior, somitos, membrana amniótica, neuróporo caudal e cauda (Figuras 1, 2, 3 e 4).

Legenda: A, observar embrião bovino (e) em vista lateral direita. Notamos a presença do pedículo (p) de onde partem os vasos e ventralmente o saco vitelino, em forma de T (setas), alongado e translúcido, e presença de vaso sanguíneo localizado no centro (vs) com pequenas ramificações. B, observar: saliência cardíaca (sc), estomodeu (es), encéfalo anterior (ea), somitos (so), membrana amniótica (a), neuróporo caudal fechando-se (nc), cauda (ca) e pedículo do embrião (pe).

Figura 1 - Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 25 dias (CR de 6,1 mm)

Legenda: A, observar embrião bovino (e) em vista dorsal. Do pedículo embrionário (p) partem os vasos. Ventralmente o saco vitelino, em forma de T (setas tracejadas), alongado e translúcido, e presença de pequenos vasos.
B, observar neuróporo cranial fechando-se (ncr), saliência cardíaca (sc), estomodeu (es) e saco vitelino (sv).

Figura 2 - Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 25 dias (CR de 6,1 mm)

Legenda: A, observar embrião bovino (e) juntamente de sua membrana embrionária (m) vascularizada por vasos que partem do pedículo do embrião (pe). O saco vitelino (sv) localiza-se na porção ventral do embrião. Notar seu aspecto translúcido e vascularização.

Figura 3 - Fotografia de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 25 dias (CR de 7,0 mm)

Legenda: A, observar embrião bovino apresentando as seguintes estruturas: neuróporo cranial fechando-se (ncr), saliência cardíaca (sc), tubo neural (tn), pedículo do embrião (pe), saco vitelino (sv) partindo da porção ventral do embrião apresentando-se em forma de T, uma das extremidades menor que a outra (setas tracejadas). Notar o saco vitelino apresenta-se bem alongado e translúcido.

Figura 4 - Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 25 dias (CR de 7,2 mm)

Aos 27 dias de gestação (CR de 9,1 mm) e 29 dias de gestação (CR de 10 mm) foram observadas camada de endométrio e carúncula no útero aberto, não havendo formações cotiledonárias. A membrana corioalantóide apresenta vasos sanguíneos partindo do cordão umbilical. O âmnio e saco vitelino estão presentes. Observamos ainda região de encéfalo anterior, 1º, 2º, 3º arcos faríngeos, curvatura cervical acentuada, saliência cardíaca, estomodeu, fígado, início da formação do broto do membro torácico, somitos, cauda e local da crista mesonéfrica (Figuras 5 e 6).

Legenda: Em A, fotografia de útero aberto evidenciando a camada de endométrio (ed) e carúncula (c). A e B; observe que o embrião (e) encontra-se dentro da membrana córioalantóide (cal), com presença de vasos (seta) que partem do cordão umbilical (co) e ausência de formações cotiledonárias. C, retirada a membrana (cal) podemos observar embrião (e) em vista lateral esquerda, envolto pelo âmnio. Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co) próximo ao saco vitelino (sv) conectado a porção ventral do embrião (seta). D, embrião em vista lateral esquerda com as seguintes estruturas: âmnio (a), encéfalo anterior (ea), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (af), curvatura cervical (cc), saliência cardíaca (sc), estomodeu (*), fígado (f), início da formação do broto membro torácico (t), somitos (s), cauda (ca), local da crista mesonéfrica (cm), cordão umbilical (co).

Figura 5 - Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 27 dias (CR de 9,1 mm)

Legenda: Em A, fotografia de útero aberto evidenciando a camada de endométrio (ed) e carúncula (c). A e B; observe que o embrião (e) encontra-se dentro da membrana córioalantóide (cal) com presença de vasos (seta) que partem do cordão umbilical (co), ausência de formações cotiledonárias.

C e D, retirada a membrana (cal) podemos observar embrião (e) em vista lateral direita, envolto pelo âmnio (a). Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co) e presença de saco vitelino (sv).

E, retirada a membrana amniótica podemos observar o embrião em vista lateral esquerda e suas estruturas: encéfalo anterior (ea), local do placódio do cristalino (*), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (af), curvatura cervical (cc), saliência cardíaca (sc), estomodeu (st), fígado (f), início da formação do broto membro torácico (t), somitos (s), cauda (ca), cordão umbilical (co).

Figura 6 - Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 29 dias (CR de 10,0 mm)

Aos 30 dias de gestação (CR de 10,0 mm e CR de 11,0 mm) a membrana corioalantóide apresentou áreas de necrose e ausência de formações cotiledonárias. Vascularização da membrana corioalantóide parte dos vasos do cordão umbilical. O saco vitelino passa a ter uma coloração amarela escura, justaposto à membrana amniótica. Visualizamos região de encéfalo anterior, fosseta do cristalino, 1º, 2º, 3º arcos faríngeos, placódio nasal, curvatura cervical, saliência cardíaca, fígado, broto do membro torácico, cauda e local da crista mesonéfrica (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Legenda: Em A, fotografia de embrião (e) presente dentro da membrana córioalantóide (cal), a qual apresenta extremidades com áreas de necrose (ne). O embrião juntamente de suas membranas não apresentam formações cotiledonárias.

B e C, embrião (e) em vista lateral direita, envolto pelo âmnio (a). Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co), juntamente de seus vasos (v) que se estendem por toda membrana corioalantóide (cal) e presença de saco vitelino (sv) de coloração amarela escura.

D, retirada a membrana amniótica podemos observar o embrião em vista lateral esquerda com as seguintes estruturas: encéfalo anterior (ea), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (af), curvatura cervical (cc), saliência cardíaca (sc), fígado (f), início da formação do broto membro torácico (mt), somitos (s), cauda (ca), cordão umbilical (co).

Figura 7 - Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 30 dias (CR de 10,0 mm)

Legenda: Em A, fotografia de útero aberto evidenciando a camada de endométrio (ed). A e B, Observe que o embrião (e) encontra-se dentro da membrana córioalantóide (cal) e presença de vasos (v). O embrião juntamente de suas membranas não apresentam formações cotiledonárias e saco vitelino encontra-se entre membrana amniótica e membrana corioalantóide.

C, retirada a membrana podemos observar embrião (e) em vista lateral esquerda, envolto pelo âmnio (a). Ventralmente ocorre a formação do cordão umbilical (co) e presença de saco vitelino (sv), de coloração amarela escura, justaposto ao âmnio (a).

D, embrião (e) em vista lateral esquerda: formação do cordão umbilical (co), encéfalo anterior (ea), fosseta do cristalino (c), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (af), placódio nasal (n), curvatura cervical (cc), saliência cardíaca (sc), fígado (f), broto membro torácico (mt), cauda (ca), cordão umbilical (co), local da crista mesonéfrica (cm) e conexão (cx) do saco vitelino (sv) na porção ventral do embrião.

Figura 8 - Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)

Legenda: Em A, fotografia de útero aberto evidenciando a camada de endométrio (ed) e carúncula (c). Observe que o embrião (e) encontra-se dentro da membrana córioalantóide (cal) e presença de vasos (v) partindo do cordão umbilical. O embrião juntamente de suas membranas não apresentam formações cotiledonárias e saco vitelino encontra-se entre membrana amniótica e membrana corioalantóide.

B, retirada a membrana podemos observar embrião (e) em vista lateral direita, envolto pelo âmnio (a). Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co) de onde partem vasos (v) e presença de saco vitelino (sv), de coloração amarela escura, justaposto ao âmnio (a).

C e D, embrião (e) em vista lateral direita: formação do cordão umbilical (co), encéfalo anterior (ea), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (af), placódio nasal (n), região do IV ventrículo encefálico (ve), curvatura cervical (cc), saliência cardíaca (sc), fígado (f), broto membro torácico (mt), cauda (ca), cordão umbilical (co), local da crista mesonéfrica (cm) e conexão (*) do saco vitelino (sv) na porção ventral do embrião.

Figura 9 - Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)

Legenda: Em A, embrião (e) encontra-se dentro da membrana córioalantóide (cal), contendo pequenos vilos (seta vermelha) e presença de vasos (v) que partem do cordão umbilical.

B, retirada a membrana podemos observar embrião (e) em vista lateral esquerda, envolto pelo âmnio (a). Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co) de onde partem vasos (v) e presença de saco vitelino (sv).

B e C, observar a formação do cordão umbilical (co) e sua ramificação (v), saco vitelino (sv) vascularizado (*) e sua divisão (seta tracejada), encéfalo anterior (ea), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (af), placódio nasal (n), região do IV ventrículo encefálico (ve), curvatura cervical (cc), saliência cardíaca (sc), fígado (f), broto membro torácico (mt), broto do membro pélvico (mp), cauda (ca), cordão umbilical (co), local da crista mesonéfrica (cm), região de intestino (in) .

Figura 10 - Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)

Aos 40 dias de gestação (CR de 25,0 mm e CR de 26,0 mm) o embrião bovino apresenta-se envolto pela membrana amniótica vascularizada, com formação do cordão umbilical por onde partem vasos que se ramificam por toda membrana corioalantóide e presença de saco vitelino vascularizado, região de encéfalo, região do IV ventrículo encefálico, curvatura cervical, saliência cardíaca, fígado, membro torácico e membro pélvico com extremidades bipartindo, cauda, local de formação dos rins (Figura 11).

Legenda: Em A, embrião (e) em vista lateral direita, envolto pelo âmnio (a) vascularizado (vA) e ao redor membrana coriolantóide (cal) removida. Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co) de onde partem vasos (v) e presença de saco vitelino (sv).

B, observar a formação do cordão umbilical (co) e sua ramificação (v), saco vitelino (sv) vascularizado, região de encéfalo (e), região do IV ventrículo encefálico (qe), curvatura cervical (cc), saliência cardíaca (sc), fígado (f), membro torácico (mt) e membro pélvico (mp) com extremidades bipartindo, cauda (ca), local de formação dos rins (r).

Figura 11 - Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 40 dias (CR de 25,0 mm)

Em embriões aos 45 dias de gestação (CR de 260 mm) inicia-se formações cotilédonárias na membrana corioalantóide, que se unem as carúnculas uterinas presentes no endométrio. No embrião ainda envolto pela membrana amniótica é possível visualizar região de encéfalo, delimitação de região frontal, olhos com pigmentação da retina, curvatura cervical, região de pescoço, focinho, membros torácicos e membros pélvicos bipartidos, medula nervosa, vascularização da derme, local de formação dos rins, cauda, saliência cardíaca, fígado, cordão umbilical e vasos partindo do mesmo, saco vitelino justaposto ao âmnio, com coloração amarelada e poucos vasos sanguíneos (Figura12).

Legenda: A, fotografia mostra incisão em útero (U) bovino evidenciando membrana corioalantóide (cal) e início de formações cotilédonárias (fco) que se unem às carúnculas (CA) uterinas presentes no endométrio (en).

B, exposição de membrana corioalantóide (cal) vascularizada (setas) e início das formações cotilédonárias (fco). Internamente evidenciamos embrião (e) envolto pela membrana amniótica (a) e membrana corioalantóide (cal) vascularizada (setas).

C, Embrião envolto por membrana amniótica (a), com remoção de membrana corioalantóide (cal) para melhor visualização das seguintes estruturas: região de encéfalo (e), delimitação de região frontal (rf), olhos com pigmentação da retina (o), curvatura cervical (cc), região de pescoço (p), focinho (fo), membros torácicos (mt) e membros pélvicos (mp) bipartidos, medula nervosa (mn), vascularização da derme (setas), local de formação dos rins (r), cauda (ca), saliência cardíaca (sc), fígado (f), cordão umbilical (co) e vasos (v) partindo do mesmo, saco vitelino (sv) justaposto ao âmnio (a), com coloração amarelada e poucos vasos sanguíneos.

Figura 12 - Fotografias de embrião bovino (IATF). Idade gestacional de 45 dias (CR de 26,0 mm)

5.2 MACROSCÓPICO: EMBRIÕES PROVENIENTES DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

Embriões com idade gestacional de 24 dias (CR de 8,0 mm e CR de 7,6 mm) apresentaram neuróporo cranial fechado, estomodeu, saliência cardíaca evidente e saco vitelino partindo da porção ventral, em forma de T, alongado e extremidades com mensurações diferentes, sendo uma menor que a outra e aspecto translúcido (Figura 13).

Legenda: Em A e B observar embriões bovinos apresentando as seguintes estruturas: neuróporo cranial fechando-se (ncr), arco mandibular (am), estomodeu (e), saliência cardíaca (sc), tubo neural (tn), somitos (so), artérias dorsais (ad), neuróporo caudal (nc), pedículo do embrião (pe), saco vitelino (sv) partindo da região ventral do embrião apresentando-se em forma de T, uma das extremidades menor que a outra (setas), membranas embrionárias (me). Notar o saco vitelino apresenta-se bem alongado e translúcido

Figura 13 - Fotografia de embrião bovino (fiv) em vista lateral esquerda. Idade gestacional de 24 dias (A, CR de 8,0 mm e B, CR de 7,6 mm)

A partir do 28º dia de gestação (CR de 10,0 mm e CR de 8,5 mm) os embriões apresentaram-se envoltos pela membrana corioalantóide, a qual se estendeu por ambos os cornos uterinos, com vasos sanguíneos ramificando-se e área de necrose nas extremidades. Não apresentaram formações cotiledonárias. Inicia-se a formação do cordão umbilical à partir do aparecimento de dois vasos partindo de uma mesma região da porção ventral do embrião, muito próximo ao saco vitelino, que nesta fase possuía coloração amarelada e forma enovelada, justaposto ao âmnio. Notamos ausência de vasos sangüíneos na membrana amniótica e pouco líquido na cavidade (Figuras 14 e 15).

Observamos local de placódio do cristalino, 1º, 2º, 3º arcos faríngeos (branquiais), curvatura cervical acentuada permitindo ao embrião posição em forma de C, início do surgimento da cauda, saliência cardíaca e início da formação do membro torácico (Figuras 14 e 15).

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino (e) envolto pela membrana amniótica (a). A membrana córioalantóide (cal) recobre o embrião e se alonga por todo corno uterino, ausência de formações cotiledonárias e presença de vasos sanguíneos ramificando-se (setas).

B, ao retirarmos a membrana corioalantóide (cal) podemos observar dois vasos principais que iniciam a formação do cordão umbilical (co) e ramificações a partir destes (setas). Notar ainda que o âmnio apresenta-se como uma delgada película, próximo ao embrião (e), desprovido de vasos.

C, embrião (e) em vista lateral esquerda podemos observar o saco vitelino (sv) de forma enovelada, e coloração amarelada, partindo da região ventral do embrião, cranial a formação do cordão umbilical (co), próximo a membrana amniótica (a).

D, Observar as seguintes estruturas no embrião bovino: encéfalo anterior (ea), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (af), curvatura cervical (cc), saliência cardíaca (sc), estomodeu (*), fígado (f), início da formação do broto membro torácico (t), cauda (ca), cordão umbilical (co) e saco vitelino (sv)

Figura 14 - Fotografias de embrião bovino (fiv) em vista lateral. Idade gestacional de 28 dias (A, B, C, D: CR de 8,5 mm e P = 0,0912 g)

Legenda: Em A, fotografia de útero aberto evidenciando a camada de endométrio (ed). Observe que o embrião (e) encontra-se dentro da membrana córioalantóide (cal), a qual apresenta extremidades com áreas de necrose (ne). O embrião juntamente de suas membranas não apresentam formações cotiledonárias (*).

B, retirada a membrana podemos observar embrião (e) em vista lateral esquerda, envolto pelo âmnio (a). Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co) e presença de saco vitelino (sv), de coloração amarela escura, justaposto ao âmnio, com aspecto enovelado.

C, retirada a membrana amniótica podemos observar o embrião em vista lateral esquerda com as seguintes estruturas: encéfalo anterior (ea), local do placódio do cristalino (*), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (af), curvatura cervical (cc), saliência cardíaca (sc), estomodeu (seta), fígado (f), início da formação do broto membro torácico (t), somitos (s), cauda (ca), cordão umbilical (co) e saco vitelino (sv), com a retirada do âmnio foi possível esticá-lo

Figura 15 - Fotografias de embrião bovino (fiv) em vista lateral. Idade gestacional de 28 dias (A, B, C: CR de 10,0 mm e P = 0,0930 g)

Embriões com 32 dias de gestação (CR de 12, 5 mm) apresentaram fosseta do cristalino, placódio nasal, região do quarto ventrículo encefálico e local da crista mesonéfrica (Figura 16).

No 36º dia de gestação (CR de 18,3 mm) podemos visualizar o embrião imerso em uma pequena quantidade de líquido amniótico, e membrana corioalantóide aumenta sua vascularização. O saco vitelino apresentou-se justaposto ao âmnio, com coloração amarela escura e aspecto enovelado. No embrião observamos divisão de encéfalo em anterior e médio, os olhos apresentam pigmentação na retina, presença de fosseta nasal, surge o brotamento do membro pélvico e formação da medula nervosa (Figuras 17 e 18).

Legenda: Em A, fotografia de útero aberto evidenciando a camada de endométrio (ed). Observe que o embrião (e) encontra-se dentro da membrana córioalantóide (cal). O embrião juntamente de suas membranas não apresentam formações cotiledonárias (*).

B, retirada a membrana podemos observar embrião (e) em vista lateral direita, envolto pelo âmnio (a). Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co) e presença de saco vitelino (sv), de coloração amarela escura, justaposto ao âmnio, com aspecto enovelado.

C, embrião (e) em vista lateral esquerda. Note que o âmnio foi removido, estando mais evidente o saco vitelino (sv) que pode ser esticado para melhor visualização. Observar ainda a formação do cordão umbilical (co).

D, embrião em vista lateral esquerda podemos observar: encéfalo anterior (ea), fosseta do cristalino (c), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (af), placódio nasal (n), região do IV ventrículo encefálico (v), curvatura cervical (cc), saliência cardíaca (sc), fígado (f), broto membro torácico (t), somitos (s), cauda (ca), cordão umbilical (co), local da crista mesonéfrica (cm)

Figura 16 - Fotografias de embrião bovino (fiv) em vista lateral. Idade gestacional de 32 dias (A, B, C, D: CR de 12,5 mm e P = 0,1672 g)

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino (e) envolto pelo âmnio (a). Já se torna possível visualizar líquido amniótico em sua cavidade. Membrana córioalantóide (cal) apresenta-se com maior quantidade de vasos sanguíneos (v).

B, retirada a membrana podemos observar embrião (e) em vista lateral direita, Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co) e presença de saco vitelino (sv), de coloração amarela escura, justaposto ao âmnio, com aspecto enovelado. Observar ainda a intensa vascularização da membrana (v). Vasos principais do cordão umbilical (co) se ramificam em vasos menores ao longo de toda membrana.

C, embrião em vista lateral esquerda. O âmnio foi removido, podemos observar: encéfalo médio (em), olho com pigmentação da retina (o), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (af), fosseta nasal (n), região do IV ventrículo encefálico (v), curvatura cervical (cc), coração (c), fígado (f), broto membro torácico (t) em forma de “pá”, broto do membro pélvico (p), medula nervosa (mn), cauda (ca), cordão umbilical (co), local da crista mesonéfrica (cm)

Figura 17 - Fotografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 36 dias (A, B, C: CR de 18,3 mm e P = 0,6663 g)

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino (e) envolto pelo âmnio (a). Presença de líquido amniótico na cavidade amniótica. Membrana córioalantóide (cal) com maior quantidade de vasos sanguíneos (v), saco vitelino (sv) justaposto ao âmnio.

B, retirada a membrana (cal) podemos observar embrião (e) em vista lateral direita envolto pela membrana amniótica. Ventralmente encontra-se o cordão umbilical (co) e presença de saco vitelino (sv), de coloração amarela escura, justaposto ao âmnio, com aspecto enovelado. Notar que com o aumento da idade gestacional o saco apresenta-se cada vez menor, com coloração mais intensa.

C, embrião em vista lateral esquerda envolto pela membrana amniótica, podemos observar: encéfalo (e), olho com pigmentação da retina (o), fosseta nasal (n), região do IV ventrículo encefálico (v), curvatura cervical (cc), coração (c), fígado (f), broto do membro torácico (t), broto do membro pélvico (p), medula nervosa (mn), cordão umbilical (co), local da crista mesonéfrica (cm)

Figura 18 - Fotografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 36 dias (A, B, C: CR de 18,3 mm e P = 0,7834 g)

Aumenta a quantidade de líquido amniótico nos embriões com idade gestacional de 40 dias (CR de 23,3 mm e CR de 21,4 mm) e cordão umbilical apresenta vasos mais espessos, envoltos por uma membrana transparente. O embrião passa a apresentar focinho (típico da espécie), os brotos dos membros torácicos e pélvicos em forma de pá, com extremidades bipartidas (Figuras 19 e 20).

Legenda: A, fotografia de embrião bovino (e) envolto pelo âmnio (a) e membrana corioalantóide (cal). Aumenta quantidade de líquido amniótico na cavidade e o cordão umbilical (co) apresenta vasos (v) mais espessos. B, retirada a membrana podemos observar embrião em vista lateral direita e suas estruturas morfológicas externas: encéfalo (e), olho com pigmentação da retina (o), focinho (fc), região do IV ventrículo encefálico (v), curvatura cervical (cc), coração (c), fígado (f), broto do membro torácico (t) e broto do membro pélvico (p) com extremidades bipartidas, medula nervosa (mn), cauda (ca), cordão umbilical (co) e saco vitelino (sv)

Figura 19 - Fotografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias (A, B: CR de 23,3 mm e P = 1,626 g)

Legenda: A, fotografia de embrião bovino (e) envolto pelo âmnio (a) e membrana corioalantóide (cal). Maior quantidade de líquido amniótico na cavidade e o cordão umbilical (co) apresenta vasos (v) mais espessos, envolto por uma membrana transparente.. B, retirada a membrana (cal) podemos observar embrião (e) em vista lateral direita envolto pelo âmnio (a). Notar presença de cordão umbilical (co), saco vitelino (sv) e vasos (v). C, embrião (e) em vista lateral esquerda e âmnio (a), cordão umbilical (co) e saco vitelino (sv). D, estruturas morfológicas externas: encéfalo (e), olho com pigmentação da retina (o), focinho (fc), região do IV ventrículo encefálico (v), curvatura cervical (cc), coração (c), fígado (f), broto do membro torácico (t) e broto do membro pélvico (p) com extremidades bipartidas, medula nervosa (mn), cauda (ca), cordão umbilical (co) e saco vitelino (sv)

Figura 20 - Fotografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias (A, B, C, D: CR de 21,4 mm e P= 1,5205 g)

Inicia-se formações cotiledonárias em embriões no 44º dia de gestação (CR de 30,3 mm e CR de 30, 5 mm) evidenciando suas características morfológicas externas: encéfalo, olho pigmentado, focinho, região do 4º ventrículo encefálico, fígado, costelas e vascularização da derme (Figuras 21 e 22).

Legenda: A, fotografia de embrião bovino (e) envolto pelo âmnio e membrana corioalantóide (cal). Maior quantidade de líquido amniótico na cavidade. Observar o início das formações cotiledonárias (setas) entre a parede do útero – endométrio (ed) e o cório. B, estruturas morfológicas externas do embrião: encéfalo (e), olho com pigmentação da retina (o), focinho (fc), região do IV ventrículo encefálico (v), curvatura cervical (cc), fígado (f), broto do membro torácico (t) e broto do membro pélvico (p) com extremidades bipartidas, medula nervosa (mn), cauda (ca), costelas (ct), vascularização da derme (vd), cordão umbilical (co) e saco vitelino (sv)

Figura 21 - Fotografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (A, B: CR de 30,3 mm e P= 2,283 g)

Legenda: A, fotografia de embrião bovino (e) envolto pelo âmnio (a) e membrana corioalantóide (cal). Maior quantidade de líquido amniótico na cavidade. Observar o início das formações cotiledonárias (setas) entre a parede do útero – endométrio (ed) e o cório.

B, estruturas morfológicas externas do embrião: encéfalo (e), olho com pigmentação da retina (o), focinho (fc), região do IV ventrículo encefálico (v), curvatura cervical (cc), pavilhão auricular – orelha externa (pa), região do pescoço (rp), coração (c), fígado (f), broto do membro torácico (t) e broto do membro pélvico (p) com extremidades bipartidas, cauda (ca), vascularização da derme (vd), cordão umbilical (co)

Figura 22 - Fotografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (A, B: CR de 30,5 mm e P= 2,556 g)

5.3 MACROSCÓPICO: EMBRIÕES PROVENIENTES DE TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

Aos 28 dias de gestação, em embrião clonado (CR de 6,8 mm e CR de 8,2 mm), encontra-se envolto pela membrana córioalantóide, a qual apresenta extremidades com áreas de necrose. Nota-se ainda presença de saco vitelino enovelado e cordão umbilical de onde partem dois vasos principais, que se ramificam por toda membrana corioalantóide.

Ao retirarmos a membrana corioalantóide, podemos observar embrião envolto pelo âmnio, contendo líquido amniótico em seu interior, presença de saco vitelino, de coloração amarela clara, encéfalo, 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais, saliência cardíaca, estomodeu, fígado, início da formação do broto membro torácico, somitos, cauda, local da crista mesonéfrica, local de formação do intestino, cordão umbilical (Figuras 23 e 24).

Legenda: Em A e B, fotografia de porção endometrial (ed) do útero bovino. Observe que o embrião (e) encontra-se envolto pela membrana córioalantóide (cal), a qual apresenta extremidades com áreas de necrose (ne). Nota-se ainda presença de saco vitelino (*) enovelado e cordão umbilical (co) de onde partem dois vasos principais, os quais se ramificam por toda membrana corioalantóide (cal).

C, retirada a membrana corioalantóide (cal), podemos observar embrião em vista lateral esquerda, envolto pelo âmnio (a), contendo líquido amniótico em seu interior. Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co) e presença de saco vitelino (sv), de coloração amarela clara, e suas pontas (setas tracejadas) foram esticadas para melhor visualização. Observamos ainda as seguintes estruturas: encéfalo (e), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (ab), saliência cardíaca (sc), estomodeu (et), fígado (f), início da formação do broto membro torácico (t), somitos (so), cauda (ca), local da crista mesonéfrica (cm), local de formação do intestino (i), cordão umbilical (co).

Figura 23 - Fotografias de embrião bovino (clone) em vista lateral. Idade gestacional de 28 dias (CR de 6,8 mm)

Legenda: Em A e B, fotografias de porção endometrial (ed) do útero bovino e membrana embrionária. Observe que o embrião (e) encontra-se envolto pela membrana córioalantóide (cal), apresentando extremidades com áreas de necrose (ne). Nota-se ainda presença de saco vitelino (*) enovelado e cordão umbilical (co) de onde partem dois vasos principais, os quais se ramificam por toda membrana corioalantóide (cal).

C, retirada a membrana corioalantóide (cal) e membrana amniótica, podemos observar embrião em vista lateral esquerda. Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co) e presença de saco vitelino (sv), de coloração amarela clara, e suas pontas (setas tracejadas) foram esticadas para melhor visualização, presença de pequenos vasos sanguíneos (V*) que se ramificam formando uma rede. A conexão (cx) do saco vitelino a porção ventral do embrião pode ser visualizada. Observamos ainda as seguintes estruturas embrionárias em desenvolvimento: encéfalo (e), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (ab), saliência cardíaca (sc), estomodeu (et), fechamento do neuróporo cranial (nc), fígado (f), início da formação do broto membro torácico (t), somitos (so), cauda (ca), curvatura cervical (cc), local da crista mesonéfrica (cm), local de formação do intestino (i).

Figura 24 - Fotografias de embrião bovino (clone) em vista lateral. Idade gestacional de 28 dias (CR de 8,2 mm)

Embriões clonados aos 32 dias de gestação (CR de 13,0 mm) encontram-se envoltos pela membrana córioalantóide, vascularizada pelos vasos que partem do cordão umbilical e se ramificam por toda membrana, não apresentando formações cotiledonárias. Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical e presença de saco vitelino conectado a porção ventral do embrião, com coloração amarela escura, contendo subdivisão em T, e extremidades reduzidas. A membrana corioalantóidea foi dissecada (Figuras 25 e 26).

Note a coloração avermelhada do líquido amniótico (Figura 25).

Legenda: Em A e B, fotografias de útero aberto, A, evidenciando a camada de endométrio (ed). O embrião (e) encontra-se envolto pela membrana córioalantóide (cal), vascularizada (v) pelos vasos que partem do cordão umbilical (co) e se ramificam por toda membrana, não apresentando formações cotiledonárias. Note a coloração avermelhada do líquido amniótico (la). C, Embrião (e) em vista lateral esquerda, envolto pelo âmnio (a). Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co) e presença de saco vitelino (sv) conectado a porção ventral do embrião (*), com coloração amarela escura, contendo subdivisão em T, e extremidades reduzidas (setas tracejadas). A membrana corioalantóidea foi dissecada (cal).

D, retirada a membrana amniótica podemos observar o embrião em vista lateral esquerda com as seguintes estruturas: região de encéfalo (e), local do placódio do cristalino (o), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (ab), curvatura cervical (cc), região de quarto ventrículo encefálico (qv), saliência cardíaca (sc), estomodeu (*), fígado (f), início da formação do broto membro torácico (t), somitos (s), cauda (ca), cordão umbilical (co), região de pulmão (p), intestino (i) e local da crista mesonéfrica (cm).

Figura 25 - Fotografias de embrião bovino (clone) em vista lateral. Idade gestacional de 32 dias (CR de 13,0 mm)

Legenda: Em A e B, observar camada de endométrio (ed) e embrião (e) envolto por membrana córioalantóide (cal), vascularizada (v) pelos vasos que partem do cordão umbilical (co) e se ramificam por toda extensão da membrana, não apresentando formações cotiledonárias. Note a linha tracejada que acompanha a conformação do saco vitelino (sv), que parte da porção ventral do embrião e se divide formando um T com longas pontas, justaposta a membrana corioalantóide (cal).

C, Embrião (e) em vista lateral esquerda, envolto pelo âmnio (a). Ventralmente verificamos a formação do cordão umbilical (co) e presença de saco vitelino (sv) conectado a porção ventral do embrião (cx), com coloração amarela escura e vascularizado. Observar ainda região de encéfalo (e), local do placódio do cristalino (o), 1º, 2º, 3º arcos faríngeos – branquiais (ab), curvatura cervical (cc), região de quarto ventrículo encefálico (qv), saliência cardíaca (sc), podendo visualizar porção ventricular (Ve) e porção atrial (At) do coração, região de pulmão (p), abertura para formação da cavidade oral (*), fígado (f), início da formação do broto membro torácico (t), cauda (ca), cordão umbilical (co), região de intestino (i), local da crista mesonéfrica (cm), estômago (es) e início de brotamento do membro pélvico (mp)

Figura 26 - Fotografias de embrião bovino (clone) em vista lateral. Idade gestacional de 32 dias (CR de 13,0 mm)

Aos 36 dias de gestação, em embrião clonado (CR de 14,0 mm), notamos que o saco vitelino apresentava coloração esbranquiçada, com duas pequenas e finas pontas, semelhante a uma bexiga. O embrião encontrava-se submerso em líquido amniótico, de coloração avermelhada, semelhante a extravasamento sanguíneo, envolto por membrana amniótica. Tornou-se difícil visualização das estruturas morfológicas externas devido ao extravasamento de sangue (Figura 27).

Outro embrião clonado, aos 36 dias de gestação (CR de 17,3 mm) apresentou membrana corioalantóide, com maior quantidade de vasos sanguíneos partindo do cordão umbilical, saco vitelino de coloração amarela escura justaposto ao âmnio. Observamos região de encéfalo, olho com pigmentação da retina, região do IV ventrículo encefálico, curvatura cervical, coração, fígado, broto do membro torácico e membro pélvico, medula nervosa e cauda (Figura 28).

Legenda: Em A, útero aberto evidenciando camada de endométrio (ed), embrião envolto pela membrana amniótica (a). O saco vitelino (sv), com coloração esbranquiçada. Externamente visualizamos membrana corioalantóide (cal) vascularizada (v).

B, retirada membrana corioalantóide (cal) observamos que o embrião encontra-se submerso em líquido amniótico, com aspecto avermelhado, envolto pelo âmnio (a). O saco vitelino (sv) não está justaposto ao âmnio, se assemelhando a uma bexiga com duas finas pontas (seta).

C, embrião em vista lateral direita. Macroscopicamente, torna-se difícil diferenciação de região cranial (cr) e caudal (ca). Saco vitelino (sv) preso a porção ventral do embrião, assemelhando-se a uma bexiga, com duas pequenas pontas (setas vermelhas). Observe também os dois pequenos brotos de membro torácico (mt) e membro pélvico (mp).

D, difícil visualização das estruturas externas devido ao aspecto avermelhado do embrião. Estão presentes e visíveis: região cranial (cr), curvatura cervical (cc), fígado (f), pequenos brotos do membro torácico (mt) e membro pélvico (mp) e cordão umbilical (co).

Figura 27 - Fotografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 36 dias (CR de 14,0 mm)

Legenda: Em A, útero aberto evidenciando camada de endométrio (ed), carúncula (c) e embrião (e) envolto por membrana corioalantóide (cal).

B. fotografia de embrião bovino (e) em vista lateral esquerda, envolto pelo âmnio (a). Presença de líquido amniótico na cavidade amniótica. Membrana córioalantóide (cal) com maior quantidade de vasos sanguíneos (v) que partem do cordão umbilical (co), saco vitelino (sv) justaposto ao âmnio, com coloração amarela escura.

C, embrião em vista lateral esquerda podemos observar: encéfalo (e), olho com pigmentação da retina (o), região do IV ventrículo encefálico (ve), curvatura cervical (cc), coração (c), fígado (f), broto do membro torácico (mt), broto do membro pélvico (mp), medula nervosa (mn), cauda (ca) e cordão umbilical (co)

Figura 28 - Fotografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 36 dias (CR de 17,3 mm)

Embrião bovino clonado com idade gestacional de 40 dias apresentou CR de 7,5 mm. Sua membrana corioalantóide e âmnio continham aspecto gelatinoso, opaco, com difícil diferenciação entre líquido e tecido, ausência de vasos sangüíneos na superfície. A morfologia externa do embrião apresentou-se arredondada e pouca diferenciação entre porção cranial e porção caudal. O fígado ocupou quase que por completo a região ventral do embrião de onde partiu um saco vitelino semelhante a um “balão murcho”, ausência da formação do cordão umbilical (Figura 29).

Legenda: A, fotografia de embrião bovino (e) envolto pela membrana corioalantóide (cal). Note que a membrana tem aspecto gelatinoso e opaco, não havendo diferenciação entre líquido e tecido, além da ausência de vasos sanguíneos.

B, âmnio (a) também apresenta aspecto gelatinoso. Observe que o embrião apresenta formato arredondado, com pouca diferenciação entre porção cranial (cr) e caudal (cd). O fígado (f) ocupa quase que por completo a região ventral do embrião. Ausência de formação do cordão umbilical e presença de saco vitelino.

Figura 29 - Fotografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 40 dias (A, B: CR de 7,5 mm e P= 0,0774 g)

Embrião com 40 dias de gestação (23,5 mm) e 43 dias de gestação (CR de 27,5 mm) apresentaram-se envoltos pela membrana corioalantóide, iniciando as formações cotiledonárias com as carúnculas endometriais. Aumenta quantidade de líquido amniótico, o cordão umbilical apresenta vasos mais espessos, ramificando-se. Pudemos observar região de encéfalo, olho com pigmentação da retina, focinho, região do IV ventrículo encefálico, curvatura cervical, fígado, broto do membro torácico e broto do membro pélvico com extremidades bipartidas, cauda, cordão umbilical e saco vitelino (Figuras 30 e 31).

Legenda: A, fotografia de útero aberto evidenciando camada de endométrio (ed) e início das formações cotiledonárias (seta amarela). O embrião bovino (e) apresenta-se envolto pela membrana corioalantóide (cal).

B, aumenta quantidade de líquido amniótico na cavidade e o cordão umbilical (co) apresenta vasos (v) mais espessos, contendo ramificações pela membrana.

C, retirada a membrana corioalantóide (cal) podemos observar embrião em vista lateral esquerda juntamente de suas estruturas morfológicas externas: encéfalo (e), olho com pigmentação da retina (o), focinho (fc), região do IV ventrículo encefálico (ve), curvatura cervical (cc), fígado (f), broto do membro torácico (mt) e broto do membro pélvico (mp) com extremidades bipartidas, cauda (ca), cordão umbilical (co) e saco vitelino (sv)

Figura 30 - Fotografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 40 dias (CR de 23,5 mm)

Legenda: A, fotografia de embrião bovino (e) envolto pelo âmnio (a) e membrana corioalantóide (cal). Aumenta a quantidade de líquido amniótico na cavidade. Observar o início das formações cotiledonárias (setas) entre a parede do útero – endométrio (ed) e cório. Vasos sanguíneos (v) partem do cordão umbilical.

B, a membrana corioalantóide (cal) foi removida, permitindo visualização do âmnio (a) e embrião (e) submerso em líquido amniótico. O saco vitelino (sv) encontra-se justaposto ao âmnio, com aspecto enovelado e coloração amarela escura. Cordão umbilical (co) está evidente.

C, estruturas morfológicas externas do embrião: encéfalo (e), olho com pigmentação da retina (o), focinho (fc), região do IV ventrículo encefálico (ve), curvatura cervical (cc), saliências auriculares (as), fígado (f), broto do membro torácico (t) e broto do membro pélvico (p) com extremidades bipartidas, medula nervosa (mn), cauda (ca) e cordão umbilical (co).

Figura 31 - Fotografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 43 dias (CR de 27,5 mm)

Aos 50 dias de gestação (CR de 35 mm) a membrana corioalantóide encontra-se vascularizada com formações cotiledonárias. Há ainda resquício do saco vitelino, próximo ao cordão umbilical e justaposto ao âmnio, com coloração amarela escura. O feto nesta idade apresentou encéfalo, pigmentação dos olhos, focinho, fígado, costelas, curvatura cervical, pavilhão auricular – orelha externa, região do pescoço, membro torácico e membro pélvico, vascularização da derme, casco e cauda (Figura 32).

Legenda: A, fotografia de útero evidenciando endométrio (ed), membrana corioalantóide (cal) e formações cotiledonárias (seta) entre a parede do útero - carúnculas e o cório.

B e C, note que o feto bovino (fe) encontra-se submerso em líquido amniótico envolto pelo âmnio (a) e a membrana corioalantóide (cal) apresenta-se vascularizada (v) por vasos que partem do cordão umbilical (co). Visualizamos ainda o resquício de saco vitelino (sv), próximo ao cordão umbilical (co) e justaposto ao âmnio (a). O mesmo apresentava-se como um ponto de coloração amarela, semelhante a uma gelatina.

C e D, estruturas morfológicas externas do feto em vista lateral esquerda: encéfalo (e), pigmentação dos olhos (o), focinho (fc), fígado (f), costelas (cl), curvatura cervical (cc), pavilhão auricular – orelha externa (pa), região do pescoço (rp), membro torácico (t) e membro pélvico (p), vascularização da derme (vd), casco (cs), cauda (ca) e cordão umbilical (co).

Figura 32 - Fotografias de feto bovino (clone). Idade gestacional de 50 dias (CR de 35,4 mm)

Aos 68 dias de gestação (CR de 53,3 mm) pudemos observar feto bovino imerso em líquido amniótico e formações cotiledonárias entre a parede do útero (endométrio) e cório. Características morfológicas típicas do período fetal foram observadas, como presença de pálpebra recobrindo os olhos, focinho, cavidade oral, pavilhão auricular, casco e cordão umbilical (Figura 33).

Legenda: A, fotografia de feto bovino (e) envolto pelo âmnio (a). Líquido amniótico presente na cavidade, formações cotiledonárias (setas) entre a parede do útero – endométrio (ed) e o cório.

B, estruturas morfológicas externas do feto: encéfalo (e), pálpebra recobrindo os olhos (pl), focinho (fc), cavidade oral (cv), curvatura cervical (cc), pavilhão auricular – orelha externa (pa), região do pescoço (rp), membro torácico (t) e membro pélvico (p), casco (c), cauda (ca), cordão umbilical (co), placenta (pc)

Figura 33 - Fotografias de feto bovino (clone). Idade gestacional de 68 dias (A, B: CR de 53,3 mm e P= 9,548 g)

Com 70 dias de gestação (CR de 13,0 mm) encontramos um feto involuído, com curvatura cervical alongada, olhos recobertos por pálpebra, ausência de focinho, com região frontal arredondada, membros torácicos e pélvicos semelhantes ao período embrionário, sem bipartição ou formação de cascos, com extremidade em formato de “pá” (Figura 34).

Legenda: Em A, fotografia de feto bovino apresentando as seguintes estruturas: região de encéfalo (e), região de pescoço (rp), curvatura cervical (cc), olhos recoberto pela pálpebra (pa), região frontal (fr), cavidade oral (cv), broto dos membros torácicos (t) e pélvicos (p), ambos com extremidade em formato de pá, cauda (ca) e cordão umbilical (co)

Figura 34 - Fotografia de feto bovino (clone). Idade gestacional e 70 dias (A: CR de 13,0 mm e P= 0,167 g)

Ao passo que a Idade Gestacional progride inicia-se a diferenciação e formação do primórdio dos órgãos embrionários, os quais se desenvolvem e se estabelecem até o início do período fetal, quando o embrião apresenta características externas e internas próprias da espécie (Gráfico 1 e Tabela 4).

Fonte: Alberto, M. L. V. (2010).

Gráfico 1 - Crescimento e desenvolvimento (Crown Rump) X idade gestacional de embriões bovinos IATF

Tabela 4- Idade Gestacional e descrições morfológicas dos embriões provenientes das técnicas de IATF, FIV, TN - São Paulo – 2010

(Continua)

Idade Gestacional	Descrições Morfológicas	IATF	FIV	TN
25	Presença de pedículo embrionário, saco vitelino translúcido com divisão em T vascularizado, saliência cardíaca, estomodeu, encéfalo anterior, somitos, membrana amniótica, neuróporo caudal em processo de fechamento, arco mandibular, tubo neural.	X	X	
27 - 29	Membrana corioalantóide, cordão umbilical, membrana amniótica, saco vitelino, encéfalo anterior, arcos faríngeos, curvatura cervical, saliência cardíaca, estomodeu, fígado, broto do membro torácico, somitos, cauda.	X	X	X
30	Membrana corioalantóide, cordão umbilical, membrana amniótica, saco vitelino reduzido e amarelado, encéfalo anterior, arcos faríngeos, curvatura cervical, saliência cardíaca, estomodeu, placódio nasal, região de IV ventrículo encefálico, fígado, broto do membro torácico, broto do membro pélvico, somitos, cauda.	X	X	
32	Membrana corioalantóide, cordão umbilical, membrana amniótica, saco vitelino reduzido e amarelado, encéfalo anterior, fosseta do cristalino, placódio nasal, região do IV ventrículo encefálico, arcos faríngeos, curvatura cervical, saliência cardíaca, estomodeu, fígado, broto do membro torácico, somitos, cauda.		X	X

Idade Gestacional	Descrições Morfológicas	(Conclusão)		
		IATF	FIV	TN
35 - 36	Membrana corioalantóide, cordão umbilical, membrana amniótica, saco vitelino enovelado, justaposto e amarelado, divisão encéfalo, olho com pigmentação da retina, fosseta do cristalino, placódio nasal, região do IV ventrículo encefálico, arcos faríngeos, curvatura cervical, coração, estomodeu, fígado, broto do membro torácico, medula nervosa, cauda.	X	X	X*
40	Membrana corioalantóide, âmnio, cordão umbilical, saco vitelino reduzido, encéfalo, região de IV ventrículo encefálico, curvatura cervical, coração, fígado, medula nervosa, focinho, olho com pigmentação da retina, membro torácico e membro com extremidade em bipartição, cauda.	X	X	X**
45	Membrana corioalantóide, formação cotiledonária, âmnio, cordão umbilical, saco vitelino reduzido, região de pescoço, vascularização da derme, costelas, encéfalo, região de IV ventrículo encefálico, curvatura cervical, coração, fígado, medula nervosa, focinho, olho com pigmentação da retina, membro torácico e membro com extremidade em bipartição, cauda.	X	X	X

X* - Presença de saco vitelino com coloração esbranquiçada e duas finas pontas, a membrana corioalantóide apresenta-se vascularizada, membrana amniótica e líquido amniótico com extravasamento sanguíneo, difícil diferenciação de região cranial e caudal, pequenos brotos de membro torácico e membro pélvico, curvatura cervical, fígado, cordão umbilical.

X**- âmnio apresenta aspecto gelatinoso, embrião com formato arredondado e difícil diferenciação entre porção cranial e caudal, fígado ocupando quase que por completo a região ventral do embrião, ausência de formação do cordão umbilical e presença de saco vitelino.

Ao comparar o crescimento de embriões provenientes das técnicas de IATF, FIV e TN, verifica-se que o início do desenvolvimento se apresenta semelhante entre os embriões até os 28 dias de gestação. A partir do 32º dia, nota-se uma maior taxa de crescimento dos embriões FIV comparados aos embriões IATF, os quais se mantêm com CR de 10,0 mm até o 40º dia de gestação, quando os mesmos apresentam uma taxa de crescimento aumentada até o início do período fetal (Gráfico 2).

Embriões TN crescem gradativamente, apresentando um pico de crescimento ao entrarem no período fetal, enquanto outros embriões provenientes desta mesma técnica apresentam-se com CR semelhante a um embrião em início de desenvolvimento (Gráfico 2).

Fonte: Alberto, M. L. V. (2010).

Gráfico 2 - Crescimento e desenvolvimento (Crown Rump) X idade gestacional de embriões bovinos IATF, FIV, TN.

5.4 MICROSCÓPICOS

5.4.1 Microscopia de Luz: Embriões Provenientes Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

Nossos resultados mostram que o aparelho respiratório se relaciona com a porção anterior do intestino primitivo. Nos embriões com 25 dias de gestação (CR de 6,1 mm e CR de 7,0) e 27 dias de gestação (CR de 9,1 mm) pudemos observar algumas estruturas em desenvolvimento, tais como: tubo neural, notocorda, somitos, artéria dorsal, prega lateral, faringe primordial, arcos faríngeos, âmnio, mesênquima cefálico, encéfalo, tubo laringotraqueal, canal pericardioperitoneal, átrio esquerdo, átrio venoso, cone cardíaco, ventrículo direito, ductos mesonéfricos, celoma intraembrionário, intestino primitivo, fígado. Notamos ainda o início de fusão das aortas dorsais (Figuras 35, 36 e 37).

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando planos de corte apresentados nas fotomicrografias B, C e D.

B, C e D: Observar tubo neural (tn), notocorda (n), somitos (so), artéria dorsal (ad), prega lateral (pl), faringe primordial (fp), arcos faríngeos (af), âmnio (a), mesênquima cefálico (mc), encéfalo (e), tubo laringotraqueal (tl), canal pericardioperitoneal (cp), átrio esquerdo (ae), átrio venoso (av), cone cardíaco (cca), ventrículo direito (vd), ductos mesonéfricos (dm), celoma intraembrionário (ci), intestino primitivo (i), fígado (f).

D: Note início de fusão das aortas dorsais (ad). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 35 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 25 dias e CR de 6,1 mm

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando plano de corte apresentado na fotomicrografia B. B: Observar tubo neural (tn), notocorda (n), somitos (so), artéria dorsal (ad) fusionada, âmnio (a), canal pericardioperitoneal (cp), átrio venoso (av), cone cardíaco (cca), ventrículo direito (vd), ductos mesonéricos (dm), celoma intraembrionário (ci), formação estômago (et), fígado (f). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 36 – Fotografia e fotomicrografia de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 25 dias e CR de 7,0 mm

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando planos de corte apresentados nas fotomicrografias B e C.

B e C: Observar medula espinal (ms), artéria dorsal (ad) fundida, faringe primordial (fp), ânio (a), mesênquima cefálico (mc), encéfalo (e), canal pericardioperitoneal (cp), átrio esquerdo (ae), átrio venoso (av), cone cardíaco (cca), ventrículo direito (vd), ductos mesonéfricos (dm), celoma intraembrionário (ci), estômago primitivo (et), mesogástro dorsal (mdo), fígado (f). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 37 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 27 dias e CR de 9,1 mm

Embriões bovinos com Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm) e 35 dias (CR de 18,5 mm) foram cortados seqüencialmente obtendo-se os planos de corte descritos, verificando então fusão da artéria dorsal, subdivisão das câmaras do coração e formação do pulmão, com brônquios principais e brônquio traqueal característico da espécie (Figuras 38 e 39).

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando sequência de planos de corte apresentados nas fotomicrografias B, C e D.

B, C e D: Observar encéfalo (e), medula espinal (ms), faringe primordial (fp), artéria dorsal (ad), mesênquima cefálico (mc), canal pericardioperitoneal (cp), átrio esquerdo (ae), seio venoso (sv), traquéia (t), esôfago (es), crista neural (cn), cone cardíaco (cca), ventrículo direito (vd), saliência maxilar (smx), saliência mandibular (sm), brônquio principal (bp), brônquio traqueal (bt), saliência do broto do membro torácico (sbt). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 38 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 30 dias e CR de 11,0 mm

Legenda: Em A, observar fotomicrografia de embrião com as seguintes estruturas: região de encéfalo (ea), encéfalo médio (em), encéfalo posterior (ep) e quarto ventrículo encefálico (qv), medula espinal (ms), seio nasal (sn), mesênquima cefálica (mc), canal pericardioperitoneal (cp), coração (c) subdividido em átrios e ventrículos, pulmão (p), crista mesonéfrica (cm), fígado (f), diafragma (d), estômago (est), região de cordão umbilical (cou), alças intestinais (ai), bexiga urinária (bx) e neuróporo caudal (nc) fechado. Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 39 – Fotomicrografia de embrião bovino (latf) em corte sagital, vista lateral direita. Idade gestacional de 35 dias e CR de 18,5 mm.

Aos 40 dias de gestação nos bovinos, embriões com CR de 25,0 mm e CR de 24,0 mm e Idade gestacional de 45 dias com CR de 26,0 mm apresentavam formação e divisão de brônquios principais, presença de brônquio traqueal e brotamentos para formação dos brônquios segmentares. Ao redor dos brônquios estava presente tecido mesenquimal condensado e mesênquima frouxo nas áreas mais afastadas dos brônquios. Ainda nesta fase visualizamos a formação de vasos sanguíneos no pulmão, pleura visceral em íntimo contato com o pulmão, pleura parietal recobrindo a parede da cavidade pleural, local de divisão dos lobos pulmonares, coração com região de ventrículo e átrio (Figuras 40 e 41).

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando planos de corte apresentados nas fotomicrografias B e C.

B, C, E, F: visualizar esôfago (es), formação e divisão de brônquios principais (seta vermelha), presença de brônquio traqueal (bt), brotamentos para formação dos brônquios segmentares (bs – setas amarelas). Ao redor dos brônquios podemos notar a presença de mesênquima condensado (região corada em roxo escuro) e mesênquima frouxo (corada em roxo mais clara) nas áreas mais afastadas. Ainda nesta fase visualizamos a formação de vasos sanguíneos no pulmão. Observe: pleura visceral em íntimo contato com o pulmão, pleura parietal (pp) recobrendo a parede da cavidade pleural (cp), local de divisão dos lobos pulmonares (*), nervos (n), coração com região de ventrículo (ve) e átrio (at) e separando porção torácica de porção abdominal encontra-se o diafragma (di) e fígado (f) na região abdominal. Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 40 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 40 dias: CR de 25,0 mm (A, B, C) e CR de 24,0 mm (D, E, F)

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando planos de corte apresentados nas fotomicrografias B e C.

B, C: visualizar esôfago (es), traquéia (t), coração com região de ventrículo (ve) separados por septo interventricular (sve) e átrio (at), saco pericardico (sp) em íntimo contato com o coração. Separando porção torácica de porção abdominal encontra-se o diafragma (di). Formação e divisão de brônquios principais (seta vermelha), brotamentos para formação dos brônquios segmentares (setas amarelas). Ao redor dos brônquios podemos notar a presença de mesênquima condensado (região corada em roxo escuro) e mesênquima frouxo (corada em roxo mais claro) nas áreas mais afastadas. Notamos a presença de vasos sanguíneos no pulmão. Observe: pleura visceral em íntimo contato com o pulmão, pleura parietal (pp) recobrendo a parede da cavidade pleural (cp), local de divisão dos lobos pulmonares (*) e nervos (n). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 41 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 45 dias e CR de 26,0 mm

5.4.2 Microscopia de Luz: Embriões Provenientes de Fertilização *In Vitro* (FIV)

Embriões com 24 dias de gestação (CR de 8,0 mm) não apresentaram formação do divertículo laringotraqueal, apenas a presença de um tubo único (intestino primitivo) foi observado nos cortes seriados deste embrião. O tubo endotelial cardíaco estava presente juntamente das seguintes estruturas: tubo neural, notocorda, ductos mesonéfricos, aorta dorsal, celoma intra-embriônico, prega lateral, âmnio e saco vitelino (Figura 42).

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando planos de corte apresentados nas fotomicrografias B e C.

B e C: Observar tubo neural (tn), notocorda (n), ductos mesonéricos (dm), artéria dorsal (ad), celoma intraembrionário (ci), artérias celíacas (ac), intestino primitivo (i), fígado (f), tubo endotelial cardíaco (tec), âmnio (a), prega lateral (pl) e saco vitelino (sv). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 42 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 24 dias e CR de 8,0 mm

Com 28 dias de gestação nos embriões com CR de 8,5 mm aparece o tubo laringotraqueal e sua septação através da prega traqueoesofágica. Cortes seqüenciais em sentido caudal apresentaram a total separação dos tubos em traquéia e esôfago. Nas áreas ao redor dos tubos visualizamos tecido mesenquimal. Neste mesmo período os embriões apresentaram cavidade pericárdica, átrio dividido em direito e esquerdo, cone cardíaco, seio venoso, camada de miocárdio e epicárdio (Figuras 43 e 44).

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando planos de corte apresentados nas fotomicrografias B e C.

B e C: Observar tubo neural (tn), crista neural (cn), notocorda (n), artéria dorsal (ad), tubo laringotraqueal (tl), cavidade pericárdica (cp), átrio direito (ad), átrio esquerdo (ae), cone cardíaco (cc), seio venoso (sv), miocárdio (m), epicárdio (e), saliência mandibular (sm). Note em B a total septação do tubo laringotraqueal em esôfago (es) e traquéia (t). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 43 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 28 dias e CR de 8,5 mm

Legenda: Em A, fotomicrografia ilustrando em maior aumento o tubo laringotraqueal (tl) e sua septação através da prega traqueoesofágica (pt). Observar ainda tecido mesenquimal (me) ao redor do tubo, cavidade pericárdica (cp) e camada de tecido muscular – miocárdio (m). B: Seção de corte mais caudal: observar a total septação do tubo laringotraqueal em esôfago (es) e traquéia (t), tecido mesenquimal (me), cavidade pericárdica e miocárdio (m). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 44 – Fotomicrografias do tubo laringotraqueal de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 28 dias e CR de 8,5 mm

No 32º dia de gestação (CR de 12,5 mm) nos embriões bovinos iniciam a fusão das aortas dorsais e total separação da traquéia e esôfago. Em corte mais caudal visualizamos a bifurcação da traquéia para formação dos brônquios principais e surgimento dos lobos pulmonares direito e esquerdo (Figuras 45 e 46).

Na cavidade pericárdica observamos átrio direito e esquerdo, 1º forame interatrial, ventrículo direito e esquerdo, septo interventricular, além da formação dos brotos do membro torácico e medula espinal (Figuras 45 e 46).

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando planos de corte apresentados nas fotomicrografias B, C e D.

B, C e D: Observar formação da medula espinal (ms), gânglio espinal (g), notocorda (n), artéria dorsal (ad) quase fundindo-se, ductos mesonéfricos (dm), traquéia (t), esôfago (es), brônquios principais (b), cavidade pericárdica (cp), fígado (f), átrio direito (ad), átrio esquerdo (ae), 1º forame interatrial (*), ventrículo direito (vd), ventrículo esquerdo (ve), septo interventricular (si), broto membro torácico (mt). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 45 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 32 dias e CR de 12,5 mm

Legenda: A, observe fusão das aortas dorsais (setas), esôfago (es) e traquéia (t) totalmente separados, com tecido mesenquimal (me) se condensando ao redor dos tubos. Em B, seção de corte mais caudal, a traquéia se bifurca para formação dos brônquios principais (bp). Ao redor encontramos tecido mesenquimal (me) e pleura visceral (pv) em íntimo contato com o órgão. C, os brônquios principais (bp) separados, iniciando a formação dos lobos pulmonares esquerdo (le) e direito (ld). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 46 – Fotomicrografias de formação de pulmão de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 32 dias e CR de 12,5 mm

O brônquio traqueal foi observado em embriões com idade gestacional de 36 dias e CR de 18,3 mm a partir de um brotamento na porção lateral direita da traquéia, cranial a sua bifurcação. Presença de tecido mesenquimal condensado nas áreas próximas a traquéia e brônquios e tecido mesenquimal frouxo nas áreas mais afastadas (Figura 47).

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando plano de corte apresentado nas fotomicrografias B e C.

B, Observar formação da medula espinal (ms), gânglio espinal (g), placa do teto (pt), placa basal (pb), notocorda (n), traquéia, esôfago e bronquio traqueal (C), cavidade pericárdica (cp), fígado (f), coração (cr) e broto membro torácico (mt).

C, Mostra em maior aumento a área demarcada em B. Esôfago (es) e traquéia (t) apresentam epitélio em diferenciação, circundado por mesênquima condensado (mc) e regiões mais afastadas mesênquima frouxo (mf), presença de nervos (n), pleura visceral (pv) e cavidade pleural (cpl). Notar aparecimento do brônquio traqueal (bt), logo abaixo brônquio segmentar (bs) no lobo pulmonar direito (ld). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 47 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 36 dias e CR de 18,3 mm

Em embriões com 40 dias de gestação (CR de 23,5 mm) a cavidade pleural apresentou pulmão em fase pseudoglandular, com brônquios principais originando brotamentos para formação dos brônquios segmentares. O mesênquima formador do órgão se condensa nas áreas próximas aos brônquios e brotamentos tornando-se frouxo nas áreas afastadas, contendo vasos sangüíneos dispersos. A pleura visceral apresenta-se em íntimo contato com o pulmão e pleura parietal recobre a cavidade pleural. O pulmão inicia sua subdivisão em lobos pulmonares (Figuras 48 e 49).

Observamos as três camadas musculares do coração: o epicárdio como uma delgada camada recobrando o miocárdio, que contém grande quantidade de núcleos e pouca fibra, ao contrário do endocárdio com menor quantidade de núcleos celulares e mais fibras, além da presença de trabéculas contendo células sangüíneas em seu interior (Figura 49).

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando plano de corte (longitudinal) apresentados na fotomicrografia B.

B, Cavidade torácica e parte de cavidade abdominal, podemos observar coração com parte do átrio (a) e ventrículo (v), cavidade pleural (cp), pulmão (p), pleura parietal (pp), costelas (ct), diafragma (d) delimitando cavidades, esôfago (es) – porção abdominal e mesonefro. Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 48 – Fotografia e fotomicrografia de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias e CR de 23,3 mm

Legenda: A, lobo pulmonar contém brônquios principais (bp) e brotamentos (br) para formação dos brônquios segmentares. Ao redor dos brônquios podemos notar a presença de mesênquima condensado (mc) e mesênquima frouxo (mf) nas áreas mais afastadas. Ainda nesta fase visualizamos a formação de vasos sanguíneos (v) no pulmão. Observe: pleura visceral (pv) em íntimo contato com o órgão, pleura parietal (pp) recobrindo a parede da cavidade pleural (pl), local de divisão dos lobos pulmonares (*), esôfago (es), e nervos (n).

B, na fotomicrografia da parede ventricular de coração de embrião bovino visualizamos as diferentes camadas musculares: epicárdio (ep) como uma delgada camada recobrindo o miocárdio (m), que apresenta grande quantidade de núcleos e pouca fibra, camada de endocárdio (en) onde visualizamos menor quantidade de núcleos celulares e mais fibras, e presença de trabéculas contendo células sanguíneas (cs). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 49 – Fotomicrografias de pulmão e coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias e CR de 23,3 mm

O modelo do coração pode ser observado aos 44 dias de gestação (CR de 30,3 mm), contendo átrio direito e esquerdo, aurículas, ventrículo direito e esquerdo, septum primum, septo interventricular, valva mitral, veias da base do coração e ápice (Figura 50).

Os brotos pulmonares dos embriões apresentaram brônquios principais originando brotamentos de brônquios segmentares. O mesênquima de sustentação em diferenciação contém vasos sanguíneos dispersos (Figura 51).

Legenda: A fotografia de embrião bovino e B fotomicrografia do coração do respectivo embrião onde podemos visualizar: átrio direito (ad), átrio esquerdo (ae), aurícula (a), septum primum (sp), veias (v) da base do coração, ventrículo direito (vd), septo interventricular (si), ventrículo esquerdo (ve), valva mitral (vm) e ápice (ap) do coração. C, maior aumento do átrio mostrado em B. Observar camada muscular (m) contendo pouca fibra e grande quantidade de núcleos, e células sanguíneas (cs) na cavidade atrial. D, maior aumento da parede do ventrículo, apresentado em B. Observar epicárdio (ep) como uma delgada camada, miocárdio (m) e endocárdio (en). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 50 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias e CR de 30,3 mm

Legenda: Em A e B, o lobo pulmonar apresenta brônquios principais (bp) originando brotamentos (seta) para formação dos brônquios segmentares (bs). Ao redor dos brônquios notamos a presença de mesênquima condensado (mc) e mesênquima frouxo (mf) nas áreas mais afastadas. Ainda nesta fase visualizamos a formação de vasos sanguíneos (vs) no pulmão. Observe: pleura visceral (pv) em íntimo contato com o órgão, pleura parietal (pp) recobrindo a parede da cavidade pleural (cp) e local de divisão dos lobos pulmonares (*). B traz maior aumento evidenciando o epitélio (ep) brônquico em diferenciação e a presença de vasos sanguíneos (vs) na porção de tecido mesenquimal. Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 51 – Fotomicrografias de pulmão e brônquio de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias e CR de 30,3 mm

5.4.3 Microscopia de Luz: Embriões Provenientes de Transferência Nuclear

Embrião bovino clonado com Idade gestacional de 28 dias e CR de 8,2 mm apresenta coração com porção ventricular e atrial, diafragma, fígado, estômago primitivo, ductos mesonéfricos e arcos faríngeos. Em embriões com Idade gestacional de 32 dias e CR de 13,0 mm está presente canal pericardioperitoneal, átrio esquerdo, ventrículo, cone cardíaco, crista neural, saliência maxilar, saliência mandibular, estômago primordial envolto por mesogástrio dorsal, fígado, ductos mesonéfricos e saliência do broto do membro torácico (Figuras 52 e 53).

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando corte apresentado na fotomicrografia B.

B: Observar área cardíaca apresentando coração com porção ventricular (ve) e atrial (at), diafragma, fígado (f), estômago primitivo (est), ductos mesonéfricos (dm) e arcos faríngeos (af). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 52 – Fotografia e fotomicrografia de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 28 dias e CR de 8,2 mm

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando plano de corte apresentado na fotomicrografia B. B: Observar encéfalo (e), medula espinal (ms), faringe primordial (fp), artéria dorsal (ad), mesênquima cefálico (mc), canal pericardioperitoneal (cp), átrio esquerdo (ae), ventrículo (ve), cone cardíaco (cca), crista neural (cn), saliência maxilar (smx), saliência mandibular (sm), estômago primordial (est) envolto por mesogástrio dorsal, fígado (f), ductos mesonéfricos (dm), saliência do broto do membro torácico (sbt). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 53 – Fotografia e fotomicrografia de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 32 dias e CR de 13,0 mm

Ao analisarmos embrião bovino clonado aos 36 dias e CR de 14,0 mm notamos presença de coração com formação de átrio (a) e ventrículo (v), divisão das câmaras cardíacas diferenciadas, região de encéfalo (e) reduzida, fígado (f) aumentado, não conseguindo diferenciar demais estruturas embrionárias (Figura 54).

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino utilizados nas fotomicrografias B e C. B, C: podemos visualizar coração com formação de átrio (a) e ventrículo (v), divisão das câmaras cardíacas diferenciadas, região de encéfalo (e) reduzida, fígado (f) aumentado, não conseguindo diferenciar demais estruturas embrionárias. Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 54 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 36 dias e CR de 14,0 mm

Embrião com 40 dias de gestação apresentou CR de 7,5 mm e observamos um encéfalo reduzido, neuróporo cranial aberto, região do 4º ventrículo encefálico, região de formação da cavidade oral deformada, coração com formação de átrio e ventrículo, fígado aumentado ocupando toda cavidade abdominal, ductos mesonéfricos, formação de metanefro e local de comunicação do saco vitelino. Obtivemos difícil visualização da constituição celular dos órgãos em desenvolvimento (Figura 55).

Legenda: A, fotografia do embrião bovino e B, fotomicrografia do respectivo embrião onde podemos visualizar região de encéfalo (e) reduzida, o neuróporo cranial (ncr) aberto, região de 4º ventrículo encefálico (v), região de formação da cavidade oral (co), coração com formação de átrio (a) e ventrículo (v), fígado (f) aumentado, ductos mesonéfricos (dm), formação do metanefro (mt) e local de comunicação do saco vitelino (sv). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 55 – Fotografia e fotomicrografia de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 40 dias e CR de 7,5 mm

Embrião bovino (clone) com Idade gestacional de 40 dias e CR de 23,5 mm apresentou traquéia, região de coração com subdivisão de ventrículos direito, ventrículo esquerdo, átrio direito, átrio esquerdo, aurículas, cavidade pleuropericárdica, base do coração, ápice do coração. Formação e divisão de brônquios principais, diferenciação de brônquio traqueal, cavidade pleural, pleura visceral (aderida ao órgão em desenvolvimento) pleura parietal (parede da cavidade pleural) e costelas (Figura 56).

Aos 43 dias de gestação em clone (CR de 27,5 mm) o lobo pulmonar contendo brônquios principais e brotamentos para formação dos brônquios segmentares. Ao redor dos brônquios podemos notar a presença de mesênquima condensado e mesênquima frouxo nas áreas mais afastadas e formação de vasos sanguíneos no pulmão (Figura 57).

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando planos de corte apresentados nas fotomicrografias B, C e D.

B: visualizar esôfago (es), traquéia (t), região de coração com subdivisão de ventrículos direito (vd), ventrículo esquerdo (ve), átrio direito (ad), átrio esquerdo (ae), aurículas (au) cavidade pleuropericárdica (cp), base do coração (circunferência amarela), ápice do coração (ap), membros torácicos em formação.

D e E: formação e divisão de brônquios principais (bp), diferenciação de brônquio traqueal (bt), cavidade pleural (cpl), pleura visceral (aderida ao órgão em desenvolvimento) pleura parietal (parede da cavidade pleural), costelas (cs) e fígado (f) na região abdominal. Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 56 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 40 dias e CR de 23,5 mm

Legenda: Em A, fotografia de embrião bovino ilustrando plano de corte apresentado na fotomicrografia B. B: observar fotomicrografia de embrião bovino em corte sagital, vista lateral esquerda com as seguintes estruturas: região de encéfalo anterior (ea), encéfalo médio (em), quarto ventrículo encefálico (qv), medula espinal (ms), focinho (fo), mesênquima cefálica (mc), cavidade oral (cor), região de faringe (fa), coração (co) subdividido em átrios e ventrículos, pulmão (pu), crista mesonéfrica (cm), fígado (f), estômago (est), região de cordão umbilical (cou) e alças intestinais (ai). C: aumento de área pulmonar: note a presença do lobo pulmonar contendo brônquios principais (bp) e brotamentos (br) para formação dos brônquios segmentares. Ao redor dos brônquios podemos notar a presença de mesênquima condensado (mc) e mesênquima frouxo (mf) nas áreas mais afastadas. Ainda nesta fase já visualizamos a formação de vasos sanguíneos (vs) no pulmão. Observe: pleura visceral (pv) em íntimo contato com o órgão, pleura parietal (pp) recobrendo a parede da cavidade pleural (pl), local de divisão dos lobos pulmonares (*). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 57 – Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino (clone). Idade gestacional de 43 dias e CR de 27,5 mm

Feto com 68 dias de gestação e CR de 53,3 mm apresentou pulmão em fase pseudoglandular e coração acomodado na cavidade pericárdica, subdivido em átrio direito e esquerdo e ventrículo direito e esquerdo. O epitélio traqueal diferencia-se em epitélio respiratório, musculatura lisa, cartilagem e tecido conjuntivo estavam presentes. Os brônquios pulmonares formam sacos terminais contendo epitélio cúbico. Brotos de bronquíolos estavam presentes e ausência de vasos sanguíneos nos cortes obtidos e analisados (Figura 58).

Legenda: A, fotografia de feto bovino e B, C, D fotomicrografias do coração, traquéia e pulmão do respectivo feto.

B, podemos observar pulmão (p) em fase pseudoglandular, coração acomodado na cavidade pericárdica (cp) e suas câmaras: átrio direito (ad), ventrículo esquerdo (ve) e ventrículo direito (vd).

C, Observar esôfago (es) logo abaixo da traquéia (t). Epitélio traqueal diferencia-se em epitélio respiratório (ep), presença de músculo liso (ml), cartilagem (ct) e tecido conjuntivo ao redor (tc).

D, pulmão em fase pseudoglandular apresenta brônquios (b) com formação dos sacos terminais (st), epitélio (ep) cúbico, broto de bronquíolos (bb) e tecido conjuntivo de sustentação (tc). Não visualizamos vasos sanguíneos nos cortes obtidos. Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 58 – Fotografia e fotomicrografias de coração, traquéia e pulmão de feto bovino (clone). Idade gestacional de 68 dias e CR de 53,3 mm

Aos 70 dias de gestação e CR de 13,0 mm visualizamos um feto bovino com região de encéfalo indiferenciada, neuróporo cranial fechado com região de 4º ventrículo encefálico desorganizada, cavidade oral e arcos branquiais não delimitados, coração com grande ventrículo e pequeno átrio, pulmão não desenvolvido, fígado, alças intestinais, neuróporo caudal e formação de medula espinal. A integridade das células estavam comprometidas, impedindo a visualização da constituição, tipo e fase celular nos órgãos em desenvolvimento (ou já formados) (Figura 59).

Legenda: A, fotografia do feto bovino e B, fotomicrografia do respectivo feto. Podemos visualizar região de encéfalo (e), neuróporo cranial (ncr), região do quarto ventrículo encefálico (v), região de formação da cavidade oral (cv), coração (c), esôfago (e), pequeno pulmão (área marcada em vermelho), fígado (f), ductos mesonéfricos (dm), alças intestinais (ai), neuróporo caudal (nc) e formação da medula espinal (s). Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 59 – Fotografia e fotomicrografia de feto bovino (clone). Idade gestacional de 70 dias e CR de 13,0 mm

5.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão: Embriões Provenientes de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

O embrião bovino com idade gestacional de 30 dias e CR de 11,0 mm proveniente de inseminação artificial apresenta pericárdio contendo núcleos arredondados, contendo nucléolos com aparência de rede, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e fibrilas de colágeno, vaso sanguíneo delimitado por endotélio contendo células sanguíneas em seu interior, presença de desmossomos entre as membranas celulares e citoplasma de coloração mais acinzentada. Pequena área de matriz extracelular.

A formação da musculatura cardíaca apresenta-se com finos feixes de fibras próximas ao seu núcleo, presença de mitocôndrias e pequena área de matriz extracelular.

A região de epitélio brônquico, continha células em formato alongado e núcleo acompanhando formato da mesma, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias, presença de vesículas na porção apical do epitélio brônquico. Porção basal do epitélio encontra-se delimitados pela lâmina basal. Abaixo região de mesênquima condensado e mesênquima frouxo nas regiões mais afastadas, com vasta área de matrix extracelular. Notamos ainda prolongamentos e interdigitações das membranas das células mesenquimais e núcleos alongados (Figuras 60, 61, 62, 63 e 64).

Legenda: Em A, fotomicrografia panorâmica da região de membrana pericárdica aumentada em B. Observar núcleos (n) com formatos mais alongados, retículo endoplasmático rugoso (R), mitocôndrias (mt) e fibrilas de colágeno (F).

C, fotomicrografia panorâmica de vaso sanguíneo (vs) delimitado por endotélio (e) contendo células sanguíneas em seu interior, presente na membrana pericárdica.

D, seta amarela indica região aumentada de A. Célula com núcleos (n) bem arredondados, presença de desmossomos (região demarcada em vermelho) entre as membranas celulares, mitocôndrias (mt) e retículo endoplasmático rugoso (R).

Figura 60 – Eletromicrografias do pericárdio de coração de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)

Legenda: Em A, B e D: fotomicrografias panorâmica da região de membrana pericárdica. Observar núcleos (n) com formatos arredondados, vasos sanguíneos (vs) e desmossomos (d). C e E: aumento das regiões apresentadas em A, B, D. Note presença de núcleos arredondados (n), contendo nucléolos (*) com aparência de rede, retículo endoplasmático rugoso (R) concentrados próximo a membrana nuclear, mitocôndrias (mt), desmossomos (d) em alguns pontos da membrana celular e citoplasma de coloração mais acinzentada. Pequena área de matriz extracelular (me).

Figura 61 – Eletromicrografias do pericárdio de coração de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)

Legenda: A, B, C, D: Formação de músculo cardíaco (setas) em finos feixes de fibras próximas ao núcleo (n), presença de mitocôndrias (mt) e pequena área de matriz extracelular (me). Note em D presença de citoplasmas mais acinzentado.

Figura 62 – Eletromicrografias do coração de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)

Legenda: A, região de epitélio brônquico, contendo células em formato alongado e núcleo (n) acompanhando formato da mesma.

B e C: aumento da região de epitélio (luz) apresentando células alongadas contendo núcleos (n), retículo endoplasmático rugoso (R) e mitocôndrias (mt). Note ainda presença de vesículas (seta) na porção apical do epitélio brônquico.

D e E: transição de epitélio (ep) e mesênquima (ms) delimitados pela lâmina basal (seta verde)

Figura 63 – Eletromicrografias do pulmão de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)

Legenda: A, região de mesênquima frouxo (mf) presente nas áreas mais afastadas do epitélio brônquico. Notar vasta área de matriz extracelular (me).
 B, aumento da eletromicrografia A. notar núcleo (n) com formato irregular, mitocôndrias (mt) e citoplasma acinzentado.
 C e D: mesênquima condensado (mc) próximo ao epitélio brônquico. Notar prolongamentos e interdigitações das membranas das células mesenquimais (seta vermelha) e núcleos alongados (n).

Figura 64 – Eletromicrografias do pulmão de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 30 dias (CR de 11,0 mm)

O coração do embrião bovino de IATF com idade gestacional de 35 dias e CR de 15,6 mm apresentou formação de músculo cardíaco, muitas mitocôndrias, vaso sanguíneo contendo células sanguíneas em seu interior, revestidos por endotélio contendo núcleos alongados. No pericárdio visualizamos núcleos, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso.

Brônquio pulmonar em formação apresentou área de epitélio brônquico, lâmina basal e região de mesênquima condensado próximo ao tecido epitelial. Note que os núcleos da porção mesenquimal apresentam-se alongados e próximos a lâmina basal, e núcleos da porção epitelial são mais arredondados, tendendo para porção apical do brônquio. Na porção apical observamos a presença de microvilos, retículo endoplasmático rugoso, desmossomos e mitocôndrias.

Região mesenquimal continha vasos sanguíneos (Figuras 65 e 66).

Legenda: A, B, C: Formação de músculo cardíaco (setas amarelas), muitas mitocôndrias (mt), vaso sanguíneo (vs) contendo células sanguíneas em seu interior, revestidos por endotélio (en) contendo núcleos alongados (n). D, aumento da região de pericárdio (per) apresentada em C. Notar presença de núcleo (n), mitocôndrias (mt) e retículo endoplasmático rugoso (R).

Figura 65 – Eletromicrografias do coração de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 35 dias (CR de 15,6 mm)

Legenda: A e B: brônquio pulmonar em formação. Visualizar área de epitélio brônquico (ep), lâmina basal (seta vermelha) e região de mesênquima condensado (mc) próximo ao tecido epitelial. Note que os núcleos da porção mesenquimal apresentam-se alongados e próximos a lâmina basal, e núcleos da porção epitelial são mais arredondados, tendendo para porção apical do brônquio. C, aumento da região apical do brônquio (luz). Podemos visualizar microvilos (seta verde), retículo endoplasmático rugoso (R), desmossomos (d) e mitocôndrias (mt). D, região de mesênquima contendo vaso sanguíneo (vs) com células sanguíneas em seu interior, e camada endotelial (en) com núcleo alongado.

Figura 66 – Eletromicrografias do pulmão de embrião bovino (latf). Idade gestacional de 35 dias (CR de 15,6 mm)

5.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura: Embriões Provenientes de Fertilização *in vitro* (FIV)

Embrião com 24 dias de gestação (CR de 7,6 mm) apresentou membrana amniótica recobrindo-o, pedículo embrionário e saco vitelino. Aos 28 dias de gestação (CR de 10,0 mm) visualizamos local do placódio do cristalino, quatro pares de arcos faríngeos, região de encéfalo médio e posterior, placódio nasal, curvatura cervical, saliência do coração, saliência mesonéfrica e somitos (Figura 67).

Ainda aos 28 dias de gestação, aumentamos a área de saliência cardíaca e observamos diferenciação celular na parede do coração, com migração de células mesoteliais que irão cobrir o miocárdio (Figura 68).

Legenda: Em A, observamos âmnio (a) presente recobrindo todo o embrião, note que o espaço entre âmnio e embrião é pequeno, contendo pouca quantidade de líquido amniótico nessa fase. Presença de pedículo embrionário (pe) de onde partem vasos e saco vitelino (sv) na porção ventral do embrião.

B, observar local do placódio do cristalino (o), quatro pares de arcos faríngeos (af), encéfalo médio (ea), encéfalo posterior (ep), placódio nasal (n), curvatura cervical (cc), saliência do átrio direito do coração (as), saliência do ventrículo direito (vd), saliência mesonéfrica (sm), somitos (so) e saco vitelino (sv).

Figura 67 – Eletromicrografias de embriões bovinos (fiv). Idade estacional de A - 24 dias e CR de 7,6 mm, e B – 28 dias e CR de 10,0 mm

Legenda: Em A, embrião bovino marcando saliência cardíaca (sc) apresentada em B, em maior aumento.

B, observar saliência ventricular direita (svd) e saliência ventricular esquerda (sve), caudal aos quatro pares de arcos faríngeos (af).

C e D, diferenciação da parede do coração. Note a migração de células mesoteliais que irão cobrir o miocárdio

Figura 68 – Eletromicrografias de embrião bovino (fiv) evidenciando área cardíaca. Idade gestacional de 28 dias e CR de 10,0 mm

5.4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão: Embriões Provenientes de Fertilização *in vitro* (FIV)

Na eletromicrografia do ventrículo esquerdo do coração de embrião bovino aos 36 dias de gestação (CR de 18,3 mm) pudemos observar citoplasma de coloração acinzentada e membrana celular com projeções. As fibras musculares cardíacas se ramificam e alongam-se. Presença de vaso sanguíneo, desmossomos, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e vacúolos (Figuras 69, 70 e 71).

Legenda: Em A, observar citoplasma (c) de coloração mais acinzentada, membrana celular com projeções e núcleo (n) alongado e próximo a membrana celular.
 B, célula com núcleos (n) bem arredondados, fibras musculares (f) se ramificando vaso sanguíneo delimitado por endotélio (e) contendo células sanguíneas em seu interior – hemácias (h).
 C, células com núcleos (n) irregulares, contendo grânulos de cromatina dispersos e condensados nas áreas próximas a membrana nuclear, presença de retículo endoplasmático rugoso (r), mitocôndrias (m) e proximidade de membranas entre as células. Não visualizamos matriz extracelular.

Figura 69 – Eletromicrografias de ventrículo esquerdo do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 36 dias (CR de 18,3 mm / Peso - 0,7834 g)

Legenda: Em A, observar citoplasma (ci) de coloração mais acinzentada, membrana celular com projeções e núcleo (n) alongado e próximo a membrana celular. Notar ainda grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (r) e vacúolos (v). Célula ao lado observamos presença de mitocôndrias (m).

Figura 70 – Eletromicrografia de ventrículo esquerdo do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 36 dias (CR de 18,3 mm / peso - 0,7834 g)

Legenda: A, célula contendo mitocôndrias (m), feixes transversais de fibras musculares (f) e desmossomos (setas).

B, fibras musculares cardíacas longitudinais (f), núcleos arredondados (n) e presença de vaso sanguíneo delimitado por endotélio (e).

Figura 71 – Eletromicrografias de ventrículo esquerdo do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 36 dias (CR de 18,3 mm / Peso - 0,7834 g)

O pulmão de embrião bovino com 40 dias de gestação (CR de 21,4 mm) apresentou brônquio pulmonar constituído por células alongadas e núcleo acompanhando seu formato e ausência de matriz extracelular. A lâmina basal delimita região de epitélio e mesênquima, e na luz do brônquio encontramos vesículas formadas pelo epitélio (Figura 72).

Legenda: A e B, epitélio (e) do brônquio pulmonar constituído por células alongadas com núcleos (n) acompanhando o formato das células e ausência de matriz extra celular. Delimitando região de epitélio (ep) e mesênquima condensado (me) encontra-se a lâmina basal (L). Ainda na região de mesênquima (me) próximo a lâmina basal visualizamos feixes de fibras colágenas (fi). C, célula mesenquimal apresentando núcleo alongado (n), vacúolos (v) e retículo endoplasmático rugoso (r). D, luz do brônquio encontram se vesículas (ve) pertencente ao epitélio brônquico e retículo endoplasmático rugoso (r). Desmossomos (d) presente entre as projeções vesiculares.

Figura 72 – Eletromicrografias de pulmão de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias (CR de 21,4 mm / Peso - 1,5205 g)

No ventrículo direito do coração de embrião bovino com idade gestacional de 40 dias (CR de 21,4 mm) a célula cardíaca contém fibras musculares longitudinais e mitocôndrias. Estão presentes interdigitações de membrana formadas pela membrana da célula (Figura 73).

No ventrículo esquerdo visualizamos fibras musculares cardíacas se ramificando, mitocôndrias, vacúolos e pequena área de matriz extracelular (Figura 74).

Legenda: A, célula cardíaca contendo fibras musculares longitudinais (f), núcleos (n) acompanhando o formato da célula e mitocôndrias (setas vermelhas). Note ainda área demarcada representada em B.

B, duas células cardíacas: visualizar núcleo (n) e interdigitações de membrana (setas amarelas).

Figura 73 – Eletromicrografias de ventrículo direito do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias (CR de 21,4 mm / Peso - 1,5205 g)

Legenda: A, célula cardíaca contendo núcleo (n) com grânulos de cromatina condensados e dispersos, mitocôndrias (m), vacúolos (v) e fibras musculares (f) se ramificando. Pequenas áreas de matriz extra celular (ex) e presença de desmossomos (d).

Figura 74 – Eletromicrografia de ventrículo esquerdo do coração do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 40 dias (CR de 21,4 mm / Peso - 1,5205 g)

No pulmão de embrião bovino com 44 dias de gestação (CR de 30,5 mm) existe interdigitação de membrana entre a região de mesênquima e epitélio, os núcleos tem formatos irregulares e as fibras colágenas apresentam-se próximas a lâmina basal. Vaso sanguíneo presente na região de mesênquima frouxo, cisterna de golgi, retículo endoplasmático rugoso e fibras colágenas estão presente. Além dos desmossomos entre as projeções de membrana (Figuras 75 e 76).

Legenda: Em A, observar região de epitélio brônquico (ep) e mesênquima (me) e entre eles interdigitação de membranas (setas) na região da lâmina basal. Observar ainda formatos irregulares dos núcleos (n) e presença de fibras colágenas (fc) próximo a lamina basal.
B, Observe as vesículas (ve) no epitélio, formando a luz do brônquio. Note presença de vacúolos (vc) e retículo endoplasmático rugoso (r).

Figura 75 – Eletromicrografias de pulmão de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (CR de 30,5 mm / Peso - 2,556 g)

Legenda: Em A, área de mesênquima frouxo, notar presença de vaso sanguíneo (v), endotélio (e). As membranas das células mesenquimais apresentam prolongamento (setas) promovendo comunicação entre células, seus núcleos (n) ocupam quase por completo o interior da célula, contém grânulos de cromatina condensados e dispersos.

B, observe projeções de membrana (pm) e desmossomos (d) promovendo comunicação celular. No interior da célula é possível visualizar núcleo (n) e cisternas de golgi (cg).

C e D, mesênquima condensado onde evidenciamos núcleos (n) com formatos irregulares, contendo maior quantidade de grânulos de cromatina condensados (heterocromatina), presença de fibras colágenas (fc) no interior da célula e retículo endoplasmático rugoso (r). Notar ainda os desmossomos (seta) entre duas membranas celulares e projeções de membrana.

Figura 76 – Eletromicrografias de pulmão de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (CR de 30,5 mm / Peso - 2,556 g)

O coração de embrião bovino com 44 dias de gestação (CR de 30,5 mm) apresenta ventrículo esquerdo contendo grandes vasos, formação de fibras musculares cardíacas e mitocôndrias.

No ventrículo direito visualizamos região de miocárdio e pericárdio, com uma única camada celular, núcleos arredondados, retículo endoplasmático rugoso, vasos sanguíneos e mitocôndrias (Figuras 77, 78 e 79).

O átrio apresenta poucas fibras musculares, muitas mitocôndrias, desmossomos e tecido mesenquimal com núcleos de formas irregulares (Figura 80).

Legenda: A, presença de grande vaso sanguíneo contendo células sanguíneas (cs) em seu interior, células endoteliais (en) compostas por núcleos (n) com formato alongado. Ao redor observamos a formação de músculo cardíaco (setas) em finos feixes de fibras próximas ao núcleo (n).

B, maior aumento, notamos a presença de mitocôndrias (m) e fibras musculares cardíacas (f) no citoplasma (c) da célula.

Figura 77 – Eletromicrografias de ventrículo esquerdo do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (CR de 30,5 mm / Peso - 2,556 g)

Legenda: A, região de miocárdio (mi) contendo pequenos feixes de fibras musculares (setas) próximas ao núcleo (n) e região de pericárdio (pr) apresentando se em uma única camada de células, com núcleos arredondados (n) e grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (r). B, observar ramificação das fibras musculares (setas) e núcleos (n) alongados acompanhando o sentido das fibras.

Figura 78 – Eletromicrografias de ventrículo direito do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (CR de 30,5 mm / Peso - 2,556 g)

Legenda: A, observe a grande quantidade de mitocôndrias (m) no interior da célula, juntamente de retículo endoplasmático rugoso (r), núcleo (n) e fibras musculares (f). B, presença de vaso sanguíneo delimitado pelo endotélio (en) contendo células sanguíneas (cs) em seu interior. Produção e ramificação (seta) de fibras musculares (f). Núcleos alongados (n).

Figura 79 – Eletromicrografias de ventrículo direito do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (CR de 30,5 mm / Peso - 2,556 g)

Legenda: A, presença de poucas fibras musculares (f) e tecido mesenquimal contendo núcleos (n) com formatos irregulares.

B, fibra muscular (f) próxima ao núcleo (n) da célula e grande quantidade de mitocôndrias (m) ao redor. Notar também presença de desmossomos (d).

Figura 80 – Eletromicrografias de átrio do coração de embrião bovino (fiv). Idade gestacional de 44 dias (CR de 30,5 mm / Peso - 2,556 g)

5.4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão: Embriões Provenientes de Transferência Nuclear (TN)

No 68º dia de gestação (CR de 53,3 mm), o pulmão de feto bovino apresenta brônquio com células epiteliais contendo núcleo que acompanham seu formato e ausência de matriz extracelular, camada de músculo liso situado no tecido conjuntivo acompanha a circunferência de tecido epitelial que constitui o brônquio. As células pulmonares localizam-se próximas umas as outras, seus núcleos são arredondados, presença de centríolo, cisterna de golgi, mitocôndria, retículo endoplasmático rugoso e desossomos (Figuras 81 e 82).

Legenda: A, B e C, brônquio pulmonar: camada de epitélio (ep) forma uma circunferência originando a luz do brônquio (lu), células epiteliais contém núcleos que acompanham seu formato e ausência de matriz extracelular. Entre o epitélio (ep) e tecido conjuntivo (tc) visualizamos a lâmina basal (L). Camada de músculo liso (mm) e vaso sanguíneo (v) estão presentes na região de tecido conjuntivo (tc).

Figura 81– Eletromicrografias de pulmão de feto bovino (clone). Idade gestacional de 68 dias (CR de 53,3 mm / Peso – 9,545 g)

Legenda: A, B e C, Célula pulmonar apresentando proximidade entre membranas (mb), núcleos arredondados (n), centríolos (ct), complexo de golgi (cg), mitocôndrias (m), retículo endoplasmático rugoso (r), extensa área de desmossomos (d). Note que em B e C o citoplasma (ci) da célula apresenta coloração mais acinzentada.

Figura 82 – Eletromicrografias de pulmão de feto bovino (clone). Idade gestacional de 68 dias (CR de 53,3 mm / Peso – 9,545 g)

6 DISCUSSÃO

Do epitélio surge o ectoderma que forma o âmnio, o embrião e as células da linha primitiva, o processo notocordal e o endoderma do embrião. O hipoblasto é responsável pela formação do endoderma que reveste o saco vitelino primitivo e de parte do mesoderma extra-embriônico (MOORE; PERSAUD, 2004), constituindo desta forma as três camadas germinativas, sendo que a mesodérmica desempenhará um papel fundamental na organização dos eixos do corpo, dando surgimento ao sistema circulatório dentre outras estruturas (WEINSTEIN, 2005).

Ao avaliarmos a formação e desenvolvimento dos embriões juntamente de suas estruturas e anexos embrionários, pudemos notar algumas diferenças quanto à morfologia quando comparadas as técnicas de IATF, FIV e TN, que talvez seja justificada por alterações celulares ocorridas no início da organogênese.

Embriões, fetos, placenta e bezerro podem diferenciar-se substancialmente em relação à sua morfologia e desenvolvimento quando comparados com embriões *in vivo*, apresentando aumento no tempo gestacional, defeitos gastrointestinais, cardiopulmonares, malformação do esqueleto, mortalidade pré-natal, maior frequência de fetos machos, edema fetal, alteração no crescimento dos órgãos, incluindo coração, encéfalo, medula espinal e músculo esquelético, esteatose do fígado, além dos parâmetros bioquímicos anormais (BEHBOODI et al., 1995; GARY et al., 1996; WELLS; MISICA; TERVIT, 1999; SOUSA et al., 2001; BERTOLINI; ANDERSON, 2002; FARIN; FARIN; PIEDRAHITA, 2004; HOFFERT et al., 2005; CHAVATTE-PALMER et al., 2004; CHAVATTE-PALMER et al., 2006; FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006; DROST; 2007; LONERGAN et al., 2007; MATSUZAKI; SHIGA, 2002; OGURA et al., 2002; SAKAI et al., 2005; WAKAYAMA; YANAGIMACHI, 2002). No entanto, disfunções relacionadas a restrições protéicas são descritas por Perry et al. (1999) e Murakami et al. (2006) e acreditam não causar alteração de peso no feto a termo, nas membranas e no número de cotilédones.

Com relação ao desenvolvimento e morfologia do saco vitelino, verificamos diferenças marcantes, pois embriões IATF ao 25º dia de gestação apresentam a membrana vitelina partindo da porção ventral do embrião, com formato em T, alongado, translúcido, com presença de vasos sanguíneos que também partem da porção ventral, ao centro, e se ramificam em finos capilares. As mesmas características foram constatadas para os embriões FIV, confirmando os achados de

Evans e Sack (1973) ao descreverem a presença do saco vitelino em embriões bovinos aos 22 dias de idade gestacional.

De acordo com Moore e Persaud (2004) e Winters, Green e Constock (1942) o hipoblasto prolifera ventralmente ao epiblasto passando a revestir internamente a cavidade blastocística constituindo o saco vitelino. Provavelmente, esta atividade celular não ocorre normalmente em embriões clonados, uma vez que encontramos o saco vitelino com características peculiares, onde o mesmo conectava-se ventralmente ao embrião, no entanto seu formato assemelhava-se a uma bexiga, sua coloração apresenta-se amarela escura e a subdivisão em T continha extremidades reduzidas.

Tal fato foi observado em embriões provenientes de TN com idade gestacional de 32 e 36 dias de gestação, levando-nos a acreditar que esta anormalidade ocorra em função de comunicação celular e transferência gênica incorreta no início do desenvolvimento, acarretando todo o restante do processo de formação, uma vez que o intestino primitivo se desenvolverá a partir de migração de células do saco vitelino, e posteriormente septará para formação do sistema respiratório inferior, sistema esse que apresenta complicações pré e pós-natais, diferenciando-se substancialmente em sua morfologia e desenvolvimento quando comparados com embriões *in vitro* (WELLS; MISICA; TERVIT, 1999; SOUSA et al., 2001; MATSUZAKI; SHIGA, 2002; OGURA et al., 2002; WAKAYAMA; YANAGIMACHI, 2002; BERTOLINI et al., 2004; CHAVATTE-PALMER et al., 2004; HOFFERT et al., 2005; SAKAI et al., 2005; CHAVATTE-PALMER et al., 2006; FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006; DROST, 2007; LONERGAN et al., 2007).

Ao passo que a gestação progride, em embriões IATF e FIV a partir dos 30 dias de gestação, o saco vitelino passa a ter coloração amarela escura, torna-se enovelado e justaposto a membrana amniótica, iniciando seu processo de regressão, uma vez que sua função de nutrição começará a ser suprida via placenta e sua função hematopoiética diminui, estando os órgãos em estágio de desenvolvimento mais avançados e a circulação sanguínea entre mãe e feto se estabelecendo.

Assis Neto (2009) descreveu o desenvolvimento placentário em bovinos e verificou que o saco vitelino está localizado na cavidade exocelomática, na porção central do embrião, próximo ao cordão umbilical, permanecendo conectado ao intestino posterior do embrião e suas extremidades alongam-se acompanhando o

alantóide ventralmente, persistindo até os 70 dias medindo 0,30 cm. Discordamos de tal descrição em relação à persistência do saco vitelino, uma vez que sua mensuração no 45º dia de gestação em embriões IATF, FIV e Clones eram inferiores a 0,5 cm, estando justaposto ao âmnio, com coloração amarela escura. Em fetos clonados com 68 dias de gestação não estava presente saco vitelino.

Aos 15 e 20 dias de gestação, os sacos gestacionais ocupavam ambos os cornos uterinos, o cório apresentava-se como a membrana mais externa, desprovida de formações cotiledonárias e de vasos sanguíneos sob a superfície. O alantóide encontrava-se transparente e completamente separado do cório e do âmnio, com poucos vasos próximos a face ventral do embrião e a membrana amniótica mostrava-se transparente, lisa e desprovida de vasos na sua superfície, formando uma delgada película envolvendo o embrião (ASSIS NETO, 2009). Complementamos tal descrição ao encontrarmos início de vascularização na membrana amniótica de embriões IATF com idade gestacional de 40 dias e embriões FIV com idade gestacional de 36 dias.

Ao mesmo tempo, as membranas embrionárias se diferenciam para formação da placenta, que de acordo com Anthony et al. (1995) e Luther et al. (2007) trata-se de um órgão múltiplo, diretamente responsável pela mediação e modulação do ambiente materno para o desenvolvimento normal do feto, sendo um órgão ativo, com capacidade de sintetizar e secreta uma gama de proteínas e hormônios esteróis, fatores de crescimento e outras moléculas bioativas. Provavelmente, embriões clones apresentam inúmeras alterações placentárias devido às falhas presentes durante o período embrionário.

Verificamos que as formações cotiledonárias se iniciam a partir do 45º dia de gestação nos embriões bovinos oriundos de IATF e FIV, pois anteriormente a este período, observamos membrana coioalantóide iniciando processo de vascularização, onde os vasos partiram do cordão umbilical e se ramificaram por toda membrana, ao passo que a gestação evoluía. Diferentemente das gestações de TN, que apresentam menor evolução na vascularização quando comparadas aos outros embriões de mesma idade, explicando os achados de Hill et al. (2000); Hill et al (2001) e Batchelder et al. (2007) ao descreverem que as placentas dos animais clonados apresentam desenvolvimento rudimentar, contendo epitélio trofoblástico cubóide, reduzida vascularização e pequenas áreas cotiledonárias com partes hemorrágicas, no entanto, Sousa et al. (2001) acreditam que a alta insuficiência

placentária e a incidência de retardo no desenvolvimento não se associam as alterações cromossômicas oriundas das técnicas de TN.

A membrana amniótica aparece nos embriões por volta do 18º dia de gestação (EVANS; SACK, 1973) e a partir daí se desenvolvem juntamente da formação e acúmulo do líquido amniótico. Comprovamos os descritos pelos autores acima para embriões provenientes de IATF, FIV e TN, e complementamos ainda que alguns embriões clones apresentam âmnio e líquido amniótico de coloração avermelhada, semelhante a extravasamento sanguíneo.

Outra alteração por nós encontrados foi a presença de membrana e líquido amniótico, de aspecto gelatinoso e vascularização ausente em embrião com 40 dias de gestação, o qual deveria apresentar membrana vascularizada e estabelecida para o início das formações cotiledonárias e posterior formação dos placentônios. De acordo com Lanza et al. (2000) e Tveden-Nyborg et al. (2005) o atraso ou modificações em relação a formação das membranas extra embrionárias, principalmente âmnio e alantóide, são cruciais pra continuidade do desenvolvimento.

Tveden-Nyborg et al. (2005) concluem ainda que embriões provenientes de FIV e TNCS apresentam desenvolvimento mais lento que embriões *in vivo*, prejudicando o fenômeno da placentação, explicando a alta perda gestacional relacionada às técnicas. Acredita-se que as disfunções na placentação em gestações de TNCS resultem em aberrações nas expressões gênicas devido à necessidade de proliferação, diferenciação e função das células trofoblásticas (ARNOLD et al., 2006). As Células Trofoblásticas Binucleadas (CTB) são consideradas uma peça chave para o desenvolvimento da implantação, placentação e comunicação materno-fetal, e uma alteração na proliferação e diferenciação destas resulta em um defeito na transcrição de um determinado gene relacionado à gestação nos bovinos clonados (PATEL et al., 2004).

No entanto, em nossos estudos verificamos uma sincronia no desenvolvimento de embriões IATF e FIV, e confirmamos os achados de Winters, Green e Constock (1942); Duplessis (1970) e Evans e Sack (1973) diferentemente para algumas gestações de TN, para embriões de 32 dias (CR 13,0 mm) e 36 dias (CR 14,0 mm), que macroscópica e morfológicamente tornava-se difícil distinguir região cranial e caudal e desenvolvimento das estruturas externas do embrião.

Ao realizarmos análise microscópica nesses embriões, através de histologia, notamos a dificuldade de visualização das estruturas internas, com fígado ocupando

quase que por completo a cavidade abdominal, justificando os problemas apresentados por bezerros recém nascidos, como esteatose do fígado, alteração no crescimento dos órgãos e parâmetros bioquímicos anormais (BERTOLINI, ANDERSON, 2002; CHAVATTE-PALMER et al., 2004; FARIN, FARIN, PIEDRAHITA, 2004; HOFFERT et al., 2005; CHAVATTE-PALMER et al., 2006; FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006; DROST, 2007; LONERGAN et al., 2007), caso a gestação seja levada a termo.

Desta maneira, há descritos que a eficiência global da clonagem na espécie bovina está limitada a 5 – 6% no máximo (WELLS et al., 2004) e dos 30 aos 60 dias de prenhes a mortalidade pode ocorrer em 50 – 100% nas gestações (HILL et al., 1999; EDWARDS et al., 2003).

Acreditamos tratar-se de um período crítico por haver uma relação “mais intensa” entre mãe e embrião/feto, pois é nesta fase que se torna necessário, agora mais que antes, o bom e normal funcionamento do coração do embrião, para realização das trocas materno embrionária/fetal. Uma falha nesse processo, juntamente a formação da placenta levará o embrião/feto a óbito, seguido de aborto.

Estudamos a formação do coração e realizamos um comparativo entre embriões provenientes de IATF, FIV e TN. Verificamos que embriões IATF e FIV com idade gestacional entre 24 – 25 dias já apresentam área cardiogênica, início de batimentos cardíacos e coração ainda em diferenciação para constituição de dois átrios e dois ventrículos, confirmando os achados de Noden, De Lahunta (1990); Moore e Persaud (2004) e Moore, Persaud e Shiota (2002) ao descreverem que as células mesenquimais derivadas do mesoderma esplâncnico prolifera-se formando aglomerados celulares isolados, dando origem aos tubos endoteliais que se unem formando o sistema cardiovascular primitivo, tornando-se evidente aos 18 dias e iniciando a pulsação aos 22 – 23 dias.

Na área cardiogênica de embriões IATF e FIV, até o período de 28 dias de gestação, as células mesenquimais se agregaram e se dispuseram em ambos os lados formando os cordões angioblásticos, que se canalizaram formando tubos cardíacos endocárdicos, os quais se aproximam um do outro e se fundem formando um único tubo endocárdico, e com isso o miocárdio primitivo forma-se do mesoderma esplâncnico. Após, células mesoteliais migram pra cobrir o miocárdio.

Quando o coração primitivo se dobra, o átrio e o seio venoso passam a situar-se dorsalmente ao tronco arterioso ao bulbo cardíaco e ao ventrículo

(MOORE; PERSAUD, 2004).

Abu-issa, Waldo e Kirby (2004) descrevem que as células miocárdias irão originar-se a partir do mesoderma esplâncnico, onde células mesenquimais diferenciam-se em cardiomiócitos, e talvez justifique nossos achados, quando observamos a presença de muitas mitocôndrias, núcleo ocupando grande parte da célula, retículo endoplasmático rugoso em grande quantidade, desmossomos e interdigitações de membrana.

Neste momento, a célula necessita de energia para produção das fibras musculares, justificando a presença das inúmeras mitocôndrias, além do que os “grandes núcleos” possuem envoltório poroso capazes de regular o intenso trânsito de macromoléculas entre núcleo e citoplasma, sendo responsáveis pela passagem de informação celular, transmitidas célula-célula através da presença de desmossomos, locais onde o citoesqueleto se prende a membrana celular formando um elo, e através das interdigitações de membrana, promovendo maior contato celular.

Aos 30/32 dias de gestação ocorre fusão total do coxim endocárdico átrio ventricular, completa separação do tronco aórtico e pulmonar e septação inicial do conus (VITUMS, 1981).

O mesmo foi observado em nossos resultados com embriões IATF e FIV, diferentemente de embriões clones, que aos 32 dias de gestação apresentaram átrio bem desenvolvido, com pequeno ventrículo, cone cardíaco e poucos vasos no tecido. Embrião no 36º dia de gestação o átrio apresentou-se bem reduzido e a formação das fibras musculares estava desorganizada comparada aos embriões provenientes de outras técnicas e de mesma idade. Já embrião clonado com 40 dias de gestação continha coração inserido na área cardiogênica, com tamanho um pouco maior em relação ao seu CR (7,5 mm), justificando os achados de Bertolini et al. (2004); Hoffert et al. (2005); Chavatte-Palmer et al. (2004); Chavatte-Palmer et al. (2006) e Farin, Piedrahita e Farin (2006) para embriões e fetos clonados.

Ao analisar um feto proveniente de TN com idade gestacional de 68 dias, observamos que o coração apresentava-se com pouca vascularização tecidual, explicando talvez a insuficiência cardiovascular de bezerros recém-nascidos.

Uma vez que a vasculogênese é falha neste processo de formação do coração, a mesma poderá estar interferindo no processo de formação da placenta referente à vascularização, assim também relatado por Robertson, Brosens e Dixon

(1967) e Vilas Boas et al. (2008) ao descreverem que a migração incompleta do trofoblasto explica a insuficiência placentária e a seqüência de eventos relacionados à má adaptação circulatória na gestação. A insuficiência vascular placentária parece decorrer de inadequada interação entre trofoblasto e tecidos uterinos, provocando alterações qualitativas e quantitativas nas arteríolas espiraladas do leito placentário, não ocorrendo a segunda onda de invasão trofoblástica. Com isso, ocorre redução no total de vasos que irrigam o espaço intervilosso, isquemia, liberação de citotoxinas e outras alterações que consolidam a agregação vascular, levando a redução do fluxo de troca materno-fetal no espaço intervilosso e manutenção do perfil hemodinâmico presente antes da gestação.

Hammond (1978) acrescenta ainda que o surgimento dos vasos possa estar correlacionado com a divisão da porção pulmonar e aórtica do saco aórtico.

O início do primórdio respiratório aparece no 28º dia de gestação nos humanos, com um sulco mediano na extremidade caudal da parede ventral da faringe primitiva, a fenda laringotraqueal, invaginando-se ao final da 4ª semana gestacional formando um divertículo respiratório saculiforme, o broto pulmonar (DUPLESSIS, 1970; CRELIN, 1976; PRINGLE, 1986; MOORE; PERSAUD, 2004). Verificamos que diferentemente dos humanos, a formação do divertículo pulmonar ocorre entre o 24º e 25º dia de gestação nos bovinos IATF e FIV, iniciando sua septação, o septo traqueoesofágico. Aos 28 dias o tubo já se dividiu em traquéia e esôfago, e a traquéia por sua vez inicia sua subdivisão caudal para formação dos brônquios principais.

Bryden, Evans e Binns (1972) afirmam que a divisão da porção caudal do divertículo respiratório forma os brotos pulmonares, o qual não ocorre por dicotomia, mas sim por ramificações colaterais. Ioannides et al. (2003) explica a existência de um gene denominado Sonic Hedgehog (Shh) que desempenha um papel de regulação germinativa dos órgãos a partir do endoderma do intestino primitivo, que provavelmente esteja atuando na separação entre traquéia e esôfago e nos brotamentos pulmonares, inclusive na formação do brônquio traqueal, característica da espécie bovina, o qual é independente dos brônquios principais, partindo da traquéia, cranialmente a sua bifurcação, com função de ventilação do lobo cranial direito no período pós natal.

Embriões bovinos provenientes de IATF, FIV e TN apresentam a formação dos brônquios principais simultaneamente a formação do brônquio traqueal no 30º

dia de gestação. Assim como Hislop (2002), verificamos que os brotos pulmonares ramificados contêm mesênquima circundante seguido de expansão mesenquimal, com finalidade de formar os lobos segmentares. Regiões mais próximas aos brotamentos brônquicos o mesênquima encontra-se condensado e regiões mais afastadas mesênquima frouxo.

O estágio prematuro estende a proliferação dos tubos gerando um sistema de ramificação estabelecendo o modelo do órgão maduro (PETERS et al., 1994; CARDOSO, 1995). O mesênquima condensado que envolve a árvore brônquica originará os tecidos (cartilagem, músculo liso) já o mesênquima frouxo originará tecido conjuntivo (LOBO, 1966).

Em análise ultraestrutural, o tecido pulmonar de embriões com 44 dias de gestação apresentou epitélio brônquico contendo núcleos de formatos irregulares, retículo endoplasmático rugoso, vacúolos e fibras colágenas próximas a lâmina basal, contradizendo Wessels (1970) ao afirmar que as fibras colágenas raramente são visualizadas ao microscópio eletrônico.

As células mesenquimais apresentam prolongamentos de membrana, além da presença de desmossomos necessários para formação do citoesqueleto, que se prende a membrana celular, nos levando a acreditar que esteja ocorrendo intensa comunicação celular, local de transmissão das informações, que passam de célula a célula, gerando os fatores indutores responsáveis pelo desenvolvimento do órgão.

Caplan (1991); Gilbert (1994) e Inui (2003) descrevem ser o mesênquima o responsável pela especificidade de indução no ectoderma e desenvolve-se de acordo com a região que o mesoderma ocupava. O mesênquima tem um papel instrutivo pelos genes em resposta as células e sua especificidade regional de indução é crítica durante o desenvolvimento do sistema respiratório, pois quando isolado e cultivado o epitélio respiratório de maneiras diferentes foi observado grande maleabilidade, diferenciando-se de acordo com as instruções mesenquimais fornecidas, tratando-se de um elemento chave para um desenvolvimento normal.

Simultaneamente a organogênese pulmonar ocorre o desenvolvimento de conexões vasculares (BURRI, 1984). Até os 28 dias gestacionais, os grupos de células endoteliais estão fundidos ao redor do mesênquima no divertículo ventral. Aos 34 dias de gestação, o plexo capilar circunda os dois brotos pulmonares, estando em conexão com artérias e veias pulmonares (HISLOP, 2002), explicando, portanto a grande necessidade dos estudos relacionados ao desenvolvimento do

sistema cardiorespiratório, e com isso podermos aprofundar nossas pesquisas e correlacioná-las a possíveis falhas genéticas que estejam ocorrendo durante a organogênese de embriões provenientes de técnicas de manipulação.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados deste trabalho, pôde-se concluir que falhas ocorridas durante o processo de formação e desenvolvimento embrionário causam anormalidades pré e/ou pós natais relacionadas tanto a organogênese quanto a formação dos anexos embrionários e placenta.

Apesar do avanço tecnológico traduzido pela clonagem animal, há ainda muitas falhas neste processo, as quais freqüentemente levam a perdas embrionárias ou ao nascimento de animais com deficiências respiratórias e placentárias.

As disfunções cardiorespiratórias e placentárias encontradas nos embriões/fetos bovinos provenientes de FIV e TN não ocorreram simplesmente durante a formação dos órgãos, mas provavelmente por alterações cromatínicas que conduzem a uma mudança de expressão genética, a qual ocorre nos primeiros dez dias do desenvolvimento, vindo a comprometer todo o restante da gestação.

REFERÊNCIAS

- ABU-ISSA, R.; WALDO, K.; KIRBY, M. L. Heart fields: one, two ou more? **Developmental Biology**, v. 272, p. 281-285, 2004.
- ALEXOPOULOS, N. I.; MADDOX-HYTTEL, P; TERCILIOGLOU, R.T.; RUDDOCK-D'CRUZ, N.; MADOX-HYTTEL, P. Stereomicroscopic and histological examination of bovine embryos following extended in vitro culture. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, p. 799-808, 2005.
- ALVES, D. F.; RAUBER, L. P.; RUBIN, F. B. Desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Brazilian Journal Veterinary of Animal Science**, v. 40, n. 4, p. 279-286, 2003.
- ANTHONY, R. V.; PRATT, S. L.; LIANG, R.; HOLLAND, M. D. Placental fetal hormonal interactions: impact on fetal growth. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1861-1871, 1995.
- ARNOLD, D. R.; BORDIGNON, V.; LEFEBVRE, R.; MURPHY, B. D.; SMITH, L. C. Somatic cells nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. **Reproductive and Fertility**, p. 1470-1626, 2006.
- ARNOLD, D. R.; FORTIER, A. L.; LEFEBVRE, R.; MIGLINO, M. A.; PFARRER, C.; SMITH, L. C. Placental insufficiencies in cloned animals – a workshop report. **Placenta**, v. 22, p. S108-S110, 2008.
- ARTHUR, G. H. **Reprodução e obstetrícia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 1979. 573 p.
- ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, F. T. V.; SANTOS, T. C.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Morpho-physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. **Reproduction of Domestic Animals**, p. 1-13, 2009.
- BARNES, F. L. The effects the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. **Theriogenology**, v. 53, p. 649-658, 2000.
- BARON, M. H. Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. **Experimental hematology**. v. 31, n. 12, p. 1160-1169, 2003.
- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T. BERBER, R. C. A.; VALENTIM, R.; CARVALHO FILHO, A. F.; COSTA NETO, W. P. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo “Ovsynch” para inovulação em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 96-106, 2003.
- BATCHELDER, C. A.; BERTOLINE, M.; MANSON, J. B.; MOYER, A. L.; HOFFERT, K. A.; PETKOV, S. G.; FAMULA, T. R.; ANGELOS, J.; GEORGE, L. W.;

ANDERSON, G. B. Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, n. 1, p. 63-81, 2007.

BEHBOODI, E.; ANDERSON, G. B.; BONDURANT, R. H.; CARGILL, S. L.; KREUSCHER, B. R.; MEDRANO, J. F.; MURRAY, J. D. Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 44, p. 227-232, 1995.

BERTOLINI, M.; ANDERSON, G. B. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology**, v. 57, p. 181-187, 2002.

BERTOLINI, M.; MASON, J. B.; BEAM, S. W.; CARNEIRO, G. F.; SWEEN, M. L.; KOMINEK, D. J.; MOYER, A. L.; FAMULA, T. R.; SAINZ, R. D.; ANDERSON, G. B. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. **Theriogenology**, v. 58, n. 5, p. 973-994, 2002.

BERTOLINI, M.; MOYER, A. L.; MASON, J. B.; BATCHELDER, C. A.; HOFFERT, K. A.; BERTOLINI, L. R.; CARNEIRO, G. F.; CARGILL, S. L.; FAMULA, T. R.; CALVERT, C. C.; SAINZ, R. D.; ANDERSON, G. B. Evidence of increased substrate availability to in vitro-derived bovine fetuses and association with accelerated conceptus growth. **Reproduction**, v. 128, p. 341-354, 2004.

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

BORDINGNON, V. Clonagem animal por transferência nuclear: Avanços e desafios. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 31, p. 64-73, 2003. Supplement.

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

BRYDEN, M. M.; EVANS, H.; BINNS, W. Embryology of the sheep. III the respiratory system, mesenteries and celom in the fourteen to thirty-four day embryo. **Anatomy Records**, v. 175, p. 725-736, 1972.

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

BURRI, P. H. Fetal and postnatal development of the lung. **Annual Review of Physiology**, v. 46, p. 617-628, 1984.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, p. 641-650, 1991.

CARDOSO, W. V. Transcription factors and pattern formation in the developing lung. **American Journal of Physiology**, v. 269, p. L429-L442, 1995.

CARZETA, S. M. M.; MIGLINO, M. A.; MARQUES, R. S.; VULCANO, M.; PEREIRA, F. T. V. Caracterização das áreas hemófagas da placenta bovina. **Pesquisa Brasileira Veterinária**, v. 27, n. 6, p. 229-235, 2007.

CHAVATTE-PALMER, P.; REMY, D.; CORDONNIER, N.; RICHARD, C.; ISSENMAN, H.; LAIGRE, P. Review: health status of cloned cattle at different ages. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 94-100, 2004.

CHAVATTE-PALMER, P.; SOUSA, N.; LAIGRE, P.; CAMOUS, S.; PONTER, A. A.; BECKERS, J. F.; HEYMAN, Y. Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. **Theriogenology**, v. 66, p. 829-840, 2006.

CONSTANT, F.; GUILLOMOT, M.; CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; BERTHELOT, V.; CAMOUS, S.; TURBE, A.; RENARD, J. P. Structural and functional studies on placenta of bovine somatic clones. **Placenta**, a. 37, p. 114, 2003.

CONSTANT, F.; GUILLOMOT, M.; HEYMAN, Y.; VIGNON, X.; LAIGRE, P.; SERVELY, J. L.; RENARD, J. P.; CHAVATTE-PALMER, P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 122-130, 2006.

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

CURRAN, S.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 10 through 20. **The Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 190, n. 10, p. 1289-1293, 1986.

DAVIES, C. J.; HILL, J. R.; EDWARDS, J. L.; SCHRICH, F. N.; FISHER, P. J.; ELDRIDGE, J. A.; SCHLAFFER, D. H. Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 267-280, 2004.

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

DROST, M. Complications during gestation in the cow. **Theriogenology**, v. 68, p. 487-491, 2007.

DUPLESSIS, H. **Embriologia**: cuadernos practicos. 1. ed. Barcelona: [s.n.], 1970. v. 3, 144 p.

EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; MCCracken, M. D.; VAN AMSTEL, S. R.; HOPKINS, F. M.; WELBORN, M. G.; DAVIES, C. J. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, p. 113-123, 2003.

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

FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses in vitro-produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 53-62, 2004.

FARIN, P. W.; FARIN, C. E. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 676-682, 1995.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 178-191, 2006.

FIELD, E. J. The early development of the sheep heart. **Journal of Anatomy**, v. 80, p. 75-87, 1977.

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

GATTONE, V. H.; MORSE, D. E. Pleuroperitoneal canal closure in the rat. **The Anatomy Records**, v. 208, p. 445-460, 1984.

GILBERT, S. F. **Developmental biology**. 4. ed. Massachusetts: Sinawer Associates, 1994. 894 p.

GITLER, A. D.; LU, M. M.; JIANG, Y. Q.; EPSTEIN, J. A.; GRUBER, P. J. Molecular markers of cardiac endocardial cushion development. **Developmental Dynamics**, v. 228, p. 643-650, 2003.

GOOTWINE, E. Placental hormones and fetal-placental development. **Animal Reproduction Science**, v. 83, p. 551-566, 2004.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 4. ed. Barueri: Manole, 1982. 720 p.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. 513 p.

HAMMOND, W. S. The developmental transformation of the aortic arches in the calf (*Bos taurus*), with especial reference to the formation of the arch of the aorta. **The American Journal of Anatomy**, v. 62, n. 1, p. 149-176, 1978.

HASHIZUME, K.; ISHIWATA, H.; KIZAKI, K.; YAMADA, O.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; PATEL, O. V.; AKAGI, S.; HIRASAWA, A.; TSUJIMOTO, G.; TODOROKI, J.; IZAIKE, Y. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. **Cloning and Stem Cells**, v. 4, n. 3, p. 197-209, 2002.

HAVE-OPBROEK, A. A. W. The development of the lung in mammals: an analysis of

concept and findings. **The American Journal of Anatomy**. v. 162, p. 201-219, 1981.

HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LAZZARI, G.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIGNON, X.; GALLI, C. Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: preliminary results. **Cloning and Stem Cells**. v. 6, n. 2, p. 111-120, 2004.

HILFER, S. R. Morphogenesis of the lung: Control of Embryonic and Fetal Branching. **Annual Review of Physiology**, v. 58, p. 93-113, 1996.

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T. E.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1787-1794, 2000.

HILL, J. R.; EDWARDS, J. F.; SAWYER, N.; BLACKWELL, C.; CIBELLI, J. B. Placental anomalies in a viable cloned calf. **Cloning**, v. 3, n. 2, p. 83-88, 2001.

HILL, J. R.; ROUSELL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetus (13 case studies) **Theriogenology**, v. 51, n. 8, p. 1451-1465, 1999.

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

HOFFERT-GOERES, K. A.; BATCHELDER, C. A.; BERTOLINE, M.; MOYER, A. L.; FAMULA, T. R.; ANDERSON, G. B. Angiogenesis in day-30 bovine pregnancies derived from nuclear transfer. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, n. 4, p. 595-607, 2007.

IOANNIDES, A. S.; HEDERSON, D. J.; SPITZ, L.; COPP, A. J. Role of sonic hedgehog in the development of the trachea and oesophagus. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 38, p. 29-36, 2003.

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

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

KINGDOM, J.; HUPPERTZ, B.; SEAWARD, G.; KAUFMANN, P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. **Obstetrics e Gynecology**, v. 92, p. 35-43, 2000.

LANGSTON, C.; KIDA, K.; REED, M.; THURLBECK, W. M. Human lung growth in late gestation and in the neonate. **American Review of Respiratory Disease**, v. 129, p. 607-613, 1984

LANZA, R. P.; CIBELLI, J. B.; DIAZ, F.; MORAES, C. T.; FARIN, P. W.; FARIN, C. E.; HAMMER, C. J.; WEST, M. D.; DAMIANI, P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. **Cloning**, v. 2, n. 2, p. 79-90, 2000.

LARSEN, W. J. **Human embryology**. 2. ed. Churchill Lurmgstone: [s. n.], 1997. 512 p.

LEE, R. S. F.; PETERSON, A. J.; DONNISON, M. J.; RAVELICH, S.; LEDGARD, A. M.; LI, N.; OLIVER, J. E.; MILLER, A. L.; TUCKER, F. C.; BREIER, B.; WELLS, D. N. Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1-11, 2004.

LEISER, R.; KREBS, C.; KLISCH, K.; EBERT, B.; DANTZER, V. Placental vascular corrosion cast studies: a comparison between ruminants and humans. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, p. 76-87, 1997a.

LEISER, R.; KREBS, C.; KLISCH, K.; EBERT, B.; DANTZER, V.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B. Fetal villosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation. **Journal of Anatomy**, v. 191, p. 517-527, 1997b.

LOBO, B. A. **Noções básicas de embriologia humana**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1966. 318 p.

LOI, P.; CLINTON, M.; VACKOVA, I.; FULKA JR., J.; FEIL, R.; PALMIERI, C.; SALDA, L. D.; PTAK, G. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. **Theriogenology**, v. 65, p. 1110-1121, 2006.

LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; BOLAND, E.; RIZOS, D.; FAIR, T.; DUFFY, P.; SUNG, L. Y.; DU, F.; CHAUBAL, S.; XU, J.; YANG, X.; TIAN, X. C. Pregnancy and fetal characteristics after transfer of vitrified in vivo and cloned bovine embryos. **Theriogenology**, v. 68, p. 1128-1137, 2007.

LUTHER, J.; MILNE, J.; AITKEN, R.; MASATOSHI, M.; LAWRENCE, R.; REDMER, K.; WALLACE, J. Placental growth, angiogenic gene expression, and vascular development in undernourished adolescent sheep. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 35-357, 2007.

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

MARQUES JUNIOR, A. P.; BARRETO FILHO, J. B.; SATURNINO, H. M. Aspectos morfológicos da placenta de vacas zebu (*Bos taurus indicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 45, n. 2, p. 213-219, 1993.

MATSUZAKI, M.; SHIGA, K. Endocrine characteristics of cloned calves. **Cloned Stem Cell**, v. 4, p. 261-267, 2002.

McEVOY, T. G. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 38, p. 268-275, 2003.

McEVOY, T. G.; ALINK, F. M.; MOREIRA, V. C.; WATT, R. G.; POWELL, K. A. Embryo technologies and animal health – consequences for the animal following ovum pick-up, in vitro embryo production and somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 65, p. 926-942, 2006.

McEVOY, T. G.; ROBINSON, J. J.; SINCLAIR, K. D. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. **Reproduction**, v. 122, p. 507-518, 2001.

MEIRELLES, F. V.; PROVIDELO, F. D.; PERECIN, F.; MERIGHE, G. K. F.; FERREIRA, C. R.; FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P.; MIRANDA, M. S.; CHIARATTI, M. R.; BEM, T. H. C. Transferência de núcleo: potenciais aplicações no controle genético nuclear e citoplasmático. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 382-390, 2007.

MIGLINO, M. A. **Pesquisa anatômica sobre artérias e veias do cordão umbilical, sua ramificação e disposição na placenta de bovinos**. 1991. Tese (Livro Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1991.

MIGLINO, M. A.; PEREIRA, F. T. V.; VISINTIN, J. A.; GARCIA, J. M.; MEIRELLE, F. V.; RUMPF, R.; AMBROSIO, C. E.; PAPA, P. C.; SANTOS, T. C.; CARVALHO, A. F.; LEISER, R.; CARTER, A. M. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, p. 604-607, 2007.

MIGLINO, M. A.; VERECHIA, F. T.; VISINTIN, J. A.; MELLO, M. R. B.; GARCIA, J. M.; YAMAZAKI, W.; AMBRÓSIO, C. E.; CARVALHO, A. F.; BRAGA, F. C.; SANTOS, T. C.; LEISER, R.; CARTER, A. M. Cloned cattle placentation: microvascular architecture and structure. **Acta scientiae veterinariae**, v. 31, 2003.

MILES, J. R.; FARIN, C. E.; RODRIGUES, K. F.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, P. W. Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1919-1926, 2004.

MINO, P.; KING, R. J. Epithelial-mesenchymal interactions in lung development. **Annual Review of Physiology**, v. 56, p. 13-45, 1994.

MONTENEGRO, M. A.; ROJAS, M. A. Transformación epitelio-mesenchimática durante el desarrollo embrionario. **Revista Chilena Anatomía**, v. 19, n. 3, p. 3-12, 2001.

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

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V.; SHIOTA, K. **Atlas colorido de embriologia clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 284 p.

MURAKAMI, M.; FERGUSON, C. E.; PEREZ, O.; BOEDIONO, A.; PACCAMONTI, D.; BONDOLI, K. R.; GODKE, R. A.; Transfer of inner cell mass cells derived from bovine nuclear transfer embryos into the trophoblast of bovine in vitro-produced embryos. **Cloning and Stem Cells**, v. 8, n. 1, p. 51-59, 2006.

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

NODEN, D. M.; DE LAHUNTA, A. **Embriología de los animales domésticos: mecanismo de desarrollo y malformaciones**. 1. ed. Zaragoza: Acribia, 1990. 399 p.

NUMABE, T.; OIKAWA, T.; KIKUCHI, T.; HORIUCHI, T. Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 64, p. 13-20, 2000.

OGURA, A.; INOUE, K.; OGONUKI, N. LEE, J.; KOHDA, T.; ISHINO, F. Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. **Cloning Stem Cells**, v. 4, p. 397-405, 2002.

O'RAHILLY, R.; MULLER, F.; HUTCHINS, G. M.; MOORE, G. W. Computer ranking of the sequence of appearance of 100 features of the brain and related structures in staged human embryos during the first 5 weeks of development. **American Journal of Anatomy**, v. 171, p. 243-257, 1984.

PATEL, O. V.; YAMADA, O.; KIZAKI, K.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; TAKAHASHI, S.; IZAIKE, Y.; SCHULER, L. A.; TAKEZAWA, T.; HASHIZUME, K. Expression of trophoblast cell-specific pregnancy-related genes in somatic cell-cloned bovine pregnancies. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1114-1120, 2004.

PERRY, V. E. A.; NORMAN, S. T.; OWEN, J. A.; DANIEL, R. C. W.; PHILLIPS, N. Low dietary protein during early pregnancy alters bovine placental development. **Animal Reproduction Science**, v. 55, p. 13-21, 1999.

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

PRINGLE, K. C. Human fetal lung development and related animal models. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 29, p. 502-513, 1986.

RAVELICH, S. R.; SHELLING, A. N.; RAMACHANDRAN, A.; REDDY, S.; KEELAN, J. A.; WELLS, D. N.; PETERSON, A. J.; LEE, R. S. F.; BREIER, B. H. Altered placental lactogen and leptin expression in placentomes from bovine nuclear transfer pregnancies. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1862-1869, 2004.

REICHENBACH, H-D.; ARNOLD, G. J.; BAUERSACHS, S.; BEIER, H. M. Morte embrionária na TE: redução através da melhor compreensão dos mecanismos da

comunicação materno-embrionária? **O Embrião**, Jaboticabal, n. 17, p. 3-6, 2003.

REYNOLDS, L. P.; MILLAWAY, D. S.; KIRSCH, J. K.; INFELD, J. E.; REDMER, D. A. Growth and in-vitro metabolism of placental tissues of cows from day 100 to day 250 of gestation. **Journal of Reproduction**, v. 89, p. 213-222, 1990.

RIBEIRO, A. A. C. M.; LACERDA, P. M. O.; MELO, M. P.; BALICIRO, J. C. C.; SOUSA, R. R. Placental microstructure and efficiency in cloned bovine: a design-based stereological approach. **Cell Tissues Research**, v. 333, p. 105-114, 2008.

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

ROBERTSON, W. B.; BROSENS, I.; DIXON, H. G. The pathological response of the vessels of the placental bed to hypertensive pregnancy. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 93, n. 2, p. 581-592, 1967.

RUMPF, R.; DODE, M. A. N.; FELICIANO SILVA, A. E. D. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. **III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal**, p. 248-253, 2002.

SADLER, T. W. **Jan langman**: embriologia médica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 347 p.

SAKAI, R. R.; TAMASHIRO, L. K.; YAMAZAKI, Y.; YANAGIMACHI, R. Cloning and assisted reproductive techniques: influence on early development and adult phenotype. **Birth defects research (Part C)**, v. 75, p. 151-162, 2005.

SOUSA, P. A. de; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L. E.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 23-30, 2001.

SPOONER, B. S.; WESSELLS, N. K. Mammalian lung development: interactions in primordium formation and bronchial morphogenesis. **Journal Experimental Zoology**, v. 175, p. 445-454, 1970.

STRINGFELLOW, D. A.; SERDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**: um guia de procedimentos e informações gerais para uso em tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários. 3. ed. [S. L.]: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999. 179 p.

SULIVAN, T. M.; MICKE, G. C.; MAGALHAES, R. S.; MARTIN, G. B.; WALLACE, C. R.; GREEN, J. A.; PERRY, V. E. A. Dietary protein during gestation affects circulating indicators of placental function and fetal development in heifers. **Placenta**, p. 1-7, 2009.

TADERERA, J. V. Control of lung differentiation in vitro. **Developmental Biology**, v. 16, p. 489-512, 1967.

TOBENAS-DUJARDIN, A. C.; DUPARE, F.; ALI, N.; LAQUERRIERE, A.; MULLER, J. M.; FREGER, P. Embryology of the internal carotid artery dural crossing: apropos of a continuous series of 48 specimens. **Surgery Radiology Anatomy**, v. 27, p. 495-501, 2005.

TVEDEN-NYBORG, P.; PEURA, T. T.; HARTWICH, K. M.; WALKER, S. K.; MADDOX-HYTTEL, P. Morphological characterization of pre and peri-implantation in vitro cultured, somatic cell nuclear transfer and in vivo derived ovine embryos. **Reproduction**, v. 130, p. 681-694, 2005.

TYLER, W. S. Small airways and terminal units: comparative subgross anatomy of lungs. **American Review of Respiratory Disease**, v. 128, p. S32-S37, 1983.

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

VILLAS BOAS, J. M. S.; MAESTÁ. I.; CONSONNI, M. Mecanismos de centralização: da insuficiência placentária à adaptação circulatória fetal. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, p. 1-13, 2008.

VITUMS, A. The embryonic development of the equine heart. **Anatomy, Histology and Embryology**, v. 10, p. 193-211, 1981.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v. 349, p. 369-374, 1998.

WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. **Nature Genetic**. v. 22, p. 127-128, 1999.

WATANABE, Y. F. **A fecundação *in vitro* e a reação acrossomal como critério de seleção para fertilidade em touros da raça Nelore**. 1998. 79 f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

WEINSTEIN, D. C. Mesodermal differentiation: signal integration during development. **Science**, v. 23, p. 299, 2005.

WELLS, D. N.; FORSYTH, J. T.; MCMILLAN, V.; OBACK, B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 101-110, 2004.

WELLS, D.; MISICA, P.; TERVIT, H. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 735-745, 1999.

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

WINTERS, L. M.; GREEN, W. W.; CONSTOCK, R. E. Prenatal development of the bovine. **Agriculture Experimental Sta Minnesota**, v. 50, p. 1-50, 1942.

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; ADAM, C. L. Structure and function in the ruminant synepitheliochorial placenta: central role of the trofoblasto binucleate cell in deer. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, p. 88-99, 1997.

YANAGIMACHI, R. Cloning: experience from the mouse and other animals. **Molecular and Cell Endocrinology**, v. 187, p. 241-248, 2002.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. I large offspring syndrome in cattle and sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 3, p. 155-163, 1998.

ANEXO A

Data da FIV	Laboratorio	Data da TE	Local	Dia	Mãe	Pai	Embrião	Receptora	Diagnóstico 08/04/2008
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Bx	35	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Mo	43	Vazia
14/03/2008	Pirassun	21/03/2008	Poços	D7	Abatedouro	Votrer (Nelore)	Bx I	46	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Mo	46	Vazia
14/03/2008	Pirassun	21/03/2008	Poços	D7	Abatedouro	Votrer (Nelore)	BI I	53	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	53	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	55	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Bx + Bx	88	Retoque
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Bi	99	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	100	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Holandesa	Votrer (Nelore)	Bx	104	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Bi	108	Vazia
14/03/2008	Pirassun	21/03/2008	Poços	D7	Abatedouro	Votrer (Nelore)	Be I	110	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	110	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Mo+Mo+Mo	114	Retoque
14/03/2008	Pirassun	21/03/2008	Poços	D7	Abatedouro	Votrer (Nelore)	Bx I	118	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	118	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Holandesa	Votrer (Nelore)	Bi	119	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Bx	120	Retoque
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Holandesa	Votrer (Nelore)	Mo I + Mo II	121	Vazia
14/03/2008	Pirassun	21/03/2008	Poços	D7	Abatedouro	Votrer (Nelore)	Be I	122	Retoque
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Bi	122	Retoque
14/03/2008	Pirassun	21/03/2008	Poços	D7	Abatedouro	Votrer (Nelore)	Bx I	125	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Mo	125	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Bx	127	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Holandesa	Votrer (Nelore)	Bi II + Mo I	129	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	130	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Mo	131	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Bi	132	Vazia
14/03/2008	Pirassun	21/03/2008	Poços	D7	Abatedouro	Votrer (Nelore)	Bx I	134	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Holandesa	Votrer (Nelore)	BI	134	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	135	Prenha
14/03/2008	Pirassun	21/03/2008	Poços	D7	Abatedouro	Votrer (Nelore)	Bx I	136	Retoque
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Mo +Mo	137	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Mo	138	Vazia
14/03/2008	Pirassun	21/03/2008	Poços	D7	Abatedouro	Votrer (Nelore)	Be I	140	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Bi	140	Prenha

14/03/2008	Pirassun	21/03/2008	Poços	D7	Abatedouro	Votrer (Nelore)	Bx I	142	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	142	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Holandesa	Votrer (Nelore)	Bi	142	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	143	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	144	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Mo	145	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Bi	148	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	149	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	150	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI	152	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Holandesa	Votrer (Nelore)	Bi	153	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Mo	154	Prenha
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	BI + BI	157	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Bx	158	Prenha
14/03/2008	Pirassun	21/03/2008	Poços	D7	Abatedouro	Votrer (Nelore)	Bx I	159	Vazia
15/03/2008	Cravinhos	21/03/2008	Poços	D6	Nelore	Score (Holandês)	Bi	159	Vazia

ANEXO B

Sessão	Manipa	Data TE	Passagem	% Fus	% Blast	Palheta	Número	Local TE	Dia	Embrião	Recep.	Diag 30d	Diag 60d
Experimento	4/3/2009	11/3/2009	2	85,7	13,3	1	1089	Mineirembrio	D7	Bx I	MT 279	V	-
Experimento	4/3/2009	11/3/2009	2	85,7	13,3	2	1090	Mineirembrio	D7	Bx I	MT 5156	V	-
Experimento	4/3/2009	11/3/2009	2	85,7	13,3	3	1091	Mineirembrio	D7	Bx I	MT 3444	V	-
Experimento	4/3/2009	11/3/2009	2	85,7	13,3	4	1092	Mineirembrio	D7	Bx II	MT 262	P	
Experimento	4/3/2009	11/3/2009	2	80,0	25,0	5	1093	Mineirembrio	D7	Bx I	MT 9727	V	-
Experimento	4/3/2009	11/3/2009	2	80,0	25,0	6	1094	Mineirembrio	D7	Bx I + Bx II	MT 3471	V	-
Experimento	4/3/2009	11/3/2009	2	80,0	25,0	7	1095	Mineirembrio	D7	Bx I	MT 2731	V	-
Experimento	4/3/2009	11/3/2009	2	80,0	25,0	8	1096	Mineirembrio	D7	Bx I + Bx II	MT 3159	V	-
Experimento	4/3/2009	11/3/2009	2	80,0	25,0	9	1097	Mineirembrio	D7	Bl I	MT 9091	V	-
Experimento	4/3/2009	11/3/2009	2	80,0	25,0	10	1098	Mineirembrio	D7	Bx II	MT 3448	V	-
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	28,0	1	1099	Mineirembrio	D7	Be I	W 997	V	-
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	28,0	2	1100	Mineirembrio	D7	Be I	W 1052	V	-
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	28,0	3	1101	Mineirembrio	D7	Bx I	W 1062	V	-
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	28,0	4	1102	Mineirembrio	D7	Bx I	W 1016	P	
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	28,0	5	1103	Mineirembrio	D7	Bx I + Bx II	W 868	V	-
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	28,0	6	1104	Mineirembrio	D7	Bx I	W 963	P	
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	28,0	7	1105	Mineirembrio	D7	Bx I	W 1024	V	-
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	21,4	8	1106	Mineirembrio	D7	Bx I	W 922	V	-
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	21,4	9	1107	Mineirembrio	D7	Bx I	W 851	V	-
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	21,4	10	1108	Mineirembrio	D7	Bx I	W 913	V	-
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	21,4	11	1109	Mineirembrio	D7	Bx I	W 1086	V	-
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	21,4	12	1110	Mineirembrio	D7	Be I	W 968	V	-
Experimento	7/3/2009	14/3/2009	1	65,8	21,4	13	1111	Mineirembrio	D7	Bl I	W 1082	V	-
Experimento	#####	18/3/2009	2	75,6	16,1	1	1112	Mineirembrio	D7	Bx I	MR 413	V	-
Experimento	#####	18/3/2009	2	75,6	16,1	2	1113	Mineirembrio	D7	Bx I	L 0783	V	-
Experimento	#####	18/3/2009	2	75,6	16,1	3	1114	Mineirembrio	D7	Bx I	L 0842	V	-
Experimento	#####	18/3/2009	2	75,6	16,1	4	1115	Mineirembrio	D7	Bx I	L 0892	V	-
Experimento	#####	18/3/2009	2	75,6	16,1	5	1116	Mineirembrio	D7	Bx I	MR 0381	V	-
Experimento	#####	18/3/2009	2	75,0	14,8	6	1117	Mineirembrio	D7	Bx I	MR 0606	V	-
Experimento	#####	18/3/2009	2	75,0	14,8	7	1118	Mineirembrio	D7	Bx I	L 0835	P	
Experimento	#####	18/3/2009	2	75,0	14,8	8	1119	Mineirembrio	D7	Bx I	MR 5008	V	-
Experimento	#####	18/3/2009	2	75,0	14,8	9	1120	Mineirembrio	D7	Bl I	L 0875	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	83,7	36,1	1	1121	Mineirembrio	D7	Bl I + Bx II	ML 8442	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	83,7	36,1	2	1122	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 9799	P	

Experimento	#####	25/3/2009	3	83,7	36,1	3	1123	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 2744	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	83,7	36,1	4	1124	Mineirembrio	D7	Be I	ML 9827	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	83,7	36,1	5	1125	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 9897	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	83,7	36,1	6	1126	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 0345	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	83,7	36,1	7	1127	Mineirembrio	D7	Bl I	ML 8443	P	
Experimento	#####	25/3/2009	3	83,7	36,1	8	1128	Mineirembrio	D7	Bl I	ML 0312	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	83,7	36,1	9	1129	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 2381	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	83,7	36,1	10	1130	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 9883	P	
Experimento	#####	25/3/2009	3	83,7	36,1	11	1131	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 9535	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	83,7	36,1	12	1132	Mineirembrio	D7	Bl I	ML 2482	P	
Experimento	#####	25/3/2009	3	84,8	30,8	13	1133	Mineirembrio	D7	Bi I + Bx II	ML 8884	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	84,8	30,8	14	1134	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 9315	P	
Experimento	#####	25/3/2009	3	84,8	30,8	15	1135	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 9978	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	84,8	30,8	16	1136	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 3081	P	
Experimento	#####	25/3/2009	3	84,8	30,8	17	1137	Mineirembrio	D7	Bl I	ML 9760	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	84,8	30,8	18	1138	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 7030	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	84,8	30,8	19	1139	Mineirembrio	D7	Bl I	ML 7008	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	84,8	30,8	20	1140	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 9185	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	84,8	30,8	21	1141	Mineirembrio	D7	Bl I	ML 9686	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	84,8	30,8	22	1142	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 2413	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	3	84,8	30,8	23	1143	Mineirembrio	D7	Bl I	ML 2430	V	-
Experimento	#####	25/3/2009	2	77,7	-	-	-	-	-	-	-		
Experimento	#####	25/3/2009	2	72,9	-	-	-	-	-	-	-		
Experimento	#####	25/3/2009	3	80,0	-	-	-	-	-	-	-		
Experimento	#####	25/3/2009	3	80,0	-	-	-	-	-	-	-		
Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	41,3	1	1144	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 908	V	-
Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	41,3	2	1145	Mineirembrio	D7	Be I + Bx II	ML 9694	V	-
Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	41,3	3	1146	Mineirembrio	D7	Be I + Bx II	ML 10986	V	-
Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	41,3	4	1147	Mineirembrio	D7	Be I + Bx II	ML 3066	V	-
Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	41,3	5	1148	Mineirembrio	D7	Be I + Bx II	ML 9734	V	-
Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	41,3	6	1149	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 867	V	-
Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	41,3	7	1150	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 3108	V	-
Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	30,0	8	1151	Mineirembrio	D7	Be I + Bx II	ML 9974	V	-
Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	30,0	9	1152	Mineirembrio	D7	Be I + Bx II	ML 5298	V	-
Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	30,0	10	1153	Mineirembrio	D7	Bx I	ML 8296	V	-

Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	30,0	11	1154	Mineirembrio	D7	Bx I + Bx II	ML 2867	V	-
Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	30,0	12	1155	Mineirembrio	D7	Bl I	ML 2761	V	-
Experimento	#####	4/4/2009	4	76,6	30,0	13	1156	Mineirembrio	D7	Bl I	ML 2490	V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	1	1157	Mineirembrio	D7	Bl I + Bl II		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	2	1158	Mineirembrio	D7	Bx I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	3	1159	Mineirembrio	D7	Be I	ML 2424	P	
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	4	1160	Mineirembrio	D7	Be I	ML 9994	P	
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	5	1161	Mineirembrio	D7	Be I	ML 9665	P	
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	6	1162	Mineirembrio	D7	Bx I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	7	1163	Mineirembrio	D7	Bx I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	8	1164	Mineirembrio	D7	Bx I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	9	1165	Mineirembrio	D7	Be I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	10	1166	Mineirembrio	D7	Bx I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	11	1167	Mineirembrio	D7	Be I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	12	1168	Mineirembrio	D7	Bl I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	13	1169	Mineirembrio	D7	Bx I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	14	1170	Mineirembrio	D7	Be I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	15	1171	Mineirembrio	D7	Be I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	16	1172	Mineirembrio	D7	Be I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	17	1173	Mineirembrio	D7	Be I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	18	1174	Mineirembrio	D7	Be I		V	-
Experimento	1/4/2009	8/4/2009	5	72,2	30,8	19	1175	Mineirembrio	D7	Be I		V	-