CELINA ALMEIDA FURLANETTO MANÇANARES

Análise morfológica da área de transição do intestino primitivo para o saco vitelino em embriões e fetos bovinos (24 a 50 dias de gestação)

São Paulo
2007

CELINA ALMEIDA FURLANETTO MANÇANARES

Análise morfológica da área de transição do intestino primitivo para o saco vitelino em embriões e fetos bovinos (24 a 50 dias de gestação)

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

Orientadora:
Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2007

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

8f
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
3/12/07

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1925
FMVZ

Mançanares, Celina Almeida Furlanetto

Análise morfológica da área de transição do intestino primitivo para o saco vitelino em embriões e fetos bovinos (24 a 50 dias de gestação) / Celina Almeida Furlanetto Mançanares. – São Paulo: C. A. F. Mançanares, 2007.
115 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2007.

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. Desenvolvimento embrionário. 2. Saco vitelino. 3. Intestino primitivo.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise morfológica da área de transição do intestino primitivo embrionário para o saco vitelino em embriões bovinos (10 - 60 dias)", protocolado sob o nº1072/2007, utilizando 50 (cinquenta) vacas, 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 17 de abril de 2007.

(We certify that the Research "Morphological analysis of transitional area of yolk sac primitive intestine in bovine embryos (10-60 days)", protocol number 1072/2007, utilizing 50 (fifty) cows, 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 the day 04/17/2007).

São Paulo, 23 de abril de 2007

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MANÇANARES, Celina Almeida Furlanetto

Título: Análise morfológica da área de transição do intestino primitivo para o saco vitelino em embriões e fetos bovinos (24 a 50 dias de gestação)

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: _____

CONTINUE ANDANDO

*Às vezes o caminhar é lento, mas o importante é não parar.
Mesmo um pequeno progresso é um avanço na direção certa.
E qualquer um é capaz de fazer um pequeno progresso.
Se você não pode conquistar algo importante hoje, conquiste algo menor.*

*Pequenos riachos se transformam em rios poderosos.
Continue em frente.*

*O que de manhã parecia fora do alcance, pode ficar mais próximo à tarde se você continuar em frente.
O tempo que usar trabalhando com paixão e intensidade aproximará você do seu objetivo.*

*É bem mais difícil começar de novo se você para completamente.
Então, continue em frente.
Não desperdice a chance que você mesmo criou.
Existe algo que pode ser feito agora mesmo, ainda hoje.*

*Pode não ser muito, mas fará com que você continue no jogo.
Caminhe rápido enquanto puder.
Caminhe lentamente quando for preciso.
Mas, seja o que for, continue andando.*

(Autor desconhecido)

Dedicatória

DEDICO,

DEUS, pela força e coragem para enfrentar tantos momentos difíceis. Obrigado PAI porque naquele momento de desânimo me lembrei que TU és meu PAI. Senhor haja sempre por mim, pois sou apenas um instrumento em suas mãos.

Aos meus pais: João Batista Furlanetto e Sebastiana Almeida Furlanetto pela educação, amor, carinho, compreensão e apoio, sempre incondicional, em todos os momentos da minha vida, por compartilharem meus melhores e meus piores momentos sempre com uma palavra de conforto e de estímulo. Devo a vocês tudo o que sou, porque sei que sempre procuraram fazer o que era melhor pra mim, mesmo que muitas vezes eu não os compreendesse. Vocês são maravilhosos. Amo vocês e serei eternamente grata.

Ao Ivan pela força, incentivo, carinho, tolerância e principalmente amor que foram fundamentais na nossa convivência ate hoje. Sem você nada disso seria possível. Te amo.

Aos meus filhos: Leonardo, Rafael e Vinícius que são os meus anjos, que me guiam, iluminam, irradiam e alegam todos os minutos de minha vida. Fiquei muitas horas, e dias longe de vocês, mas no meu pensamento vocês nunca ficaram distantes.
Agradeço todo instante pela família maravilhosa que Deus nos deu.

Ao meu sogro Miguel e minha sogra Isabel que acreditaram, incentivaram e me ajudaram para que este sonho se realizasse. Vocês são maravilhosos.

Aos meus irmãos: Marina e Fernando, por acreditarem em mim, e na minha ausência deram amor, carinho e cuidados com meus filhos. Amo vocês.

Ao Beto que me ensinou a dar o primeiro passo na vida acadêmica, incentivando e despertando a curiosidade pelo conhecimento. Se cheguei até aqui foi porque um dia você acreditou em mim.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora e amiga Dra. Maria Angélica Miglino, agradeço pela confiança mais uma vez depositada, pelo apoio, carinho, força e incentivo para que eu pudesse passar por mais essa fase. Adoro você.

À minha co-orientadora, amiga, companheira e querida Dra. Ana Flávia de Carvalho, mais uma vez quero te agradecer pela confiança, orientação e incentivo. Obrigada também por contribuir para meu crescimento profissional e pessoal, pelo respeito, atenção, carinho e amizade. Te adoro.

AGRADECIMENTOS

A UNIFEOP Centro Universitário Fundação de Ensino “Octávio Bastos” em especial João Octávio e João Flávio pela oportunidade, colaboração e credibilidade durante todos estes anos.

Aos professores do Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP: José Roberto Kfoury Jr.; Paula de Carvalho Papa; Antônio; Pedro Primo Bombonato; Francisco Henandez Blazquez; Augusto Coppi Maciel Ribeiro pelos seus sábios ensinamentos na nossa vida pessoal e profissional.

Ao querido professor Laiser, o meu muito obrigado por suas orientações durante sua estadia no Brasil.

Ao professor Zago e José Manoel, pelos seus ensinamentos.

Ao José Roberto por mais uma vez me aceitar como orientada por um período.

A Dona Terezinha pelo carinho e pelas suas orações.

Ao Caju e Daniele pelo carinho, confiança, hospitalidade, aconchego e disposição em sempre me ajudar.

A minha querida amiga e companheira Rita, por me ajudar e estar sempre presente nos momentos importantes de minha vida. Ao Ricardo também obrigado por tudo.

A minha querida amiga Miryan, que na hora do meu desespero em terminar a tese, se dedicou e me ajudou com muito carinho. Ao Hugo também pelo apoio, paciência e hospitalidade.

A minha amiga e companheira Alexandra, saudades daquela época que vivíamos juntas, nossos desesperos, alegrias, compras, passeios e trabalhos. Oh tempinho bom!

Ao meu grande amigo de sempre “André”, não poderia deixar de te agradecer em especial, pois você foi como um irmão, me acolhendo em todos os momentos que precisei.

Aos meus alunos e amigos Jussara, Ana Cláudia, Priscila, Leandro, Felipe, Tatiane Belatine, Juliana Casals, Mariane Martucci pela amizade, disposição e boa vontade em ajudar sempre que precisei.

Aos meus amigos: Phelipe, Cristiane, Gerlane, Adriana e João Morini, pela amizade, atenção, paciência, disposição, e incentivo.

*Aos meus queridos amigos e primos da “Prata” Lucimara, Eliana, Mazinha, Ana, Morão, Gustavo, e Nere
que sempre me apoiaram e incentivaram nesta jornada.*

*A nossa querida turma dos embriões Daniela, Fabiana, Evander pelo companheirismo, amizade,
convivência e troca de conhecimentos.*

*A Marina, Tatiana Carlesso, Assis, Flavinha, Rose, Patrícia, Ana Rita, Fernanda, Maran pelos Walkíria,
Emerson, seus conhecimentos, atenção, disposição e amizade.*

Ao Ricardo mais uma vez pela sua sincera amizade, auxílio na coleta de materiais e boa vontade de sempre.

Aos membros da banca examinadora pelas opiniões valiosas e preciosas para a finalização deste trabalho.

*Aos funcionários da FMVZ-USP, Ronaldo, Índio, Sandra, Diogo, e Gaspar pela amizade, disposição e
apoio.*

Aos funcionários da biblioteca, da FMVZ-USP, pelas correções das normas da tese.

Ao Maicon, Jaqueline e Cauê, pela ajuda e atenção sempre dispensada.

*Aos meus amigos do laboratório da UNIFEOD Dulce, Maria, Marquinho, Sorriso pelo apoio, amizade e
carinho durante o nosso convívio.*

A todos os colegas da Pós-graduação, pelos momentos que passamos juntos.

Ao Frigorífico Frigonossa- Poços de Caldas - MG pela colaboração na obtenção do material.

Ao CNPQ pelo financiamento deste trabalho.

Enfim a todos...meu MUITO OBRIGADA!

***“As pessoas entram em nossas vidas por acaso, mas não é por
acaso que elas permanecem.”***

Resumo

RESUMO

MANÇANARES, C. A. F. **Análise morfológica da área de transição do intestino primitivo para o saco vitelino em embriões e fetos bovinos (24 a 50 dias de gestação).** [Morphological analysis of the transition site of the primitive intestine to the yolk sac in bovine embryos and fetal (24 to 50 days pregnancy)]. 2007. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O saco vitelino é a principal fonte de nutrição do embrião durante o período em que a placenta verdadeira ainda não está completamente formada. É responsável pela hematopoiese, pois dele se desenvolvem os primórdios das células sanguíneas, bem como parte do sistema circulatório primitivo do embrião. Tivemos como objetivo caracterizar a área transicional do saco vitelino para o intestino primitivo através de análise macroscópica, microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e reação imunohistoquímica para detecção de células germinativas (Oct-4). Foram realizados cortes seqüenciais de todos os embriões para permitir a visualização da estrutura como um todo. Nas amostras obtidas, pudemos observar a presença do saco vitelino com a área de conexão com intestino primitivo composto por inúmeras ilhotas vasculares que correspondem aos vasos envolvidos pelas células vitelínicas e células mesenquimais. No interior dos vasos identificamos hemangioblastos em grande quantidade. A camada correspondente ao mesênquima é delgada e com células alongadas e endoderma da membrana vitelínica é composto por células endodérmicas, grandes, uni ou binucleadas. Tal arranjo celular se assemelha a uma glândula devido a sua arquitetura em ilhas vasculares somado às camadas teciduais. O epitélio do intestino primitivo inicia sua diferenciação com células colunares estratificadas e bordadura em escova seguido de células mesenquimais indiferenciadas. A área transicional entre o saco vitelínico e o intestino primitivo é estreita em relação à luz destas duas estruturas com células de formato irregular, constituindo um delicado revestimento no lúmen contendo hemangioblastos. No mesênquima da área transicional inúmeros e pequenos capilares foram observados com hemangioblastos em seu interior. Em embriões e fetos submetidos à imunohistoquímica, verificamos células reativas como o metanefro, gônadas, parênquima hepático e saco vitelino.

Palavras-chave: Desenvolvimento embrionário. Saco vitelino. Intestino primitivo.

Abstract

ABSTRACT

MANÇANARES, C. A. F. **Morphological analysis of the transition site of the primitive intestine to the yolk sac in bovine embryos and fetal (24 to 50 days gestation).** [Análise morfológica da área de transição do intestino primitivo embrionário para o saco vitelino em embriões e fetos bovinos (24 a 50 dias de gestação)]. 2007. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The yolk sac is the main source of embryo nutrition during the period that true placenta are not still formed and responsible by hematopoieses because from it were developed the blood cells, as a part of embryo primitive circulatory system. We aimed to characterize the transitional area between the yolk sac and the primitive intestine by light microscopy, transmission electron microscopy and detection of germ cell lines by Oct-4 immunohistochemistry. Were done in all embryos serial sections to permit the identification for all structures. Were possible identify the yolk sac connection with primitive intestine composed by many blood islet corresponding to relation with yolk and mesenchymals cells. Inside the vessels were identified hemangioblasts. The layer corresponding to mesenchyme is thin and with elongated cells and the vitellinic membrane endoderm is composed by large, uni or binucleate endodermic cells. This shape is similar to a gland related to their architecture, vessels islets and tissue layers. Primitive intestine epithelium begins their differentiation with stratified columnar cells and undifferentiated mesenchymals cells. This transitional area is thin related to their lumen with irregular shape and constituted by delicate lumen basement and hemangioblast. Inside the mesenchyme there are many smaller capillaries observed with hemangioblast in it. Embryos and fetus submitted to immunohistochemistry and were verified positive cells like metanefrons, gonads, hepatic parenchyma and yolk sac.

Key words: Development. Embryo. Yolk sac. Primitive intestine.

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados relacionados ao número dos embriões bovinos, Crown-Rump CR (cm), idade aproximada e referência utilizada60
- Tabela 2** - Dados relacionados ao número dos embriões bovinos, Crown Rump / CR (cm), idade aproximada e referência utilizada. São Paulo, 2007 ...61

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das quatro estruturas membranosas formadas durante os primeiros estágios de desenvolvimento embrionário e a participação da morfogênese placentária (Adaptado LAISER; KAUFMANN, 1994)	37
Figura 2 - Histogênese do epitélio intestinal: A fase inicial de proliferação e morfogênese epitelial; B, período intermediário de diferenciação celular e C, fase final de amadurecimento bioquímico e funcional das células epiteliais (Adaptado SANTA BÁRBARA et al., 2003)	50
Figura 3 - Fotografia em vista lateral esquerda de embriões bovinos	65
Figura 4 - Fotografia de embrião bovino em vista lateral, apresentando CR 0,4 cm (grupo I) com idade gestacional estimada entre 24/26 dia	68
Figura 5 - Fotografia de embrião bovino em vista lateral, apresentando CR de 0,9 cm (grupo II) com idade gestacional estimada entre 27/29 dias.....	69
Figura 6 - Fotografia de embrião bovino em vista lateral, apresentando CR 1,4 cm (grupo III) com idade aproximada de 30 a 32 dias de gestação.....	70
Figura 7 - Fotografia de embrião bovino vista lateral, apresentando CR 1,6 cm (grupo IV) com idade gestacional estimada entre 33/35 dias	71
Figura 8 - Caracterização externa do desenvolvimento de embrião bovino com 2,5 cm de CR (grupo V) com idade gestacional estimada entre 36/38 dias.....	72
Figura 9 - Fotografia de feto bovino vista lateral, apresentando CR 3,1 cm (grupo VI) com idade gestacional estimada entre 46/50 dias.....	73
Figura 10 - Fotomicrografia de embrião bovino com CR de 1 cm e Idade gestacional aproximada de 30 dias	74
Figura 11 - Fotomicrografia do saco vitelino de embriões bovino em diferentes períodos gestacionais.....	77
Figura 12 - Fotomicrografia do saco vitelino de embriões bovino do grupo III (CR 1,2 cm) e grupo V (CR 2,1).....	78
Figura 13 - Fotomicrografia do saco vitelino de embrião bovino do grupo V (CR de 2,1 cm), idade gestacional estimada entre 36/38 dias	79
Figura 14 - Fotomicrografia e Eletromicrografia de saco vitelino de embrião bovino com CR de 2,3 cm e idade gestacional estimada entre 30 e 40 dias).....	80

Figura 15 - Fotomicrografias do intestino primitivo de embriões bovinos do grupo II (CR de 1,0 cm), idade gestacional estimada entre 27/29 dias de gestação	82
Figura 16- Fotomicrografia do intestino primitivo (na região da alça intestinal) de embrião bovino do Grupo II (CR 1,4 cm), idade gestacional estimada entre 30/32 dias	83
Figura 17 - Fotomicrografia e Eletromicrografia de intestino de embrião bovino do Grupo IV (CR 1,8 cm), idade gestacional estimada entre 33/35 dias.....	84
Figura 18 - Fotografia e Esquema de embrião bovino em vista lateral, com CR de 1,5 cm (grupo V) e idade gestacional estimada entre 36/38 dias.....	87
Figura 19 - Esquema e Fotomicrografia da área de transição do saco vitelino e intestino primitivo de embrião bovino do grupo V	88
Figura 20- Esquema e Fotomicrografia da área de transição do saco vitelino e intestino primitivo de embrião bovino do grupo V	89
Figura 21 - Esquema e Fotomicrografia da área de transição do saco vitelino e intestino primitivo de embrião bovino do grupo V	90
Figura 22 - Esquema e Fotomicrografias do intestino primitivo de embrião bovino do grupo V	91
Figura 23 - Esquema e Fotomicrografias da alça intestinal primária de embrião bovino do grupo V	93
Figura 24 - Fotomicrografia de embriões bovino do grupo IV (CR de 1,6 cm) com idade gestacional estimada entre 33/35 dias.....	94

Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

ATP	Adenosina trifosfato
Cm	centímetros
CR	Crow Rump
°C	grau Célcus
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo
µm	micrômetros
mg	miligrama
MG	Minas Gerais
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
%	porcentagem
SP	São Paulo
HSCs	Hematopoietic Stem Cells
PGC	Primordial Germ Cells

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3	REVISÃO DE LITERATURA	33
3.1	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	33
3.2	ANEXOS EMBRIONÁRIOS	35
3.3	CARACTERÍSTICAS DAS IDADES EMBRIONÁRIAS	38
3.4	ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SACO VITELINO	41
3.5	ANÁLISE MORFOLÓGICA DO INTESTINO	49
3.6	CÉLULAS GERMINATIVAS	53
3.7	REAÇÃO DE IMONOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE OCT-4	54
4	MATERIAL E MÉTODO	59
4.1	LABORATÓRIOS	59
4.2	COLETA E ANÁLISE MACROSCÓPICA	59
4.2.1	Mensuração	59
4.3	MICROSCOPIA DE LUZ	62
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	62
4.5	IMUNOHISTOQUÍMICA: DETECÇÃO DE OCT-4	63
5	RESULTADOS	65
5.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA	66
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA	74
5.2.1	Análise microscópica do saco vitelino	75
5.2.2	Análise microscópica do Intestino primitivo	81
5.2.3	Análise microscópica da transição do saco vitelino com o intestino primitivo	85
5.2.4	Reação de imunohistoquímica para detecção de Oct-4	93
6	DISCUSSÃO	96
7	CONCLUSÃO	104
	REFERENCIAS	106
	ANEXO	113

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nos mamíferos domésticos, o aumento dos índices produtivos bem como a maior disseminação de material genético superior nos rebanhos, tem sido alvo de intensos estudos e investimentos, o que tem permitido um grande avanço e desenvolvimento de diversas biotecnologias ligadas à reprodução animal.

A mortalidade pré-natal é responsável por aproximadamente um terço de todas as falhas de gestação e pode ser dividida em mortalidade embrionária e mortalidade fetal. A mortalidade pré-natal deve-se a fatores maternos, embrionários ou a interações maternos fetais (JAINUDEEN; HAFEZ, 1988). Em bovino as perdas fetais nos primeiros estágios de gestação podem ser resultados de anormalidades dos embriões ou de sua placenta, alterações no útero ou nas interações materno fetal (HILL et al., 2000).

Segundo Jainudeen e Hafez (1988) aproximadamente 25 a 40% dos embriões de bovinos são perdidos entre o período de penetração dos espermatozóides no óvulo e o processo final de implantação. A maioria das perdas ocorre antes ou imediatamente após a implantação, resultando a incompleta reabsorção do produto da concepção. O óvulo fertilizado se desenvolve até o estágio de mórula ou estágio precoce de blastocisto, porém regenera antes da metade do ciclo estral. Os blastocistos regeneram após a fase média do ciclo, porém antes ou imediatamente após a implantação.

Arthur (1979) afirma que o período embrionário é o período de maior susceptibilidade a teratógenos; esta é a época em que as camadas germinativas primitivas e os rudimentos de órgãos são formados. Cada órgão tem um período crítico de desenvolvimento e os processos bioquímicos envolvidos no crescimento e na diferenciação de cada órgão, têm a seqüência ordenada controlada por vários genes. Se não ocorrer uma destas reações bioquímicas, ou se essa for retardada, é provável que ocorra uma aberração no desenvolvimento. Em geral, a susceptibilidade do conceito a influências deletérias diminui com a idade do embrião. A morte de embriões pode ser seguida por reabsorção ou aborto.

Segundo Alves et al. (2003) as técnicas de transferência e produção *in vitro* de embriões bovinos estão crescendo e se aprimorando cada vez mais. Mas muitas vezes, o meio de cultivo utilizado na produção *in vitro* afeta o desenvolvimento após

a fecundação e interfere no metabolismo ou na expressão de genes importantes para o desenvolvimento do embrião.

O estudo das alterações sofridas pelo embrião ao longo de seu desenvolvimento ajuda a compreender as relações normais que ocorrem na estrutura do corpo, bem como as causas de possíveis anomalias.

A embriologia, ou o estudo do embrião tem uma significativa importância, pois representa os avanços relacionados ao conhecimento das mudanças que ocorrem durante o desenvolvimento do embrião.

O saco vitelino é uma das membranas extra-embionárias que desempenha um papel importante para a sobrevivência inicial do embrião em muitas espécies de mamíferos, é a principal fonte de nutrição do embrião durante o período em que a placenta verdadeira ainda não está completamente formada, e sua importância também está relacionada à hematopoiese, pois dele se desenvolvem os primórdios das células sanguíneas, bem como parte do sistema circulatório primitivo do embrião (WOLF, 2003).

De acordo com Russe et al. (1992) a circulação no saco vitelino em bovinos e ovinos é responsável pela transmissão de metabólicos entre mãe e embrião até a formação da placenta. Esta estrutura é altamente relacionada ao bom desenvolvimento do embrião, uma vez que dela depende a nutrição, proteção e também a formação de órgãos fundamentais para a sobrevivência do embrião, como o intestino primitivo, que se desenvolve a partir do saco vitelino. Este fato intrigante nos leva a observar mais detalhadamente esta estrutura que possui funções fundamentais para o desenvolvimento de embrião de bovinos e também de outras espécies.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo caracterizar morfolologicamente a área de transição entre o intestino primitivo e saco vitelino inferindo sobre sua importância na manutenção do concepto até a formação da placenta verdadeira.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e classificar os embriões e fetos bovinos quanto ao tempo de gestação relacionados ao seu estágio de desenvolvimento e crescimento no período inicial de prenhes (24 a 50 dias).

- Caracterizar morfolologicamente o saco vitelino e intestino primitivo através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.

- Identificar os sítios de células germinativas nos embriões bovinos em diferentes estágios por meios de marcação com Oct 4 (Fator de transcrição Oct-4 POU - Pict-Oct-Unc).

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

Os dados bibliográficos incluem publicações sobre desenvolvimento embrionário, saco vitelino e intestino primitivo em várias espécies animais e humano, sendo que os trabalhos utilizados nessa revisão bibliográfica descrevem achados que nos servirão como base para estabelecer uma análise comparativa destas estruturas com de outras espécies, no sentido de criar condições para melhor compreensão e interpretação dos resultados.

A revisão de literatura foi dividida nos seguintes tópicos: desenvolvimento embrionário, saco vitelino, intestino primitivo e reação imunohistoquímica para detecção de Oct-4.

3.1 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

O estudo do desenvolvimento embrionário, especialmente em animais é um dos aspectos mais importantes para o estudo da evolução e desenvolvimento dos órgãos, bem como para as prováveis causas das más formações congênitas. Após a fertilização, o desenvolvimento do embrião envolve a diferenciação tanto quanto o desenvolvimento fetal e dos tecidos extra-embrionários, até o momento da implantação. Durante esta fase ocorrem várias mudanças celulares e moleculares com origem genética, por exemplo, o alongamento dos tecidos embrionários, contato entre a mãe e o embrião e a placentação (USHIZAWA et al., 2004).

A maioria das espécies animais apresenta particularidades específicas durante o desenvolvimento embrionário. Porém todas apresentam uma sequência básica que é bastante semelhante - segmentações ou clivagens, gastrulação, neurulação e organogênese (NODEN; DE LAHUNTA, 1990).

O desenvolvimento embrionário ocorre após a fecundação do oócito, inicia-se o processo de segmentação, isto é a divisão da célula ovo até a formação de células chamada blastômeros. Na espécie humana, por volta do quarto dia após a fecundação, surge a mórula, um maciço celular que contém de doze a dezesseis blastômeros. Na espécie humana, a mórula, uma vez formada, é invadida por um

líquido que promove o deslocamento dos blastômeros para a periferia. Forma-se assim, a blástula ou blastocisto, estrutura que apresenta uma cavidade cheia de líquido, denominada blastocele, e uma camada celular constituída de micrômeros e macrômeros denominada blastoderme (GARCIA et al., 1991).

A gastrulação é o início da morfogênese (desenvolvimento da forma e estrutura de vários órgãos e partes do corpo) é o evento significativo que ocorre durante a terceira semana em embriões humanos. Nesta fase inicia-se a formação da linha primitiva (MOORE; PERSAUD, 2004).

Em anfioxo, no final do processo podem-se reconhecer nitidamente dois folhetos: ectoderma (externo) e mesentoderma (interno). A cavidade delimitada pelo mesentoderma é denominada de arquêntero ou intestino primitivo, e o orifício de abertura do arquêntero é chamado de blastóporo. Num estágio mais avançado do desenvolvimento da gástrula, a região dorsal passa por um processo de achatamento, formando a placa neural. A seguir, as células ectodérmicas das bordas multiplicam-se até recobrir a placa, organizando as cristas neurais. A placa neural, então, invagina-se de modo a formar a goteira ou sulco neural, que originará o tubo neural, onde se desenvolverá o sistema nervoso central. Simultaneamente, o mesoderma (ou seja, as células do mesentoderma que foram o teto do arquêntero) formando-se três evaginações: a evaginação central dá origem a um eixo de sustentação contínuo denominado notocorda, as evaginações laterais formam os somitos e o conjunto de células que revestem o tubo digestivo constitui o endoderma (GARCIA et al., 1991).

Nesse estágio, portanto, o embrião revela a presença de três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma), um tubo neural, uma notocorda e um intestino primitivo – arquêntero (GARCIA et al., 1991).

Os eventos mais significativos da transformação da gástrula em nêurula são os surgimentos do tubo neural, da notocorda, do mesoderma e do celoma. Para a formação do tubo neural, as células do ectoderma presentes na porção mediana da região dorsal, ao longo de todo o embrião, sofrem um achatamento, constituindo a placa neural. Posteriormente, a placa neural invagina-se, formando o sulco neural, que se aprofunda e funde os seus bordos, constituindo o tubo neural, responsável pela formação do sistema nervoso do embrião (MOORE; PERSAUD, 2004).

Para a formação da notocorda e do mesoderma, ocorre uma segmentação da mesentoderme em três porções distintas, as duas porções laterais darão origem a

mesoderma, enquanto a central originará a notocorda, que é responsável pela formação da coluna vertebral. O mesoderma de cada um dos lados apresenta em seu interior uma cavidade denominada celoma, que corresponde à cavidade geral do corpo dos animais. Logo após, as duas mesodermas crescem ventralmente até que ambos os lados se encontrem e se fundam na região mediana ventral do embrião. Posteriormente, observam-se três regiões distintas no mesoderma: a epímera região dorsal, o mesômero ou região mediana e o hipômero ou região ventral (ou mesoderma apical, médio e lateral) (GARCIA et al., 1991).

O epímero origina blocos celulares ao longo do embrião denominados de somitos. Em cada somito, surgirão mais três camadas celulares que são denominadas de dermátomo, miótomo e esclerótomo. O mesômero estabelece uma ligação entre o epímero e o hipômero, sendo que este possui duas camadas celulares envolvendo o celoma. A camada externa ou parietal localiza-se abaixo do ectoderma, formando com ela a somatopleura, a camada interna ou visceral, localizada junto à endoderme, formará com ela a esplâncnopleura (GARCIA et al., 1991).

3.2 ANEXOS EMBRIONÁRIOS

Além do estudo das modificações estruturais do embrião para a formação do corpo, é também de grande relevância uma análise das modificações que geram as estruturas extra-embriônicas. A placenta é uma estrutura de origem mista, exclusiva dos mamíferos. Permite a troca de substâncias entre o organismo materno e o fetal. Nos primeiros meses de gestação, a placenta trabalha produzindo hormônios, além de substâncias de defesa, nutrição, respiração e excreção. O tamanho e função da placenta se alteram continuamente durante o curso da gestação (JAINUDEEN; HAFEZ, 1988). As membranas extra-embriônicas são o elo de comunicação entre os organismos materno-embriônico que formarão a placenta, que é um órgão vital para o desenvolvimento e crescimento fetal (WOLF, 2003).

A placenta de ruminantes é caracterizada como cotiledonária, devido à presença de carúnculas endometriais, que são espessamentos do tecido sub-epitelial do útero, presentes mesmo em vacas vazias. Na gestação, estas carúnculas

formam conexões com a proliferação do cório. Os vilos coriônicos formam os cotilédones, unidade fetal que, junto com as carúnculas, formam as unidades funcionais, denominadas placentônio (PINTO, 2002). As carúnculas são estruturas especializadas, aglandulares, que interagem com o corioalantóide para formar os placentônios (KING et al., 1982).

Existem quatro diferentes estruturas membranosas que estão envolvidas no desenvolvimento da placenta; cório, âmnio, alantóide e saco vitelino. O cório é uma camada epitelial derivada da parede externa do blastocisto, o trofoblasto. Durante o curso de implantação ele é completado pela camada interna do mesênquima derivado do embrião. O âmnio é uma camada derivada da divisão (roedores e primatas) ou dobramento (mamíferos) do ectoderma embrionário. O alantóide é uma bexiga urinária extra embrionária que se desenvolve a partir do intestino caudal. O saco vitelino se desenvolve como uma estrutura anexa do intestino médio embrionário consiste de uma camada de epitélio endodérmico seguido de um mesênquima fetal vascularizado (LEISER; KAUFMANN, 1994).

São anexos embrionários o âmnio, o cório, o alantóide e o saco vitelino (Figura 1). Estas estruturas, embora derivadas do zigoto, quase nada contribuem para a formação do embrião. Apenas a parte dorsal do saco vitelino será incorporada e formará o revestimento epitelial do intestino, e o alantóide estará relacionado com a formação da bexiga e do úraco (GARCIA et al., 1991).

O âmnio é uma fina membrana que delimita uma bolsa repleta de líquido - o líquido amniótico que tem função de proteger o embrião contra choques mecânicos (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O alantóide surge de uma evaginação da parte posterior do intestino do embrião. Em embriões de aves e répteis ele atua como uma superfície respiratória, enquanto em mamíferos os seus vasos sanguíneos transportam sangue entre o embrião e placenta. O alantóide pode também absorver os minerais presentes nas cascas dos ovos, promovendo a partir daí a formação do esqueleto. Nos mamíferos associa-se ao cório para formar a placenta e o cordão umbilical. O cório é a membrana extra-embrionária mais externa de aves, répteis e mamíferos, estando envolvido no intercâmbio gasoso respiratório. Em mamíferos, ele é parte da placenta, e também está envolvido com a nutrição e eliminação de resíduos. É uma película delgada que envolve os outros anexos embrionários (WOLPERT et al., 2000).

Figura 1- Representação esquemática das quatro estruturas membranosas formadas durante os primeiros estágios de desenvolvimento embrionário e a participação da morfogênese placentária (Adaptado LAISER; KAUFMANN, 1994)

O mesênquima que preenche as vilosidades coriônicas origina os vasos sanguíneos do embrião, os quais se comunicam com ele através do cordão umbilical, já que a placenta é um órgão extra-embriônico (WOLF et al., 2003). O cordão umbilical é o anexo que une o feto à placenta, apresentando no seu interior os vasos alantoideanos (umbilicais). Em alguns mamíferos apresenta duas artérias e uma única veia, estruturas que garantem a nutrição e respiração do embrião (SANTOS; AZOUBEL, 1996). O cordão umbilical de bovinos constitui-se de duas artérias, duas veias e o ducto alantóide (MIGLINO, 1991).

O saco vitelino é um anexo presente em embriões de todos os vertebrados, sendo especialmente desenvolvido nos peixes, répteis e aves. Corresponde a uma estrutura em forma de saco ligada a região ventral do embrião. Sua principal função é armazenar reservas nutritivas. Nos mamíferos placentários é reduzido, visto que a nutrição ocorre via placentária (SANTOS; AZOUBEL, 1996) é também responsável pela produção das hemácias (PALIS; YODER, 1998; GODIN; CUMANO, 2002).

3.3 CARACTERÍSTICAS DAS IDADES EMBRIONÁRIAS

Atualmente pouco foi feito para estabelecer uma tabela de valores normais do tamanho e crescimento do desenvolvimento pré-natal em bovinos. É importante verificar mais intensamente a seqüência das mudanças que ocorrem durante o período pré-natal. De um ponto de vista biológico, o estabelecimento de tabelas normais do crescimento e o tamanho para o feto de bovino são importantes como os de outros animais (NICHOLS, 1944; GREEN, 1948).

O trabalho de Winters et al. (1942) esclarece muitos problemas com sua investigação combinando três fatores essenciais necessários para estabelecer uma curva normal de crescimento: idade, peso e medida (Crown Rump - CR).

Alberto (2006) definiu as idades dos embriões bovinos seguindo metodologia de Evans; Sack (1973) e observou que embriões com 10,0 mm, observa-se nitidamente os arcos branquiais, flexura cervical e saliência cardíaca.

Assis Neto (2005) estudando embriões bovinos afirmou que de 15 a 20 dias de gestação os embriões apresentaram $0,71 \pm 0,17$ cm de CR ("Crow Rump"), com 20 a 30 dias de gestação = $1,23 \pm 0,13$ cm, de 30 a 40 dias = $1,90 \pm 0,27$ cm de CR; 40 a 50 dias de gestação = $2,79 \pm 0,19$ cm e de 50 a 60 dias, $3,76 \pm 0,52$ cm de CR e já nesta idade são considerados fetos.

Hafez e Rajakosk (1964) estudaram o desenvolvimento placentário e fetal durante a gestação múltipla de bovinos, e perceberam que aos 30 dias de gestação não houve diferença significativa na medida de Crown Rump e no peso dos embriões únicos, duplos, triplos, quádruplos e quintuplos. O comprimento de Crown Rump dos embriões com 30 dias, variou de 8,1 à 12,5 mm, com média de 10 mm.

Estudos morfológicos têm fornecido informações sobre o desenvolvimento do trofoblasto e de embriões bovinos durante a gestação (WINTERS et al., 1942; HAMILTON; LAING, 1946). Winters et al. (1942) descreveram o primeiro estágio do alongamento coriônico no embrião com 13 dias. Chang (1952) estudou embriões com idades desconhecidas e observou um crescimento extremamente rápido do trofoblasto, antes da idade estimada de 18 dias. Tais achados foram argumentados por Greenstein et al. (1957) que tentaram definir padrões diários da variação normal e o desenvolvimento para embriões com 16 a 26 dias de gestação.

Desde 1951, poucas informações têm sido publicadas relativas ao tempo, lugar e maneira exata da implantação das membranas embrionárias de embriões bovinos, das carúnculas para o útero. A informação limitante disponível mostra uma ampla variação no tempo quando o processo de implantação deve ocorrer. Muitas destas informações têm sido obtidas durante estudos sobre algumas outras fases do desenvolvimento embrionário (MELTON et al., 1951).

De acordo com Assis Neto (2005) o início do desenvolvimento placentário bovino ocorre antes da implantação definitiva do ovo fecundado. Bowen e Burghardt (2000) afirmam que a implantação em mamíferos é resultante de uma série de interações altamente coordenadas que começam com o contato íntimo entre a superfície das membranas do conceito e o epitélio uterino e terminam com a formação da placenta, com funções de respiração, proteção e nutrição.

Segundo Melton et al. (1951) o tempo no qual a membrana cório-alantóide começa a se implantar na parede uterina pode ser um estágio crítico no desenvolvimento de embriões bovinos e, durante este período de transição modifica-se a maneira pela qual o embrião recebe sua nutrição. Num estágio inicial do desenvolvimento o embrião recebe nutrição suficiente do leite uterino, mas durante o desenvolvimento, sua necessidade aumenta e uma fonte direta alimentar é estabelecida. Durante a placentação inicial o tecido embrionário tem íntimo contato com o tecido maternal.

Winters et al. (1942) relataram que “a implantação do embrião na parede uterina acontece durante o 11º e 12ª dias” após fertilização. Hammond¹ (1927 *apud* MELTON et al., 1951) afirmou que no fim do primeiro mês de gestação as membranas fetais estão implantadas, mas, as junções dos cotilédones por projeções das membranas fetais ocorrem antes do final do segundo mês.

Kingman (1948) relatou que “o 15º e 19º dia de gestação é o período da implantação e inclui aqueles fatores que fazem possivelmente o primeiro passo no estabelecimento direto da comunicação entre mãe e feto. Pelo 19º dia de gestação uma união frágil tem sido estabelecida nas regiões ao redor do embrião, mas em direção ao ápice a separação completa se mantém”.

Melton et al. (1951) afirmaram que a Implantação não é um processo repentino, mas gradual e contínuo sobre um período de várias semanas. O primeiro

¹ HAMMOND, D. J. **Physiology of reproduction in the cow**, Cambridge, London, 1927.

ponto de implantação foi imediatamente ao redor do embrião e isto é onde o primeiro disco placentário pode ser visto na membrana coriônica.

Yamada et al. (2002) dividiu o processo de implantação dos bovinos em 3 fases: pré-implantação, implantação e pós-implantação. Na fase de pré-implantação (17º e 19º dias de gestação) o conceito se localiza somente no corno gestante; na fase de implantação (20-25 dias de gestação), o trofoblasto encontra-se no lúmen uterino em ambos os cornos uterinos e na fase de pós-implantação (26-30 dias de gestação), a formação placentária era encontrada no corno gravídico, próxima ao embrião.

Melton et al. (1951) indicaram que a implantação de embriões bovinos acontece após 13º dia. Depois da fertilização o desenvolvimento do embrião envolve diferenciação, como também desenvolvimento do corpo fetal e tecidos extra-embrionários até o momento de implantação. Durante este período várias mudanças celulares e moleculares acontecem devido a uma origem genética, por exemplo, o alongamento de tecidos embrionários, contato de células entre a mãe e o embrião e placentação.

Segundo Leiser (1975) a fase de fixação definitiva, começa por volta do 19º dia de gestação nos bovinos, mediante interdigitação dos microvilos, culmina na formação do cotilédone. Esta fase tem início na região próxima ao embrião e então se espalha por toda a superfície coriônica, incluindo as regiões intercarunculares. O contato do cotilédone com a superfície caruncular (placentônio), não começa até o 30º dia de gestação, indicando que o desenvolvimento da placenta depende da localização em relação ao embrião e idade gestacional.

Ushizawa et al. (2004) analisaram os genes de expressão cDNA em embriões bovinos com 7, 14 e 21 dias de gestação e membranas extra-embrionárias com 28 dias e perceberam que um grande número de genes da membrana extra-embrionária aumentam até o período de implantação e estes perfis provêm de informação fundamentais para uma compreensão da diferenciação da membrana e desenvolvimento extra embrionário .

3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SACO VITELINO.

O saco vitelino é um anexo extra-embriônico que acompanha a parede do exoceloma e o mesoderma extra-embriônico, estando delimitado por uma camada unicelular endodérmica (PALIS; YODER, 2001). Para Godkin et al. (1988) o saco vitelino de bovinos alcançava o desenvolvimento ao redor do 20º dia de gestação e rapidamente sofre regressão (MOSSMAN, 1987; NODEN; DE LAHUNTA, 1990), já para Wrobel e Suess (1998) este se desenvolve com 18 a 23 dias de gestação. O saco vitelino involui e se degenera em um curto período de tempo (MOSSMAN, 1987; NODEN; DE LAHUNTA, 1990), para Barone (1986) a partir da terceira semana e para Bryden et al. (1972) no 25º dia de gestação. Seus vestígios até o final da gestação não são mais encontrados (LATSHAW, 1987; NODEN; DE LAHUNTA, 1990; WOODING; FLINT, 1994).

De acordo com Wrobel e Suess (1998) o saco vitelino se desenvolve de um disco trilaminar para um corpo cilíndrico. Russe et al. (1992) observaram que durante a fase inicial de elongação do saco vitelino, a endoderme diferencia-se, na região da membrana citoplasmática, em células prismáticas e células chatas, as quais acompanham o trofoblasto.

De acordo com Latshaw (1987) a classificação baseada nas membranas extra-embriônicas fetais a placenta vitelínica é formada de uma membrana trilaminar constituída de trofoblasto, mesoderma e endoderma. Esta membrana está presente antes que o saco vitelino e o cório sejam separados. Em mamíferos domésticos, o saco vitelino é transitório.

Em humanos, aproximadamente duas a três semanas após a fertilização e a implantação do ovo no endométrio, surge no mesênquima lateral a notocorda agrupamentos de células, denominados “ilhas sanguíneas”, que representam os progenitores dos sistemas vasculares e hematopoético. As células mais externas das ilhas formam o endotélio e as mais centrais (hemocitoblasto) se tornam livres no lúmen (ZAGO; COVAS, 2006).

Segundo Russe et al. (1992) o desenvolvimento do saco vitelino muda de forma e estrutura na endoderme. No início as células chatas, que revestiam o blastocisto se contiveram a apenas poucas organelas celulares, tornando-se prismáticas em embriões com 3mm de comprimento (Crown rump – CR). Na análise

microscópica de luz, observaram o citoplasma tonalizado de escuro com grande quantidade de vesículas e microvilosidades. No embrião implantado, com tamanho de 4-5 mm, a endoderme do saco vitelino é simples sendo formada por células prismáticas e células primárias grandes de 15-20 μm de altura, com coloração escura. Para 5,5mm de CR (ovino entre o 18º dia de gravidez) começa a proliferar-se e infiltrar-se entre os capilares na mesoderme. Ao mesmo tempo aparecem ao lado das células escuras, células arredondadas claras no epitélio. Para 9 mm de CR o número de células claras, com 20 μm de tamanho são repletas de vesículas. O epitélio torna-se em parte estratificado. Na parede do saco vitelino de um embrião com 11 mm de CR encontram-se dispostas às células endodérmicas claras e escuras freqüentemente alternadas uma ao lado da outra ou formando grupos de células homogêneas.

Considerando a persistência macroscópica do saco vitelino, a grande quantidade de organelas de suas células tais como: retículos endoplasmáticos, mitocôndrias e outras estruturas citoplasmáticas, a presença de ilhas de eritroblastos primários, vasos sanguíneos com fenestrações, indícios de hematopoiese, secreção e absorção celular, e por fim o fato do saco vitelino não estar fusionado a nenhuma membrana extra-embriônica nos períodos examinados (15-70 dias de gestação), parece provável a existência de uma placenta vitelina ativa, importante para a manutenção da gestação, que se estabelece temporariamente entre a placenta coriovitelínica transitória e a placenta cório-alantóide definitiva (ASSIS NETO, 2005).

Sob microscopia eletrônica de transmissão foram observadas numerosas células escuras e claras. Em ovinos e bovinos nas células escuras, foram observados retículo endoplasmáticos granulares ordenados paralelamente. As células claras apresentaram-se grandes, cheias de cisternas com material flocoso do retículo endoplasmático dominante, e em algumas regiões com ribossomos. As mitocôndrias ovóides apresentaram cristais e uma matriz relativamente clara. complexos de Golgi são notados, entretanto não são predominantes. As células claras possuem um núcleo com vesículas rico em eucromatina contendo nucléolos. O núcleo poligonal das células escuras é rico em heterocromatina. Para 12mm de CR, a infiltração da endoderme do saco vitelino entre os capilares densos preenchidos com eritroblastos primitivos é muito intensa. Com 36 mm de CR, o saco vitelino constitui-se de aglomerados celulares que são formados por células claras ou escuras, ou de ambos os tipos (RUSSE et al., 1992).

Tiedemann (1979) afirmou em seus estudos que os vasos sanguíneos do endotélio do saco vitelino de gatos são fenestrados e apresentam membrana basal completa. Estas condições são favoráveis para a passagem de proteínas e de células sanguíneas. A diapedese de plaquetas, reticulócitos e eritrócitos também foram relatados e o mesmo ocorre nos humanos (LARSEN; KNOTH, 1971).

A maior parte dos embriões vertebrados, répteis, aves e mamíferos tem membranas extra-embrionárias. Neste caso um ramo da aorta dorsal alcança estruturas adjacentes como o saco vitelino que está unido ao intestino médio e o alantóide sendo um divertículo do intestino posterior; os primeiros vasos formam as artérias vitelinas e os segundos, as artérias alantoideas ou umbilicais (NODEN; DE LAHUNTA, 1990).

De acordo com Rüsse et al. (1992) os primeiros eritrócitos embrionários são formados no mesoderma esplâncnico do saco vitelino. Alguns dos vasos sanguíneos vitelinos dentro do embrião são mantidos como principais vasos sanguíneos viscerais no adulto. A parte endodérmica do saco vitelino dá origem às células germinativas primordiais (células sexuais primordiais) que posteriormente migraram para as gônadas. Elas também apresentam características de células produtoras de hormônios esteróides e, portanto têm função endócrina (LATSHAW, 1987).

Os vasos sanguíneos se formam por vasculogênese ou angiogênese. Na vasculogênese os vasos se originam das ilhotas sanguíneas, no mesoderma do saco vitelino e depois no mesoderma lateral e em outras regiões (SANDLER, 2005). As células externas das ilhotas vasculares são diferenciadas em células endoteliais, enquanto que as internas em sangue primitivo (CHOI, 2002). Estas ilhotas se originam de células mesodérmicas que são induzidas pelo fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2 – Fibroblast Growth Factor - 2) a formar os hemangioblastos, um precursor comum da formação de vasos sanguíneos e células sanguíneas (CHOI, 2002; SANDLER, 2005).

Segundo Tiedemann (1977) os vasos sanguíneos do endotélio do saco vitelino de gatos são fenestrados e apresentam membrana basal completa, facilitando a passagem de proteínas e de células sanguíneas.

Embora existam diferenças entre as espécies, o aparecimento padrão de célula progenitora hematopoiética no saco vitelino é semelhante no rato e no homem (PALIS; YODER, 2001).

A importância do saco vitelino como órgão placentário e hematopoiético são bem conhecidos nos roedores (HAAR; SLADE, 1970; KING; ENDERS, 1970; ACKERMAN, 1971), porém a literatura é escassa em animais domésticos.

Nos ruminantes o saco vitelino é funcional durante um curto período de tempo (NODEN; DE LAHUNTA, 1990), porém, suas funções nesta fase são muito importantes, dentre elas destacamos: absorção e digestão de nutrientes maternos, síntese de proteínas, formação da circulação vitelina e secreção intravascular de nutrientes (LATSHAW, 1987; BARON, 2003).

Embrião muito jovem pode existir durante breve tempo, graças aos nutrientes que absorve do seu próprio saco vitelino e do leite uterino. À medida que o embrião aumenta de tamanho é necessário um estabelecimento de um melhor sistema de nutrição (SALESBURY; VANDERMARK, 1964).

Segundo Liu et al. (1991) o saco vitelino do camundongo produz especificamente proteínas idênticas as proteínas do soro fetal de bovinos como a transferrina, alfa 1 - fetoproteína, alfa1 - antitripsina, alfa1 - glicoproteína ácida.

Matsumoto (2007) conclui em seu trabalho que a alfafetoproteína presente no saco vitelino de embrião bovino garante sua sobrevivência e posterior desenvolvimento, pois diminui a atividade do sistema imunológico materno impedindo que a mãe considere o embrião como corpo estranho.

No homem, suíno e porquinho da índia, o saco vitelino é uma estrutura rudimentar a qual geralmente não participa das trocas materno-fetais. Em eqüinos e felinos o saco vitelino se funde localmente com o cório formando uma placenta coriovitelínica (LEISER; KAUFMANN, 1994). A placenta coriovitelínica se apresenta nos mamíferos como uma estrutura temporária que existe quando o exoceloma se estende na área vascular, e se abre na esplancnopleura vascular e na somatopleura não vascular (GREENSTEIN; FOLEY, 1958). No porquinho da índia o saco vitelino substitui localmente o cório, e assim forma a placenta vitelina. Em peixes vivíparos e anfíbios, o epitélio vitelino é decisivo para a barreira de trocas maternas fetais (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Similar ao fígado fetal, o saco vitelino e o alantóide têm funções hematopoiéticas durante estágios específicos do desenvolvimento embrionário para que a produção do RBP possa servir para transportar o retinol necessário para a diferenciação e proliferação hematopoiética das células (LIU et al., 1991). Além da função hematopoiética o saco vitelino pode executar as funções do fígado (antes da

maturação do fígado fetal), sintetizando proteínas em comum com o fígado fetal (GULBIS et al., 1998).

Thomas et al. (1990) afirmou que interface entre os tecidos materno e fetal do saco vitelino visceral contribui para manter o conteúdo protéico do compartimento fetal, sendo estas proteínas capazes de entrarem na circulação fetal, mas ainda não se sabe o local de ação desta secreção.

A hematopoiese ou hemopoiese é a produção dos elementos celulares e figurados do tecido sanguíneo. A atividade hematopoiética gera mais de nove tipos celulares diferentes, divididos em: linhagem linfóide (linfócitos T e B, células NK (*Natural killer*), e células dendríticas linfóides); linhagem eritro-mielóide (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, eritrócitos etc), a partir de uma célula denominada célula-tronco hematopoiética ou HSC (hematopoietic stem cell) (WEISSMAN; ANDERSON, 2001).

As primeiras células sanguíneas observadas no embrião são eritroblastos localizados nas ilhas vasculares do saco vitelino extraembrionário (MCGRATH; PALIS, 2005).

Os processos de vasculogênese e hematopoese do saco vitelino são interdependentes do ponto de vista do desenvolvimento embrionário. As células originais que formam os vasos sanguíneos (angioblastos) são responsáveis também pela formação das células sanguíneas circulantes (células-tronco hematopoéticas). Ambos os tipos celulares (angioblastos e células-tronco hematopoéticas) partem de um precursor comum, o hemangioblasto. A expansão das primitivas células-tronco hematopoéticas é regulada pelo endotélio do saco vitelino; assim como a regulação de produção da hemoglobina embrionária realizada pelas células hematopoéticas. A linfopoese e mielopoese também são eventos regulados pelo endotélio vitelino (AUERBACH et al., 1997).

No embrião em desenvolvimento, a hematopoiese inicial e estrutura vascular são identificadas como ilhas de sangue do saco vitelino (PALIS; YODER, 2001; CHOI, 2002; MCGRATH; PALIS, 2005). Estas são formadas pelas células mesodermicas agregadas que migraram no início da formação. As células externas são diferenciadas em células endoteliais, enquanto que as internas em sangue primitivo. O término da associação do desenvolvimento entre hematopoiese e células endoteliais sugere que elas partam de um progenitor comum, o hemangioblasto (CHOI, 2002).

Os hemangioblastos no centro das ilhotas sanguíneas formam células-tronco hemocitopoiética, as precursoras de todas as células sanguíneas, enquanto os hemangioblastos periféricos se diferenciam em angioblastos, os precursores dos vasos sanguíneos. Estes hemangioblastos proliferam e são finalmente induzidos a formar células endoteliais pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF- Vascular Endotelial Growth Factor) segregado por células mesodérmicas circulantes (SANDLER, 2005).

O desenvolvimento hematopoiético do saco vitelino ocorre na região luminal da ilhota sanguínea é alinhada pelas células endoteliais (YOUNG et al., 1998; GODIN; CUMANO, 2002). O surgimento do tecido sanguíneo está diretamente relacionado com o aparecimento evolutivo do terceiro folheto embrionário, denominado mesoderma. Diversos estudos demonstram que a deficiência de genes envolvidos na determinação mesodérmica afeta irreversivelmente o tecido hematopoiético (GODIN; CUMANO, 2002).

De acordo com Mikkola et al. (2005) as células da hematopoiese se desenvolvem no embrião em vários locais anatômicos. Atividades coordenadas de diferentes locais de hematopoiese asseguram ambos produção rápida de células de sangue diferenciadas para as necessidades imediatas do embrião e estabelecimento de um grande aglomerado de células indiferenciadas hematopoiéticas (HSCs - hematopoietic stem cells).

Jafredo et al. (2005) afirmam que o saco vitelino produz um estoque de células hematopoéticas, onde partes dessas células se diferenciam *in situ*, ou seja, no próprio tecido, enquanto outras colonizam órgãos hematopoéticos. No entanto, a capacidade de diferenciação das células hematopoiéticas pode estar influenciada pelo microambiente do saco vitelino, podendo originar células mielóides, eritróides e hematopoéticas.

Segundo Rohen e Drecool (2005) a hematopoiese ocorre durante a vida embrionária em etapas, começa juntamente com o sistema vascular no mesênquima extra-embrionário que é a eritropoiese megaloblástica nas ilhotas sanguíneas do saco vitelino e no cório, a qual origina grandes megaloblastos nucleados, porém continua até a sexta semana. A outra etapa da hematopoiese chamada de período hepatoesplênico, aparece no fígado e a partir da 12ª semana no baço.

Em humano, posteriormente o fígado e o baço funcionam como órgão hemocitopoiético temporário, porém, no segundo mês de vida intra-uterina a

clavícula já começou a se ossificar e tem início a formação da medula óssea hematógena (vermelha) em seu interior e a medida que a ossificação avança no resto do corpo, a medula óssea se torna cada vez mais importante como órgão hemocitopoiético (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; ROHEN; DRECOOL, 2005; MIKKOLA et al., 2005).

Mikkola et al. (2005) afirmam em seus estudos, que o início da atividade de HSC na placenta começa antes de HSCs caíam na circulação ou colonizem o fígado fetal. Além disso, a atividade da hematopoiese da placenta culmina em uma expansão rápida do aglomerado de células de HSC definitiva durante a qual acontece o tempo quando o reservatório de HSC mais ao vivo fetal começa a crescer.

Em embriões de mamíferos, a hematopoiese e vasculogênese começam nas ilhas vasculares do mesênquima do saco de vitelino (BANKS, 1992; BARON, 2003; MIKKOLA et al., 2005; PALIS et al., 2005), formada por grandes células nucleadas (hemangioblasto) que representam células fonte originárias tanto do angioblasto (células primitivas do revestimento vascular) como os de células fonte das linhagens sanguíneas primitivas (hemocitoblasto). Os angioblastos, dispostos mais externamente, formam tubos endoteliais que revestem pequenas cavidades e assim se tornam os primeiros vasos de natureza capilar. Os hemangioblastos localizados mais internamente se transformam em células fonte sanguíneas. A formação dos vasos sanguíneos e das células hematopoiéticas na região das ilhotas sanguíneas é induzida pelo endoderma do saco vitelino e prossegue pelo cório adjacente, pelo trofoblasto e posteriormente para o corpo do animal (BARON, 2003; ROHEN; DRECOOL, 2005).

Os mecanismos que controlam a formação dos hemangioblastos e hematopoiese embrionária e endotelial (angioblasto) ainda não são compreendidos (BARON, 2003).

Cumano et al. (2001) separaram o saco vitelino e esplancnopleura antes da circulação intraembrionária e mantiveram o “explants” em cultura antes da transferência. Precursores derivados do local intraembrionário geraram progênie de células hematopoiéticas de multilinhagens em ratos adultos com mais de 6 meses. Os resultados revelaram uma capacidade diferencial de hematopoiese em tecidos vivos embrionários, e indicou que as únicas células capazes de hematopoiese adulta a longo prazo são de origem intra-embionária.

Palis et al. (2005) desenvolveram uma cultura celular obtida através de “explant” do saco vitelino para estudar o processo de desenvolvimento das células sanguíneas e células endoteliais do mesoderma extra-embriônico. Os autores sugerem que o endoderma do saco vitelino ou sua matriz extracelular é necessária para a coalescência de células endoteliais para o desenvolvimento de redes capilares.

Para Palis e Yoder (2001) o saco de vitelino também é o primeiro local de produção de células sanguíneas no rato e no homem. Células eritrocíticas primitivas originam no saco vitelino e completam a maturação incluindo enucleação, na circulação sangüínea. Embora diferenças de espécies existam, o aparecimento padrão de célula progenitora hematopoiética no saco vitelino é semelhante no rato e homem. Em ambas as espécies, há uma fase de desenvolvimento na quais as células sangüíneas vermelhas são produzidas pelos progenitores eritrocíticos do saco de vitelino.

Há 20 anos, Mossman (1987) afirmou que a estrutura do saco vitelino, grau de diferenciação, tempo de aparecimento e desaparecimento, e a grande variação entre as espécies, são pobremente descritos na literatura.

Segundo Latshaw (1987) e Baron (2003) o saco vitelino de mamíferos domésticos é inicialmente grande, mas ele regride quando a placenta permanente se desenvolve.

Conforme a cavidade se expande, a área de transferência efetiva da placenta vitelina diminui. Quando a formação da cavidade extra-embriônica está completa, a separação do mesoderma no ponto de fixação entre o saco vitelino e o cório é destruída. Nesta hora, uma placenta vitelínica verdadeira não mais existe (LATSHAW, 1987).

O saco vitelino dos bovinos alcança o desenvolvimento ao redor do 20º dia de gestação, e então ocorre uma regressão rápida (GODKIN et al., 1988).

Nos ruminantes o saco vitelino é grande e vascular e completamente cercada pela cavidade extra-embriônica. Na vaca o saco vitelino tem se soltado do cório pelo vigésimo dia de gestação e no vigésimo quinto dia o saco vitelino reduz a uma estrutura sólida como um cordão (LATSHAW, 1987). Segundo Barone (1976) o saco vitelino involui e se degenera muito cedo nos ruminantes, e a partir da segunda semana até o final da prenhez seus vestígios não são encontrados. Nos embriões

ovinos com 42 mm de CRL ocorre também a degeneração das paredes do saco vitelino (RUSSE et al., 1992).

De acordo com Tiedmann (1979) a ultraestrutura da superfície do endoderma do saco vitelino com 23 a 32 dias é igual. Sobre a margem superior dos moldes das células endodérmicas, estas possuem um arranjo circular. O endoderma é tipicamente pavimentoso no pólo apical das células, e a média de diâmetro é de 16 micra. Curtos e uniformemente distribuídos, os microvilos mostram-se somente marginais e diferencia-se de célula para célula. Com 54 dias ou mais, as células são menores e possuem forma de cúpula. Nas bordas dos grossos sulcos posicionam-se microvilos que se associam com os sítios de barreiras terminais. Os microvilos apicais são mais grossos, mais numerosos e mais curtos. Neste encontra-se grande quantidade de retículo endoplasmático, especialmente no meio da gestação, mas são mencionados. Neste estágio, as células assemelham-se com as células do parênquima do fígado em muitos aspectos. Em relação ao mesotélio do saco vitelino, este também não mostra alterações em relação na microscopia eletrônica por todo o período gestacional. As células do mesotélio mostraram-se com longos microvilos (2,5um) por todo o epitélio comparado neste trabalho. Muitas células mesoteliais possuem somente a metade do diâmetro das células endodérmicas.

Segundo Assis Neto (2005) o saco vitelino em fases iniciais da gestação apresenta uma porção única que se bifurca próximo do ventre do embrião, formando duas extremidades longas e finas. Com o evoluir da gestação o comprimento total do saco vitelino vai diminuindo e as extremidades alongadas vão se tornando vestigiais e desaparecem.

3.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO INTESTINO

De acordo com Carlson (1996), Santa Bárbara et al. (2003) e Sadler (2005) como resultado do dobramento cefalocaudal e lateral do embrião, uma porção do saco vitelino que possui um revestimento de endoderma é incorporada pelo embrião, resultando no intestino primitivo. Duas outras porções dessa cavidade revestida por endoderma, o saco vitelino e a alantóide, permanecem na parte de fora do embrião. Graças à sua relação íntima com o saco vitelino através do pedúnculo do embrião, o

intestino pode ser dividido em intestino anterior, intestino médio de fundo aberto e intestino posterior. A porção média (ou intestino médio) permanece temporariamente ligada ao saco vitelino através do duto vitelino, ou pedículo do embrião.

O trato intestinal, pouco depois de sua formação consiste de uma camada simples de epitélio colunar endodérmico cercado por uma camada de mesoderma esplancnopleural. No processo de histogênese do epitélio intestinal, podem-se destacar três fases como sendo as mais relevantes: (1) fase inicial de proliferação e morfogênese epitelial, (2) um período intermediário de diferenciação celular durante o qual aparecem os tipos celulares distintivos que, caracterizam o epitélio intestinal, e (3) fase final de amadurecimento bioquímico e funcional dos diferentes tipos de células epiteliais (Figura 2). Nota-se também, uma diferenciação da parede mesenquimal do intestino, que se diferencia em várias camadas de tecido conjuntivo e musculatura lisa ricamente innervada (CARLSON, 1996; SANTA BARBARA et al., 2003; SADLER, 2005).

O desenvolvimento do intestino médio caracteriza-se pelo rápido alongamento do intestino e de seu mesentério, resultando na alça intestinal primária. Na região do ápice, essa alça mantém uma comunicação livre com o saco vitelino, através do estreito duto vitelino. Ao longo do desenvolvimento, o ramo cefálico da alça forma a porção mais distal do duodeno, o jejuno e parte do íleo. Enquanto que, o ramo caudal transforma-se na porção inferior do íleo, no ceco, no apêndice, no cólon ascendente e nos dois terços proximais do cólon transverso (SADLER, 2005).

Figura 2 – Histogênese do epitélio intestinal: A fase inicial de proliferação e morfogênese epitelial; B, período intermediário de diferenciação celular e C, fase final de amadurecimento bioquímico e funcional das células epiteliais (Adaptado SANTA BÁRBARA et al., 2003)

A área gastrintestinal desenvolve de um simples tubo para a um órgão complexo com padrões de diferenciação ao longo de quatro eixos de assimetria. O órgão está composto três camadas germinativas sinalizando uma a outra durante o desenvolvimento para formar a estrutura adulta. O epitélio do intestino é constituído por epitélio de tecido em desenvolvimento, constantemente diferenciando de uma célula tronco em um “pool” de progenitores ao longo da vida do organismo. Sinais do mesoderma adjacente e entre celas de epitelial é requerido para desenvolvimento e diferenciação em ordem normal, homeostase e apoptose (SANTA BARBARA et al., 2003).

O trato gastrintestinal dos vertebrados é notavelmente complexo, tridimensional, especializado e derivado de uma simples estrutura tubular. O intestino está composto das três camadas de germinativas, endoderma (epitélio lúmen), mesoderma (músculo liso) e ectoderma (sistema entérico nervoso). Morfologicamente o desenvolvimento do trato gastrintestinal é similar em todas as espécies de vertebrados estudados. Ao término da gastrulação, o endoderma é homogêneo fenotipicamente até que os movimentos morfogenéticos aconteçam crânio caudalmente. O tubo do intestino de vertebrados desenvolve-se de duas invaginações ventrais, uma anterior e outra posterior. Estas invaginações se prolongam da camada endodérmica e funda na linha média do embrião para formar um tubo. Durante este processo, mesoderma de esplâncnico derivado do mesoderma lateral cerca o endoderma (SANTA BARBARA et al., 2003).

É importante ressaltar que a formação do tubo intestinal propriamente dito envolve seu alongamento contínuo, transformação em uma hérnia através da parede corporal, rotação e dobramento para o seu acondicionamento eficiente na cavidade do corpo, e sua histogênese e amadurecimento funcional (CARLSON, 1996). Na altura do intestino médio, as alças intestinais fazem saliência na porção umbilical e constituem a hérnia umbilical, devido à falta de espaço no abdome para seu crescimento (ALMEIDA, 1999).

Sadler (2005) e Carlson (1996) mencionam que, o desenvolvimento da alça intestinal primária sofre uma rotação em torno do eixo formado pela artéria mesentérica superior, em vista frontal, essa rotação segue o sentido anti-horário, percorrendo aproximadamente 270° (quando completa). Ainda segundo o autor, mesmo durante a rotação continua o alongamento da alça do intestino delgado, e o jejuno e o íleo formam várias alças enroladas. Da mesma maneira, o intestino grosso

se alonga consideravelmente, mas não participa do fenômeno de enrolamento, onde a ocorrência da rotação é durante o período de herniação (cerca de 90°) bem como o retorno das alças intestinais para a cavidade abdominal (os restantes 180°) que ocorre durante a 10ª semana.

Durante estes espiralamentos, formação de hérnia e movimentos de retorno, os intestinos ficam suspensos da parede dorsal do corpo por meio de um mesentério. A rotação e outras mudanças de posição do intestino ocorrem em parte porque o aumento do comprimento do intestino é muito maior que o aumento do comprimento do embrião (CARLSON, 1996; ALMEIDA, 1999; SANTA BARBARA et al., 2003; SADLER, 2005).

A primeira parte do intestino a retornar para a cavidade abdominal, é a porção proximal do jejuno. As alças a retornar mais tarde vão se acomodando mais e mais para a direita. A própria artéria mesentérica superior serve como um pivô em torno do qual mais tarde ocorrerá a rotação do intestino. O broto do ceco, que surge por volta da sexta semana como um pequena dilatação cônica do ramo caudal da alça intestinal primária, é a última parte do intestino a retornar para a cavidade abdominal (CARLSON, 1996; SADLER, 2005).

No embrião inicial, a extremidade caudal do intestino posterior termina na cloaca, que possui um revestimento por endoderma, que, nos vertebrados inferiores serve como uma saída comum para a excreção de uma série de produtos da digestão, urinários e de gametas, mais tarde a cloaca que também inclui a base do alantóide se expande para formar um seio urogenital comum (CARLSON, 1996).

Apesar de o intestino desenvolver várias capacidades funcionais durante o período fetal, não é observado a ocorrência de nenhuma função digestiva importante antes de começar a alimentação após o nascimento. Os intestinos do feto contêm em seu interior um material esverdeado chamado de mecônio, composto por uma mistura de lanugo e vernix caseosa desprendidos da pele, células descamadas do intestino, secreção biliar e outras substâncias engolidas junto com o fluido amniótico (CARLSON, 1996).

Bertin (1958) utilizando critério embriológico dividiu o tubo digestivo em: intestino anterior (compreendendo a boca e o esôfago, o estômago se presente, até os orifícios dos canais hepatopancreáticos ou até a válvula pilórica, quando esta existir); médio (cujo limite posterior é marcado por uma válvula, por glândulas retais ou por cecos) e posterior (que inclui o reto até o ânus). Yamamoto (1966), Gremski,

(1975), Sire et al.(1981) e Anderson (1986) seguiram esta orientação nas suas pesquisas sobre a ultra-estrutura e a fisiologia do epitélio absorptivo e outros autores dividiram o intestino propriamente dito em anterior e posterior fundamentados exclusivamente na morfologia.

O intestino humano desenvolvido apresenta o epitélio dos vilos contínuo com aqueles do epitélio das glândulas intestinais. Estes possuem células tronco, algumas células absorptivas, células caliciformes, células de “Paneth” e células enteroendócrinas. Células absorptivas são células colunares altas, cada uma com um núcleo oval em sua porção basal e no ápice de cada célula uma camada homogênea denominada borda estriada ou borda em escova (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2004).

3.6 CÉLULAS GERMINATIVAS

Há mais de 100 anos a origem e desenvolvimento das células germinativas em vertebrados têm ocupado as mentes de embriologistas. Problemas fundamentais de células germinativas primordiais (PGC – Primordial Germ Cells) distribuição, caracterização, restrição de linhagem e diferenciação foi estudado no rato. Estudos do comportamento das células germinativas primordiais em embriões bovino têm levado em consideração o crescimento rápido do saco vitelino e mesentério dorsal que interfere na migração das células germinativas primordiais para o local extra-embriônico do rebordo gonadal. A maioria dos mamíferos como também os bovinos mostram reação histoquímica positiva para fosfatase alcalina, porém algumas outras células embrionárias também são positivas e assim o marcador específico para PGC está sujeito a várias limitações (WROBEL; SUESS, 1998).

Os sítios hematopoéticos mudam à medida que surgem novas populações de células-tronco. Foi demonstrado que precursores derivados do saco vitelino são responsáveis pela colonização e pelo desenvolvimento hematopoético de outros tecidos, sendo seqüencialmente desenvolvidos no embrião e no feto, como, por

exemplo, no fígado, timo, baço, bursa de Fabrícus nos pássaros e medula óssea (MOORE; METCALF², 1970 apud TAVIAN, 1999).

Na membrana do saco vitelino, a partir do 16º dia de gestação em humanos, são identificadas as células pluripotentes que originarão todas as linhagens celulares. As hemácias desta primeira geração possuem uma morfologia característica: são grandes, nucleadas, megalobásticas e com a cromatina condensada. A circulação é estabelecida em torno do 22º dia pela confluência dos circuitos sanguíneos vitelino, umbilical e intraembrionário (REBEL et al.³, 1996 apud ZAGO; COVAS, 2006).

As células do saco vitelino isoladas por volta do nono dia podem ser enxertadas e têm a capacidade de repovoar receptores animais logo após o transplante no fígado de camundongos recém-nascidos (YODER et al., 1997).

Segundo Latshaw (1987) alguns dos vasos sanguíneos vitelinos dentro do embrião são mantidos como principais vasos sanguíneos viscerais no adulto a porção endodérmica dá origem às células germinativas primordiais (células sexuais primárias) que irão migrar para as gônadas.

De acordo com Zanjani et al. (1993) e Tavian et al. (1999) durante a organogênese humana a proliferação e diferenciação de progenitores hematopoéticos em diversos micro-ambientes como saco vitelino, região ventral da aorta, fígado fetal, timo, baço e medula óssea, as células-tronco atingem estes órgãos através da circulação fetal. Segundo estes autores, o fígado, medula óssea e sangue fetal, são considerados sítios de origens de células-tronco mesenquimais.

No embrião humano, cerca de três semanas de idade, as células germinativas primordiais encontram-se localizadas na parede do saco vitelino, de onde se originam, migram para a gônada em desenvolvimento (testículo ou ovário), atingindo-a por volta da 4ª para 5ª semana, onde iniciam uma invasão do mesênquima e se incorporam gradualmente aos cordões sexuais primitivos. Na gônada do indivíduo geneticamente determinado, estas células darão origem à

² MOORE; METCALF. Ontogeny of the hemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. **Br J Haematol.** v. 18, n. 3, p. 279-296, 1970.

³ REBEL, V. I.; MILLER, C. L.; EAVES, C. J. et al.. The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts. **Blood.** v. 87, p. 3500-7, 1996.

linhagem gametogênica responsável pela oocitogênese ou pela espermatogênese, de acordo com o sexo estabelecido (ALMEIDA, 1999).

Wrobel e Suess (1998) estudaram as células germinativas em 34 embriões bovinos (18 a 39 dias). Para identificação das células primordiais bovinas em várias localizações e o desenvolvimento em diferentes fases, utilizaram-se reações de fosfatase alcalina combinada com a aplicação de lectinas. As primeiras células primordiais potencializadas foram identificadas dentro do embrião trilaminar de 18 dias de idade, na parede caudal do saco vitelino próximo ao disco germinativo.

3.7 REAÇÃO DE IMONOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE OCT-4

Oct-4 é a abreviação de Octamer-4, o qual trata-se de um fator de transcrição que é codificado pelo gene Pou5f1. Fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao DNA e ativam ou reprimem determinados genes. Oct-4 é influenciada por genes expressos durante o início do desenvolvimento embrionário, e por isso, pode ser muito importante no processo de desenvolvimento e diferenciação celular (PESCE; SCHÖLER, 2001).

O fator de transcrição Oct4 é expresso durante fases de divisão e é essencial para a diferenciação do blastocisto, é restrita a massa celular interna e epiblasto. Depois da gastrulação Oct4 só é ativo em células germinativas e é inativo em células somáticas (BOIANI et al., 2002).

O fator de transcrição Oct-4 POU (Pict-Oct-Unc) é expresso em células tronco embrionárias e células germinativa de ratos (PESCE; SCHÖLER, 2001), camundongos e suínos (VEJSTED, 2006). O gene Oct-4 compartilha alto grau de organização estrutural e foram identificados em outras espécies de mamíferos inclusive humanos, bovinos e ratos. É a 352^a proteína aminoácida pertencente à classe V das proteínas POU que expressam a totipotencialidade das células embrionárias. Inicialmente expressas em blastômeros e no desenvolvimento de embriões, o gene de expressão Oct-4 oriundas da massa celular interna (MCI) é regulado no trofoectoderma e no endoderma primitivo. Após o desenvolvimento a expressão do OCT-4 é mantida no ectoderma embrionário até o estágio cilíndrico do

embrião. Somente algumas células mantêm a expressão do Oct-4, até a inativação do gameta na diferenciação sexual (PESCE; SCHÖLER, 2001).

As células germinativas embrionárias (PGCs – primitive germinal cells) são estimuladas a proliferarem nos órgãos genitais e necessitam de fatores de crescimento. Quando aparecem os túbulos seminíferos as PGCs se diferenciam em gonócitos, subseqüentemente, os gonócitos são estimulados a proliferação por alguns dias e estes permanecem inativos. Após o nascimento, ocorre o início da espermatogênese: diferenciação dos gonócitos em espermatogônias (ROOIJ et al., 1989).

As células germinativas primordiais continuam a expressar Oct-4, elas proliferam e migram formando os órgãos genitais. Em embriões machos a persistência na expressão de Oct-4 em células germinativas é bem demonstrada no desenvolvimento fetal (KEHLER et al.⁴, 2004 apud MARTINS, 2006)

Estudos com modelos animais têm mostrado que transplante de células tronco fetais ou células tronco pluripotentes podem ter sucesso no tratamento de muitas doenças crônicas, sendo assim, Martins (2006) delineou uma linha de tratamento para distrofia muscular em cães da raça Golden Retriever, mediante caracterização e uso das células germinativas embrionárias para terapia celular. Fêmeas sem raça definida (SRD) foram selecionadas a partir do exame citológico e inseminadas artificialmente, e após 30 dias de gestação os animais foram castrados pela técnica de ovário-salpingohisterectomia.

Os embriões coletados possibilitaram a obtenção e estabelecimento de células tronco germinativas embrionárias, de fibroblastos fetais, de células musculares, os quais analisaram através de citometria de fluxo, interação no co-cultivo de células musculares caninas e células germinativas embrionárias e a imunopositividade das células na detecção de Oct-4. Os componentes somáticos das gônadas foram identificados através de anticorpo específico para linhagens primitivas celulares (células germinativas) e da organização estrutural do órgão. Através das análises morfológicas das células foram identificadas diferentes idades gestacionais e dois tipos de populações de células germinativas. A população tipo 1, apresentou núcleos grandes com proeminentes nucléolos e citoplasma translúcido, identificando esse tipo celular como gonócito. Entretanto a população tipo 2, foi

⁴ KEHLER, J.; TOLKUNOVA, E.; KOSCHORZ, B.; PESCE, M. et al, Oct4 is required for primordial germ cell survival. **EMBO reports**, v. 5, p. 1078-1083, 2004.

identificada pela presença de núcleos grandes, irregulares sem visualização dos nucléolos e presença de citoplasma claro, elucidando uma típica célula tronco embrionárias germinativas. Os resultados afirmaram que os embriões com 22 dias de idade gestacional, a região paramesonéfrica apresenta-se indiferenciada, diferentemente de embriões com 24 dias de idade, no qual o rim primitivo apresentou-se visivelmente diferenciado (MARTINS, 2006).

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

O material e os procedimentos realizados nesta pesquisa apresentam-se subdivididos em:

4.1 LABORATÓRIOS

O presente estudo foi realizado no setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Pesquisas em Ciências Morfológicas do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos – São João da Boa Vista – SP.

4.2 COLETA E ANÁLISE MACROSCÓPICA

Do total de 1580 vacas abatidas no frigorífico - Frigonossa / Poços de Caldas – MG, 280 úteros foram dissecados. Em cada corno uterino foi realizada uma incisão no sentido craniocaudal da cérvix uterina em direção ao corno gestante. Foram encontradas 51 amostras entre embriões e fetos bovinos (24 a 50 dias de gestação) com todos os anexos embrionários que foram posteriormente separados para as análises macro e microscópicas do saco vitelino e intestino primitivo.

4.2.1 Mensuração

Com o auxílio de uma lupa estereomicroscópica Zeiss, os embriões foram analisadas e medidos segundo a metodologia determinada por Winters et al. (1942); Melton et al. (1951) e Evans e Sack (1973), com mensuração da distância do ponto

maior da cabeça numa extremidade e a última vértebra sacral na extremidade oposta (Crown Rump / CR), utilizando-se um paquímetro. As amostras foram devidamente etiquetadas com os números correspondentes aos animais, medida CR e data da coleta.

Para a descrição da análise macroscópica, os embriões bovinos foram divididos em grupos I, II III, IV, V e VI (Tabela 1) através do CR e características morfológicas e de acordo com os dados dos autores relacionados na tabela 2. A idade estimada foi baseada nos trabalhos de Winters et al. (1942); Melton et al. (1951) e Evans e Sack (1973).

Tabela 1- Grupo de embriões, período gestacional, Crown-rump (CR) médios e número (n) de embriões bovinos - São Paulo – 2007

Grupo	Período Gestacional (dias)	CR (cm)	n
I	24 — 26	0,3 - 0,5	6
II	27 — 29	0,6 - 1,0	8
III	30 — 32	1,1 - 1,5	7
IV	33 — 35	1,6 - 2,0	9
V	36 — 38	2,1 - 2,5	9
VI	46 — 50	2,6 - 3,0	3

Tabela 1- Dados relacionados ao número dos embriões bovinos, Crown-Rump CR (cm), idade aproximada e referência utilizada. São Paulo, 2007.

Grupo (idade em dias)	n	Medida (cm) dos embriões Crown-Rump	Idade estimada Dias
1 24----- 26	6	0,30	24*
		0,35	25*
		0,40	26
Média		0,50	26
2 27 ----- 29	8	0,6	27
		0,7	27
		0,8	27*
		1,0	28 d e 16hs**
Média			27.6
3 30 ----- 32	7	1,2	32*
		1,4	32**
Média			32.0
4 33 ----- 35	9	1,6	35
		1,7	36.5
		1,8	38d e 12 h*
		2,0	38d e 12 h*
Média			36.9
5 36 ----- 38	16	2,1	38.6**
		2,2	40.0**
		2,3	40.0 *
		2,4	42.5
		2,5	45.0* ***
Média			40.0
6 46 ----- 50	5	2,6	45.0* ***
		2,7	45.0* ***
		3,0	45.0
Média			45.0

Fontes: *Winters et al. (1942); **Melton et al. (1951); ***Evans e Sack, (1973).

4.3 MICROSCOPIA DE LUZ

As membranas fetais foram colocadas em solução fixadora de paraformaldeído 4% em PBS pH 7,4 a 0,1M¹ e bouin. Após a fixação, o material foi desidratado em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em parafina Histosec² (BEHMER, 1976; TOLOSA et al., 2003). Foram obtidos cortes seriados com espessura de 5µm em micrótomo³, submetidos a colorações pelos métodos de Picrosírius (JUNQUEIRA et al., 1979) e hematoxilina e eosina para posterior descrição. Após a coloração, as lâminas foram montadas com lamínulas, utilizando-se Entelan⁴.

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para observação ao microscópio eletrônico de transmissão as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato pH 7,4 a 0,1 M. Uma vez fixados, os fragmentos (embriões e anexos) foram lavados em tampão fosfato pH 7,4 a 0,1M, e foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1 %⁵ por 1 hora. Após lavagens em tampão fosfato, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (de 70 % a 100 %) finalizando a última passagem em óxido de propileno⁶.

Durante 12-16 horas, as amostras ficaram mantidas sob agitação em uma mistura 1:1 de óxido de propileno e resina Spurr⁷. Em seguida, esta mistura foi substituída por resina pura, onde os materiais permaneceram por mais 4 a 5 horas.

¹ Dulbecco's phosphate buffer saline-DPBS, Gibco Co, USA

² Merck – lote k91225309

³ LEICA®, modelo 2165

⁴ Merck

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

⁶ Propylene oxide EM Grade, Polysciences, Inc., USA

⁷ Spurr's kit-Electron Microscopy Sciences, Co. USA

Para a localização de áreas adequadas, os blocos contendo as amostras foram cortados em um ultramicrotomo⁸. Cortes semifinos de 1 µm de espessura foram obtidos e corados a quente com uma solução aquosa de borato de sódio 1% em água destilada, contendo 0,25 % de azul de Toluidina para observação ao microscópio de luz.

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA: DETECÇÃO DE OCT-4

Para a realização do protocolo de imunohistoquímica foram utilizados 6 embriões (fixados em formaldeído a 10% tamponado, pH 7,4 a 0,1 M) com idades aproximadas de 24 a 26 dias de gestação (CR= 0,5 cm); 27 a 29 dias de gestação (CR= 0,9 cm); 30 a 32 dias de gestação (CR= 1,4 cm) e 33 a 35 dias de gestação (CR= 1,6 cm e CR 1,8 cm). Os embriões foram processados rotineiramente através das técnicas de inclusão em parafina (BEHMER, 1976; TOLOSA et al., 2003) e emblocados em planos transversais e horizontais. Em seguida os blocos foram cortados seqüencialmente (5 µm) e colocados em lâminas previamente silanizadas, (3 - aminoproyltriethoxy-silane) Sigma⁹ com dois cortes por lâmina sendo um para controle negativo.

O protocolo utilizado para esta técnica foi fornecido por Morten Vejlsted, doutorando do Departamento de Ciências Básicas Animal e Veterinária da Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark (ANEXO A).

A documentação fotográfica macroscópica foi feita através de uma câmara digital¹⁰ e microscópica¹¹. A nomenclatura utilizada foi referida conforme International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, International Committee on Veterinary Gross Histological Nomenclature e International Committee on Veterinary Embryological Nomenclature.

⁸ LEICA® modelo ULTRACUT UCT

⁹ A 3648-100

¹⁰ Sony Mavica 3.2MP

¹¹ Fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400

Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados a seguir referem-se a caracterização macroscópica do embrião, do saco vitelino e do intestino primitivo em diferentes estágios gestacionais (Figura 3).

Legenda: Notar a diferenciação morfológica nos diferentes períodos gestacionais. Crown Rump: A = 0,8 cm (27 a 29 dias de gestação); B = 1,4 cm (30 a 32 dias de gestação); C = 1,7cm e D = 2,0 cm (33 a 35 dias de gestação); E = 2,1cm (36 a 38 dias de gestação). Barra: 1 cm

Figura 3 - Fotografia em vista lateral esquerda de embriões bovinos

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Para a descrição macroscópica, os embriões bovinos foram divididos em grupos I, II III, IV, V e VI através do CR e características morfológicas.

Os embriões do grupo I CR 0,3 - 0,5 cm com idade aproximada de 24 a 26 dias de gestação apresentaram-se pequenos, levemente encurvados, tubo neural em formação, esboço da formação dos arcos branquiais, cório bem desenvolvido, saco vitelino de coloração amarelada e grande em relação ao embrião, apresentando uma porção maciça próxima ao ventre do embrião com duas extremidades sendo as duas membranas finas e uma delas apresentou-se mais alongada que a outra. A área de transição do saco vitelino e intestino primitivo macroscopicamente não pôde ser caracterizada nesta fase (Figura 4).

No grupo II com idade aproximada de 27 a 29 dias de gestação (CR 0,6 -1,0 cm) pudemos observar o terceiro e quarto arco braquial, as vesículas do cérebro formadas, flexura cervical e saliência cardíaca visível. Neste período o saco vitelino encontra-se bem desenvolvido, tanto na parte central como nas suas extremidades, e alongam-se juntamente com a porção ventral do alantóide, próximo aos vasos umbilicais do embrião (Figura 5).

Nos embriões do grupo III, idade aproximada de 30 a 32 dias de gestação com 1,1 a 1,5 de Crown Rump, respectivamente, mostrou as seguintes características: curvatura crânio caudal em formato de "C", arcos branquiais se diferenciando, o olho aparece delineado devido à pigmentação da retina, fosseta nasal, flexura cervical acentuada, broto do membro torácico com formato de "pá", broto do membro pélvico e cauda em desenvolvimento. Na região ventral do embrião o coração aparece predominando esta região e caudal a este a delimitação do intestino primitivo juntamente com o saco vitelino envolvidos pelo cordão umbilical. O saco vitelino neste período apresenta-se ainda desenvolvido com suas extremidades alongadas, com uma porção do saco vitelino incorporada pelo embrião formando o intestino primitivo e as outras porções permanecendo fora do embrião (Figura 6).

Embriões do grupo IV com Crown-rump 1,6 a 2,0 cm (33 a 35 dias de gestação) apresentaram-se com características muito semelhantes ao grupo anterior. Nesta fase os membros torácicos mostravam-se em forma de pás e os pélvicos em forma de nadadeira. O saco vitelino encontra-se em comunicação com o

intestino primitivo (médio) através do ducto vitelino que se encontra nesta fase estreito e as extremidades alongadas mostraram-se bem mais visíveis que a porção central (mais próxima do ventre) (Figura 7).

As características externas dos embriões do grupo V (36 a 38 dias de gestação, CR 2,1-2,5cm) apresentaram-se com os membros torácicos iniciando a bipartição (casco), desenvolvimento do focinho e dorsalmente parece a crista néfrica (rim mesonéfrico). A porção central do saco vitelino não é facilmente visível como as suas extremidades devido ao processo de involução (Figura 8).

No grupo VI (CR 2,6 A 3,0 cm) de idade aproximada de 46 a 50 dias, os membros torácicos apresentaram com bipartição dos cascos, desenvolvimento do focinho, saliências auriculares iniciando a formação da orelha externa, vascularização da pele visível com áreas de hematomas, costelas aparentes, neóporos fechados, cauda desenvolvida e ventralmente observou-se a herniação intestinal no cordão umbilical com as extremidades do saco vitelino bem visível e de coloração amarelada o que o diferenciava de outras estruturas (Figura 9).

Legenda: Em 4A, observar a região cefálica (RC) e caudal (CA); flexura cervical (FC); porção central do saco vitelino (SV) bem desenvolvido, com suas extremidades alongadas (setas). Barra: 0,1 cm. Observar em 4B o detalhe do saco vitelino (SV) com intestino primitivo. Barra: 1 cm

Figura 4 - Fotografia de embrião bovino em vista lateral, apresentando CR 0,4 cm (grupo I) com idade gestacional estimada entre 24/26 dias

Legenda: 5A e 5B, observar arcos branquiais (AB), saliência cardíaca (C), intestino primitivo (IP), flexura cervical (FC), âmnio (A), porção central do saco vitelino (seta branca), extremidades do saco vitelino (SV) e alantóide (AL). Barra: 0,5 cm. Em 5B, detalhe da área de transição do saco vitelino e intestino primitivo. Barra: 0,1 cm

Figura 5 - Fotografia de embrião bovino em vista lateral, apresentando CR de 0,9 cm (grupo II) com idade gestacional estimada entre 27/29 dias

Legenda: 6A e 6B, observar curvatura crânio caudal em formato de "C", vesícula óptica (VO), flexura cervical (FC), arcos branquiais (AB), broto do membro torácico (MT), porção central do saco vitelino (seta), broto do membro pélvico (MP), fígado (F), extremidade do saco vitelino (SV), desenvolvimento da cauda (CA), âmnio (A), somitos (S). Barra: 0,5 cm. 6B, detalhe da transição do saco vitelino (SV) com intestino primitivo (IP), fígado (F), membro pélvico (MP). Barra: 0,1 cm

Figura 6 - Fotografia de embrião bovino em vista lateral, apresentando CR 1,4 cm (grupo III) com idade aproximada de 30 a 32 dias de gestação

Legenda: 7A, neste período observar os membros torácicos em forma de pás (MT) e os pélvicos em forma de nadadeira (MP); vesícula óptica (olho com pigmentação da retina, (VO); flexura cervical (FC); fígado (F); o saco vitelino (SV) encontra-se em comunicação com o intestino primitivo (IP) através do ducto vitelino (DV) que se encontra nesta fase estreito. Barra: 0,5 cm. 7B, detalhe da área de transição do saco vitelino como intestino primitivo. Barra: 0,1 cm

Figura 7 - Fotografia de embrião bovino vista lateral, apresentando CR 1,6 cm (grupo IV) com idade gestacional estimada entre 33/35 dias

Legenda: 8A, observe membros torácicos (MT), desenvolvimento do focinho (seta branca), dorsalmente o local da crista mesonéfrica (CM) encontra-se o rim mesonéfrico, flexura cervical (FC); broto do membro pélvico (MP), fígado (F), intestino primitivo (IP); saco vitelino (SV) e cordão umbilical (semicírculo). Em 8B, a área de conexão do saco vitelino com o intestino primitivo (IP). Observar a distribuição do saco vitelino com suas extremidades alongadas (seta rosa), ducto vitelino (DV) e o intestino primitivo (IP). Barra: 1 cm

Figura 8 - Caracterização externa do desenvolvimento de embrião bovino com 2,5 cm de CR (grupo V) com idade gestacional estimada entre 36/38 dias

Legenda: 9A, observar região cefálica (RC), membros torácicos (MT) bipartidos (cascos), saliências auriculares (orelha externa) (SA), vascularização da pele com áreas de hematomas (setas menores), costelas aparentes (CS), fígado (F), cauda (CA), herniação intestinal (HI), cordão umbilical (seta maior), extremidade do saco vitelino (SV). Barra: 1 cm. 9B, detalhe da área de transição entre o intestino primitivo (IP) e saco vitelino (SV), observar as extremidades do saco vitelino em fase de involução (seta)

Figura 9 - Fotografia de feto bovino vista lateral, apresentando CR 3,1 cm (grupo VI) com idade gestacional estimada entre 46/50 dias

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Os resultados a seguir referem-se às análises microscópicas através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão da área de transição do intestino primitivo com o saco vitelino (Figuras 10, 11, 12,13 e 14).

A conformação e aspectos gerais do embrião bovino com idade gestacional aproximada de 30 dias são apresentadas na figura 10 para uma melhor interpretação dos resultados obtidos.

Legenda: Observar vértebras (V), mesonefro (M), estômago (E1), fígado (F), coração-ventrículo (Cv), coração-átrio (Ca), telencéfalo (T), cordão umbilical demarcado pelo círculo (Cu), vaso umbilical (*), âmnio (A), intestino I, saco vitelino (SV). Notar local de conexão do saco vitelino com o intestino (seta). Coloração: Hematoxilina Eosina, Aumento: 10X

Figura 10 - Fotomicrografia de embrião bovino com CR de 1,0 cm e Idade gestacional aproximada de 30 dias

5.2.1 Análise microscópica do saco vitelino

O saco vitelino apresentou-se como uma estrutura trilaminar divididas em 3 camadas: uma camada única de células endodérmicas - endoderme, revestindo a cavidade vitelina; uma camada simples mesotelial, voltada ao exoceloma – mesotélio; e uma camada intermediária mesenquimal vascular - mesênquima. O endoderma composto por células endodérmicas, que se apresentam apoiadas pelo mesênquima embrionário e mesotélio (Figuras 11, 12, 13 e 14).

O epitélio vitelino com o tecido conjuntivo formava dobras que se projetam para a luz, resultando em estruturas canaliculares (Figuras 11, 12 e 14). Estas células apresentam um núcleo circular e muitas vezes, com formato oval com nucléolos evidentes (Figura 14).

Nas amostras embrionárias do grupo I observou-se eritroblastos primários no interior das ilhas vasculares que estão localizadas no mesênquima embrionário. O epitélio do saco vitelino apresentou-se globoso a colunar em uma única camada apoiadas pelo mesênquima embrionário, formando pequenas rugas na luz do saco vitelino (Figura 11).

O saco vitelino dos embriões do grupo II com idade aproximada de 27 a 29 dias de gestação (CR 0,6 -1,0 cm) e grupo III (CR 1.1 a 1.5cm, idade aproximada 30 a 32 dias) apresentou características semelhantes. Pudemos observar que nestes períodos o saco vitelino apresentou-se semelhante ao grupo I, só que com as ilhas vasculares mais desenvolvidas e com maior quantidade de hemácias nucleadas (hemangioblastos) de origem fetal. O saco vitelino era composto por inúmeras ilhas vasculares que correspondem onde os vasos são envolvidos pelas células vitelinas (endodérmicas) e células mesenquimais (mesoderma). No interior dos vasos foi possível identificar um grande número de hemácias nucleadas (hemangioblastos) de origem (Figura 12).

Neste período as células do saco vitelino também se apresentaram em uma única camada de células de formato globoso a colunares e neste período o epitélio formava algumas rugas mais definidas que as do grupo I. A camada que corresponde ao mesênquima era delgada e com células alongadas caracteristicamente sintetizadoras (Figura 12). O endoderma da membrana vitelina era composto pelas células endodérmicas, grandes, uni o binucleadas e muitas

vezes com 2 núcleolos. Este arranjo celular era semelhante a um arranjo glandular devido a sua arquitetura em ilhas vasculares somado às camadas teciduais (endoderma e mesoderma). A região do mesênquima mostrou-se repleta de vasos com eritrócitos em seu interior (Figura 12).

O saco vitelino de embriões do grupo V (36 a 38 dias de gestação, CR 2,1-2,5 cm) apresentou-se com células ainda com formato cúbico a colunar, células claras e células mais escuras, e algumas se apresentavam binucleadas. O epitélio vitelino com o tecido conjuntivo enrugava-se profundamente para a luz do saco vitelino formando pequenos canalículos que davam a impressão de uma camada espessa de epitélio.

Na microscopia eletrônica de transmissão pudemos identificar no interior do núcleo a cromatina descondensada sob a forma de eucromatina em grande quantidade (núcleos eucromáticos), indicando que estas células possuem alta atividade celular de síntese protéica, devido a maior a proporção ativa do DNA (eucromatina) em relação à porção inativa (heterocromatina). Puderam-se observar mitocôndrias, localizadas principalmente entre o núcleo e a extremidade luminal. Grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso distribuía-se espaçadamente e pequenas vesículas são observadas por toda região citoplasmática. Ocasionalmente foram observados, entre as células epiteliais endodérmicas do saco vitelino espaços intercelulares. Este fato deveu-se a uma possível área de fenestração do revestimento endotelial. Os eritroblastos primários encontravam-se dentro dos vasos (Figura 14).

Legenda: 11A e 11B, embriões do grupo I (CR 0,4 cm) e II (CR 0,8 cm), observar as ilhotas vasculares (lv) revestidas por células endoteliais (seta amarela) e em seu interior células sanguíneas primitivas, os eritoblastos primários (setas azuis), lúmen (L). Notar em 11C e 11D o saco vitelino composto por três camadas: endoderma (E), mesoderma (Ms) e mesênquima (Mq); no endoderma observar uma única camada de células globosas e às vezes prismática (setas rosas) e células basais. Epitélio vitelino com o tecido conjuntivo dobrado para a luz do saco vitelino formando pequenos canalículos (seta preta). Coloração: Hematxilina e Eosina, Barra = 50 μm

Figura 11 - Fotomicrografia do saco vitelino de embriões bovino em diferentes períodos gestacionais

Legenda: 12A observar saco vitelino próximo à área de transição, endoderma (E), mesoderma (Ms) e lúmen (L). 12B, notar o detalhe da grande ilhota vascular, repleta de eritroblastos primários (seta cheia) no mesênquima embrionário (Mq). 12C, células do endoderma com presença de dois nucléolos (seta azul). 12D, detalhe das células do endoderma mostrando células de formato globoso (G) e as vezes prismático (P). 12A, 12C, 12D, Coloração: Hematoxilina e Eosina e 12B, Picrosírius. Barra = 50 µm

Figura 12 - Fotomicrografia do saco vitelino de embriões bovino do grupo III (CR 1,2 cm) e grupo V (CR 2,1)

Legenda: Notar formato cúbico das células (Cb), colunar (Cl) no endoderma (E); mesênquima (Mq) com presença de fibras colágenas (seta), mesotélio (Ms) e lúmen (L). Coloração Picrosírius. Barra: 50μm

Figura 13 - Fotomicrografia do saco vitelino de embrião bovino do grupo V (CR de 2,1 cm), idade gestacional estimada entre 36/38 dias

Legenda: 14A, Fotomicrografia de corte semifino do saco vitelino de embrião bovino, notar sua estrutura trilaminar composta pelas camadas de endoderma (En), mesoderma (Ms) e mesênquima (Mq) na zona intermediária. Lúmen (L), vaso sanguíneo (Vs). Coloração: Azul do toluidina, 40X. Eletromicrografia 14B observar as células endodérmicas contendo núcleo (N) de formato irregular, eucromáticos e algumas vezes com dois nucléolos (seta azul), presença de microvilos na membrana apical (Mi), voltados para o lúmen (L), 3500X; 14C, notar a zona ocludente (setas rosa) nas células endodérmicas do saco vitelino. Numerosos retículos endoplasmáticos rugosos estão presentes no citoplasma (Re), mitocôndrias (Mi), presença de desmossomos (De) e núcleo (N), 4400X; 14D, observar a zona ocludente (seta rosa) e os microvilos inter cruzados no lúmen (Mi), 1100X; 14E, observar uma grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (Re) e pequenas vesículas (V) no citoplasma, 5600X ; 14F, eritroblastos (E) dentro do vaso sanguíneo (Vs) e células endoteliais (Ce), 5600X

Figura 14 - Fotomicrografia e Eletromicrografia de saco vitelino de embrião bovino com CR de 2,3 cm e idade gestacional estimada entre 30 e 40 dias

5.2.3 Análise microscópica do Intestino primitivo

O intestino primitivo pôde ser dividido em três partes: intestino cranial, intestino caudal e intestino médio. O intestino médio (primitivo) está em íntima relação com o saco vitelino através do ducto vitelino (ou pedículo vitelino). Este permanece temporariamente ligado ao saco vitelino (Figuras 15, 16 e 17).

Na região ventral do embrião, o ápice da alça intestinal se encontrava na cavidade extra-embriônica no cordão umbilical. O ápice da alça intestinal se encontrava ligado diretamente com o ducto vitelino (Figura 16).

O intestino primitivo apresentou o epitélio iniciando sua diferenciação com células colunares estratificadas e bordadura em escova (endoderma) seguida logo abaixo por células mesenquimais indiferenciadas provenientes do mesoderma (Figuras 15, 16 e 17).

Legenda: 15A, corte transversal do epitélio em diferenciação (seta cheia) e células mesenquimais indiferenciadas (Ms). 15B, corte longitudinal do intestino primitivo, na região luminal, a bordadura em escova (seta azul). 15C, detalhe do intestino primitivo com secreção (S) em seu interior e epitélio prismático estratificado (seta roxa). 15D, corte transversal do intestino de embrião com CR 2,1 cm, células mesenquimais indiferenciadas (Ms) e epitélio (E). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra: 50 µm

Figura 15 - Fotomicrografias de intestino primitivo de embriões bovinos do grupo II (CR de 1,0 cm), idade gestacional estimada entre 27/29 dias

Legenda: 16A, fotomicrografia de corte semifino do intestino primitivo, observar o início da diferenciação das camadas intestinais (setas vazias) e mesênquima (Ms). Em 16B, detalhe de um vaso, revestido por células endoteliais (seta cheia) com células sanguíneas no seu interior (estrela). 16C, Observar as células indiferenciadas de formato alongado (setas cheias), no lúmen, borda em escova (Be), mesênquima (Ms) e epitélio intestinal (Ei). Coloração azul de Metileno. Barra = 200μm

Figura 16 - Fotomicrografia do intestino primitivo (na região da alça intestinal) de embrião bovino do Grupo II, (CR 1,4 cm), idade gestacional estimada entre 30/32 dias

Legenda: 17A, Fotomicrografias de cortes semifinos do intestino primitivo de embriões do gupo IV. 17A, mostrando o início de diferenciação do epitélio intestinal (seta cheia). Barra 500 μ m, Azul de Toluidina. 17B, eletromicrografias do intestino primitivo evidenciando a diferenciação do mesênquima (Mq) e epitélio intestinal (E), 710X. 17C, observar o lúmen (L), 5600X. 17D, mostra detalhes do formato irregular das células epiteliais, iniciando a diferenciação (setas vazias), 4400X

Figura 17 - Fotomicrografia e Eletromicrografia do intestino primitivo de embrião bovino do grupo IV (CR 1,8 cm), idade gestacional estimada entre 33/35 dias

5.2.3 Análise microscópica da transição do saco vitelino com o intestino primitivo

Nas amostras embrionárias, pudemos observar a presença de células ativas no saco vitelino e na área de conexão do intestino primitivo na sua porção anterior com o saco vitelino.

A área transicional entre o saco vitelino e o intestino primitivo é estreita em relação à luz de ambas estruturas contendo células de formato irregular, ora achatadas, ora globosas formando um delicado revestimento na luz desta região. No interior (lúmen) havia a presença de hemangioblastos e figuras indicando a passagem destas células para o mesênquima. No mesênquima desta área transicional inúmeros e pequenos capilares foram observados com hemangioblastos no seu interior. A área de conexão entre o saco vitelino e intestino primitivo nos embriões apresentaram o saco vitelino localizado ventralmente ao embrião e bem desenvolvido.

No grupo V (36 a 38 dias de gestação) foram feitos cortes transversais seqüenciais de toda a área de transição entre o saco vitelino e intestino primitivo. Pudemos dividir todas as secções em cinco: um cortes na região central do saco vitelino, um na região final do saco vitelino, um no centro do ducto vitelino (área de transição), um no início do intestino primitivo e um na região da alça intestinal (Figura 18).

Ao redor da região central do saco vitelino estavam presente as artérias e veias umbilicais e o ducto do alantóide, todos envolvidos pelo mesênquima embrionário. O epitélio do endoderma do saco vitelino mostrou-se cúbico, e junto ao mesênquima e mesoderma, formavam rugas voltadas para o interior da luz (ampla). Algumas células se apresentaram mais claras que outras e às vezes contendo dois núcleos (Figuras 19 e 20).

A camada do mesênquima apresentou algumas ilhas vasculares com eritrócitos em seu interior, com menos freqüência que as observadas nas extremidades do saco vitelino.

De acordo com o plano de corte ilustrado na figura 20 (secção B - C) mais próximo do ducto vitelino, o epitélio do endoderma se apresentou com três tipos diferentes de células epiteliais: globosa, cúbicas e cilíndricas, com núcleos grandes e

alongados apoiados no mesênquima. As rugas aparecem acentuadas, voltadas para luz que nesta região se apresentam estreitas. No mesênquima não foi encontrado ilhas vasculares, mas sim vasos sanguíneos com eritroblastos. Nesta região aparece o mesoducto lateralmente a porção central do saco vitelino, envolvendo um vaso com eritroblastos no seu interior.

De acordo com o plano de corte ilustrado na figura 21 (secção E - F) no ducto vitelino, foi difícil identificar sua luz. Nesta região observamos dois vasos envolvidos pelo mesênquima. O plano de corte ilustrado na figura 22 (secção G - H), área da transição (porção média) foi difícil identificar as estruturas características do saco vitelino propriamente dito e do intestino primitivo. Esta área denominada de transição possuía um aglomerado de células indiferenciadas. Ao redor do ducto pudemos observar vasos sanguíneos.

No plano de corte ilustrado na figura 23 (secção I - J) observamos a formação de uma protusão da alça intestinal em direção ao ducto vitelino, dentro do cordão umbilical e do celoma extra-embriônico. Esta protusão proveniente da cavidade embrionária (celoma intra-embriônico) dividiu o intestino primitivo em duas porções: cranial e caudal. No centro do ducto observou-se um arranjo de células em início de diferenciação para epitélio intestinal margeado por mesênquima vascularizado.

O plano de corte ilustrado na figura 23 (secção I - J) refere-se à área da alça intestinal (primária), onde se evidenciou a presença dos ramos cranial e caudal. Nesta região o epitélio apresentava-se estratificado, iniciando diferenciação celular e pequena luz intestinal.

Legenda: 18A, Fotografia de embrião bovino e 18B, esquema representativo de cortes transversais seqüenciais da região de transição entre o saco vitelino e intestino primitivo de A - J. Observar as estruturas próximas à transição: (azul) - veias umbilicais, (verde) - saco vitelino e intestino primitivo, (vermelho) - artérias umbilicais, (amarelo) - alantóide e (azul) - mesênquima

Figura 18 - Fotografia e Esquema de embrião bovino em vista lateral, com CR de 1,5 cm (grupo V) e idade gestacional estimada entre 36/38 dias

Legenda: A, esquema apresentando a secção de cortes ilustrados nas fotomicrografias 19B e 19C. 19B, Fotomicrografia da região do saco vitelino envolvidas pelo mesênquima embrionário (Mq), observar a disposição nesta área do saco vitelino (Sv), com rugas (seta vazia), voltadas para o lumén (L), artérias (Au) e veias (V) umbilicais, alantóide (A), celoma extra-embrionário (C). Barra: 500 µm. 19C, Detalhe das estruturas do saco vitelino, rugas (seta vazia), epitélio cúbico (Cb) a colunar (Cl), no endoderma (E), mesotélio (Ms), células sanguíneas (Cs), lumén (L). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra: 50 µm

Figura 19 - Esquema e Fotomicrografia da área de transição do saco vitelino e intestino primitivo de embrião bovino do grupo V

Legenda: 20A, esquema apresentando a secção de cortes ilustrados nas fotomicrografias 20B e 20C. Plano de corte C – D. 20B, fotomicrografia da área de transição do saco vitelino e intestino primitivo; celoma extra-embriônico (C), artérias umbilicais (Au) e veias umbilicais (V), mesênquima (Ms). Barra: 500. 20C, detalhe da fotomicrografia da área de transição do saco vitelino e intestino primitivo. Observar os vasos sanguíneos com hemangioblasto em seu interior (seta cheia), três tipos diferentes de células epiteliais endodérmicas: globosas (G), cúbicas (Cb) e colunar (Cl), com núcleo grande (Nu), presença de dois nucléolos (círculo), rugas acentuadas (seta vazia) voltadas para o lumém (L). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra: 50 µm

Figura 20 - Esquema e fotomicrografia da área de transição do saco vitelino e intestino primitivo de embrião bovino do grupo V

Legenda: 21A, esquema apresentando a secção de cortes ilustrados nas Fotomicrografias C e D. Plano de corte E – F. 21B, Fotomicrografia na região do ducto vitelino, mesênquima (Mq), celoma extra-embriário (C). Barra: 500 µm. 21C, detalhe da área do ducto vitelino, mostrando o ducto fechado (L), células endoteliais (seta cheia), no centro um aglomerado de células indiferenciadas (Ci), vasos sanguíneos com hemangioblastos (seta vazia). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra: 50 µm

Figura 21 - Esquema e Fotomicrografias da área de transição do saco vitelino e intestino primitivo de embrião bovino do grupo V

Legenda: Em 22A, esquema apresentando a secção de cortes ilustrados nas Fotomicrografias C e D. Plano de corte G - H. 22B, Fotomicrografia no início do intestino primitivo (Ip), próximo ao ducto vitelino. Barra: 500µm. 22C, Detalhe do intestino primitivo, mostrando o arranjo de células, iniciando a diferenciação do epitélio intestinal (seta), mesoducto (Mo), celoma extra-embriônico (C) e mesênquima (Ms). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra: 50 µm

Figura 22 - Esquema e Fotomicrografias do intestino primitivo de embrião bovino do grupo V

Legenda: 23A, esquema apresentando a secção de cortes ilustrados nas fotomicrografias C e D, plano de corte I - J. 23B, Fotomicrografia na região da alça intestinal primária. Observar o ramo cranial (R) e caudal (D) da alça do intestino primitivo, celoma extra-embriónico (C). Barra: 500 µm. 23C, detalhe do intestino primitivo, mostrando o arranjo de células, iniciando a diferenciação do epitélio intestinal (seta), mesoducto (Mo), celoma extra-embriónico (C) e mesênquima (Mq). Coloração: Hematxilina e Eosina. Barra: e 50 µm

Figura 23 - Esquema e Fotomicrografia da alça intestinal primária de embrião bovino do grupo V

5.2.4 Reação de imunohistoquímica para detecção de Oct-4

Em todos os embriões submetidos à reação imunohistoquímica de Oct-4 pudemos observar algumas regiões marcadas pelo anticorpo.

Os animais utilizados para esta reação tinham CR de 0,5 cm (Grupo I – entre 24 e 26 dias de gestação), CR 0,9 cm (Grupo II – entre 27 e 29 dias de gestação), CR 1,4 cm (Grupo II – entre 27 e 29 dias de gestação), CR 1,6 (Grupo III – entre 30 e 32 dias de gestação), CR 1,8 cm (Grupo IV - entre 33 e 35 dias de gestação).

O embrião como um todo e seus anexos foram submetidos à reação imunohistoquímica, podendo-se observar várias regiões contendo células fortemente reativas: rim primitivo, saco vitelino, parênquima hepático e região gonadal (Figura 24).

Legenda: 24A, 24B, 24C e 24D fotomicrografias de controle. 24 F, fotomicrografias identificando as células oct-4 positiva, 24E - rim primitivo, 24F - saco vitelino, 24G - fígado e 24H – gônadas

Figura 24 - Fotomicrografia de embriões bovino do grupo IV (CR de 1,6 cm) e idade gestacional estimada entre 33/35 dias

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os itens discutidos estão relacionados ao período gestacional estimados dos embriões, a descrição macro e microscópica do saco vitelino, e a marcação de imunohistoquímica para detecção de Oct-4.

Poucos estudos têm sido realizados de desenvolvimento e crescimento de embriões e fetos bovino (NICHOLS, 1944) e até hoje encontramos a mesma dificuldade para estabelecer a idade correta destes animais, correlacionando à mesma através de medidas de Crown- Rump (CR). O trabalho de Winters et al. (1942) esclareceram muitos problemas com sua investigação, combinando três fatores essenciais necessários (idade, peso e medida) e estabeleceram uma curva crescimento.

As idades estimadas de acordo com o comprimento do ponto maior da cabeça numa extremidade e a última vértebra sacral na extremidade oposta (Crown Rump / CR) dos embriões e fetos seguiram metodologias adotadas por pesquisas que tiveram como parâmetros embriões bovinos da espécie *Bos taurus*. A idade estimada foi baseada nos trabalhos de Winters et al. (1942); Melton et al. (1951) e Evans e Sack (1973). Os embriões utilizados neste trabalho foram agrupados em seis períodos gestacionais de acordo com suas medidas do CR. Consultando as tabelas de Evans e Sack (1973) e Noden e DeLahunta (1990), constata-se que as informações contidas apresentaram valores coincidentes aproximados das medidas de CR utilizadas no presente trabalho. A curva de crescimento do CR aumenta gradativa e linearmente em função da idade gestacional bovina, em conformidade com Reynolds et al. (1990).

Hafez e Rajakosk (1964) estudaram o desenvolvimento placentário e fetal durante a gestação múltipla de bovinos e mostraram que embriões com 30 dias, a medida CR variou de 0,8 à 1,2 cm com média de 1,0 cm. Nossos achados mostraram que com 30/32 dias variou CR de 1,1 a 1,4cm.

Assis Neto (2005) estudando embriões bovinos afirmou que de 15 a 20 dias de gestação os embriões apresentaram $0,71 \pm 0,17$ cm de CR (“Crow-Rump”), com 20 a 30 dias de gestação = $1,23 \pm 0,13$ cm, de 30 a 40 dias = $1,90 \pm 0,27$ cm de CR; 40 a 50 dias de gestação = $2,79 \pm 0,19$ cm e de 50 a 60 dias, $3,76 \pm 0,52$ cm de CR e já nesta idade são considerados fetos. No entanto nossos resultados mostram que com

24 a 26 dias de gestação os embriões apresentam 0,3 a 0,5 cm de CR, 27 a 29 dias; CR=0,6 a 1,0 cm, 30 a 32 dias de gestação; CR= 1,1 a 1,5 cm, 33 a 35 dias de gestação; CR=1,6 a 2,0 cm, 36 a 38 dias de gestação; CR= 2,1 a 2,5 cm e 46 a 50 dias de gestação.

O saco vitelino dos embriões bovinos se desenvolve com 18/23 dias de gestação, de um disco trilaminar constituído de trofoblasto, mesoderma e endoderma, para um corpo cilíndrico (LATSHAW, 1987; WROBEL; SUESS, 1998). A idade inicial de nossos embriões foi de 24 dias, no entanto não pudemos observar o início de desenvolvimento desta estrutura. Para Russe et al. (1992) esta fase inicia-se aos 22 dias de gestação.

O saco vitelino está localizado na cavidade exocelômica, na porção ventral do embrião, próximo ao cordão umbilical, permanecendo conectado ao intestino posterior do embrião, mediante sua porção central (ASSIS NETO, 2004), estando delimitado por uma camada unicelular endodérmica (PALIS; YODER, 2001). Nossos achados estão de acordo com os autores e complementam ainda que 24 a 26 dias de gestação o saco vitelino é composto por três regiões, uma central, uma conexão de saco vitelino com intestino primitivo e duas projeções (extremidades) que se alongam acompanhando o alantóide ventralmente, estes resultados também foram observadas por Russe et al. (1992) e Assis Neto (2005).

Os embriões do grupo I, com CR de 0,3 - 0,5 cm apresentaram-se muito pequenos, levemente encurvados, tubo neural em formação, cório bem desenvolvido, saco vitelino de coloração amarelada e extenso em relação ao embrião, apresentando uma porção maciça próxima ao ventre do embrião com duas extremidades sendo as duas membranas finas e uma delas apresentou-se mais alongada que a outra (ASSIS NETO, 2005). Devido ao pequeno tamanho do embrião, a área de transição do saco vitelino e intestino primitivo macroscopicamente não puderam ser caracterizados nesta fase.

No grupo II (CR 0,6 -1,0 cm) pudemos observar o terceiro e quarto arco braquial, as vesículas do cérebro formadas, flexura cervical e saliência cardíaca visível, tais características também foram observadas por Alberto (2006). Neste período o saco vitelino encontra-se bem desenvolvido, tanto na parte central como nas suas extremidades, e alongam-se juntamente com a porção ventral do alantóide, próximo aos vasos umbilicais do embrião, características também encontradas por Assis Neto (2005).

Os embriões do grupo III, com 1,1 a 1,5 de Crown-Rump e grupo IV (CR 1,6 a 2,0 cm), mostraram características semelhantes, tais como: curvatura crânio caudal em formato de "C", arcos branquiais se diferenciando, o olho aparece delineado devido à pigmentação da retina, flexura cervical acentuada, broto do membro torácico com formato de "pá", broto do membro pélvico e cauda em desenvolvimento, estas estruturas também foram descritas por Winters et al. (1942) e Assis Neto (2005). Acrescentamos ainda que na região ventral do embrião, o coração aparece predominante e caudal a este, a delimitação do intestino primitivo juntamente com o saco vitelino estão envolvidos pelo cordão umbilical. O saco vitelino encontra-se em comunicação com o intestino primitivo (médio) através do ducto vitelino que nesta fase é estreito com suas extremidades alongadas.

As características externas dos embriões do grupo V e VI mostraram-se muito semelhantes, apresentando o início da bipartição dos cascos, desenvolvimento do focinho e saliências auriculares iniciando a formação da orelha externa, vascularização da pele com áreas de hematomas, costelas aparentes, neuróporos fechados e cauda desenvolvida. Nossos resultados são semelhantes aos relatados por Alberto (2006) quanto às características, mas diferem quanto a idade gestacional, uma vez que em nosso trabalho este grupo apresentou idade estimada entre de 46 a 50 dias enquanto que a autora cita idade gestacional aproximada de 45 dias. Ventralmente ao embrião observou-se a herniação intestinal no cordão umbilical com as extremidades do saco vitelino bem visível e de coloração amarelada diferenciado de outras estruturas. A porção central do saco vitelino não foi facilmente visível como as suas extremidades devido ao processo de involução, tais características citadas confirmam e complementam os achados de Assis Neto (2005).

O saco vitelino involui e degenera-se muito cedo em bovinos (MOSSMAN, 1987; NODEN; DELAHUNTA, 1990) e, em eqüinos e carnívoros domésticos, o saco vitelino persiste funcionalmente (RUSSE et al., 1992). Às características macroscópicas do processo de involução do saco vitelino em bovinos são contraditórias entre vários autores, a partir da terceira semana para Barone (1986) e Bryden et al. (1972) no 25º dia de gestação, reduzido a um grupo sólido de células, e seus vestígios até o final da gestação não são mais encontrados (LATSHAW, 1987; NODEN; DE LAHUNTA, 1990; WOODING; FLINT, 1994). Pudemos observar o saco

vitelino em todas nossas amostras embrionárias (24 a 50 dias de gestação) com diferentes características morfológicas, como já citadas anteriormente.

Assis Neto (2005) descreve em seus estudos que com o evoluir da gestação o comprimento total do saco vitelino vai diminuindo e as extremidades alongadas vão se tornando vestigiais e desaparecem. Não foi possível analisar o desaparecimento do saco vitelino, pois a proposta de nosso trabalho era descrever esta estrutura até 50 dias de gestação.

Verificamos ainda, assim como Assis Neto (2005) que o saco vitelino é composto de três camadas: uma camada revestindo a cavidade vitelina, o endoderma, composto por células endodérmicas apoiadas em mesênquima embrionário; uma camada simples mesotelial, voltada ao exoceloma, o mesotélio; e uma camada intermediária mesenquimal vascular, o mesênquima. O endoderma da membrana vitelina apresenta-se composto por células endodérmicas, grandes, uni o binucleadas. Este arranjo celular era semelhante a um arranjo glandular devido a sua arquitetura em ilhas vasculares somado às camadas teciduais (endoderma e mesoderma)

Zago e Covas (2006) descrevem que em humanos, aproximadamente duas a três semanas após a fertilização e implantação do ovo no endométrio, surge no mesênquima lateral a notocorda, agrupamentos de células, denominados “ilhotas sanguíneas”. As células externas das ilhotas vasculares são diferenciadas em células endoteliais, enquanto que as internas em sangue primitivo (CHOI, 2002). Nossos achados estão de acordo com a descrição dos autores e sugerimos que estas estruturas apresentam tamanhos diferentes, com CR de 0,4 a 1,0 cm, em grande quantidade e bem desenvolvidas; e a partir de CR 1,0 são menores em quantidade. Este fato pode ser devido à degeneração do saco vitelino, que nos ruminantes é funcional durante um curto período de tempo (NODEN; DE LAHUNTA, 1990). O início do processo de degeneração da parede do endoderma do saco vitelino está associado ao colabamento de canalículos presentes em embriões ovinos com 36 mm de CR, e em embriões bovinos com 42 mm de CR (RUSSE et al., 1992). Nos embriões ovinos com 42 mm de CRL ocorre também a degeneração das paredes do saco vitelino (RUSSE et al., 1992).

A parede do saco vitelino é especialmente vascularizada na maior porção do saco vitelino (RUSSE et al., 1992). Nas amostras embrionárias de todos os grupos

podemos observar vasos sangüíneos localizados em todo mesênquima embrionário do saco vitelino.

O saco vitelino se desenvolve como uma estrutura anexa do intestino médio embrionário e consiste de uma camada de epitélio endodérmico seguido de um mesênquima fetal vascularizado (LEISER; KAUFMANN, 1994). Russe et al. (1992) observaram que durante a fase inicial de elongação do saco vitelino, a endoderme diferencia-se na região da membrana citoplasmática, em células prismáticas e células chatas, as quais acompanham o trofoblasto. Em nossos estudos o epitélio do saco vitelino apresentou-se de globoso a prismático, em uma única camada de células apoiadas pelo mesênquima embrionário, formando pequenas rugas na luz do saco vitelino, fato este também observado por Assis Neto (2005).

A aorta dorsal alcança estruturas adjacentes como o saco vitelino que está unido ao intestino médio e o alantóide sendo um divertículo do intestino posterior; os primeiros vasos formam as artérias vitelinas e os segundos, as artérias alantoideas ou umbilicais (NODEN; DE LAHUNTA, 1990). O cordão umbilical é o anexo que une o feto à placenta, apresentando no seu interior os vasos alantoideanos (umbilicais). Em bovinos o cordão umbilical constitui-se de duas artérias, duas veias e ducto alantóide (MIGLINO, 1991). Em cortes transversais ao saco vitelino, podemos observar ao redor da região central, a presença das duas artérias e duas veias umbilicais e o ducto do alantóide, todos envolvidos pelo mesênquima embrionário.

Alguns mamíferos apresentam duas artérias e uma única veia, estruturas que garantem a nutrição e respiração do embrião (SANTOS; AZOUBEL, 1996). Alguns dos vasos sangüíneos vitelinos dentro do embrião são mantidos como principais vasos sangüíneos viscerais no adulto (LATSHAW, 1987).

Ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) as células do saco vitelino apresentaram cromatina descondensada no núcleo sob a forma de eucromatina indicando que estas células possuem alta atividade celular de síntese protéica. Salesbury e Vandermark (1964) afirmaram que o embrião pode sobreviver durante um curto período devido aos nutrientes que absorve do seu próprio saco vitelino e do leite uterino. Liu et al. (1991) analisando as proteínas do saco vitelino de camundongos observou que estas são idênticas as proteínas do soro fetal de bovinos como a transferrina, α 1-fetoproteína, α 1-antitripsina, α 1-glicoproteína ácida.

Ainda ao MET podemos observar microvilos nas células endodérmicas, como

descrito por Tiedman (1979) no saco vitelino de gatos e Assis Neto (2005) em bovinos, contendo mitocôndrias localizadas principalmente entre o núcleo e a extremidade luminal. A grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso distribuído espaçadamente, segundo Russe et al. (1992) está ligado à função do metabolismo de proteínas. Na região citoplasmática mostrou-se com pequenas vesículas por toda região citoplasmática e ocasionalmente entre as células epiteliais endodérmicas do saco vitelino, espaços intercelulares seria uma possível área de fenestração no revestimento endotelial. Os vasos sanguíneos do endotélio do saco vitelino de gatos são fenestrados e apresentam membrana basal completa sendo esta condição favorável para a passagem de proteínas (TIEDEMANN, 1979) e células sanguíneas como plaquetas e eritrócitos (LARSEN; KNOTH, 1971).

O intestino primitivo pôde ser dividido em três partes: intestino cranial, intestino caudal e intestino médio. O intestino médio (primitivo) está em íntima relação com o saco vitelino através do ducto vitelino (ou pedículo vitelino). Este permanece temporariamente ligado ao saco vitelino, fato também observado por Carlson (1996); Santa Bárbara et al. (2003) e Sadler (2005).

Segundo estes mesmos autores, no processo de histogênese do epitélio intestinal podem-se destacar três fases: proliferação e morfogênese epitelial, diferenciação celular e fase final de amadurecimento bioquímico e funcional dos diferentes tipos de células epiteliais. Em nossos resultados pudemos observar detalhadamente apenas a primeira fase, e a segunda somente o início da diferenciação celular.

O epitélio intestinal de indivíduos adultos é composto por células tronco, algumas células absortivas, células caliciformes, células de Paneth, células enteroendócrinas e células absortivas colunares, cada uma com um núcleo oval em sua porção basal e no seu ápice, borda em escova (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Na microscopia de luz o intestino primitivo apresentou o epitélio iniciando sua diferenciação com células colunares estratificadas e bordadura em escova (endoderma) seguida logo abaixo por células mesenquimais indiferenciadas. Na microscopia eletrônica de transmissão mostrou detalhes do formato irregular das células epiteliais, iniciando a diferenciação e a ausência de células absortivas nesta região.

O fator de transcrição Oct-4 POU (Pict-Oct-Unc) é expresso em células tronco embrionárias e células germinativa de ratos (PESCE; SCHÖLER, 2001),

camundongos e suínos (VEJSTED, 2006), cães (MARTINS 2006) e em nossos achados, em bovino. A marcação das células germinativas de embriões bovino através da reação imunohistoquímica de Oct-4 foi imunopositiva na região gonadal e paramesonéfrica como descrito por Martins (2006). Como o embrião inteiro e seus anexos foram submetidos à reação imunohistoquímica, pôde-se notar também várias regiões apresentando células reativas assim como parênquima hepático e saco vitelino.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

■ Com os estudos realizados no decorrer desta pesquisa pudemos avaliar o desenvolvimento morfológico do saco vitelino e sua intercomunicação com o intestino primitivo. Em embriões com idade gestacional estimada de 25 dias o saco vitelino apresentava-se com coloração amarelada e relativamente grande, indicando alta funcionabilidade em relação à nutrição do embrião, uma vez que proteínas produzidas por este anexo será de plena importância durante o período que se segue, a organogênese. No entanto, para que estas proteínas vitelínicas sejam transferidas do saco para o embrião, necessita-se de um ponto transitório que confira comunicação com intestino primitivo.

Observamos a constituição celular desta região, sendo a camada mesênquimal considerado por nós como mais importante, uma vez que sua função indutora atuará diretamente na transmissão de informações juntamente das proteínas do saco vitelino. Cerca de 35 dias de gestação a transição entre saco vitelino e intestino apresenta-se com pequeno lúmen, indicando o fim da dependência vitelínica e início de comunicação placentária. Uma falha durante este processo inicial afetará todo o desenvolvimento embrionário e sua manutenção no ambiente materno, explicando talvez uma das grandes causas das falhas e perdas gestacionais.

Referências

REFERENCIAS

- ALBERTO, M. L. V. **Estudo do desenvolvimento do aparelho respiratório de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 60 dias**. 2006. 102 p, Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ALMEIDA, J. M. **Embriologia veterinária comparada**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 176 p.
- ALVES, D. F.; RAUBER, L. P.; RUBIN, F. B.; BERNARDI, M. L.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 4, p. 279 - 286, 2003.
- ANDERSON, T. A. Histological and cytological structure of the gastrointestinal tract of the luderick, *Girella tricuspidata* (pisces, kyphosidae), in relation to diet. **Journal Morphology**, v. 190, p. 109 - 119, 1986.
- ARTHUR, G. H. **Reprodução e obstetrícia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 1979, 73 p.
- ASSIS NETO, A. C. **Avaliação morfológica da placentação em bovinos de gestações normais e de gestações manipuladas em laboratórios**. 2004. 220 p. Exame qualificação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- AUERBACH, R.; WANG, S.; YU, D.; GILIGAN, B.; LU, L. Role of endothelium in the control of mouse yolk sac stem cell differentiation. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 22, n. 3, p. 333 - 338, 1998.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. Rio de Janeiro: Manole: 1992, 629 p.
- BARON, M. H. Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. **Experimental hematology**, v. 31, n. 12, p. 1160 - 1169, 2003.
- BARONE, R. **Anatomie comparée des mammifères domestiques**. Splanchnologie. Paris: Vigot Frères, v. 2, p. 579 – 605, 1976.
- BEHMER, O. A. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart; 1976. 241 p.
- BERTIN, L. Appareil digestif. In: GRASSÉ, P. P. (Ed.). **Traité de zoologie**. v. 13, n. 2, p. 1248 - 1302, 1958.

BOIANI M, E.; SCHÖLER H. R.; MCLAUGHLIN, K. J. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. **Genes Development**, v. 15, n. 16, p. 1163 - 1166, 2002.

BOWEN, J. A.; BURGHARDT, R. C. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. **Cells and Developmental Biology**, v. 11, p. 93 - 104, 2000.

CARLSON, B. M. **Embriologia humana e biologia do desenvolvimento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 408 p.

CHANG, M. C. Development of bovine blastocyst with a note on implantation. **Anatomy Records**, v. 113, p. 143 - 161, 1952.

CHO, F. N.; CHEN, S.; TAI, M. H.; YAN, T. L. The quality and size of yolk sac in early pregnancy loss. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 46, p. 413 – 418, 2006.

CHOI, K. Theo hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells. **J. Hematother Stem Cell Reserch**, v. 11, p. 91 - 101, 2002.

CUMANO, A.; FERRAZ, J. C.; LEKLAINÉ, M.; DI SANTO, J.; GODIN, I. Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. **Immunity**, v. 15, p. 477 – 485, 2001.

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

GARCIA, S. M. L.; JECKEL NETO, E.; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia**. 1. ed. Porto Alegre: Artes Medicas Sul, 1991. 350 p.

GODKIN, J. D.; LIFSEY, B. J.; BAUMBAUCH, G. A. Characterization of protein production by bovine chorionic and allantoic membranes. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 195 - 204, 1988.

CUMANO, A.; GODIN, I. Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. **Current opinion in imunology**, v. 13, n. 2, p. 166-171, 2001.

GREMSKI, W. **Contribuição ao estudo ultraestrutural do epitélio do trato digestivo de *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Pisces)**. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1975.

GREEN, W. W. Comparative growth of the sheeep and bovine animal during prenatal life. **America Journal Veterinary Research**, v. 7, p. 395 - 402, 1946.

GREENSTEIN, J. S.; FOLEY, R. C. Early embryology of the cow. Gastrula and primitive streak stages. **Journal Dairy Science**, v. 41, p. 409 - 421, 1958.

GULBIS, B.; JAUNIAUX, E.; COTTON, F.; STORDEUR, P. Protein and enzyme patterns in the fluid cavities of the first trimester gestacional sac: relevance to the

absorptive role secondary yolk sac. **Molecular Human Reproduction**, v. 9, p. 857 - 862, 1998.

GREENSTEIN, J. S.; FOLEY, R. C. The early embryology of the cow with notes on comparable human development. **International Journal Fertility**, v. 3, p. 67 - 69, 1958.

HAAR, J. L.; ACKERMAN, G. A. Phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. **Anatomic Record** v. 170, p. 199 - 224, 1971.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1988. 720 p.

HAFEZ, E. S. E.; RAJAKOSKI, E. Placental and fetal development during multiple bovine pregnancy. **Anatomy Records**, v. 150, p. 303 - 316, 1964.

HAMILTON, W. J.; LAING, J. A. Development of the egg of the cow up to the bovine uterus. **Journal Anatatomic**, v. 80, n. 194, p. 409 - 421, 1946.

HAMOND, J. **The physiology of reproduction in the cow**. Cabridge: Univ. Press. London, 1927.

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, n. 6, p. 1787 - 94, 2000.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinary**. 4. ed. Zurich, 1994. (Together with nomina histological, 2. ed. 1992 and nomina embriologica veterinaria, 1992).

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY EMBRIOLOGYCAL. **Nomina Embriological**. 2. ed. Revista Zurich, 1994 (Together with nomina anatomica veterinaria).

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY HISTOLOGICAL NOMENCLATURA. **Nomina histological**. 2. ed. Revista Zurich, 1994. (Together with nomina anatomica veterinaria).

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Distúrbios reprodutivos nas fêmeas In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, 4. ed. São Paulo: Manole, 1988. 513 p.

JAFREDO, T.; BOLLEROT, K.; SUGIYAMA, D. G.; DREVON, C. Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. **International Journal Developmetal Biology**, v. 49, p. 269 - 277, 2005.

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

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNONAS, G.; BRETAN, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in the tissue sections. **Histochem Journal**, v. 11, n. 4, p. 447 - 455, 1979.

KEHLER, J.; TOLKUNOVA, E.; KOSCHORZ, B.; PESCE, M. Oct4 is required for primordial germ cell survival. **EMBO Reports**, v. 5, p. 1078 - 1083, 2004.

KING, B.; ENDERS, A. Protein absorption and transport by the guinea pig visceral yolk sac placenta. **American Journal Anatomy**, v. 129, p. 261 - 288, 1970.

KINGMAN, H. T. The placentoma of the cow. **American journal of veterinary research**, v. 9, n. 125, p. 993 - 1005, 1948.

LARSEN J. F.; KNOTH, M. Ultrastructure of the anchoring villi and trophoblastic shell in the second week of placentation. **Acta Obstetric Gynecology Scand.**, v. 50, n. 2, p. 117 - 128, 1971.

LATSHAW, W. K. **Veterinary development anatomy: a clinical oriented approach**. Toronto: Decker, 1987, p. 49 - 74.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental Clinic of Endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 122 - 134, 1994.

LIU, K. H.; BREWTON, R. G.; BAUMBACH, G. A. GODKIN, J. D. Characterization of protein production by ovine placental membranes: identification of a placental retinal-binding protein. **Endocrinology**, v. 129, p. 126 - 132, 1991.

MARTINS, D. S. **Caracterização de células tronco germinativas caninas para o tratamento da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD)**. 105 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

MATSUMOTO, F. S. **Caracterização das proteínas do saco vitelínico de embriões bovinos *Bos indicus***. 2007. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MC GRATH, K.; PALIS, J. Hematopoiesis in yolk sac: more than meets the eye. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 1021 - 1028, 2005.

MELTON, A. A.; BERRY, R. O.; BUTLER, O. D. The interval between time of ovulation and attachment of the bovine embryo. **Journal Animal Science**, v. 10, p. 993 - 1005, 1951.

MIGLINO, M. A. **Pesquisa anatômica sobre a ramificação e distribuição das artérias e veias da placenta de bovinos**. 1991.303 p. Tese (Livre Docência)

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 991.

MIKKOLA, H. K. A.; GEKAS, C.; ORKIN, S. H.; DIETERLEN-LIEVRE, F. Placenta as a site for hematopoietic stem cell developme. **Experimental Hematology** , v. 33, p. 1048 – 1054, 2005.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2004, 462 p.

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

NICHOLS, C. W. The embryology of the calf: fetal grow wheight, relatives age and certain body measurements. **America Journal animal Science**, v. 5, p. 135 - 141, 1944.

NODEN, D. M.; DE LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos** 1. ed. [S. I]: Acribia, 1990, 339 p.

PALIS, J.; MCGRATH, K. E.; KINGSLEY, P. D. Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants. **Blood**, v. 8, n. 1, p. 156 - 163, 1995.

PALIS, J.; YODER, M. Y. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. **Experimental Hematology**, v. 29, p. 927 – 936, 2001.

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

PINTO, L. M. **Caracterização da célula binucleada na placenta de vacas nelore (*Bos indicus*-Linnaeus, 1758)**. 2002. 87 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ROHEN, J. W.; DRECOLL, E. L. **Embriologia funcional. O desenvolvimento dos sistemas funcionais do organismo humano**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 147 p.

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

SANDLER, T. W. **Langman embriologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 347 p.

SANTA BARBARA, A. P.; VAN DEN BRIN, B. G. R.; ROBERTS, D. J. C. Development and differentiation of the intestinal epithelium. **Cells Mol Life Science**, v. 60, p. 1322 – 1332, 2003.

SANTOS, H. S. L.; AZOUBEL, R. **Embriologia comparada**. Jabuticabal: Funep, 1996, 188 p.

SALESBURY, G. W.; VANDERMARK, N. L. **Fisiologia de la reproduccion e inseminacion artificial de los bovidos**. 1. ed. Zaragoza: Acribia, p. 705, 1964.

SIRE, M. F.; LUTTON, C.; VERNIER, J. M. News views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. **Journal Lipid Research**, v. 27, p. 81 - 94, 1981.

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

TAVIAN, M.; HALLAIS, M. F.; PEULT, B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human-embryo. **Development**, v. 126, p. 793 - 803, 1999.

THOMAS, T.; SOUTHWELL, B. R.; SCHREIBER G.; JAWORROWSKI, A. Plasma protein synthesis and secretion in the visceral yolk sac of the fetal rat: gene expression, protein synthesis and secretion. **Placenta**, v. 11, p. 413 - 430, 1990.

TIEDMANN, K. The amniotic, allantoic and yolk sac epithelia of the cat: SEM and MET studies. **Anatomy embryology**, v. 158, p. 75 - 94, 1979.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histología normal e patológica**. 2. ed. Barueri: Manole, 2003, 331 p.

USHIZAWA, K.; HERATH, C. B.; KANEYAMA, K.; SHIOJIMA, S.; HIRASAWA, A.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; OCHIAI, K.; TOKUNAGA, T.; TSUNODA, Y.; TSUJIMOTO, G.; HASHIZUME, K. cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. **Reproduction Biology Endocrinology**, n. 2, v. 77, p. 1 - 16, 2004.

VEJSTED, M.; OFFENBERG, H.; MADDUX-HYTTEL, P. Identification of primordial germ cells in porcine embryos from the primitive streak stage. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 1-2, p. 7 - 11, 2006.

YAMADA, O.; TODOROKI, J.; KIZAKI, K.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; PATEL, O. V.; SCHULER, L. A.; HASHIZUME, K. Expression of prolactin-related protein I at the fetomaternal interface during the implantation period in cows. **Reproduction**, v. 124, p. 427 - 437, 2002.

YODER, M. C.; HIATT, K.; DUTT, P.; MUKHERJEE, P.; BODINE D. M.; ORLIC, D.; Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. **Immunity**, v. 7, p. 335 - 344, 1997.

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

WEISSMAN, I. L.; ANDERSON, D. J.; GAGE, F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. **Annual Review Cell Developmental Biology**, v. 17, p. 387 - 403, 2001.

WINTERS, L. M.; GREEN, W. W.; CONSTOCK, R. E. Prenatal development of the bovine. **Minnesota Agr. Exp. Sta. Tech. Bull**, n. 50, p. 1 - 50, 1942.

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

WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R.; BROCKES, J.; JESSELL, P. L.; MEYEROWITZ, E. **Biologia do desenvolvimento**. 1. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, 484 p

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

WROBEL, K. H.; SUESS, F. Identification and temporospatial distribution of bovine primordial germ cells prior to gonadal sexual differentiation. **Anatomy Embryology**, v. 197, p. 451 – 467, 1998.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Células-tronco: a nova fronteira da medicina. **Células-Tronco hematopoéticas Nardi e Afonso**. São Paulo: Ahtneu, 2006. p. 49 – 65.

ZANJANI, E. D.; ASCEMSÃO, J. L.; TAVASSOLI, M. Liver-derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. **Blood**, v. 81, p 399 - 404, 1993.

ANEXO A

IMUNOHISTOQUÍMICA: DETECÇÃO DE OCT-4

1- As lâminas foram desparafinadas e hidratadas:

1a) Xilol		2 x 10 minutos
1b) Xilol álcool		1 x 5 minutos
1c) Álcool 100%		2 x 5 minutos
- 1d) As lâminas foram imersas em uma solução de metanol (70%) e peróxido de hidrogênio (30%) durante vinte minutos, em câmara escura.

Obs.: Este procedimento foi realizado com intuito de bloquear a peroxidase existente dentro das células, sendo que a revelação ocorre pela reação da mesma.

1e) Álcool 95%		1 x 5 minutos
1f) Álcool 70%		1 x 5 minutos
1g) Água destilada		1 x 5 minutos

2- As lâminas foram imersas em solução de tampão citrato pH 6,0 a 0,1M, (3 partes de citrato de sódio em 1 parte de ácido cítrico) diluído 1:10 em água destilada, utilizando-se um berço dentro de uma forma refratária, em microondas, 720W. Tampão citrato: 9 ml sol A + 41 ml sol B + 450 ml de água destilada = 500 ml.

3- As lâminas ficaram totalmente cobertas pela solução e então levadas ao microondas por três ciclos de cinco minutos. A cada ciclo terminado, o recipiente era completado com mais tampão citrato. Este procedimento foi feito para que as cadeias aldeídicas formadas pelo fixador (formol 10% tamponado) se desfizessem.

4- As lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos em agitação em seguida lavadas duas vezes em PBS 0,1M durante cinco minutos.

5- As lâminas foram retiradas do PBS e cujo excesso foi retirado com papel absorvente. Os cortes foram circundados com caneta histológica para que fossem submetidos a uma gota cada de PROTEIN BLOCK– X0909 (DAKO) em seguida foram incubados em câmara úmida a temperatura ambiente durante 45 minutos.

6- O Anticorpo primário Policlonal cabra anti-human Oct-4 – Santa Cruz (1:500, em BSA/PBS) foi diluído utilizado na concentração de 1:500. Nos cortes controle foi pingada uma gota de PBS 0,1M ao invés do anticorpo primário. Nos cortes para reação, foi pingada uma gota do anticorpo primário sem excesso de PROTEIN BLOCK– X0909 (DAKO). Os cortes foram incubados “over night” (20h) em câmara úmida e fria (5° C).

7- As lâminas foram retiradas da câmara úmida e fria e foram lavadas com PBS a 0,1M, por 3 vezes de 5 minutos e depois enxutas, retirando-se o excesso do corte.

8- A seguir os cortes receberam uma gota do Anticorpo secundário (DAKO LSAB + Kit Peroxidase – K0690) e foram levadas para câmara úmida a temperatura ambiente durante 45 minutos). Após esta incubação os cortes foram lavados em PBS a 0,1M para serem submetidos à streptavidina.

9- Foi colocado sobre os cortes a streptavidina por 45 minutos. Este procedimento foi feito para que os anticorpos secundários se ligassem aos primários, formando assim um complexo maior facilitando a visualização onde quer que ocorra a marcação. Logo após o tempo determinado as lâminas foram lavadas várias vezes em PBS a 0,1M 1:10.

10- Para revelar a imunorreatividade foram utilizadas soluções do Kit AEC Zymed – 00-2007. Os cortes receberam gotas do revelador e rapidamente ocorreu a reação reveladora. As lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada e depois em água corrente circulante por cinco minutos para retirada do excesso do revelador.

11- Os cortes foram corados pela hematoxilina de Harris durante um minuto (coloração de fundo) e lavadas em água corrente durante cinco minutos

12- Para montagem foi colocada sobre a lâmina uma gota de Faramount (DAKO) (VEJSTED et al., 2006) e sobre esta, uma lamínula. Em seguida os cantos das lamínulas foram vedados com esmalte incolor e levados à geladeira por 24 horas para secar.