DANIELA GOMES CAGNOTO

Estudo do desenvolvimento dos Sistemas Renais de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 50 dias

São Paulo
2007

DANIELA GOMES CAGNOTO

Estudo do desenvolvimento dos Sistemas Renais em embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 50 dias

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Arani Nanci Bomfim Mariana

São Paulo
2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1921
FMVZ

Cagnoto, Daniela Gomes

Estudo do desenvolvimento dos Sistemas Renais em embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 50 dias / Daniela Gomes Cagnoto. – São Paulo : D. G. Cagnoto, 2007.
78 f. : il.

Dissertação (mestrado) - 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. Arani Nanci Bomfim Mariana.

1. Pronefro. 2. Mesonefro. 3. Metanefro. 4. Embrião bovino. 5. Sistemas Renais. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo do desenvolvimento dos sistemas renais de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 50 dias", protocolo nº1065/2007, utilizando 50 (cinquenta) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Manoel dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Study about the development of renais in bovinos embryos (*Bos indicus* and *Bos Taurus*) during the gestation period (10-60 days)", protocol number 1065/2007, utilizing 50 (fifty) bovinos, under the responsibility of Prof. Dr. José Manoel dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 08 de novembro de 2007.

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CAGNOTO, Daniela Gomes

Título: Estudo do desenvolvimento dos Sistemas Renais em embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 50 dias

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

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico,

A Deus,

Por sempre guiar os meus caminhos...

A meus pais, José Carlos e Izabel,

*Por me incentivarem ao estudo desde criança;
Pelas vezes que me ensinaram o caminho correto, mesmo que pela minha dor;
Por serem o meu porto seguro em qualquer situação;
Por terem deixado de realizar sonhos para realizar os meus;
Pelo amor incondicional;
Devo a vocês a pessoa que sou hoje;
Amo muito vocês!*

Ao meu marido Gustavo,

*Pelas horas de paciência nos momentos de ansiedade;
Pelo apoio de concretizar este sonho;
Pelo cuidado que tem comigo sempre;
Amo você.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

- **Ao Professor Doutor José Manoel,**
*Pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, pelos conselhos, calma e paciência;
Por sempre estar disposto a auxiliar, mesmo com centenas compromissos.
Por ter sido meu orientador da melhor forma.*
- **Aos meus amigos Rita, Ricardo e Paula,**
Por vocês nos momentos mais difíceis, terem mostrado verdadeiros amigos, acalmado, ajudando e aconselhando. Muito obrigada pela força!
- **A Profa. Dra. Maria Angélica,**
Pela oportunidade de continuar estudando e contribuir com a pesquisa.
- **Aos professores do departamento,**
Por todos os ensinamentos durante este período.
- **Aos funcionários Ronaldo, Maicon, Jaque, Índio, João, Raimundo, Diogo, Maíse,**
Pela ajuda no aprendizado, conselhos e amizade.
- **A minha amiga Sandra,**
Pela amizade, ajuda, companheirismo, conselhos e momentos de descontração.
- **Aos meus colegas da pós-graduação, Claudinha, João, Celina, Drica, Miryan, e todos que de alguma forma me ajudaram a realizar este sonho.**
- **Ao Frigorífico Mantiqueira de São José dos Campos – SP e ao Frigorífico Frigonossa de Possos de Caldas – SP,**
Que contribuíram para este trabalho na obtenção do material.

RESUMO

RESUMO

CAGNOTO, D. G. **Estudo do desenvolvimento dos Sistemas Renais de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 50 dias.** [Study about the development of renais systems in bovines embryos (*Bos indicus* and *Bos taurus*) during the gestation period 10 and 50 days]. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O presente estudo científico tem como objetivo descrever o desenvolvimento dos Sistemas Renais bovinos, durante o período embrionário. Para tanto, foram utilizados embriões coletados em frigoríficos da região, e após a coleta os mesmos foram fotografados e medidos utilizando-se o método Crow-Rump (CR). Para descrição morfológica foram colocados em solução de Bouin para microscopia de luz e em solução de Glutaraldeído 2,5% para microscopia eletrônica de transmissão. Nos embriões com idade gestacional aproximada de 14 a 15 dias, não observamos a presença do pronefro, entretanto encontramos o mesonefro e indícios morfológicos que indicam sua atividade funcional. O mesonefro apresenta no interior de suas células tubulares inúmeras mitocôndrias e interdigitações, indicando uma alta atividade de transporte iônico. Observamos que o metanefro, ou rim definitivo, inicia seu desenvolvimento em embriões apresentando idade gestacional aproximada de 23 e 24 dias. Nossos achados mostram que a involução do mesonefro acontece simultaneamente com a diferenciação metanefrogênica. Em idade gestacional entre 45 e 46 dias, já iniciando sua fase fetal, o metanefro possui as unidades filtradoras (néfrons), com seus respectivos glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais e alça de Henle.

Palavras-chave: Pronefro. Mesonefro. Metanefro. Embrião bovino. Sistemas Renais.

ABSTRACT

ABSTRACT

CAGNOTO, D. G. **Study about the development of renais systems in bovines embryos (*Bos indicus* and *Bos taurus*) during the gestation period 10 and 50 days.** [Estudo do desenvolvimento dos Sistemas Renais de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 50 dias]. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The present scientific study it has as objective to describe the development of the bovine Renais Systems, during the embryonic period. For in such a way, embryos collected in freezers of the region had been used, and after the collection the same ones had been photographed and measured using the Crow-Rump method (CR). For morphologic description they had been placed in solution of Bouin for light microscopy and in solution of Glutaraldeide 2.5% for electronic microscopy of transmission. In the embryos with approached gestational age of 14 the 15 days, we do not observe the presence of pronephro, however we found mesonephro and morphologic indications that shows functional activity. Mesonephro presents in the interior of its tubular cells innumerable mitochondria and interdigitações, indicating one high activity of ionic transport. We observe that metanephro, or definitive kidney, initiates its development in embryos presenting approached gestational age of 23 and 24 days. Our findings show that the involution of mesonephro happens simultaneously with the metanephrogenic differentiation. In gestational age between 45 and 46 days, already initiating its fetal phase, metanephro possess the filter units (nephrons), with its respective glomeruli, proximal and distal twisted tubules and handle of Henle.

Key words: Pronephro. Mesonephro. Metanephro. Bovine Embryo. Renais Systems.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografias de embrião bovino com CR 3 mm e idade gestacional estimada de 14 a 15 dias	1
Figura 2 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino, apresentando CR 8,3 mm e idade gestacional estimada de 18 e 19 dias (A).....	1
Figura 3 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino, apresentando CR 10 mm e idade gestacional estimada de 25 e 28 dias.....	1
Figura 4 - Fotomicrografias de embrião bovino, apresentando CR 10 mm e idade gestacional estimada de 25 e 28 dias	1
Figura 5 - Fotomicrografias de embrião bovino, apresentando CR 10 mm e idade gestacional estimada de 25 e 28 dias	1
Figura 6 - Fotografia e fotomicrografia de embrião bovino, apresentando CR 16 mm e idade gestacional estimada de 30 e 31 dias.....	1
Figura 7 - Fotomicrografias de embrião bovino, apresentando CR 16 mm e idade gestacional estimada de 30 e 31 dias	1
Figura 8 - Fotografia e Fotomicrografias de mesonefro e rim metanefro de embrião bovino apresentando CR 27 mm e idade gestacional estimada 45 a 46 dias.....	1
Figura 9 - Fotomicrografias do mesonefro e metanefro de embrião bovino apresentando CR 27 mm e idade gestacional estimada 45 a 46 dias.....	1
Figura 10 - Eletromicrografia do túbulo contorcido distal do mesonefro de embrião bovino medindo CR de 9,0 mm com idade gestacional estimada de 20 a 21 dias.....	1

Figura 11 - Eletromicrografia da porção basal do túbulo contorcido distal do mesonefro de embrião bovino medindo CR de 9,0 mm com idade gestacional estimada de 20 a 21 dias	1
Figura 12 - Eletromicrografia de túbulo mesonéfrico de embrião bovino medindo CR de 16 mm com idade gestacional estimada de 30 a 31 dias.....	1
Figura 13 - Eletromicrografia da porção apical do túbulo contorcido proximal do metanefro de embrião bovino medindo CR de 16 mm com idade gestacional estimada de 30 a 31 dias	1
Figura 14 - Eletromicrografia da porção apical do túbulo contorcido proximal do mesonefro de embrião bovino medindo CR de 16 mm com idade gestacional estimada de 30 a 31 dias	1
Figura 15 - Eletromicrografia da porção apical do túbulo contorcido proximal do rim mesonéfrico de embrião bovino medindo CR de 16 mm com idade gestacional estimada de 30 a 31 dias	1
Figura 16 - Eletromicrografia da porção basal do túbulo contorcido proximal do mesonefro de embrião bovino medindo CR de 16 mm com idade gestacional estimada de 30 a 31 dias	1
Figura 17 - Eletromicrografia de túbulo mesonéfrico de embrião bovino medindo CR de 23 mm e com idade estimada de 40 a 41 dias.....	1
Figura 18 - Eletromicrografia de túbulo mesonéfrico de embrião bovino medindo CR de 23 mm e com idade estimada de 40 a 41 dias.....	1
Figura 19 - Eletromicrografia de túbulo mesonéfrico de embrião bovino medindo CR de 23 mm e com idade estimada de 40 a 41 dias.....	1
Figura 20 - Eletromicrografia de célula do túbulo de mesonefro de embrião bovino medindo CR de 23 mm e com idade estimada de 40 a 41 dias	1

Figura 21 - Eletromicrografia da porção apical do túbulo contorcido distal de embrião bovino medindo CR de 27 mm com idade gestacional estimada de 45 a 46 dias1

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CR	Crow Rump
°C	Grau Célsius
mm	milímetros
µm	micrômetros
nm	nanômetros
mg	miligramas
%	porcentagem
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo
SP	São Paulo
MG	Minas Gerais
USA	Estados Unidos da América

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 FERTILIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	26
3.2 FASES DO PERÍODO GESTACIONAL	30
3.3 ORGANIZAÇÃO E ARQUITETURA RENAL	31
3.3.1 Características anatômicas particulares dos rins bovinos	33
3.4 FASES DO DESENVOLVIMENTO RENAL	33
3.4.1 Pronefro	34
3.4.2 Mesonefro	35
3.4.3 Metanefro	36
3.5 MORTALIDADE DURANTE O PERÍODO EMBRIONÁRIO	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 COLETA DE MATERIAL	41
4.2 ESTUDOS MACROSCÓPICOS	42
4.3 ESTUDOS MICROSCÓPICOS	42
4.3.1 Processamento microscopia de luz	42
4.3.2 Processamento microscopia eletrônica de transmissão	43
5 RESULTADOS	45
5.1 MICROSCOPIA DE LUZ	45
5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	55
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	75

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura é uma das atividades agropecuárias que mais cresce no país. Pertencendo a família Bovidae e compreendendo duas espécies: *Bos taurus* e *Bos indicus* (HAFEZ; HAFEZ, 2004), os bovinos tem a capacidade de adaptação a vários tipos climáticos e geográficos, é considerado uma espécie de fácil manejo. Objetiva-se um sucesso na reprodução destes animais dentro do sistema de cria. O desenvolvimento e utilização de técnicas que visam o melhor desempenho reprodutivo e produtivo do rebanho são de fundamental importância para que haja um manejo de qualidade.

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo e a bovinocultura tem grande importância para a economia do país. A pecuária brasileira participa com cerca de 9% do PIB e as exportações da área referem-se a US\$ 2 bilhões por ano (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA; PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2007).

As pesquisas relacionadas ao desenvolvimento embrionário bovino são limitadas, entretanto técnicas de transferência de embriões bovinos vêm se desenvolvendo rapidamente abrangendo novas perspectivas para reprodução e melhoramento animal (FERNANDES, 1994). Desta forma, há necessidade de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento do embrião.

Estudos do desenvolvimento embrionário, especialmente em animais, são uns dos aspectos mais importantes para a evolução das espécies e sua organogênese, bem como para as prováveis causas das más formações congênitas (USHIZAWA et al., 2004).

O alto índice de mortalidade embrionária e fetal no terço inicial da gestação de bovinos é uma das maiores causas de perdas econômicas na produção animal. Assim, torna-se de grande importância um estudo sobre a dinâmica embriológica, desde o momento da implantação até a organogênese completa, pois posteriormente será denominado feto. Estes dados serão importantes devido à alta mortalidade embrionária que ocorrem nestes animais.

Na literatura científica não há referências sobre a cronologia do desenvolvimento renal em embriões bovinos. Esta pesquisa contribui no entendimento do desenvolvi-

mento completo dos sistemas renais destes animais, que como já citado, possuem alta mortalidade embrionária afetando a produção econômica.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

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

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Correlacionar à idade gestacional com:

- O desenvolvimento dos Sistemas Renais do embrião, caracterizando as diferenças nos vários estágios do desenvolvimento durante o período inicial de prenhes;
- Identificar as características microscópicas no processo de formação dos Sistemas Renais do embrião, juntamente de seus tecidos e constituição celular.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Pesquisas relacionadas à embriologia humana são encontradas com facilidade, porém ao procurarmos publicações sobre a embriologia animal vimos um campo restrito de pesquisas.

A Revisão de Literatura foi dividida nos seguintes tópicos: fertilização e desenvolvimento embrionário, fases do período gestacional, fases do desenvolvimento renal e mortalidade durante o período embrionário.

3.1 FERTILIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A fertilização, o processo pelo qual os gametas masculinos e femininos se fundem, se dá na ampola uterina. Esta é a parte mais larga da tuba, situando-se próximo do ovário. As fases da fertilização incluem: penetração do espermatozóide na coroa radiada, penetração na zona pelúcida e fusão entre a membrana celular (membrana plasmática) do oócito e a do espermatozóide (SADLER, 2005).

A fertilização é um processo duplo: em seu aspecto embriológico envolve a ativação do oócito pelo espermatozóide. Sem o estímulo da fertilização, o oócito não completa a sua mitose e nem ocorre a formação do zigoto e consequentemente não há o desenvolvimento embrionário; já em seu aspecto genético a fertilização envolve a introdução do material hereditário do macho dentro do oócito para posterior fusão dos pró núcleos (HAFEZ, 1982; MOORE; PERSAUD, 2004).

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

Arthur (1979); Junqueira e Carneiro (2004); Moore e Persaud (2004) descrevem a formação do embrião e seus anexos a partir do oócito, sendo fertilizado na ampola da

tuba uterina, ocorrendo a formação do zigoto, sendo que sua segmentação ocorre à medida que ele se desloca passivamente na direção do útero. Joshi (1988) complementa que a tuba uterina é um dos locais mais importantes nos processos reprodutivos, visto que nesta ocorrem os eventos da capacitação e transporte do espermatozóide, o transporte do oócito, a fecundação e desenvolvimento dos primeiros estágios embrionários que antecedem a implantação. Seu fluido é proveniente da secreção das células mucosas do epitélio e do transudato seletivo sanguíneo. Formando o epitélio da tuba uterina bovina aparecem dois tipos celulares: as células ciliadas e as secretoras não ciliadas, ambas influenciadas por hormônios ovarianos, o estrogênio e o progestogênio (NAYAK; ELLIGTON, 1977; JOSHI, 1988).

De acordo com Gonçalves (1998), as células ciliadas estão envolvidas no transporte do oócito e possivelmente, na regulação da progressão espermática. Moore e Persaud (2004) relataram que essas mesmas células participam da reação de capacitação dos espermatozoides, enquanto que as células não ciliadas secretam fatores ligados à nutrição dos espermatozoides e das células nos primeiros estágios embrionários.

Seguindo-se a fertilização, inicia-se a clivagem do zigoto com a formação dos blastômeros e, como resultado das contrações peristálticas e ciliares normais da tuba uterina, as células embrionárias são impulsionadas em direção ao útero. Quando os blastômeros alcançam o útero, em três ou quatro dias nos bovinos (NODEN; LAHUNTA, 1990), a figura embrionária apresenta-se formada por dezesseis a trinta e duas células originadas por mitoses sucessivas, originando assim a mórula. Trata-se de um aglomerado celular compacto e envolvido pela membrana de fertilização (HAFEZ, 1982; MOORE; PERSAUD, 2004).

Junqueira e Carneiro (2004) e Moore e Persaud (2004), complementam ainda que o acúmulo gradual de líquido aparece na parte central da cavidade da mórula. Os blastômeros afastados pelo líquido passam a constituir uma camada periférica, o trofoblasto. O embrioblasto ou massa celular interna encontra-se espessada num ponto onde permanece um aglomerado celular, o que faz saliência para dentro da cavidade, constituindo o blastocisto.

Na espécie humana, por volta do quarto dia após a fecundação, surge a mórula, um maciço celular que contém doze a dezesseis blastômeros. A mórula, uma vez for-

mada, 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 blastocelo, e uma camada celular constituída de micrômeros e macrômeros denominada blastoderme (GARCIA et al., 1991).

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

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

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

Por ocasião da implantação a mucosa do útero se encontra na fase secretora, período durante as glândulas e artérias uterinas tornam-se espiraladas e os tecidos suculentos. Em consequência disso, podem-se reconhecer no endométrio três camadas distintas: uma camada compacta superficial, uma esponjosa intermediária e uma delgada basal. Normalmente o blastocisto humano se implanta no endométrio ao longo da parede anterior ou posterior do corpo do útero, onde fica incrustado entre as aberturas das glândulas (SADLER, 2005).

Neste estágio de desenvolvimento já existe um mesênquima extra-embrionário, derivado do hipoblasto que aparece no blastocisto o que contribui para a formação dos anexos embrionários (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990; MOORE; PERSAUD, 2004).

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

Do epiblasto surge o ectoderma que forma o âmnio, o ectoderma que forma o embrião e as células da linha primitiva que futuramente formarão parte do mesoderma extra-embrionário, mesoderma do embrião, o processo notocordal e endoderma do embrião. O hipoblasto é responsável pela formação do endoderma que reveste o saco vitelínico primitivo e de parte do mesoderma extra-embrionário (MOORE; PERSAUD, 2004).

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

Os três folhetos embrionários, durante a morfogênese, são responsáveis pela formação dos órgãos e sistemas. No embrião, passam a ocorrer movimentos de dobramentos laterais e ântero-posteriores que resultam na inflexão do embrião e o mesmo passa a adquirir um aspecto tubular em forma de letra C (MOORE; PERSAUD, 2004).

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

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

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

3.2 FASES DO PERÍODO GESTACIONAL

O desenvolvimento pré-natal dos animais domésticos pode ser dividido em três períodos principais: período de zigoto, período embrionário e período fetal. O período de zigoto culmina com a união inicial do blastocisto, porém anterior ao estabelecimento da circulação intra-embrionária. A duração da gestação é calculada como o intervalo entre o serviço fértil e o parto, e à medida que ela progride o útero aumenta gradativamente para permitir a expansão do feto, porém o miométrio permanece quiescente para prevenir uma expulsão prematura. O período embrionário se estende de 15 a 45 dias de gestação na vaca. Neste período ocorre um rápido crescimento e diferenciação, durante o qual os principais tecidos, órgãos e sistemas são estabelecidos e as principais características da forma externa do corpo são reconhecidas. O período fetal se estende a partir de 34 dias na ovelha e 45 dias na vaca. Este período caracteriza-se pelo crescimento e modificações da forma do feto (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

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

3.3 ORGANIZAÇÃO E ARQUITETURA RENAL

O aparelho urinário é formado pelos dois rins, dois ureteres, a bexiga e a uretra. A urina é produzida nos rins, passa pelos ureteres até a bexiga e é lançada ao exterior pela uretra. Esse aparelho contribui para a manutenção da homeostase, produzindo a urina, através da qual são eliminados diversos resíduos do metabolismo e água, eletrólitos e não eletrólitos em excesso no meio interno. Essas funções se realizam por meio de um processo complexo que envolve filtração, absorção ativa, absorção passiva e secreção. Além destas funções os rins também secretam hormônios como a renina e a eritropoietina, e ativam a vitamina D₃ (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Dyce et al. (2004) descreveu que o rim é composto por uma cápsula fibrosa que se descola facilmente em um rim sadio. O parênquima é visivelmente dividido em córtex externo, com sua cor castanho avermelhado e aspecto finamente granular, e a medula, de coloração escura, arroxeada, da qual faixas (raios medulares) se estendem no córtex. Em muitas espécies, a medula fica distribuída como diversas massas separadas, cada uma delas de forma aproximadamente piramidal. Nos rins deste tipo, uma porção do córtex está associada a cada pirâmide e recobre sua base, a face direcionada a superfície externa. O ápice da pirâmide aponta em direção ao seio renal e forma uma papila, que se assenta em uma expansão em forma de cálice da pelve renal. Cada pirâmide medular com seu córtex associado constitui um lobo renal. Os rins que conservam esta organização são denominados multipiramidais ou multilobares.

As unidades funcionais dentro do rim são conhecidas como túbulos renais ou néfrons, que são sustentados por um interstício de tecido conjuntivo (DYCE et al., 2004). O néfron começa da parte periférica do parênquima, denominada cortical, como um tubo de fundo cego, dobrado para dentro, a fim de formar uma dupla parede, a cápsula de Bowman, que envolve uma rede arterial admirável, o glomérulo vascular renal. Esta se continua no túbulo urinífero após breve estreitamento. O túbulo urinífero consta de uma primeira parte enovelada (túbulo contorcido proximal), de um segmento em forma de U (alça de Henle) e de uma segunda parte enovelada (túbulo contorcido distal), que se continua com o tubo coletor (MOTTA, 1974).

Junqueira e Carneiro (2004) relataram que o túbulo contorcido proximal é composto por células com citoplasma fortemente acidófilo devido à presença de numerosas mitocôndrias alongadas. O citoplasma apical apresenta microvilos, que formam a orla em escova e canalículos que partem da base dos microvilos e aumentam a capacidade de o túbulo proximal absorver macromoléculas. Nos canalículos formam vesículas de pinocitose, que introduzem na célula macromoléculas que atravessam a barreira de filtração glomerular. As vesículas se fundem com os lisossomos, onde as macromoléculas são digeridas. Os limites entre as células desses túbulos são dificilmente observados no microscópio óptico, pois elas têm prolongamentos laterais que se interdigitam com os das células vizinhas. Esses túbulos possuem uma luz ampla e são circundados por muitos capilares sanguíneos. A alça de Henle é uma estrutura em forma de U que consiste em um segmento espesso e um segmento delgado. O segmento espesso tem estrutura muito semelhante à do túbulo contorcido distal. O lúmen do segmento delgado é largo, porque a parede da alça é formada por células achatadas. Após curto trajeto na cortical, a parte espessa da alça de Henle torna-se tortuosa e passa a ser chamada de túbulo contorcido distal. Nos cortes histológicos, a distinção entre os túbulos contorcidos distais e os proximais, ambos encontrados na cortical e formados por epitélio cúbico, baseia-se nos seguintes dados: suas células são menores (maior número de núcleos em cada corte transversal), não tem orla estriada e são menos acidófilas (possuem menor quantidade de mitocôndrias). Estas células possuem invaginações de membrana baso-lateral e acúmulo de mitocôndrias.

As artérias renais derivam da aorta e são extraordinariamente grandes com relação aos órgãos que suprem (DYCE et al., 2004).

Cada rim recebe sangue por uma artéria renal, que, antes de penetrar no órgão, divide-se geralmente em dois ramos. Um vai irrigar a parte anterior (ventral) e outro a parte posterior (dorsal) do rim. Ainda no hilo estes, ramos dão origem às artérias interlobares que seguem entre as pirâmides renais. Na altura da junção córtico-medular (base das pirâmides), as artérias interlobares formam as arciformes, que seguem um trajeto paralelo à cápsula do órgão, percorrendo o limite entre a medular e a cortical. Das arciformes partem as artérias interlobulares, de curso perpendicular à cápsula do rim e situam-se entre os raios medulares que, com a cortical adjacente, formam os lóbulos do

rim. Das interlobulares originam-se as arteríolas aferentes dos glomérulos, que levam o sangue para os capilares glomerulares. Destes capilares, o sangue passa para as arteríolas eferentes, que se ramificam novamente para formar a rede capilar peritubular, responsável pela nutrição e oxigenação da cortical, e pela remoção dos refugos do metabolismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.3.1 Características anatômicas particulares dos rins bovinos

Os rins dos bovinos adultos mantêm a maior parte de sua lobação fetal, e cada um deles é dividido, por fissuras superficiais, em cerca de uma dúzia de lobos. A estrutura dos rins do bovino é do tipo multipiramidal. As pirâmides medulares separadas são cobertas por um córtex contínuo, embora à inspeção casual, este também pareça fragmentado por fissuras, que se estendem para dentro de sua superfície. O ápice de cada pirâmide medular ajusta-se a um cálice ou taça formada por um dos ramos terminais do ureter; posteriormente, estes ramos unem-se para formar dois canais principais, que convergem aos pólos cranial e caudal produzindo um único ureter. Portanto, não existe uma grande expansão central correspondente a uma pelve renal (DYCE et al., 2004).

3.4 FASES DO DESENVOLVIMENTO RENAL

Browder et al.(1991) descreveram que o mesoderma intermediário está presente na linha do tronco como um suporte de células conectando os somitos com a lâmina lateral do mesoderma. As células desta região dão origem aos órgãos do sistema urinário e parte do sistema reprodutivo.

Três diferentes rins se desenvolvem em estágios sucessivos em uma progressão espacial e temporal em direção crânio caudal do embrião, sendo que estes rins são uma continuidade indistinta. O primeiro rim se desenvolve no mesoderma intermediário anterior e é conhecido como pronefro (do grego “pro” significa antes). Este rim é funcio-

nal somente nos vertebrados adultos menos evoluídos, como larvas de anfíbios. Na maioria dos vertebrados ele tem um aparecimento curto e transitório e então começa a regredir e um segundo rim se forma posterior a este. Este novo rim é conhecido como rim mesonéfrico (do grego “meso” que significa meio), e este é o rim funcional dos anfíbios adultos, peixes e embriões de vertebrados superiores. Nos pássaros, répteis e mamíferos ele também começa a regredir e é sucedido pelo rim metanéfrico (do grego “meta” que significa atrás ou após) ou rim permanente (BROWDER et al., 1991).

Moore e Persaud (2004) descrevem que o início do sistema urinário se dá antes do sistema genital, ambos originados da crista urogenital. No desenvolvimento dos rins e ureteres três conjuntos de órgãos excretores são formados em embriões humanos. Ainda segundo esses autores, o pronefro é representado por alguns acúmulos de células e estruturas tubulosas e tortuosas, na região do pescoço. Este degenera rapidamente. O próximo conjunto de rins a se formar é o mesonefro que consiste em glomérulos e túbulos mesonéfricos, sempre caudalmente ao pronefro rudimentar. Os túbulos abrem-se no ducto mesonéfrico que se abre na cloaca. Também ocorre sua degeneração, tornando seus túbulos em ductos eferentes do testículo. O terceiro e permanente conjunto de rins a se formar é o metanefro, originado de duas fontes: o divertículo metanéfrico e a massa metanéfrica do mesoderma intermediário, ambos de origem mesodérmica.

3.4.1 Pronefro

Segundo Browder et al. (1991) o túbulo pronéfrico se abre do fim da cavidade celomática ao ducto conhecido como ducto pronéfrico. O ducto pronéfrico inicialmente é um cordão sólido de células que migra em direção à cloaca, onde se funde e se abre para o exterior do organismo. Nos organismos nos quais estes rins são funcionais, produtos residuais são filtrados do sangue em um sulco vascular próximo ao túbulo pronéfrico conhecido como glomus. Este filtrado é impulsionado do celoma para dentro do túbulo e então do túbulo pronéfrico em direção a cloaca. Enquanto os túbulos pronéfricos caudais estão se formando, a maioria dos túbulos anteriores começa a se degenerar.

rar em grande parte das espécies. O ducto pronefrico persiste para dar origem ao ducto excretor funcional do rim mesonéfrico.

Davies (1951) teve interesse em estudar o pronefro em ovelhas e observou que, num desenvolvimento inicial do embrião já eram encontradas estruturas semelhantes ao mesonefro. Estas estruturas em outros mamíferos eram consideradas pronefros, porém nesta espécie, o sistema de excreção não era rudimentar e se manteve até uma fase mais tardia na vida embrionária. O glomérulo era fusionado em uma massa contínua e irregular, chamada pelo autor de um “glomérulo gigante”. Este complexo glomerular era drenado por aproximadamente vinte e cinco pequenos túbulos.

3.4.2 Mesonefro

Browder et al.(1991) descreveram que como os túbulos pronefricos, os túbulos mesonéfricos se formam em uma progressão crânio caudal. Eles se diferenciam dos túbulos pronefricos primeiramente em sua relação com as veias do sangue. Embora a transição entre os túbulos pronefricos e mesonéfricos seja gradual, a demarcação entre os dois rins não é sempre distinta. Os túbulos mesonéfricos alongam-se e desenvolvem uma concavidade em forma de cálice terminal (a cápsula glomerular), a qual envolve um grupo de capilares conhecidos como glomérulos. Este glomérulo, o qual é um ramo do segmento de crescimento da aorta dorsal, difere do glomus do túbulo pronefrico, o qual é um sulco vascular alongado. A porção distal do túbulo mesonéfrico se conecta com a formação do ducto pronefrico. Devido a este ducto estar agora associado com o rim mesonéfrico, ele é chamado de ducto mesonéfrico (ou ducto de Wolffian). O filtrado do glomérulo é passado dentro do túbulo mesonéfrico, onde alguma reabsorção de íon ocorre. Esta urina não concentrada então passa dentro do ducto mesonéfrico. Como o rim pronefrico anterior, o rim mesonéfrico também começa a degenerar, e sua função é assumida pelo rim definitivo, o rim metanéfrico, em répteis, aves e mamíferos. Nem todos os tecidos são perdidos e os ductos e túbulos de Wolffian formarão parte de ductos e órgãos reprodutivos do macho.

Arey (1954) descreveu que os mesonefros em embriões humanos diferenciam-se do cordão nefrogênico na quarta semana de vida intrauterina e atinge seu completo desenvolvimento no segundo mês, e se torna totalmente afuncional no quarto mês. Saxen (1987) concluiu que em ratos o desenvolvimento completo ocorre no 12º dia de gestação e em camundongos no 11º dia. A involução dos mesonefros ocorre simultaneamente com a diferenciação metanefrogênica.

Martino e Zamboni (1966) descreveram que em embriões humanos de 7 a 10 semanas de idade, diferenças morfológicas marcantes são observadas entre o mesonefro e o rim definitivo. Estas diferenças relatam a morfologia dos vasos glomerulares aferentes e eferentes, células endoteliais dos capilares glomerulares e células epiteliais dos túbulos proximais e distais. O aparelho justaglomerular e a alça de Henle estão ausentes nos mesonefros. Estas dissimilaridades são evoluções claras da diferença da funcionalidade dos mesonefros e metanefros.

Tiedemann (1985) estudou a ultraestrutura dos túbulos distais e coletores de mesonefros de embriões suínos no 41º dia de gestação. Fotografias de microscopia eletrônica de transmissão revelaram um tipo celular simples com processo interdigital basolateral, frequentemente com uma superfície de 30 a 120 nm. Processos interdigitais maiores se ancoram verticalmente orientando as mitocôndrias em forma de lâminas. Os túbulos coletores apresentam microvilosidades e numerosas mitocôndrias.

3.4.3 Metanefro

Segundo Felix¹ (1911 apud Ludwig e Landmann, 2005, p. 439) em humanos, o cordão mesonéfrico gera massas celulares provesiculares que se tornam vesículas. Células crescem das vesículas e se fusionam com o ducto mesonéfrico e, após a aquisição de um lúmen, tornam-se túbulos enquanto as vesículas tornam-se o corpúsculo do néfron.

¹ FELIX, W. Die Entwicklung der Harn – und Geschlechtsorgane. In: **Handbuch der Entwicklungsgeschichte des Menschen**. Leipzig: Hirzel, v. 2, 1911. p. 732-955.

Browder et al. (1991) descreveram que o desenvolvimento do rim adulto metanéfrico ou permanente dos répteis, aves e mamíferos partem de duas origens: os ductos coletores se originam do crescimento dos ductos mesonéfricos e os túbulos diferenciam-se da cápsula do mesênquima nefrogênico posterior até o túbulo mesonéfrico. O primeiro aparecimento do rim metanéfrico é um crescimento do ducto mesonéfrico próximo ao ponto onde ele fusiona com a cloaca, este crescimento é conhecido como divertículo metanéfrico. Ele se alonga e formará o futuro ureter e termina em uma expansão em saco cego que formará a pelve renal. Como o divertículo caminha em direção ao mesênquima posterior nefrogênico, isto mais tarde condensa o mesoderma em volta da pelve para formar o blastema metanéfrico, do qual a unidade excretora tubular renal se origina. O resultado da integração recíproca entre estes dois tecidos é a condensação do blastema metanéfrico, que formam os túbulos renais e os ramos dicotômicos dos ductos metanéfricos, para formar o sistema de ductos coletores.

No rato, o rim se forma quando o broto do ureter invade o mesênquima metanéfrico e o resultado induz interações que levam o primeiro tecido a gerar uma coleção de ductos e ureter, e mais tarde produzindo os néfrons, o aparelho justaglomerular, células estromais e neurônios (BARD, 1996).

Hammerman et al. (1992) verificou que a formação do metanefro ocorre na quinta semana de gestação em humanos, durante o 12º dia de formação do embrião em ratos e no 11º dia em camundongos.

O divertículo metanéfrico, ou broto do ureter, é o primórdio do ureter, pelve renal, cálices e túbulos coletores. Ao alongar-se penetra no mesoderma metanéfrico e induz a formação da massa metanéfrica do mesoderma intermediário sobre sua extremidade expandida, a qual dará origem ao néfron. A filtração da urina se faz durante toda a vida fetal, a qual é excretada na cavidade amniótica onde se mistura com o fluido amniótico (MOORE; PERSAUD, 2004).

3.5 MORTALIDADE DURANTE O PERÍODO EMBRIONÁRIO

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

Segundo Hafez e Hafez (2004) aproximadamente 25 a 40% dos embriões de bovinos são perdidos entre o período de penetração dos espermatozóides no oócito e no processo final de implantação. O zigoto se desenvolve até a mórula ou estágio precoce de blastocisto, porém degenera antes da metade do ciclo estral. Os blastocistos degeneram após a fase média do ciclo, porém antes ou imediatamente após a implantação.

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

Arthur (1979) e Moore e Persaud (2004) relataram que o período embrionário é o período de maior susceptibilidade a teratógenos, esta é a época em que as primitivas camadas germinativas e os rudimentos de órgãos são formados. Cada órgão tem um período crítico de desenvolvimento e os processos bioquímicos envolvidos no crescimento e diferenciação de cada órgão tem uma seqüência ordenada que é controlada por vários genes.

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

Recentemente os estudos têm evoluído para realização de diagnósticos pré-implantacionais embrionários. Os objetivos destes testes são evitar a transmissão de enfermidades genéticas, predizerem características genotípicas, como a determinação

do sexo e de padrões produtivos e reprodutivos (HASSUM FILHO, 1998), apontando de certa forma, os riscos de anomalias do embrião.

Condições de cultivo não adequadas levariam ao bloqueio de desenvolvimento ou a perda de viabilidade embrionária, assim afirma Edirisinghe et al. (1934). Já Pinto Neto et al. (1999) relatou que a transferência de embriões em bovinos, associada a super ovulação das fêmeas, é um artifício técnico que permite a multiplicação de caracteres de um único animal de padrão genético elevado, tornando possível a produção de vários bezerros no mesmo intervalo de tempo, com melhora qualitativa do rebanho.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Anatomia e Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / FMVZ – USP.

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

4.1 COLETA DE MATERIAL

Os úteros foram coletados em frigoríficos nas cidades de Poços de Caldas - MG e São José dos Campos - SP. Foram colhidos úteros de várias raças e origens de bovinos, não conseguindo manter um padrão racial. Foram coletados 50 embriões em diferentes estágios gestacionais.

No local de coleta, os úteros foram abertos realizando uma secção que se iniciava na região dorsal da cérvix em direção aos cornos uterinos cuidadosamente. Os embriões coletados foram colocados em solução de Bouin (para microscopia óptica) ou glutaraldeído 2,5%² (para microscopia de transmissão) em vidrarias apropriadas para posterior transporte até o Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ – USP- São Paulo – SP.

² Glutaraldehyde grade I: 70% aqueous solution – Sigma chemical Co., USA

4.2 ESTUDOS MACROSCÓPICOS

Após a chegada dos embriões no Laboratório foram realizadas medidas, com auxílio de um paquímetro inoxidável com divisões em milímetros (150 mm x 0,02 mm), para estimar o período gestacional.

Para os embriões pequenos foram utilizadas lupas estéreomicroscópicas³ e lupa cirúrgica⁴.

Para documentação, foram feitas fotografias de cada embrião. Em seguida seguiu-se com sua dissecação e processamento do material.

4.3 ESTUDOS MICROSCÓPICOS

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

4.3.1 Processamento microscopia de luz

Os embriões foram fixados em solução de Bouin. Após a fixação, que durou em torno de 12 horas, foram desidratados em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizados em xilol, seguindo de inclusão do embrião inteiro em paraplast®⁵.

Foram realizados cortes seriados de todo embrião de 5 µm de espessura e em seguida corados com Hematoxilina e Eosina para posterior análise e realização de fotomicrografias.

³ Zeiss, Stemi DV4

⁴ Leica

⁵ Paraplast Embedding Media Paraplast Plus, Sigma, Oxford Lab, USA

4.3.2 Processamento microscopia eletrônica de transmissão

Os embriões foram previamente fixados em solução de glutaraldeído 2,5%⁶ em tampão fosfato 0,1M, PH 7,2. Ao término da fixação o material foi lavado em tampão fosfato de sódio a 0,1M, PH 7,4 por três vezes durante 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%⁷ por 1 hora. Após novas lavagens em tampão fosfato os embriões foram desidratados em solução de álcool etílico a 50%, 70%, 90% e 100% e lavados em óxido de propileno⁸.

Por um tempo de 12 a 16 horas os fragmentos dos embriões permaneceram sob rotação a 1:1 de óxido de propileno e resina^{9,10}. Na seqüência, essa mistura foi substituída por resina pura por 4 a 5 horas. Após este período foram embebidas com resina pura em moldes. Uma vez incluídos, os embriões permaneceram em estufa a 69°C por 72 horas para consolidar a polimerização da resina.

Os blocos foram cortados em ultra-micrótomo¹¹. Cortes semi-finos de 1 µm de espessura foram obtidos corando-se a quente com solução de borato de sódio a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de Toluidina para observação ao microscópio de luz.

Os cortes ultrafinos de aproximadamente 60 nm de espessura foram colhidos em telas de cobre e contrastados pela solução de acetato de uranila 2% em água destilada por 5 minutos e pela solução de citrato de chumbo 0,5% em água destilada durante 10 minutos. As observações e eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico¹².

⁶ Glutaraldehyde grade I: 70% aqueous solution – Sigma chemical Co., USA

⁷ Osmium tetroxide 4% w/w solution in water – polyscience, Inc., USA

⁸ Propylene oxide EM Grade, Polysciences, Inc, USA

⁹ Spurr Spurr's Kit-Electron Microscopy Sciences, Co. USA

¹⁰ Araldite – 502 EMBEDDING, Kit-Electron Microscopy Sciences, USA

¹¹ Leica ULTRACUT UCT®

¹² MORGANI – modelo 268D, Microscópio Eletrônico de Transmissão – Philips

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Através das análises microscópicas, obtivemos os seguintes resultados:

5.1 MICROSCOPIA DE LUZ

Nos embriões coletados não foi possível observar o pronefro. Nos embriões com CR 3 mm de tamanho e idade gestacional aproximada em 14 a 15 dias, notamos a presença do mesonefro com seus túbulos em cortes longitudinal e transversal, ocupando posição dorsal em relação ao coração e ao fígado, esses túbulos são formados por um epitélio cúbico simples e apresentam aspecto retorcido. No mesmo embrião, podemos notar a presença dos somitos dorsalmente e junto aos túbulos vasos sanguíneos contendo células do sangue no seu interior (Figura 1).

Legenda: A: Observar a localização crânio-dorsal do mesonefro (ms) . Barra = 500 µm.
 B: Observar coração (c), fígado (f), mesonefro (ms), ducto mesonéfrico (dm). Barra = 200 µm.
 C: Coração (c), fígado (f), mesonefro (ms). Barra = 200 µm.
 D: Observar o mesonefro com túbulo contorcido proximal (tcp) e túbulo contorcido distal (tcd), células sanguíneas (cs). Barra = 50 µm.

Figura 1 - Fotomicrografias de embrião bovino com CR 3 mm e idade gestacional estimada de 14 a 15 dias

Em embriões com idade gestacional entre 18 e 19 dias e com CR de 8,3 mm encontramos os túbulos mesonéfricos definidos, formados por um epitélio cúbico simples ou colunar baixo, onde as células apresentam as bordas com aspecto uniforme em alguns ductos e não uniforme em outros. Junto aos ductos, notamos a presença de um mesênquima frouxo e vascularizado (Figura 2- C). Nestes embriões notamos a presença do tubo neural ainda não fechado, aorta dorsal e notocorda. O celoma intra-embrionário encontra-se dividido pela membrana pleuroperitoneal, constituída por mesênquima. Observamos também a presença do fígado (Figura 2 - B).

Legenda: A: Fotografia de embrião bovino em vista lateral.

B: Observar: Tubo neural (tn), Aorta dorsal (ad), Fígado (f), Celoma intra-embrionário (ci), notocorda (n), mesonefro (ms). Barra = 200 µm.

C: Observar: o túbulo mesonéfrico (ts), células mesenquimais (cm). Barra = 50 µm.

Figura 2 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino, apresentando CR 8,3 mm e idade gestacional estimada de 18 e 19 dias (A)

Em embriões com idade gestacional entre 25 e 28 dias apresentando CR de 10 mm, podemos notar que o mesonefro está localizado ventralmente ao longo de doze vértebras, (Figura 3 – B). Observamos a porção cranial do mesonefro próximo das bordas do fígado e a porção caudal junto metanefro (Figura 3 – B). Observamos ainda no mesonefro um aglomerado de células mesenquimais envolvidas por células sanguíneas. As células mesenquimais estão cercadas pelos túbulos mesonéfricos (Figura 3 – C).

Legenda: A: Fotografia de embrião bovino vista lateral.

B: Observar mesonefro (ms), fígado (f), vértebra (v), celoma intraembrionário (ci). Barra = 500 µm.

C e D: Observar mesonefro (ms), túbulos mesonéfricos (ts). Barra = 200 µm.

Figura 3 - Fotografia e fotomicrografias de embrião bovino, apresentando CR 10 mm e idade gestacional estimada de 25 e 28 dias

Na figura 4 (A) observamos o metanefro caudal ao rim mesonéfrico, neste último, os túbulos mesonéfricos possuem lúmen maior e irregular do que observado em outros estágios, e notamos um aglomerado de células mesenquimais na porção central do órgão. Nesta fase, no metanefro (B) os túbulos iniciam a sua formação e há um arranjo celular formando possivelmente os glomérulos. Os túbulos são formados por células cubóides a colunares na direção da área basal à apical.

Legenda: A: Porção Caudal do mesonefro e metanefro. Observar: túbulos mesonéfricos (ts), (vértebra (v), metanefro (mt) . Barra = 200 μ m.
B: Metanefro. Observar os túbulos metanéfricos (tt). Barra = 50 μ m.

Figura 4 - Fotomicrografias de embrião bovino, apresentando CR 10 mm e idade gestacional estimada de 25 e 28 dias

O epitélio dos túbulos mesonéfricos perde o aspecto uniforme e as células cubóides e colunares passam a apresentar borda apical irregular. Há células sanguíneas ao redor dos túbulos (Figura 5).

Legenda: A e B: Mesonefro. Observar os túbulos contorcidos proximais (tcp) e túbulos contorcidos distais (tcd), células mesenquimais (cm) e células sanguíneas (cs). Barra = 50 µm.

Figura 5 - Fotomicrografias de embrião bovino, apresentando CR 10 mm e idade gestacional estimada de 25 e 28 dias

Em embriões com idade gestacional entre 30 e 31 dias e com CR de 16 mm (Figura 6 – A) encontramos outras estruturas formadas como pulmão, estômago, fígado apresentando um tecido mais diferenciado e medula espinhal formada. Nesta fase, o mesonefro está localizado na região ventral às vértebras e dorsal ao estômago (Figura 6 - B).

Legenda: A: fotografia de embrião bovino em vista lateral.
B: Observar vértebra (v), mesonefro (ms), fígado (f), celoma intraembrionário (ci), estômago (e), pulmão (p), medula espinhal (me). Barra = 500 µm.

Figura 6 - Fotografia e fotomicrografia de embrião bovino, apresentando CR 16 mm e idade gestacional estimada de 30 e 31 dias

Em embriões com 30 e 31 dias de idade gestacional foi observado uma continuidade no processo de modificação morfológica das células dos túbulos mesonéfricos. Nesta fase, a irregularidade do lúmen aumentou em relação ao período anterior, e as células mesenquimais encontram-se mais dispersas também. O arranjo tubular é parcialmente perdido (Figura 7).

Legenda: A: Mesonefro. Observar túbulos mesonéfricos (ts), células mesenquimais (cm). Barra = 200 µm.
B: Mesonefro. Observar túbulos mesonéfricos (ts), células mesenquimais (cm).
Barra = 50 µm.

Figura 7 - Fotomicrografias de embrião bovino, apresentando CR 16 mm e idade gestacional estimada de 30 e 31 dias

O metanefro (rim definitivo) foi observado em embriões apresentando CR de 27 mm e com idade gestacional entre 45 e 46 dias (Figura 8 – A). Cranialmente ao metanefro, o mesonefro apresenta-se em menor tamanho em relação às outras fases. (Figura 8 - B). O metanefro (Figura 8 – C) apresenta um arranjo de túbulos bem definidos e sua arquitetura morfológica já está estabelecida.

Legenda: A: Fotografia de embrião bovino em vista lateral.
B: Mesonefro (ms), metanefro (mt), fígado (f), vértebra (v). Barra = 500 µm.
C: Metanefro(mt); túbulos metanéfricos (tt). Barra = 200 µm.

Figura 8 - Fotografia e Fotomicrografias de mesonefro e rim metanefro de embrião bovino apresentando CR 27 mm e idade gestacional estimada 45 a 46 dias

A arquitetura celular do sistema tubular mesonéfrico, nesta fase não está mais preservada mostrando células em processo de apoptose (Figura 9 – A). O metanefro neste período possui as unidades filtradoras (néfrons), com seus respectivos glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais e alça de Henle. O túbulo contorcido distal possui um lúmen maior do que o túbulo contorcido proximal. A alça de Henle possui lúmen largo e suas células são achatadas (Figura 9 - B).

Legenda: A: Mesonefro. Observar: túbulo mesonéfrico (ts). Barra = 50 µm.

B: Metanefro. Observar: glomérulo (g), túbulo contorcido proximal (tcp), túbulo contorcido distal (tcd), alça de henle (ah) seta. Barra = 50 µm.

Figura 9 - Fotomicrografias do mesonefro e metanefro de embrião bovino apresentando CR 27 mm e idade gestacional estimada 45 a 46 dias

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Na fase do desenvolvimento de 20 a 21 dias aproximadamente, o túbulo contorcido distal do mesonefro apresentou inúmeras mitocôndrias dispersas no citoplasma. Observamos núcleos com nucléolos e destituídos deste. Adjacente à célula do túbulo notamos uma célula endotelial e no interior do vaso há células sanguíneas (Figura 10). Em maior aumento podemos observar as interdigitações de membrana presentes na porção basal do túbulo contorcido distal (Figura 11).

Legenda: mitocôndria (m), núcleo (nu), célula endotelial (ce), luz do túbulo (lt), luz do vaso sanguíneo (lv), célula sanguínea (cs). Barra = 5 μ m.

Figura 10 - Eletromicrografia do túbulo contorcido distal do mesonefro de embrião bovino medindo CR de 9,0 mm com idade gestacional estimada de 20 a 21 dias

Legenda: mitocôndria (m), núcleo celular (nu), célula endotelial (ce), luz do vaso sanguíneo (lv), célula sanguínea (cs), interdigitações (i). Barra = 2 μ m.

Figura 11 - Eletromicrografia da porção basal do túbulo contorcido distal do mesonefro de embrião bovino medindo CR de 9,0 mm com idade gestacional estimada de 20 a 21 dias

Observamos na região basal da célula do túbulo mesonéfrico inúmeras mitocôndrias envolvidas por interdigitações de membrana. Notamos a presença de alguns vacúolos no citoplasma (Figura 12).

Legenda: mitocôndria (m), interdigitações (i), núcleo (nu), vacúolo (v). Barra = 1 μ m.

Figura 12 - Eletromicrografia de túbulo mesonéfrico de embrião bovino medindo CR de 16 mm com idade gestacional estimada de 30 a 31 dias

Na figura 13 podemos observar na célula do túbulo contorcido proximal do mesonefro a presença de microvilosidades no pólo apical da célula formando a orla em escova, onde há vários vacúolos subjacentes a esta. Nesta mesma região, as células do túbulo contorcido proximal possuem canalículos que partem da base dos microvilos. Estes canalículos formam vesículas de pinocitose. Observamos nesta região, poucas mitocôndrias comparadas à porção basal da célula e há ausência de interdigitações de membrana.

Legenda: mitocôndria (m), núcleo celular (nu), microvilosidades (mi), vacúolo (v), canalículos (ca), vesículas de pinocitose (vp). Barra = 1 μ m.

Figura 13 - Eletromicrografia da porção apical do túbulo contorcido proximal do metanefro de embrião bovino medindo CR de 16 mm com idade gestacional estimada de 30 a 31 dias

Nas figuras 14 e 15 observamos a orla em escova voltada para a luz do túbulo, vacúolos, mitocôndrias e lisossomos no citoplasma. O núcleo tem forma arredondada possuindo um nucléolo evidente e grânulos de cromatina dispersos no nucleoplasma.

Legenda: mitocôndria (m), núcleo celular (nu), microvilosidades (mi), vacúolos (v), lisossomos (L). Barra = 2 μ m.

Figura 14 - Eletromicrografia da porção apical do túbulo contorcido proximal do mesonefro de embrião bovino medindo CR de 16 mm com idade gestacional estimada de 30 a 31 dias

Legenda: mitocôndria (m), núcleo celular (nu), microvilosidades (mi), vacúolos (v), lisossomos (L). Barra = 2 μ m.

Figura 15 - Eletromicrografia da porção apical do túbulo contorcido proximal do rim mesonéfrico de embrião bovino medindo CR de 16 mm com idade gestacional estimada de 30 a 31 dias

Na figura 16 observamos na porção basal do túbulo contorcido proximal do mesonefro próximo ao núcleo, várias mitocôndrias, interdigitações de membranas e vacúolo no citoplasma. Adjacente à célula do túbulo notamos a presença de uma célula endotelial.

Legenda: mitocôndria (m), núcleo celular (nu), célula endotelial (ce), interdigitações (i), vacúolo (v). Barra = 1 μ m.

Figura 16 - Eletromicrografia da porção basal do túbulo contorcido proximal do mesonefro de embrião bovino medindo CR de 16 mm com idade gestacional estimada de 30 a 31 dias

Nos embriões apresentando CR 23 mm, observamos os túbulos mesonéfricos formados por células epiteliais cúbicas contendo núcleo esférico e central, apresentando um nucléolo evidente e a cromatina formando grânulos eletrodensos dispersos no nucleoplasma, a membrana plasmática na porção apical apresenta-se com contorno irregular. No citoplasma das células epiteliais notamos a presença inúmeras mitocôndrias. Junto às células epiteliais observamos vasos sanguíneos contendo células do sangue no seu interior. As células mesenquimais próximas aos túbulos apresentam núcleo contendo um ou dois nucléolos evidentes, a cromatina se encontra em forma de grânulos e dispersa (Figura 17).

Legenda: Observar núcleo (nu), nucléolo (nc), mitocôndrias (m), luz do túbulo (L), célula mesenquimal (cm), célula sanguínea (cs), membrana plasmática (mp). Barra = 10 µm.

Figura 17 - Eletromicrografia de túbulo mesonéfrico de embrião bovino medindo CR de 23 mm e com idade estimada de 40 a 41 dias

Na figura 18 observamos uma célula tubular do mesonefro apresentando núcleo sem nucléolo definido e grânulos de cromatina dispersos e outra apresentando núcleo com nucléolo. Ao redor do núcleo, notamos a presença de inúmeras mitocôndrias e interdigitações de membrana, que são prolongamentos citoplasmáticos entre células vizinhas. Há também uma célula endotelial próxima ao túbulo mesonéfrico sem nucléolo definido e grânulos de cromatina dispersos no nucleoplasma.

Legenda: Observar: mitocôndria (m), interdigitações (i), célula endotelial (ce), núcleo celular (nu). Barra = 5 μ m.

Figura 18 - Eletromicrografia de túbulo mesonéfrico de embrião bovino medindo CR de 23 mm e com idade estimada de 40 a 41 dias

Observamos na figura 19 a presença de uma célula do túbulo mesonéfrico com núcleo cubóide sem nucléolo evidente, com grânulos eletrodensos dispersos no nucleoplasma. Neste aumento é possível visualizar melhor as interdigitações de membrana no citoplasma envoltas por inúmeras mitocôndrias. Observa-se a irregularidade da membrana plasmática na porção apical da célula.

Legenda: mitocôndria (m), interdigitações (i), luz do túbulo (lt), núcleo (nu), membrana plasmática (mp). Barra = 2 µm.

Figura 19 - Eletromicrografia de túbulo mesonéfrico de embrião bovino medindo CR de 23 mm e com idade estimada de 40 a 41 dias

Em embriões da mesma idade gestacional anterior há próximo à porção basal inúmeras interdigitações de membrana e mitocôndrias compondo o citoplasma da célula do túbulo mesonéfrico (Figura 20).

Legenda: mitocôndria (m), interdigitações (i). Barra = 2 μ m.

Figura 20 - Eletromicrografia de célula do túbulo de mesonefro de embrião bovino medindo CR de 23 mm e com idade estimada de 40 a 41 dias

Em embriões com CR de 27 mm analisamos na porção apical do túbulo contorcido distal a presença de mitocôndrias com a arquitetura desarranjada próximas ao núcleo e notamos também que entre duas células há uma junção celular desmossômica (Figura 21).

Legenda: mitocôndria (m), núcleo celular (nu), célula endotelial (ce), luz do túbulo (lt), interdigitações (i), desmossomo (d). Barra = 1 µm.

Figura 21 - Eletromicrografia da porção apical do túbulo contorcido distal de embrião bovino medindo CR de 27 mm com idade gestacional estimada de 45 a 46 dias

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Browder et al. (1991) relata que o rim mesonéfrico cresce em uma progressão crânio caudal em humanos. O mesmo foi observado nos embriões bovinos desde o primeiro período estudado.

Os menores embriões por nós coletados e processados, com idade gestacional de 14 a 15 dias, apresentando CR de 3,0 mm, onde esperávamos encontrar pelo menos o vestígio do pronefro, observamos um rim metanéfrico formado muito parecido com o descrito por Davies (1951), quando estudou o desenvolvimento renal em embriões de ovelhas e encontrou em embriões na sua fase inicial de desenvolvimento uma estrutura muito parecida com o rim mesonéfrico que se manteve até um desenvolvimento mais avançado do embrião.

Nos embriões de vertebrados superiores, no início do desenvolvimento se forma um rim rudimentar e afuncional, formado por um cordão de células (BROWDER et al., 1991). Em consequência de nossos estudos, não podemos afirmar que este acontecimento ocorre em embriões bovinos, uma vez que não encontramos tal estrutura desde os primeiros estágios coletados (embriões com idade gestacional entre 15 e 16 dias).

Em embriões com idade gestacional estimada entre 14 e 15 dias, encontramos um rim mesonéfrico já formado, adiantados se comparados à formação do mesonefro de embriões humanos que se dá na quarta semana de gestação (AREY, 1954). O epitélio dos túbulos mesonéfricos nesta fase é cúbico simples e existe uma relação entre esses túbulos e os vasos sanguíneos ao seu redor, mostrando que a estrutura está em atividade.

Uma formação como descrita por Davies (1951) foi encontrada em embriões com idade gestacional entre 18 e 19 dias, onde observamos uma massa contínua e irregular de células mesenquimais. Estas células provavelmente teriam a mesma função do glomérulo mesonéfrico organizado descrito nas outras espécies, como relata Browder et al. (1991) que nos embriões humanos, os túbulos mesonéfricos alongam-se e desenvolvem uma concavidade em forma de cálice terminal (a cápsula glomerular), a qual envolve um grupo de capilares conhecidos como glomérulos.

O início do desenvolvimento do rim metanéfrico (ou rim definitivo) foi observado pela primeira vez em embriões bovinos com idade gestacional entre 23 a 24 dias, diferentemente do período relatado por Hammerman et al. (1992), onde afirma que em humanos, a formação do metanefro ocorre na quinta semana de gestação, durante o 12º dia de formação do embrião em ratos e no 11º dia em camundongos.

Podemos afirmar também que as células dos túbulos mesonéfricos nesta fase já não mantém sua arquitetura organizada e um início de degeneração, principalmente em sua porção cranial, é observado, coincidindo com estudos de Saxen (1987) em ratos e camundongos, onde afirmou que a involução dos mesonefros ocorre simultaneamente com a diferenciação metanefrogênica.

Verificamos nos embriões bovinos um processo contínuo de perda da arquitetura celular nos túbulos mesonéfricos com o aumento da idade embrionária. Esta degeneração crânio caudal também é descrita por Sadler (2005) em embriões humanos.

Notamos ainda que, em embriões com idade gestacional entre 45 e 46 dias, o rim metanéfrico apresenta um arranjo de túbulos bem definidos e sua arquitetura morfológica já está estabelecida. Este rim definitivo toma aos poucos o lugar do rim mesonéfrico, o qual nesta fase já possui tamanho reduzido.

Dyce et al. (2004) relata que os rins dos bovinos adultos possuem fissuras superficiais, em cerca de uma dúzia de lobos. A estrutura dos rins do bovino é do tipo multi-ramidal. Porém em nossas observações não notamos esta lobação superficial já no início da idade fetal (45 a 46 dias). Acreditamos que isto ocorra num momento mais tardio da vida intra uterina.

Verificamos como Tiedemann (1985) em embriões suínos com idade gestacional de 41 dias, que o epitélio dos túbulos mesonéfricos em embriões bovinos com idade gestacional entre 30 e 31 dias, apresenta microvilosidades no pólo apical e inúmeras mitocôndrias no pólo basal, o que indica intensa atividade de absorção e transporte iônico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004), desta forma entendemos que nessa fase do desenvolvimento o rim está em intensa atividade metabólica, contribuindo como a homeostasia do embrião.

A presença de desmossomos entre as células epiteliais indica adesão entre as mesmas, e as interdigitações laterais e basais mostram uma relação íntima entre as

células tubulares. Estas interdigitações estão presentes em maior número na porção basal de células dos túbulos contorcidos proximais do rim mesonéfrico.

Junqueira e Carneiro (2004) relatou que o citoplasma apical dos túbulos contorcidos proximais de rim metanéfrico, apresenta microvilos que formam a orla em escova e canalículos que partem da base dos microvilos e aumentam a capacidade de o túbulo proximal absorver macromoléculas. Nos canalículos formam vesículas de pinocitose, que introduzem na célula macromoléculas que atravessam a barreira de filtração glomerular. As vesículas se fundem com os lisossomos, onde as macromoléculas são digeridas. Os limites entre as células desses túbulos são dificilmente observados no microscópio óptico, pois elas têm prolongamentos laterais que se interdigitam com os das células vizinhas. Esses túbulos possuem uma luz ampla e são circundados por muitos capilares sanguíneos. Afirma ainda que, as células dos túbulos contorcidos distais não têm orla estriada e são menos acidófilas (possuem menor quantidade de mitocôndrias), além de possuírem invaginações de membrana baso-lateral e seu lúmen ter um diâmetro menor se comparado ao túbulo contorcido proximal.

Seguindo as descrições de Junqueira e Carneiro (2004), conseguimos classificar os túbulos mesonéfricos encontrados na microscopia eletrônica, apresentando características idênticas às citadas pelo autor.

Uma observação interessante foi notada quando ao analisar as fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão, não observamos a presença de alça de Henle no rim mesonéfrico, coincidindo com o relato de Martino e Zamboni (1966) que afirmaram que a alça de Henle estão ausentes nos mesonefros de embriões humanos e estas dissimilaridades são evoluções claras da diferença da funcionalidade dos mesonefros e metanefros.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Através dos nossos achados, podemos concluir que:

1 - O desenvolvimento embrionário renal em embriões bovinos depende de um crescimento progressivo de duas unidades renais, o mesonefro e o metanefro, que são originados do mesoderma intermediário.

2 - O pronefro não aparece em embriões bovinos no início do desenvolvimento (14/15 dias de gestação com CR 3,0 mm).

3 - Em embriões com idade gestacional entre 14 e 15 dias (CR 3,0 mm) há um mesonefro formado e funcional.

4 - O mesonefro de embriões bovinos não possui uma forma glomerular típica e sim um aglomerado de células mesenquimais circundadas por vasos sanguíneos.

5 - O rim definitivo começa a se desenvolver em embriões bovinos no período gestacional entre 23 e 24 dias (CR 10 mm).

6 - A involução dos mesonefros ocorre simultaneamente com a diferenciação metanefrogênica.

7 - A lobação externa do rim bovino não é observada até o início da fase fetal (45/46 dias, CR 27 mm).

8 - Há intensa atividade dos túbulos mesonéfricos durante a maior parte da vida embrionária.

9 - As células dos túbulos mesonéfricos estão em íntimo contato umas com as outras, apresentando desmossomos e inúmeras interdigitações, indicando existirem locais de comunicação celular.

10 - Podemos classificar os túbulos mesonéfricos em dois tipos: túbulo contorcido proximal e túbulo contorcido distal, usando como referência suas características morfológicas.

11 - Não há formação da alça de Henle no rim mesonéfrico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AREY, L. B. **Developmental Anatomy**. Philadelphia: Saunders, 1954. 295 p.

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

ASSIS NETO, A. C. **Avaliação morfológica da placentação em bovinos de gestações normais e de gestações manipuladas em laboratórios**. 2004. 220 p. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

AVES, D. F.; RAUBER, L. P.; RUBIN, F. B. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, v. 40, n. 4, p. 279-286, 2003.

BARD, J. B. L. A new role for the stromal cells in the kidney development. **BioEssays**, v. 18, n. 9, p. 705-707, 1996.

BROWDER, L. W.; ERICKSON, C. A.; JEFFERY, W. R. **Developmental biology**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1991. p. 300-303.

DAVIES, J. Nephric development in the sheep with reference to the problem of the ruminant pronephros. **Journal of Anatomy**. v. 85, n. 1, p. 6 – 11, 1951.

DYCE, K. M.; SACK, M. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2004, 803 p.

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

FERNANDES, C. A. C. Inovulações não cirúrgicas e taxa de gestação de receptoras de embrião. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 263 – 266, 1999.

FONSECA, J. F.; SILVA FILHO, J. M.; PINTO NETO, A.; PALHARES, M. S. Estágio de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 671 – 676, 2001.

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

GILARD, S. G. T.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; MACHADO, M. A.; SERAPIÃO, R. V.; SOARES, A. B. M.; PINHO, T. G.; VIANA, J. H. M. Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 623 – 627, 2004.

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

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

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

HAMMERMAN, M. R.; ROGERS, S. A.; RYAN, G. Growth factors and metanephrogenesis. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. 523 – 532, 1992.

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

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

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

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

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

LUDWIG, K. S.; LANDMANN, L. Early development of the human mesonephros. **Anatomy and Embryology**, v.209, p. 439 – 447, 2005.

MARTINO, C.; ZAMBONI, L. A morphologic study of the mesonephros of the human embryo. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 16, p. 399-427, 1966.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA; PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **A pecuária no Brasil**. 2007. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em 15 de fevereiro de 2007.

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

MOTTA, P. **Atlas fotográfico a cores de anatomia microscópica**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu S. A. 1974. p. 139 – 141.

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

NODEN, D. M.; DE LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos**. Zaragoza, Espanha: Acribia, 1990. 399 p.

PINTO NETO, A.; SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, J. F.; PALHARES, M. S.; COSTA, E. P. Taxa de gestação e morfologia de embriões bovinos da raça Nelore resfriados por 24 horas a 5°C em contêiner modelo Celle modificado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, p. 159 – 162, 1999.

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

SAXEN, L. **Organogenesis of the Kidney**. Cambridge: Cambridge University, 1987. 256 p.

TIEDEMANN, K. The pig mesonephros. III. Distal tubule, collecting tubule, and Wolffian duct: SEM and TEM studies. **Anatomy of Embryology**, v. 172, p.123-132, 1985.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Serviço de Biblioteca e Documentação. **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, 4. ed. rev. atual. ampl. São Paulo: SBD; FMVZ; USP, 2003. 84p.

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 . **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 77, n. 2, p. 1-16, 2004.