MARISOL LEÓN CABRERA

Tecnologias aplicadas à identificação do papel dos lipídios durante a organogênese em
mamíferos (modelos suíno e canino)

São Paulo

2018

MARISOL LEÓN CABRERA

**Tecnologias aplicadas à identificação do papel dos lipídios durante a organogênese em
mamíferos (modelos suíno e canino)**

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 como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2018

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3728
FMVZ

León Cabrera, Marisol
Tecnologias aplicadas à identificação do papel dos lipídios durante a organogênese em mamíferos (modelos suíno e canino) / Marisol León Cabrera. – 2018.
106 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2018.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Miglino.

1. Cães. 2. Suínos. 3. Lipídios. 4. Morfologia. 5. Tecnologia de imagem. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento embrionário e fetal do cão (Canis familiares): identificação do papel dos grupos de lipídios durante a organogêneses", protocolada sob o CEUA nº 7449040518 (ID 004838), sob a responsabilidade de **Maria Angélica Miglino e equipe; Marisol León Cabrera** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 09/05/2018.

We certify that the proposal "Embryonic and fetal development of dogs (Canis familiares): identification the role of lipids groups during the organogenesis.", utilizing 28 Dogs (males and females), protocol number CEUA 7449040518 (ID 004838), under the responsibility of **Maria Angélica Miglino and team; Marisol León Cabrera** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/09/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2018** a **07/2019**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Animais provenientes de campanha**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **20 a 60 dias**

N: **28**

Linhagem: **indefinida**

Peso: **3 a 20 kg**

Local do experimento: Os úteros gravídicos após serem descartados na campanha de castração serão trazidos para Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no anatomia laboratório de anatomia e histologia, do departamento de cirurgia e anatomia animal. A tomografia e RX serão realizada na sala de imagem do HOTVET da FMVZ campus SP. A micro-tomografia será realizada na faculdade de medicina da USP.

São Paulo, 04 de dezembro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 17 de outubro de 2018
CEUA N 7449040518

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Maria Angélica Miglino

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Título da proposta: "Desenvolvimento embrionário e fetal do cão (Canis familiares): identificação do papel dos grupos de lipídios durante a organogêneses".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 003956)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 02/outubro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicitamos a troca do título devido a que com a realização do trabalho o foco da pesquisa foi mudando com a obtenção de resultados, e apreciamos que o novo título encaixa melhor com a proposta. Além será acrescentado o modelo suíno, o qual é essencial para o entendimento de doenças, para o desenvolvimento de novas terapias na medicina translacional e freqüentemente usado como fonte de transplante de órgãos, devido a suas numerosas semelhanças anatômicas, fisiológicas e moleculares com os humanos. Se utilizara um feto de suíno congelado de 50 dias de gestação, obtido de um fornecedor comercial (Animal Technologies, Inc.). O qual será cortado em seções de 15 µm de espessura usando um criótomo (criostato Shandon SME Cryotoma GMI, Inc., Ramsey, MN, EUA) para seu posterior análises pela técnica de Ionização de Electrospray por Dessorção - Imageamento por Espectrometria de massas, como uma nova tecnologia para descrever imagens morfológicas vinculados a informação molecular. A Ionização de Electrospray por Dessorção - Imageamento por Espectrometria (DESI-MS imagem), permite a junção da informação morfolofisiologica, com a informação bioquímica molecular. A DESI-MS imagem será utilizada na identificação lipídica no feto de suíno de 50 dias, como proba inicial para futuramente ser realizada em outras especies animais e em varias idades gestacionais. Declarando que os lipídios atuam em varios procesos no desenvolvimento embrionario e fetal, estando associado com o baixo peso ao nascimento, com delevidade muscular em neonatos, entre outros. Tendo função na proliferação e migração celular e como fator de crescimento. Alem não será realizada a quatificação lipídica mediante cortes por historecina, devido à alta informação bioquímica oferecida pela DESI-MS, nem será feita a Microscotomografia Magenetica devido a problemas técnicos do aparelho. ".

Comentário da CEUA: "Mudança de título para adequação de projeto, sem mais."

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 04 de dezembro de 2018
CEUA N 7449040518

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Maria Angélica Miglino

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Título da proposta: "Tecnologias aplicadas à identificação do papel dos lipídios durante a organogênese em mamíferos (modelos suíno e canino)".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 004110)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 04/dezembro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Acrescentar como novo modelo animal um feto de suíno de 50 dias de gestação. Justificativa: O modelo suíno é essencial para o entendimento de doenças, para o desenvolvimento de novas terapias na medicina translacional e freqüentemente usado como fonte de transplante de órgãos, devido a suas numerosas semelhanças anatômicas, fisiológicas e moleculares com os humanos. Metodologia: Se utilizara um feto de suíno congelado de 50 dias de gestação, obtido de um fornecedor comercial (Animal Technologies, Inc.). O qual será cortado em seções de 15 µm de espessura usando um criótomo (criostato Shandon SME Cryotome GMI, Inc., Ramsey, MN, EUA) para seu posterior análises (documento de compra anexado).".

Comentário da CEUA: "Aprovado.".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CABRERA, Marisol León

Título: Tecnologias aplicadas à identificação do papel dos lipídios durante a organogênese em mamíferos (modelos suíno e canino)

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 como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Agradecimentos

CAPES: “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.;

À Faculdade de Medicina Veterinária e ao programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, pela oportunidade de ensino;

Ao Prof Graham Cooks, responsável pelo laboratório de ASTON da faculdade de química da Purdue University (EUA);

À Professora Dra. Maria Angélica Miglino por me orientar e por abrir as portas da pós-graduação e do mundo para mim;

A todos os professores e as todas as pessoas que estiveram envolvidos no meu ensino pela ajuda prestada;

RESUMO

CABRERA, M. L. Tecnologias aplicadas à identificação do papel dos lipídios durante a organogênese em mamíferos (modelos suíno e canino). 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O desenvolvimento embrionário encontra-se dividido em três etapas nas quais podem ser distinguidas as três estruturas: ovo, embrião e feto. Durante o desenvolvimento ocorrem eventos distintos e alterações morfológicas que dão início à vida. Os lipídios desempenham um papel importante no processo de formação, pois tem uma participação específica no desenvolvimento embrionário. A utilização de um conjunto de técnicas poderia auxiliar e decifrar melhor os processos de formação e a sinalização molecular do desenvolvimento. Porém, o objetivo proposto neste trabalho foi caracterizar de forma aprimorada (mediante tecnologias apropriadas) o desenvolvimento embrionário de mamíferos, em relação à identificação de grupos lipídios. Para isso, foram estudados 28 fetos e embriões de cães, com idades compreendidas entre os 22 e 55 dias de gestação, obtidos em campanha de castração, além de um feto de suíno de 50 dias de gestação, proveniente de um fornecedor comercial (Animal Technologies, Inc.). Foram analisados fígado, coração, cérebro, rins e pulmões de embriões e fetos, valendo-se de tecnologias de imagem (Microscopia Eletrônica de Varredura, Tomografia Computadorizada, Raios-X), e técnicas histológicas (colorações de Hematoxilina e Eosina, Tricrômio de Masson, Ferro Coloidal, Sudan Black) em cães. No suíno realizou-se além das citadas técnicas, a análise lipidômica realizada pela técnica de Electroespraiamento por Dispersão- Imageamento por Espectrometria (DESI-MS Imagem) e, posteriormente, coloração com Hematoxilina e Eosina. As principais conclusões relacionam-se ao emprego de várias tecnologias para descrever o desenvolvimento embrionário e fetal, caracterizando bem o desenvolvimento de estruturas, tais como: os arcos braquiais e as vesículas ópticas e óticas nos embriões, cordas tendíneas no coração, lobos hepáticos e mineralização do tecido ósseo. A vinculação dos lipídios à essas tecnologias permitiu associá-las aos processos de contração miocárdica, formação de surfactante pulmonar e trânsito de metabólitos das células epiteliais. Além disso, permitiram ainda demonstrar as distribuições lipídicas em órgãos: N-acetilglutamina no coração, ST (ht22: 0) nos intestinos, AG dímeros no fígado e um amplo número de lipídios PS no sistema nervoso. Conclui-se que, de modo geral, existe grande variabilidade na interação do papel dos lipídios com o desenvolvimento embrionário.

Palavras-Chaves: Cães. Suínos. Lipídios. Morfologia. Tecnologias de imagens.

ABSTRACT

CABRERA, M. L. Technologies applied to the identification of the role of lipids during organogenesis in mammals (swine and canine models). 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Embryonic development is divided into three stages in which the three structures can be distinguished; egg, embryo and fetus. During development occur distinct events, and morphological changes that start life. Lipids play an important role in the formation process because they have a specific participation in embryonic development. The use of a set of techniques could help and improve the processes of formation and the molecular sign of embryonic development. However, the objective of this work was to characterize the embryonic development of mammals in an improved way (through appropriate technologies), in relation to the identification of lipid groups. For this, 28 fetuses and embryos of dogs, aged between 22 and 55 days of gestation, obtained in a castration campaign, in addition to a fetus of 50 days' gestation from a commercial supplier (Animal Technologies, Inc.). The liver, heart, brain, kidneys and lungs of embryos and fetuses were analyzed using imaging technologies (Scanning Electron Microscopy, Computed Tomography, X-rays) and histological techniques (Hematoxylin and Eosin stains, Masson's Tricomial, Colloidal Iron, Sudan Black) in dogs. In the pig, all the techniques were performed, the lipid analysis revealed by the technique of Dispersion Electrospray - Spectrometry Imaging (DESI-MS Image) and subsequently staining with Hematoxylin and Eosin. The main conclusions are related to the use of several technologies to describe embryonic and fetal development, characterizing well the development of structures such as brachial arches and optic and optical vesicles in embryos, chordae tendineae in the heart, hepatic lobes and tissue mineralization bone. The lipid binding to these technologies has been associated with the processes of myocardial contraction, formation of pulmonary surfactant and transit of epithelial cell metabolites. In addition, they allowed to demonstrate the lipid distributions in organs: specific distributions were shown in organs: N-acetylglutamine in the heart, ST (ht22: 0) in the intestines, AG dimers in the liver, and a large number of PS lipids in the nervous system. We conclude that in general there is great variability in the interaction of the role of lipids with embryonic development.

Keywords: Dogs. Pigs. Lipids. Morphology. Image technology.

SUMARIO

1. Introdução	12
2. Desenvolvimento Embrionário e Fetal dos Cães (<i>Canis familiaris</i>)	15
Introdução	15
Materiais e métodos	16
Resultados	18
Conclusão	40
Referências	40
3. O uso de tecnologias aplicadas na descrição do desenvolvimento ósseo e mineralização em cães (<i>Canis familiaris</i>)	43
Introdução	44
Materiais e Métodos	45
Resultados	48
Discussão.....	55
Conclusões	57
Referências	57
4. Lipídios: O papel no desenvolvimento embrionário e fetal.	62
Introdução	62
Participação de lipídios na letalidade embrionária	63
Participação de lipídios na mineralização e formação óssea	66
Participação de lipídios no desenvolvimento do Sistema Nervoso	68
Participação dos lipídios no desenvolvimento pulmonar e na sua maturação	70
Participação de lipídios na formação de tecidos orgânicos.....	71
Conclusão	73
Referências	73
5. Metabólitos e Lipídios Associados à Anatomia de Suínos Fetais por Ionização por Electrospreiamento por Dispersão - Imageamento por Espectrometria de Massa. 81	
Introdução	82
Materiais e métodos	84
Resultados e discussão	86
Conclusão	95
Referências	95

Material Suplementar do artigo	101
6. Considerações gerais.....	104
Referências	104

1. Introdução Geral

A embriologia é uma especialidade que refere-se ao estudo do desenvolvimento dos organismos e das alterações morfológicas que dão início à vida (NODEN; LAHUNTA, 2001; MOORE; PERSAUD, 2007), estendendo-se desde a fecundação até o nascimento (MARTINS et al., 2011; HYTTEL et al., 2013). Encontram-se nesta fase da gestação mudanças que envolvem processos contínuos desde o desenvolvimento de uma célula até indivíduos completos. Estuda-se a especialidade em dois períodos distintos: embrionário e fetal (NODEN; LAHUNTA, 2001; MOORE; PERSAUD, 2007). O período embrionário é aquele no qual se estabelecem todos os sistemas e órgãos principais, enquanto o período fetal é aquele onde se produz principalmente o crescimento e a especialização dos órgãos (KNOSPE, 2002; MIGLINO et al., 2006).

Os lipídios encontram-se integralmente relacionados com as duas fases do desenvolvimento: embrionário e fetal. Eles são considerados um componente essencial para o desenvolvimento celular embrionário, durante as etapas de implantação e de pós-implantação (SUDANO et al., 2016). Alguns estudos já têm demonstrado relatos da participação dos lipídios na letalidade embrionária (WU et al., 2008; VANCE; VANCE, 2009), na calcificação e mineralização óssea (PERESS et al., 1974; MEROLLI; SANTIN, 2009) e na formação do tubo neural (ZURASHVILI et al., 2013).

Embora existam muitos estudos que descrevam o desenvolvimento embrionário, a nosso ver poucos abordam amplamente as técnicas anatômicas e histológicas envolvidas nas descrições, no que se refere aos seus componentes, como por exemplo, a presença de lipídios. Alguns apenas caracterizam a morfologia externa do embrião e suas medidas (EVANS; SACK, 1973); outros utilizam histologia básica, como por exemplo, Hematoxilina e Eosina, (MARTINS et al., 2016); enquanto outros ainda utilizam técnicas macroscópicas por técnicas mais modernas e complexas, tais como: a microtomografia e a tomografia computadorizadas (DEGENHARDT et al., 2010). Porém, as tecnologias de imagem (Microscopia Eletrônica de Varredura, Tomografia Computadorizada, Raios-X), tecnologias moleculares (Electrospreiamento por Dispersão- Imageamento por Espectrometria), associadas às tecnologias utilizadas nas descrições morfológicas (macro e microscópicas) podem prever uma informação mais completa, e mais detalhada do desenvolvimento embrionário e fetal dos mamíferos.

Embora os cães sejam animais estudados tanto para aprimoramento racial e genético quanto para utilização como modelos experimentais para doenças humanas (BATENBURG et al., 1982; LINDBLAD-TOH et al., 2005; KERSTIN et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2008). Cada vez mais animais domésticos são adicionados na família para oferecer incremento na qualidade de vida dos seres humanos. Os cães também podem ser utilizados para obtenção de dados em termos de variações embriológicas, morfológicas, biométricas e histológicas, para ser aplicadas à estudos biotecnológicos, microbiológicos, moleculares e na prática veterinária (PIERI et al., 2015). De outra parte, os suínos são modelos animais essenciais para o entendimento de doenças humanas, incluindo o desenvolvimento de novas terapias na medicina translacional, por apresentarem numerosas semelhanças anatômicas, fisiológicas e moleculares quando comparados aos seres humanos. São frequentemente usados como fonte de transplante de órgãos. O estudo da ontogenia do porco é uma opção atraente para a pesquisa em biologia do desenvolvimento (BENDIXEN et al., 2010).

Assim, o objetivo proposto no trabalho foi caracterizar de forma aprimorada (mediante várias tecnologias) o desenvolvimento embrionário de cães e suínos, utilizando também em uma das espécies (suína) a identificação de grupos lipídios. Por outro lado, a dissertação propõem identificar estruturas características de cada idade, da espécie canina, bem como contribuir para o diagnóstico clínico de malformações, além de favorecer futuras pesquisas. Este trabalho ajudaria a aumentar o conhecimento sobre o papel dos lipídios no desenvolvimento embrionário e facilitaria a prevenção de malformações e mutações em embriões. Os resultados poderiam ser utilizados como modelos de novas investigações humanas, para compreender melhor o desenvolvimento embrionário e prevenir e tratar doenças a ele relacionadas.

1.1.Objetivo Geral:

Caracterizar mediante varias técnicas o desenvolvimento embrionário de cães e suínos elegendo um deles para identificar grupos lipídios relacionados à organogênese.

1.2.Objetivos Específicos

Caracterizar mediante várias técnicas o desenvolvimento embrionário e fetal dos cães mediante descrição macroscópica e microscópicas coradas pela Hematoxilina e Eosina, Tricrômio de Masson, Ferro coloidal, Sudan Black;

Descrever o desenvolvimento do tecido ósseo e sua mineralização em cães por técnicas de imagem (Raio-X, Tomografia Computadorizada, Técnica de Alizarina Red);

Revisar o papel metabólico dos grupos lipídios no desenvolvimento embrionário e fetal dos mamíferos, utilizando os suínos e caninos como modelos animais;

Identificar mediante imagem molecular os grupos de lipídios que desempenha relevante papel na organogênese mediante a técnica de Electroespriamento por Dispersão, utilizando - Imageamento por Espectrometria (DESI-MS imagem) no modelo suíno.

2. Desenvolvimento Embrionário e Fetal dos Cães (*Canis familiaris*)

León, M.; Rodrigues, A.C.B.; Turquetti, A.O.M.; Francioli, A. L. R. ; Miglino. M.A.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Resumo

A necessidade tecnológica de procurar e interpretar novos dados que contribuíssem na identificação e descrição da idade gestacional para futuros trabalhos científicos, fez que o objetivo do presente trabalho fosse caracterizar o desenvolvimento embrionário e fetal dos cães. Foram utilizados 28 fetos e embriões de ambos sexos compreendidos entre os 20 e 55 dias de gestação, os quais foram analisados na biometria e determinação de idade. Utilizou-se técnicas de obtenção de imagem como microscopia de luz (Coloração de Hematoxilina e Eosina, Tricrômio de Masson, Ferro coloidal, Sudan Black) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para uma descrição detalhada dos diferentes estágios do desenvolvimento dos órgãos vitais (fígado, coração, cérebro, rins e pulmões). Os resultados ilustraram a formação e organização no desenvolvimento das fibras cardíacas, lóbulos hepáticos e a arquitetura epitelial dos túbulos contorcidos nos rins, e de brônquios e bronquíolos no pulmão, o que permitiu delimitar o período embrionário e fetal aos 35 dias de gestação. Além disso, descreveram-se, mediante MEV, estruturas específicas do desenvolvimento embrionário do cão tais como os arcos braquiais e as vesículas ópticas e óticas nos embriões e as cordas tendíneas no coração. Por fim, verificaram-se a vinculação de técnicas de imagem macro e microscópicas para descrever de forma pormenorizada a morfologia do desenvolvimento embrionário dos cães (*Canis familiares*), aplicando este conhecimento na análise da participação de grupos de lipídios em processos de contração miocárdica, de formação de surfactante pulmonar e do trânsito de metabolitos nas células epiteliais.

Palavras chave: Microscopia de luz, Morfológica, Fosfolipídios, Ácidos graxos, Cão.

Introdução

Nos carnívoros, em especial o cão, a gestação tem uma duração de 60-61 dias com três intervalos necessários para o desenvolvimento (Evans; Sack, 1973; Sorribas, 2006; Pretzer, 2008). O tempo de duração de cada intervalo pré-natal foi determinado por Phemister *et al.*, (1973) onde o período inicial (óvulo) ocorre entre os 2 e 17 dias de gestação, o período embrionário dos 19 aos 35 dias de gestação e fetal dos 35 dias ao nascimento. A fase embrionária está determinada pela organogênese; na fase fetal ocorre a maturação dos órgãos aparecendo as características da espécie (Pretzer, 2008).

Segundo o conhecimento existente na literatura, existem numerosos estudos que descreveram o desenvolvimento embrionário dos cães, mas poucos descreveram este processo de uma forma integral. Alguns encontram-se baseados na descrição macroscópica (Evans; Sack, 1973), no entanto outros utilizam histologia básica por Hematoxilina e Eosina, (Martins *et al.*, 2016). A seu termo, o conhecimento geral do desenvolvimento embrionário dos cães vinculado à identificação molecular é fundamental para identificar problemas do desenvolvimento, e ao papel da lipidômica aplicada às fases de desenvolvimento de espécies.

No entanto, os cães são considerados animais domésticos e, cada vez mais são acolhidos como membros da família, para oferecer incremento na qualidade de vida dos seres humanos. Eles são estudados para o melhoramento genético e utilizados como modelos experimentais para pesquisas de doenças humanas (Batenburg *et al.*, 1982). Além disso, são usados para testar protocolos de transplante de medula óssea e terapia de celular e gênica (Lindbland-Toh *et al.*, 2005; Kerstin *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2008). Isso gera uma necessidade de procurar interpretar novos dados que contribuíssem na identificação e descrição das duas idades gestacionais (Pieri *et al.*, 2015), entendendo assim os mecanismos relacionados as fases do seu desenvolvimento.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o desenvolvimento embrionário e fetal dos cães mediante descrição macroscópica e técnicas de coloração histológicas (Hematoxilina e Eosina, Tricrômio de Masson, Ferro Coloidal, Sudan Black), valendo-se dessas ferramentas para descrever variações embriológicas, morfológicas, biométricas e histológicas, as quais poderão ser aplicadas a estudos biotecnológicos, microbiológicos, moleculares e em práticas veterinárias.

Materiais e métodos

O projeto encontra-se de acordo ao Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) sob o número 7449040518. Foram obtidas 28 amostras separadas em 14 fetos e 14 embriões, de acordo Evans e Sack (1973) como se ilustra na Tabela 1. Consideramos embriões as idades gestacionais de 20-35 dias, e os fetos de 36-60 dias de gestação. As amostras foram procedentes de campanhas de castração em Embu das Artes no estado do São Paulo e transportadas para o Laboratório de Anatomia do Departamento de Cirurgia na FMVZ-USP. Todos os fetos e embriões foram pesados em balança analítica e mensurados com ajuda de um paquímetro para determinar a idade embrionária pela técnica *Crown-rump* (CR), tomando como referência o

ápice sacral (AS) da extremidade da cabeça à última vértebra sacral (Evans e Sack, 1973). Os dados de CR e peso foram analisados por estatística descritiva, determinando média e variabilidade para cada parâmetro tabelas de cálculo de Microsoft Excel (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de grupos de estudo segundo as idades gestacionais a partir das médias de Crow-Rump e peso (g), S. Paulo, 2018.

Grupo	Idade Gestacional (dias)	Crow-Rump (cm)	Peso (g)
Embrião	20	0.6 ± 0.01	0.4 ± 0.01
	22	$0,8 \pm 0,10$	$0,8 \pm 0,20$
	25	$1,25 \pm 0,12$	$2,0 \pm 0,10$
	28-30	$3,24 \pm 0,50$	$2,54 \pm 0,68$
Feto	35	$4,67 \pm 0,27$	$12,30 \pm 0,27$
	38-40	$6,9 \pm 0,30$	$23,55 \pm 2,33$
	44	$9,0 \pm 0,81$	$52,5 \pm 0,57$
	55	$12,85 \pm 2,33$	$140 \pm 3,00$

Fonte: Leon, 2018

Processamento Macroscópico

Se avaliou e foto-documentou as características externas de fetos e embriões. Além disso, os fetos foram cortados dorso ventralmente pelo plano sagital mediano, o que permitiu a visualização macroscópica dos órgãos internos. Estes foram avaliados anatomicamente, mensurados e foto-documentados. Foram extraídos para microscopia 3 fragmentos dos seguintes sistemas: respiratório (Pulmão), cardiovascular (coração), nervoso (cérebro), urinário (rins) e digestório (fígado).

Processamento Microscópico

A metade do número dos embriões e alguns fragmentos de órgãos dos fetos (pulmão, coração, cérebro, rim, fígado) foram fixados em solução de formaldeído 10% durante 48 horas. Em seguida, estes foram desidratados em concentrações seriadas de álcool (70% a 100%), diafanizados em xilol e embebidos em parafina. Os blocos obtidos foram seccionados com $5\mu\text{m}$ em micrótomo automático (Leica, RM2165). Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas e corados com Hematoxilina e Eosina (HE), para a arquitetura do tecido, Tricrômio de Masson (ilustra conformação de colágeno) e Ferro Coloidal (ilustra proteoglicanos, ácido hialurônico e mucina ácida). Em seguida, as lâminas foram fotografadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse E- 80i) no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem- CADI- FMVZ-USP.

A outra metade do número dos embriões, bem como os demais fragmentos de órgãos (exceto sistema nervoso) foram fixados em Karnovsky (Karnovsky, 1965). Uma parte dos esses fragmentos de órgãos foram emblocados em historesina (Kit historesina Leica), e cortados com lamina de vidro com 4µm em micrótomo automático (Leica, RM2165). Os cortes foram corados com Sudan Black para identificar a presença de lipídios. As lâminas foram fotografadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse E- 80i) no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem- CADI- FMVZ-USP. No em quanto a outra parte dos fragmentos de órgãos e os embriões foram lavadas com PBS 1% em três banhos durante 5 minutos, e 3 banhos com agua destilada no ultrassom por 3 minutos. Em seguida, foram desidratadas em séries crescentes de álcoois em concentrações de 50%, 70%, 90% e 100%, secas em aparelho de ponto crítico LEICA EM CPD300 (FMVZ-USP) colados com cola de carbono em bases metálicas de alumínio e metalizados com prata no aparelho metalizador EMITECH K550 (FMVZ-USP). Em seguida, foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 435VP (FMVZ-USP).

Resultados

A identificação das idades gestacionais foi realizada pela mensuração do *Crow-Rump* (CR) exposta na Tabela 1, que demonsta a média da mensuração CR (cm) e o peso (g) para cada idade gestacional identificada conforme Evans e Sack (1973). Foi possível observar o aumento do peso (g) e das medidas (cm) conforme avançadas idades gestacionais com variações inferiores a 0 na maioria das idades. Os embriões de 25 dias tiveram peso médio de 2 g e 1,25 cm de CR, e os fetos de 43 dias tiveram 52,5 g e 9,0 cm de CR, ambos com variação < 0. Isso demonstra que os embriões de cão têm uma ampla variabilidade no tamanho e peso e se aprecia o aumento considerável no tamanho e peso dos embriões e fetos durante a gestação, além de mudanças consideráveis na morfologia externa.

Descrição morfológica macroscópica de embriões e fetos

Os embriões entre os 20 a 35 dias apresentaram externamente uma aparência translúcida e não passavam de 5 cm de CR (Figura 1 e Tabela 1). Os embriões de 20 dias ainda se mostraram com órgãos primordiais, tais como: coração e fígado, situados externamente. O coração encontrava-se com uma formação tubular, na fase de dobramento, enquanto que o fígado vislumbrava-se como um pequeno broto hepático. Nesta idade também pode-se observar a presença dos arcos branquiais. De outra parte os embriões de 22 dias, com 0,6 cm de CR, simulavam o formato de "C" e apresentavam imaturidade facial, o que inclui escassa

pigmentação ocular e início da cavidade olfatória. Pode-se apreciar um broto cilíndrico dos membros, tanto pélvicos quanto torácicos, mas ainda não era possível determinar a presença de sulcos ou dígitos.

Os embriões com idades compreendidas entre os 25-28 dias de gestação com 1,25 cm de CR, apresentavam formação do meato acústico (conduto auditivo externo). Nesta etapa já encontravam-se formadas as fossas olfatórias, porém ainda rudimentares sem formação da narina característica da espécie. Os olhos já apresentam uma marcada pigmentação com início da formação palpebral e nos brotos dos membros iniciava-se a diferenciação dos dígitos. Nesta idade já era possível observar uma diferenciação do prosencéfalo e do mesencéfalo. Para as idades compreendidas entre os 28-30 dias de gestação, com 3,24 cm de CR, as fossas olfatórias do embrião já eram características da espécie. Pode-se observar formação palpebral, mais ainda sem recobrir o olho na sua totalidade. Nesta idade os membros já apresentavam-se com dígitos e os genitais externos estavam diferenciados.

Figura 1. Fotografia microscópica de embriões entre os 20 e 30 dias de gestação. (A) Vista lateral de embrião de 20 dias; (B) Vista lateral de embrião de 22 dias; (C) Vista lateral de embrião de 25-28 dias; (D) Vista ventral do embrião de 28-30 dias. (A.1, B.1, C.1, D.1, D.2) Fotografia macroscópica; (A.3) Fotografia macroscópica sobre negatoscopia; (A.2, B.2, C.2) MEV; (D.2) Aumento de D.1; 1. Arcos branquiais; 2. Alantoide; 3. Coração; 4. Broto hepático; 5. Tubo neural; 6. Prosencéfalo; 7. Mesencefalo; 8. Rombencéfalo; 9. Pigmentação ocular; 10. Início das fossas olfativas; 11. Brotos cilindros dos membros pélvicos e torácicos; 12. Fígado; 13. 4to ventrículo; 14. Membros pélvico e torácico; 15. Dígito formado; 16. Conduto auditivo; 17. Hérnia umbilical; 18. Orelha externa; 19. Narina presente; 20. Tubérculos genitais; 21. Cauda; 22. Olho. Fonte: Leon, 2018

Os fetos demonstram um aumento considerável no tamanho e externamente deixaram de ser translúcidos para tornar-se opacos, semelhando-se às características da espécie (Figura 2). Nos fetos com idades compreendidas entre os 38-40 dias com 6,9 cm de CR pode-se observar a presença de pelos tácteis ao redor da boca e dos olhos. A formação palpebral recobria os olhos na sua totalidade e os dígitos apresentavam-se totalmente diferenciados com clara

formação de garras. Aos 40 dias pode-se visualizar o fechamento da hérnia umbilical e os intestinos encontravam-se totalmente evoluídos na cavidade abdominal. Aos 44 dias alcançavam os 9,0 cm de CR e os folículos pilosos dos pelos tácteis recobriam todo o corpo. As pálpebras apresentavam uma formação completa bem diferenciada. No entanto aos 55 dias os fetos alcançavam 12 cm de CR aproximadamente com genitais muito bem definidos e pelo recobrindo todo o corpo.

Nesta fase fetal os órgãos encontravam-se anatomicamente diferenciados. Identificou-se que aos 35 dias de gestação o encéfalo encontrou-se pouco definido, no entanto identificaram-se o encéfalo e a medula espinal. De igual forma o sistema digestório não estava totalmente desenvolvido. Partes dos intestinos localizavam-se fora da cavidade abdominal, expondo-se pela hérnia umbilical, além de que o fígado ocupava praticamente toda a cavidade abdominal deixando uma pequena parte área destinada ao estômago, intestinos e demais órgãos.

Aos 44 dias de gestação visualizou-se um cérebro com diferenciação aparente entre o encéfalo, o cerebelo e o bulbo, além da medula espinal. O coração encontrava-se situado na porção média da cavidade torácica, ligeiramente inclinado à esquerda, com dois ventrículos e dois átrios. Os pulmões encontravam-se situados lateralmente ao coração na cavidade torácica, com todos os lóbulos desenvolvidos. O sistema digestório encontrava-se totalmente formado, onde era possível identificar a cavidade bucal com língua e processo mandibular. Neste período ocorria o fechamento da hérnia umbilical e os órgãos abdominais (fígado, estômago e intestinos) encontravam-se localizados na posição anatômica correta. O fígado ocupava grande parte do antímero direito da cavidade abdominal, o estômago no antímero esquerdo, no entanto os intestinos localizavam-se caudalmente ocupando a maior parte da cavidade.

Figura 2. Fotografia de fetos entre os 38 e 55 dias de gestação. (A) Vista lateral do feto de 38-40 dias; (Aa) Vista latero-rostral do feto A; (Ab) Vista caudo-ventral do feto A; (B) Vista lateral de feto de 44 dias; (Ba) Vista frontal da cabeça do feto B; (Bb) Vista caudo-ventral do feto B; (C) Vista lateral de feto de 55 dias; (Ca) Cabeça de feto de 60 dias; 1. Orelha externa; 2. Narina formada; 3. Intestinos herniados no cordão umbilical; 4. Tubérculos genitais. 5. Pelos tácteis ao redor da boca e os olhos; 6. Pálpebras totalmente fundidas; 7. Garras formadas; 8. Cordão umbilical; 9. Folículos pilosos presentes no corpo; 10. Língua; 11. Glândula mamária; 12. Corpo recoberto de pelo; 13. Pálpebras bem definidas Fonte: Leon, 2018

Descrição microscópica dos embriões

Foi possível observar nos embriões de 22 dias de gestação (Figura 3) a formação do tubo neural dividido nas três vesículas encefálicas: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Além disso, destacou-se o broto hepático e o início dos ventrículos do coração. Notou-se a presença de somitos, formação do alantoide caudal e a cavidade abdominal, sendo que o embrião se assemelhava ao formato da cauda de baleia.

Nas idades compreendidas entre os 25 e 28 dias de gestação, os órgãos vitais encontravam-se dentro das cavidades, as quais estavam bem delimitadas, encontrando-se unicamente uma abertura na cavidade abdominal (hérnia umbilical). Foi possível identificar o coração completamente formado com átrios e ventrículos. Notamos também a presença dos pulmões, da traqueia e do esôfago, com a formação do tubo laringotraqueal. Também foram identificados os rins situados na região dorsal-caudal do embrião. Aos 25 dias de gestação em fase mesonefrica e entre os 28-30 dias em fase metanefrica. O sistema nervoso ainda se encontrava em formação, com a presença do quarto ventrículo encefálico em ambas as idades.

Figura 3. Fotomicrografia de Luz dos cortes sagitais de embriões de 20, 25 e 28-30 dias de gestação, com aumento de 10x e coloração com H&E. (A) Embrião 20 dias de gestação; (B) Embrião 25 dias de gestação; (C) Embrião 28-30 dias de gestação 1. Prosencéfalo; 2. Mesencéfalo; 3. Rombencéfalo; 4. Quarto ventrículo encefálico; 5. Área da medula espinal; 6. Língua; 7. Osso Nasal; 8. Osso Mandibular; 9. Coração; 10. Coluna Vertebral; 12. Estômago;

13. Fígado; 14. Mesonefro; 15. Pedúnculo Umbilical com intestinos; 16. Pulmões; 17. Traqueia e Esôfago; 18. Somitos. Fonte: Leon, 2018

Descrição microscópica do sistema respiratório (pulmão)

Nos embriões com as idades compreendidas entre os 25 e os 30 dias de gestação os pulmões encontravam-se como brotos dentro da cavidade, localizados na região caudal do embrião, entre o coração e o intestino primitivo anterior, com bifurcação da traqueia. Aos 25 dias de gestação já era visível a divisão alveolar. No entanto, nas idades compreendidas entre os 28-30 dias foram identificados os brônquios principais e secundários (Figura 4). Nestas idades já era possível identificar os brônquios lobais formados por células epiteliais revestidos de mesênquima. O parênquima estava composto por tecido conjuntivo, proteoglicanos, ácido hialurônico e mucina ácida. Na fase de transição (pseudoglandular) notava-se o início da formação de vasos sanguíneos.

Figura 4: Fotomicrografia de Luz dos pulmões de embriões (A, B) 25 dias de gestação (C, D) embrião com idades compreendidas entre 28-30 dias de gestação. (D.1) Detalhe da região sinalda na figura D onde se visualiza o parênquima pulmonar com presença de brônquios. (A e C) Coloração de Hematxilina e Eosina (B, D) Coloração de ferro coloidal; 1. Brônquio secundário; 2. Brônquios primários; 3. Células sanguíneas; 4. Mesênquima; 5. Parênquima; 6. Vaso sanguíneo; 7. Epitélio; 8. Lúmen Fonte: Leon, 2018

Aos 35 dias de gestação os pulmões apareceram na fase fetal no período canalicular. Notou-se, nesta fase, a formação dos lóbulos pulmonares, com presença de fosfolipídios e ácidos graxos livres dispersos no parênquima pulmonar. Também foi possível identificar os brônquios primários, secundários e lobares, os quais se encontravam transformados em bronquíolos. Aos 55 dias de gestação, o pulmão encontrava-se na fase glandular, com um desenvolvimento evidente dos brônquios, aparecendo brônquios intrapulmonares, compostos por epitélio cilíndrico simples, rodeado por uma túnica muscular interna e outra externa, além da túnica adventícia. Nesta idade era possível observar as ramificações bronquiais, além de brônquios secundários caracterizados pela presença de vasos sanguíneos na periferia e, também, pela presença de fosfolipídios e ácidos graxos livres dispersos no epitélio bronquial e no epitélio alveolar (Figura 5).

Figura 5: Fotomicrografia de luz dos pulmões de fetos (A, B, C) 35 dias de gestação (D, E, F, G) feto de 55 dias de gestação (A.1) Detalhe de Brônquios Primário, mostrando a microestrutura interna; (B.1) Detalhe de parênquima pulmonar; (A, A.1,D) MEV; (B, B.1, E) Coloração de Hematoxilina e Eosina; (F) Coloração de ferro coloidal ilustrando as camadas do Brônquio intrapulmonar; (C,G) Coloração de Sudan black 1. Brônquio secundário; 2. Brônquios primários; 3. Brônquios lobar; 4. Parênquima pulmonar; 5. Bronquíolos primário e secundários; 6. Vasos sanguíneos; 7. Adventícia; 8. Área de divisão bronquial; 9. Epitélio

cilíndrico simples; 10. Brônquio intrapulmonar; 11. Túnica muscular. Seta: fosfolipídios e ácidos graxos livres Fonte: Leon, 2018

Descrição microscópica do sistema cardiovascular (coração)

Aos 22 dias de gestação o coração apresentava paredes frágeis. Nele era possível identificar um único ventrículo, com presença de células sanguíneas no interior. Suas paredes estavam formadas por células mesenquimais desordenadas (Figura 6 A). Aos 25 dias de gestação o coração apresentava formação de átrios e ventrículos, divididos pelo músculo papilar com formação de cordas tendíneas. Era possível identificar as valvas tricúspide e bicúspide com presença de proteoglicanos, ácido hialurônico e mucina ácida corados em azul pelo Ferro Coloidal (Figura 6 B.2).

Aos 35 dias de gestação notou-se, um espessamento das paredes ventriculares (Figura 6 C). As fibras musculares cardíacas encontravam-se organizadas formando os pilares musculares. Nesta idade o coração apresentava três camadas: endocárdio, miocárdio e epicárdio. A microscopia de varredura ilustrou os troncos arteriais e venosos, assim como a válvula tricúspide. Identificaram-se também fosfolipídios e ácidos graxos livres situados dentro das fibras musculares e no interstício. O coração do feto de 55 dias de gestação não apresentava diferenças morfológicas quando comparado com o feto de 35 dias, salvo no fato de que os fosfolipídios e ácidos graxos livres encontravam-se distribuídos em vacúolos e também por todo o interstício (Figura 6 D).

Figura 6: Fotomicrografia de luz e electromicrografia de varredura dos corações de embriões e fetos (A) 22 dias de gestação; (B) 25 dias de gestação (C) 35 dias de gestação; (D) 55 dias de gestação (A, B, B.1) Coloração com Hematoxilina e Eosina; (C.3, D.3) MEV; (B.2, C.2) Coloração de ferro coloidal; (C.3, D.3) Coloração Sudan Black 1. Pericárdio; 2. Miocárdio; 3. Epicárdio; 4. Células sanguíneas; 5. Musculo papilar; 6. Ventrículo direito; 7. Ventrículo esquerdo; 8. Átrios; 9. Cordas tendíneas; 10. Valva bicúspide 11. Valva Tricúspide; 12. Aorta; 13. Tronco pulmonar; 13. Vasos sanguíneos; Seta: fosfolípidios e ácidos graxos livres
Fonte: Leon, 2018

Descrição microscópica do sistema nervoso (cérebro)

Nos embriões foi possível observar o plexo coroide (Figura 7), situado no rombencéfalo aos 25 dias de gestação. A mesma estrutura também foi visualizada na região do prosencéfalo no período de 28-30 dias de gestação, idade onde o plexo aparecia um pouco mais desenvolvido. Com 35 dias de gestação o cérebro apresentava formação de uma rede de axônios (Figura 7). As fibras de axônios encontravam-se bem diferenciadas, porém não foi possível identificar a formação de células satélites, as quais aumentaram de tamanho e número aos 55 dias de gestação. Foi possível identificar as células de Purkinge, com seus respectivos dendritos, distribuídas na substância branca do sistema nervoso.

Figura 7: Fotomicrografia de Luz do sistema nervoso. (A) 25 dias; (B) 28-30 dias gestação; (C) 35 dias de gestação; (D) 55 dias de gestação. (A, B, C) Coloração com Hematoxilina e Eosina; (D, E, F) Coloração de Tricômio de Masson. 1. Plexo Coroide; 2. Procencéfalo; 3. Rombencéfalo, 4.

Células satélite; 5. Mielina; 6. Células de Purkinge; 7. Dendritos das Células de Purkinge; 8. Axônios neurais; Fonte: Leon, 2018

Descrição microscópica do sistema renal (rins)

Os mesonefros dos fetos de 25 dias de gestação encontravam-se constituídos por túbulos coletores portadores de epitélio simples cúbico sem diferenciação da corte. Os ductos mesonefricos tinham um formato regular, arredondado com células cuboides. Também demonstravam a formação dos corpúsculos renais com formação de glomérulos, envolvidos pela cápsula de glomerular. Nesta idade não era possível identificar as camadas cortical e medular (Figura 8A).

Os metanefro dos embriões com idades compreendidas entre os 28-30 dias de gestação encontrava-se caracterizado pela diferenciação das camadas cortical e medular (Figura 8B). A camada cortical caracterizava-se pela presença de glomérulos e a camada medular pela presença de túbulos. Na crista renal foi possível identificar as artérias e veias renais. O interstício encontrava-se composto por colágeno, proteoglicanos, ácido hialurônico e mucina ácida.

Figura 8: Fotomicrografia de Luz dos rins nos embriões (Coração com Hematoxilina e Eosina). (A) rim de 25 dias de gestação; (B) rins de idades compreendidas entre 28-30 dias gestação. (A.1 e B1) Ampliações microscópicas das respectivas imagen A e B. 1. Crista Mesonefrica; 2. Glomérulo em formação; 3. Espaço Sub-cápsular; 4. Área de Vascularização; 5. Túbulos renais com epitélio simples cubico; 6. Mesonefro; 7. Região cortical; 8. Região Medular; 9. Glomérulo; 10. Capsula glomerular; 11. Espaço sub-cápsular; 12. Polo vascular; 13. Infiltrado celular; 14. Túbulos contorneados proximais; 15. Túbulos contorneados Distais; 16. Colágeno intersticial * região dorsal do embrião. Fonte: Leon, 2018

Nos fetos de 35 dias, identificavam-se no metanefro cálices renais. Os glomérulos apresentavam pólos vasculares e renais delimitados pela cápsula glomerular. Notou-se a presença da alça de Henle em alguns cortes (Figura 9B). Foram identificados proteoglicanos, ácido hialurônico e mucina ácida pela coloração azul do Ferro Coloidal nas idades compreendidas entre os 28-30 dias de gestação e os 35 dias (Figura 9A). Aos 35 dias de gestação, foram identificados fosfolipídios e ácidos graxos presentes no epitélio simples cúbico dos túbulos e ao redor dos mesmos. No entanto aos 55 dias estes grupos de lipídios também foram identificados na região glomerular. Ademais os rins apresentavam com uma conformação mais organizada, composta pelos: glomérulos, túbulos proximais e distais e alça de Henle (Figura 9 B).

Figura 9: Fotomicrografia de Luz dos rins de fetos. (A) Feto de 35 dias de gestação; (B) Feto de 55 dias de gestação; (A.1, B.1) MEV; (B) Coloração com Hematoxilina e Eosina; (A.2-3, B.2-3) Coloração de Sudan Black. 1.Região cortical; 2. Região Medular; 3. Cálices renais; 4. Glomérulo; * Espaço sub-capsular; 5. TCD; 6. TCP; 7. Polo vascular; 8. proteoglicanos, ácido hialurônico e mucina acida; 9. Alça de Henle; Seta: fosfolipídios e ácidos graxos livres Fonte: Leon, 2018

Descrição microscópica do Fígado

Aos 25 dias de gestação, o fígado ocupava a maior parte da cavidade abdominal. Nesta idade identificava-se um parênquima desorganizado, composto por hepatoblastos circundados de eritroblastos. Nas idades compreendidas entre os 28-30 dias de gestação o órgão encontrava-se composto por hepatócitos e por hemácias, com formação das veias centro lobulares (Figura 10).

Nos fetos com idades de 35 dias e 55 dias de gestação (Figura 11) foi possível observar uma organização na formação de lóbulos hepáticos formados por cordões hepáticos, uma veia centro lobular e um espaço porta definido. O espaço porta continha a veia porta, artéria hepática e o ducto biliar. Em ambos casos os fosfolipídios e ácidos graxos livres encontram-se dispersos pelo tecido hepático.

Figura 10: Fotomicrografia de luz do fígado de embriões (A, D) 25 dias e (B, C, D) 28-30 dias de gestação. (A, B, C) Coloração com Hematoxilina e Eosina; (D, E) Tricômio de Masson. 1. Hepatócitos; 2. Vasos sanguíneos; 4. Lacunas hepáticas; 5. Lobo hepático. Fonte: Leon, 2018

Figura 11: Fotomicrografia de luz e Electromicrografia de varredura fetos (A,B,C,D,E) 35 dias e (F, G) 55 dias (A) Microscopia eletrônica de varredura, (B) Coloração com Hematoxilina e Eosina; (C) Ferro Coloidal; (D) Tricômio de Masson. 1.Cordões hepáticos; 2.Veia centro lobular; 3.Hepatócitos; 5.Espaço de Disse; 6.Lobo Hepático Fonte: Leon, 2018

Discussão

No atinente às idades gestacionais, a descrição mais completa, utilizada como referência padrão na embriologia, é a de Evans e Sack (1973). Eles descreveram o desenvolvimento de 10 espécies de animais domésticos, dentre os quais encontrava-se o cão. Portanto, os diferentes estágios embrionários foram definidos pelos padrões estabelecidos por Evans e Sack (1973) e por Pretzer (2008), os quais determinaram que o estágio embrionário

ocorria até os 36 dias de gestação. De maneira semelhante a seu turno, Evans e Christensen (1993) descreveram que dos 35 dias de gestação em diante, o cão pode-se considerado feto, por ter todos seus órgãos formados, ou seja, organogênese completa.

Para Pieri et al. (2015) o desenvolvimento embrionário em cães inicia-se entre os 20-21 dias de gestação no cão, idades diferentes daquelas encontradas nos resultados do presente trabalho, pois aos 20 dias já se observava o coração, fígado e o sistema nervoso em desenvolvimento, dados que correspondem aos descritos por Evans e Sack (1973) e por Concannon et al. (2001). Esses últimos descreveram a presença do coração primordial nesta idade.

Além disso, algumas das características externas encontradas nos embriões coincidem com as definidas por Evans e Sack (1973), tais como: a flexura encefálica presente nos embriões, com aproximadamente 30 somitos, na idade de 20 dias de gestação.

Aos 22 dias de gestação ocorre a formação do broto dos membros torácicos e pélvicos com a formação das fossas olfatórias. Além da formação do broto das extremidades, a presença do meato acústico é evidente na idade de 25 dias. Aos 30 dias de gestação ocorre a formação de pálpebras.

A seu termo, aos 35 dias de gestação, é evidente a presença de dígitos totalmente separados e a diferenciação genital. Tais dados corroboram aqueles descritos por Evans e Sack (1973) e por Concannon et al. (2001).

A presença das garras, dos pelos e da coloração no corpo ocorrem na idade de 60 dias, sendo que as garras já são vistas aos 45 dias de gestação.

Abreu et al. (2011) e Pieri et al. (2015) determinaram no gato a presença da flexura encefálica, os quatro arcos faríngeos, a proeminência cardíaca com as cristas divisórias e sinais de brotamento dos membros, e formação de somitos entre os 17 e 25 dias de gestação.

Algumas características, tais como a pigmentação ocular foi determinada em embriões de 25 dias de gestação, e não aos 28 dias como descrevem Evans e Sack (1973). Os folículos tácteis foram identificados neste estudo nas idades compreendidas entre os 28-30 dias e não nas idades compreendidas entre os 30 e 32 dias de gestação como descreveram Evans e Sack (1973). Para Pretzer (2008) neste intervalo de idade entre 28-30 dias de gestação surge a

formação das pálpebras e da orelha externa, além dos pelos do focinho e sobrancelhas táteis, demonstrando além dessas estruturas os intestinos herniados na região umbilical.

Conforme a revisão feita por Pretzer (2008) as mudanças morfológicas do embrião começam a aparecer macroscopicamente aos 22 dias de gestação, após os dobramentos do embrião cefalocaudalmente, ou seja, partindo das dobras da cabeça e do fechamento do tubo neural, precedendo consecutivamente a formação dos somitos, placode da lente, placode ótico, bulbo cardíaco e do crescimento dos membros. As descrições das estruturas internas visualizadas nos embriões e fetos são corroboradas por Hyttel et al. (2013), que descreveram o coração em forma de tubo em dobramento e o fígado cobrindo a maior área da cavidade abdominal em mamíferos de 22 dias. De acordo com Evans e Sack (1973), nas idades compreendidas entre os 25-28 dias de gestação, os embriões apresentaram vesícula óptica e retina pigmentadas.

Sistema Respiratório

Junqueira e Carneiro (2004) e Abreu et al. (2011) descreveram que o sistema respiratório está constituído pelos pulmões e os tubos (Brônquios, Traqueia, Laringe e Faringe) que comunicam o parênquima pulmonar com o meio externo. A descrição histológica oferecida por Junqueira e Carneiro (2004) coincide com a presença de brônquios, bronquíolos e epitélios nos tecidos pulmonares de embriões e fetos de cão. Segundo Moore e Persaud (2007) o primórdio pulmonar surge aos 28 dias de gestação em humanos, aparecendo no cão aos 25 dias de gestação. Também o autor afirmou que o broto pulmonar, encontra-se localizado na região ventral da porção caudal do intestino anterior, posição que coincide com os embriões de cão aos 25 dias de gestação. Sendo interessante lembrar que a gestação em humanos é de 9 meses, no entanto no cão é somente de 2 meses, distinguindo a notabilidade da velocidade de desenvolvimento das estruturas no modelo canino.

A subsegmentação lobar ocorre na fase fetal, após os 35 dias de gestação em nossos resultados. Segmentação que ocorre nos humanos segundo Moore e Persaud (2004) aos 41 dias de gestação. Para Hyttel et al. (2013), a subsegmentação inicia-se igualmente na fase fetal. Enquanto que para Franciulli (2007) o início desta fase ocorreu entre os 15 e 25 dias de gestação em embriões de paca. Para Johannes et al., (2007) a fase pseudoglandular nos mamíferos, caracterizada pela presença de bronquios terminais, ocorreu em fetos de 35 e 55 dias de

gestação assim como acontece no cão. A fase canalicular, caracterizada pela vascularização segundo (Martins *et al.*, 2016), ocorreu no cão aos 55 dias de gestação.

Como verificado, os grupos de lipídios participaram do desenvolvimento embrionário de diversas formas, assim como demostramos que existem variações na presença de grupos de lipídios nos órgãos durante o desenvolvimento embrionário e fetal. Segundo Bleasdale *et al.* (1982) e Hallman *et al.* (2002) os fosfoglicerídeos apareceram no final da gestação nos pulmões com a formação do surfactante pulmonar, situação que coincide com nossos resultados. A principal função do surfactante pulmonar é a proteção do parênquima pulmonar na expansão dos pulmões, segregado pelos microvilos das células Tipo 2 ou pneumócitos 2 no final das gestação (Hyttel *et al.*, 2013). Assim assumimos que os lipídios, em especial os fosfolipídios, encontram-se associados no trânsito de substâncias pelos microvilos, sua função principal neste órgão está vinculada na proteção do parênquima pela formação do surfactante pulmonar.

Sistema cardiovascular (coração)

De acordo com Moore e Persaud (2007), no ser humano o coração surge na terceira semana, porém desempenhando função fisiológica apenas na quarta semana de gestação, quando já se deu o aparecimento das câmaras cardíacas. No cão, observou-se que o coração aparece aos 20 dias de gestação, e que aos 25 dias ocorreu a formação de átrios e ventrículos e fibras musculares. Nesta idade o coração visualizou-se como um par tubos cardíacos que vão se dobrar e fundir para formar o coração definitivo com átrios e ventrículos, observado aos 25 dias de gestação conforme Martins *et al.* (2011). O coração dos cães de 25 dias de gestação apresentavam semelhança com os gatos de 19 dias descritos por Abreu *et al.* (2011), os que identificaram que o coração está constituído por cardiomioblastos e capilares, com duas câmaras cardíacas, (atrial e ventricular) e paredes formadas por epicárdio, miocárdio e endocárdio.

Nas fibras musculares e cardíacas, foi relatado que as mesmas encontravam-se rodeadas de lipídios. Assim, para Sher *et al.* (2006) e Wu *et al.*, (2009) a deficiência de lipídios promove a debilidade muscular e incapacidade severa das fibras desempenhar a contração. Além disso, alguns autores tais como Munday e López (2007), identificaram a presença de fosfatidilinositol no coração fetal, no cérebro, no cerebelo, no hipocampo e no bulbo olfatório, além de outros órgãos tais como fígado, músculo esquelético, testículos, pulmão, glândula mamário e o baço. O papel do fosfatidilinositol é conhecido na literatura pela regulação do cálcio na formação do

sistema de transmissão do sistema nervoso e da transdução de neurotransmissores e hormônios (LO VASCO, 2012; RYOUL et al., 2015). Assim determinamos que sua função no desenvolvimento do coração encontra-se vinculada à formação do sistema de conexão cardíaca.

Uma revisão de Lo Vasco (2012) narra como o fosfatidilinositol regula a concentração de cálcio no desenvolvimento do sistema de transmissão do sinal do sistema nervoso por meio de enzimas da família da fosfolipase C. Foi descrita pelo autor a participação deste lipídio na formação de morfologia dendrítica e axônios.

Sistema nervoso

O sistema nervoso de acordo com Hyttel et al. (2013) é o primeiro a ser formado nos mamíferos, partindo com a formação do tubo neural e das três vesículas encefálicas. Moore e Persaud (2007) descreveram que estas vesículas encefálicas são originadas da porção cranial do tubo neural até o quarto par de somitos, região constituída por um neuroepitélio primitivo conforme Junqueira e Carneiro (2004). Estas estruturas foram identificadas no cão em idades compreendidas entre os 20 e 25 dias de gestação, momento no qual foi observada a diferenciação das vesículas encefálicas em prosencéfalo, mesencéfalo e metencéfalo conforme (Pieri et al., 2015).

Outros autores, tais como Abreu et al. (2011), visualizaram em embriões de gatos de 17, 22, 25 dias de gestação uma dilatação do prosencéfalo rostral com presença de notocorda. Tal situação coincide com as idades compreendidas entre os 25-30 dias de gestação nos cães estudados neste estudo. De outra parte, Pieri et al. (2015) identificaram a formação da linha primitiva que dá início à formação da notocorda aos 20 dias de gestação. Nossos resultados demonstram a presença de notocorda aos 25 dias de gestação, sendo que ela se desenvolveu nas idades compreendidas entre os 28-30 dias.

Apesar de que não puderam ser corados lipídios nesses órgãos sabe-se que os fosfolipídios participam na formação do tubo neural e na neurulação (ZURASHVILI et al., 2013) e transmissão do sinal do sistema nervoso (LO VASCO, 2012). Enquanto as ceramidas participam na diferenciação de células-tronco neurais e apoptose neural (BIEBERICH *et al.*, 2011)

Sistema renal (rins)

O desenvolvimento embrionário dos rins está dividido em três fases importantes: pronefro, mesonefro e metanefro conforme Hyttel et al. (2013). Nos humanos, assim como todos os carnívoros, por exemplo, gato e cão, os rins formam-se do mesoderma intermediário, estendendo-se cranio-caudalmente na região dorsal do embrião segundo Moore et al. (2007). Pelos resultados obtidos neste trabalho foi possível identificar os mesonefros aos 25 dias de gestação e metanefros aos 28 dias de gestação.

Cagnoto e Alberto (2009) e Morini (2009) descreveram que em bovinos o mesonefro aparece como numerosas formações tubulares, tais como túbulos contornados proximais e distais, os quais coincidem com nossas descrições nos embriões de 25 dias de gestação. Nas idades compreendidas entre os 28-30 dias de gestação os rins já são transformados em metanefro, (os denominados rins definitivos), caracterizados por uma camada de células mesenquimais, com glomérulos e túbulos contornados, proximais e distais.

No caso dos rins identificou-se em cães a presença de lipídios, nas células epiteliais de túbulos renais. Segundo Pinal et al. (2006) os lipídios formam parte das células epiteliais, facilitando o transporte de solutos, proteínas ou metabólitos ao meio externo, além da participação dos mesmos na migração e polarização celular.

Fígado

O fígado surge do epitélio endodérmico na extremidade distal do intestino anterior, na terceira semana de gestação em humanos, sendo observado no cão aos 20 dias de gestação. No embrião o fígado ocupa grande parte da cavidade abdominal, situando-se na sua posição anatômica após o fechamento da hérnia umbilical (Hyttel et al., 2013). Os resultados da presente pesquisa demonstraram um fígado desorganizado nas idades compreendidas entre os 25-28 dias de gestação, identificando o fígado funcional aos 35 dias. Nessa idade, observou-se a presença das veias centro lobais, com lobos e cordões hepáticos coincidindo com as descrições de Abreu et al. (2011), os quais encontraram desorganização no fígado embrionário e um fígado totalmente funcional no feto. Os cordões epiteliais hepáticos se misturam às veias vitelina e umbilical, para o que vai formar os sinusoides hepáticos, diferenciando o parênquima do órgão aos 35 dias gestação nos cães.

A presença dos fosfolipídios no fígado explica-se com a função da fosfatidilcolina, que é um fosfolipídio com papel específico no metabolismo hepático, relacionado-se à formação de lipoproteínas e secreção biliar, porém, também, relaciona-se à maturação hepática. No

entanto, o colesterol e a fosfatidilcolina plasmática participam na manutenção de lipídios constantes no fígado, para gerar fluxo constante de lipídios dentro e fora dos hepatócitos, facilitando as funções hepáticas do organismo (MUNDAY; LÓPEZ, 2007).

Conclusão

A vinculação de técnicas de imagens macroscópicas e microscópicas permitiram descrever de forma específica a morfologia do desenvolvimento embrionário dos cães (*Canis familiares*). Permitem ainda descrever estruturas específicas no desenvolvimento do cão, tais como os arcos braquiais e as vesículas ópticas e óticas nos embriões, cordas tendíneas no coração, lobos hepáticos. Aplicando este conhecimento na presença e na variação dos fosfolipídios e ácidos graxos livres no feto, foi possível verificar a importância dos grupos de lipídios nos processos de contração miocárdica, na formação de surfactante pulmonar e no trânsito de metabólitos das células epiteliais.

Referências

- Abreu, D. K. et al. (2011) 'Estudo microscópico e macroscópico, com enfoque radiográfico e de alizarina, no desenvolvimento embrionário e fetal de gatos domésticos (*Felis catus*) em diferentes idades gestacionais', *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 31(SUPPL. 1), pp. 57–66. doi: 10.1590/S0100-736X2011001300010.
- Batenburg, J.J., Klazinga, W., and Van Golde, L. M. (1982) 'Regulation of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol synthesis in alveolar type II cells isolated from adult rat lung.', *FEBS letters*, 147(2), pp. 171–4.
- Bleasdale, J. E., Maberry, M. C. and Quirk, J. G. (1982) 'Myo-inositol homeostasis in foetal rabbit lung.', *The Biochemical journal*, 206(1), pp. 43–52. doi: 10.1042/bj2060043.
- Cagnoto, D. G. and Alberto, M. V. (2009) 'Morfologia e desenvolvimento ultraestrutural do sistema renal de embriões bovinos com idade gestacional entre 10 e 50 dias', pp. 2154–2161.
- Concannon, P., Tsutsui, T., Shille, V. (2001) 'Embryo development hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy', *J Reprod Fertil Suppl*, 57, pp. 169–179.
- Evans, HE., Christensen, G. C. (1993) Prenatal development. Miller's anatomy of the dog.

Evans, H. E. and Sack, W. O. (1973) 'Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References', *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 2(1), pp. 11–45. doi: 10.1111/j.1439-0264.1973.tb00253.x.

Francioli, A. L. R. (2007) 'Desenvolvimento embriológico e fetal em pacas (Agouti paca , Linnaeus 1766): estabelecimento de modelo experimental análogo murino para detecção de linhagens " Germ Cells " Desenvolvimento embriológico e fetal em pacas (Ag'.

Hallman, M. et al. (2002) 'Perinatal Development of Myoinositol Uptake into Lung Cells : Surfactant Phosphatidylglycerol and Phosphatidylinositol Synthesis in the Rabbit', 20(2), pp. 179–185.

Hyttel, P., Sinowatz, F. and Vejlsted, M. (2013) *Essential of Domestic Animal Embryology*, *Journal of Chemical Information and Modeling*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Johannes C. Schittny and Burri, P. H. (2007) 'Development and growth of the lung', *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders Volume 2*, pp. 91–115.

Kerstin L.T, Claire M.W, T. S. . (2005) 'Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the dog.', *Nature*, 436(803–819).

Lindblad-Toh, C.M Wade, T.S Mikkelsen, , E.K Karlsson, D.B Jaffe, M. Kamal, E. . L. (2005) 'Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog.', *Nature*, 436, pp. 803–819.

Martins, A. A. et al. (2016) 'Development of the cardiorespiratory system in dogs from days 16 to 46 of pregnancy', *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 51(5), pp. 804–812. doi: 10.1111/rda.12759.

Martins, D. S. et al. (2011) 'Early Development and Putative Primordial Germ Cells Characterization in Dogs', *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), pp. 62–66. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01631.x.

Moore, K.L, Persaud, V. (2007) 'Embriologia clinica', Elsevier, p. 536.

Morini, A. C. (2009) 'Desenvolvimento embrionário em búfalos (Bubalus bubalis Linnaeus , 1758)', *Medicina*, p. 179.

Munday, A. D. and López, J. A. (2007) 'Posttranslational protein palmitoylation: Promoting platelet purpose', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(7), pp. 1496–1499. doi: 10.1161/ATVBAHA.106.136226.

Pieri, N. et al. (2015) 'Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs and Cats.', *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 50(4), pp. 625–31. doi: 10.1111/rda.12539.

Pinal, N. et al. (2006) 'Regulated and polarized PtdIns(3,4,5)P₃ accumulation is essential for apical membrane morphogenesis in photoreceptor epithelial cells', *Current Biology*, 16(2), pp. 140–149. doi: 10.1016/j.cub.2005.11.068.

Pretzer, S. D. (2008) 'Canine embryonic and fetal development: A review', *Theriogenology*, 70(3), pp. 300–303. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.029.

Phemister R.D, P.A Holst, J.S Spano, M. . H. (1973) 'Time of ovulation in the beagle bitch', *Biol Reprod*, 84(4).

Schneider, M. R. et al. (2008) 'Canine embryo-derived stem cells and models for human diseases', *Human Molecular Genetics*, 17(R1), pp. 42–47. doi: 10.1093/hmg/ddn078.

Sher, R. B. et al. (2006) 'A rostrocaudal muscular dystrophy caused by a defect in choline kinase beta, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), pp. 4938–4948. doi: 10.1074/jbc.M512578200.

Sorribas, C. . (2006) *Atlas de Reprodução canina*.

Wu, G. et al. (2009) 'Understanding the muscular dystrophy caused by deletion of choline kinase beta in mice', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier B.V., 1791(5), pp. 347–356. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.02.006.

3. O uso de tecnologias aplicadas na descrição do desenvolvimento ósseo e mineralização em cães (*Canis familiaris*)

León, M.; Rodrigues, A.C.B.; Turquetti, A.O.M.; Francioli, A. L. R.; Melo, L.F.; Pinto, A.C.B.; Miglino, M.A.¹

Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Resumo

O sistema ósseo é formado a partir de células do mesoderma da crista neural, e sua principal função é auxiliar nos movimentos do corpo e sustentar o organismo. Sabe-se que doenças como querubismo, raquitismo e osteomalácia estão ligadas ao defeitos do desenvolvimento e da mineralização do tecido ósseo. Os cães, podem ser utilizados como modelos animais para diagnóstico em casos de malformações fetais e defeitos de osteogênese. A proposta deste trabalho é descrever o desenvolvimento ósseo e a mineralização em cães domésticos (*Canis familiaris*). Foram estudados dois grupos de diferentes idades gestacionais: o grupo inicial (22-28 dias de gestação) e o grupo complementar (35-36 dias de gestação). O primeiro foi submetido à análise por microscopia de luz, em que os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômico de Masson e Ferro Coloidal. O grupo complementar (35-55 gestação) foi submetido à técnica de Alizarina, seguida das técnicas de Radiologia e Tomografia Computadorizada (TC). Adicionalmente, foram coletados ossos (fêmur) do grupo complementar, que foram submetidos à análises morfológicas e morfométricas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados ilustraram a presença de tecido mesenquimal. Os somitos foram considerados como estruturas primárias na formação da coluna vertebral aos 22 e 25 dias de gestação, aos 28 dias observou-se diferenciação nos processos espinhosos das vértebras, nos ossos dos membros, na cabeça e nas costelas; as últimas formadas de cartilagem hialina. Também foram identificados fêmures com ossificação incompleta, mostrando fibras de cartilagem aos 35 dias. Ao analisar os animais de 35 dias, eles apresentaram menor diâmetro ósseo quando comparados aos de 44 dias. A presença de placas de ossificação foi visualizada e a calcificação foi determinada pelas imagens radiopacas da radiografia, demonstrando a estrutura óssea (mandíbula e vértebras) aos 44 dias. Foram observados detalhes anatômicos como: processos espinhais das vértebras lombares e calota craniana com a fontanela aberta, caracterizados pela Técnica do Vermelho de Alizarina, Tomografia Computadorizada e Radiografias. Contudo, observou-se que processo de formação óssea, começa aos 22 dias com a diferenciação do somito, encontrando-se o esqueleto maioritariamente formado aos 28 dias de gestação; quanto à mineralização óssea e calcificação, ambas ocorrem apenas entre 35 e 44 dias de gestação.

Palavras chaves: Ossificação, Osso, Cão, Desenvolvimento, Mineralização

Introdução

Para muitas doenças que acometem os seres humanos, os cães domésticos são um dos principais modelos experimentais estudados (BATENBURG *et al.*, 1982), como é o caso de pesquisas em Osteossarcoma (GUNN *et al.*, 2017) e Metaplasia Óssea (SAAD *et al.*, 2017). São modelos também utilizados para testar protocolos de transplante de medula óssea (Lindbland-Toh *et al.*, 2005; Kerstin *et al.*, 2005), bem como em ensaios das terapias celular e gênica (Schneider *et al.*, 2008).

No cão, o desenvolvimento pré-natal é dividido em três períodos: ovo, embrião e feto (PIERI *et al.*, 2015). No período de ovo ocorre à multiplicação celular e a implantação uterina, o período embrionário é aquele no qual se estabelecem os principais órgãos, enquanto que o período fetal é compreendido principalmente pelo crescimento e refinamento dos órgãos (KNOSPE, 2002; HYTTEL *et al.*, 2013).

O sistema ósseo é formado a partir das células derivadas do mesoderma da crista neural. O broto dos membros é formado a partir do mesoderma somático e a proliferação da placa mesodérmica lateral, da origem à formação dos modelos dos futuros ossos (HYTTEL *et al.*, 2013). A calcificação ocorre em um centro de ossificação primária por depósitos de fósforo e cálcio no interior dos condrócitos, os quais se degeneram e produzem um infiltrado no interstício das células adjacentes. Disso, resulta a posterior formação de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (Gutierrez Trujillo *et al.*, 2012), processo regulado pela via de sinalização da proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4), responsável pelo desenvolvimento de ossos e cartilagens, especificamente dos dentes e membros, e está presente também no reparo de fraturas (SATO *et al.*, 2017).

Os ossos constituem aproximadamente 20% do peso corporal em humanos (CASTRO, 2008). Os cães apresentam entre 319 e 321 ossos enlaçados estrategicamente em uma armação denominada esqueleto ósseo que dá suporte ao corpo (DYCE *et al.*, 2004). Funcionalmente, estão associados ao suporte de tecidos moles como principal função, enquanto vinculam-se com a coordenação dos movimentos voluntários, além de possuir uma função protetora outorgada pela conformação da caixa craniana, da caixa torácica e da proteção do tecido mieloide (DYCE *et al.*, 2004; CASTRO, 2008)

A avaliação da idade esquelética é essencial para o estudo da antropologia (BOUZOUGGAR, *et al.*, 2018), da medicina forense (NEMSI *et al.*, 2018) e da pediatria (LERCH *et al.*, 2018). Além disso é importante para a descrição de doenças associadas aos defeitos do desenvolvimento dos ossos tais como: querubismo (erro no desenvolvimento dos maxilares) (MASSIGNAN, 2001), raquitismo e osteomalácia (defeitos da mineralização óssea) (MECHICA, 1999), entre outras. Em humanos 3,52% dos casos de malformações fetais são diagnosticadas como anomalias dos membros, dentro dos quais se encontram a osteogênese imperfeita (SHI *et al.*, 2018).

É de suma importância um estudo aprimorado com técnicas capazes de avaliar o desenvolvimento do sistema ósseo dos cães, como base para o futuro conhecimento das alterações que ocorrem no período embrionário, e que podem refletir em doenças associadas a este sistema. Por este motivo, o objetivo deste trabalho é descrever o desenvolvimento e mineralização óssea em cães domésticos (*Canis familiaris*), mediante um conjunto de tecnologias aplicadas na descrição morfológica macroscópica e microscópica da fase embrionária e fetal.

Materiais e Métodos

Aspectos Éticos

O projeto foi vinculado ao Comitê de Ética em Uso Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ da USP) sob o número 7449040518. As amostras foram obtidas de campanhas de castração no cidade de Embu das Artes do Estado de São Paulo. O material, quando coletado, foi transportado para o Laboratório de Anatomia da Anatomia do Departamento de Cirurgia da Universidade de São Paulo (USP). A Figura 1 ilustra um diagrama explicativo do procedimento experimental.

Figura 1: Design experimental. A imagem mostra cada estágio do processo de realização do trabalho, com cada tecnologia utilizada. Fonte: Leon, 2018.

Seleção de amostras

Foram coletadas 24 amostras (12 embriões e 12 fetos), divididas em dois grupos de diferentes idades gestacionais: gestação inicial (22-28 dias de gestação) e gestação final (35-55 gestação) como complemento. A idade gestacional foi determinada de acordo com a técnica Crown-Rump (CR) descrita por Evans e Sack (1973).

Descrição Microscópica

Os animais do grupo inicial foram fixados em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, posteriormente desidratados em concentrações crescentes de álcool (70% a 100%), diafanizados em xilol e embebidos em parafina. Os blocos obtidos foram seccionados a 5µm em micrótomo automático (Leica, RM2165). Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas e corados com Hematoxilina e Eosina (HE), Tricômio de Masson e Ferro Coloidal para caracterizar a estrutura do tecido ósseo. Em seguida, as lâminas foram fotografadas em microscópio de luz (ML) (Nikon Eclipse E- 80i) no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem - CADI- FMVZ-USP.

No grupo final, foram avaliados na microscopia eletrônica de varredura (MEV) cortes transversais do fêmur de animais de 35 e 44 dias de gestação. Tais cortes foram lavados com PBS 1% em três banhos durante 5 minutos, e 3 banhos com água destilada no ultrassom por 3 minutos, em seguida foram desidratadas em séries crescentes de álcoois em concentrações de 50%, 70%, 90% e 100%, que posteriormente foram secas em aparelho de ponto crítico LEICA EM CPD300 (FMVZ-USP) e colados com cola de carbono em bases metálicas de alumínio e metalizados com prata no aparelho metalizador EMITECH K550 (FMVZ-USP). Em seguida foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 435VP (FMVZ-USP) (Figura 1).

Descrição Macroscópica

Técnicas de descrição anatômica como o Alizarin Red e técnicas computadorizadas de imagem digital, como radiografias e tomografias computadorizadas, foram realizadas em animais do grupo final (Figura 1). Fetos de 35, 44 e 55 dias de gestação foram submetidos à técnica de radiologia, onde foram radiografados em perfil (L-L) à esquerda do corpo para demonstrar o processo de mineralização óssea. Utilizou-se a alta frequência do dispositivo CADI-USP SynapseDicomSCP, com corrente de tubo de raios-x 421 mA, 43 kVp e linhas 1307. A visibilidade dos ossos nas radiografias foi analisada considerando a formação óssea (Tabela 1).

Tabela 1: Listagem de ossos analisados.

Esqueleto Axial		Esqueleto apendicular		Detalhes anatômicos
Ossos da Cabeça	Ossos do corpo	Membro Toracico	Membros pélvicos	Fontanela Osso peniano Processos espinais das vértebras
O. Frontal O. Parietal O. Occipital O. Nasal O. Mandibular	Costelas Esterno Vértebras	Escápula Úmero Rádio-ulna Falanges	Fêmur, Tíbia-fíbula, Coxins	

Fonte: Leon, 2018.

Tais fetos foram submetidos a técnica de Alizarina Red para avaliar as estruturas ósseas e cartilagíneas (Tabela 2). Para tanto, estes foram previamente fixados em solução de formaldeído a 10%, posteriormente, a pele e tecido adiposo foram removidos. Os fetos foram corados em solução de 10mg de corante Alcian Blue, 80 ml de álcool etílico 95% e 20 ml de ácido acético glacial, permanecendo refrigerados por 48 horas. Após esse procedimento, os fetos foram transferidos para solução de álcool etílico 95% e em seguida foram submetidos a uma reidratação em soluções de álcool 90% a 15% sucessivamente, finalizando com água

destilada. O material foi submerso a uma solução de borato de sódio saturada e água destilada (30 ml e 70 ml respectivamente) durante 72 horas e transferido para uma solução de 5g de hidróxido de potássio, 100 ml de água destilada e 5mg de Alizarina Red por 5 horas. Passado o tempo, foram transferidos para soluções de glicerina e água destilada em proporções: 1:3, 1:1, 3:1 e glicerina pura.

No caso específico do feto de 55 dias de gestação, foi analisado por TC transversa de todo o corpo com uma fatia de Espessura 2mm com 90 kVp e 58mA no Philips scan MX 800IDI16-CADI-USP, reconstruções 3D foram realizadas com volume do esqueleto fetal.

Análise estatística

Para determinar as diferenças significativas entre as medidas das áreas de calcificação entre os dois grupos etários (35 e 44 dias de gestação), foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para determinar a normalidade dos dados. A distribuição das médias foi declarada normal, pelo qual foi realizado uma Anova fatorial com 95% de confiança, seguido de um teste de Tukey.

Resultados

A microscopia de luz permitiu identificar somitos nos embriões com idades compreendidas entre 22 e 25 dias de gestação. Os somitos constituem a base para a formação da coluna vertebral, sendo compostos por tecido mesenquimal e caracterizados por serem estruturas epiteliais transitórias. Nos embriões, aos 28 dias de gestação, identificou-se (mediante as colorações de Trinômio de Masson e Ferro Coloidal) cartilagem do tipo hialina nos ossos (Figura 1). Também foi possível identificar os processos espinhosos das vértebras, os ossos longos dos membros, os ossos da cabeça e as costelas. No período embrionário, com idades compreendidas entre os 22 e 28 dias de gestação, a microscopia de luz não ilustrou a presença de calcificação e/ou mineralização óssea.

Figura 1: Fotomicrografia de luz de ossos de embriões. Em (A) embriões de 22 dias de gestação; (B, B1, B2) embriões de 25 dias de gestação; (C-C7) embriões com 28 dias de gestação; (A, B-B2, C-C3) Hematoxilina e Eosina; (C4-5) Tricrômio de Masson; (B2, C6-7) Ferro Coloidal; (B, C, C4) Microscopia da cabeça (A, B1-2, C1-2, C5-7) Microscopia do dorso ilustrando as vértebras (C3) Microscopia do membro pélvico; 1. Vértebras; 2. Nervo; 3. Osso maxilar; 4. Osso Mandibular; 5. Língua; 6. Úmero; 7. Osso do membro pélvico. Fonte: Leon, 2018.

A MEV permitiu observar a mineralização dos fêmures dos fetos (Figura 2). Aos 35 dias de gestação a amplitude óssea do fêmur correspondia à metade do diâmetro quando comparado com os fêmures de 44 dias. Observou-se que o processo de ossificação aos 35 dias encontrava-se incompleto, composto por fibras de cartilagem hialina com microfilamentos de cartilagem, dando uma conformação esponjosa ao osso. Já aos 44 dias de gestação o osso apresentava placas de ossificação, compostas por tecido compacto com pouca infiltração de fibras hialinas.

Figura 2: Eletromicrografia de varredura de cortes transversais de fêmur de fetos de cães. Em (A) Feto de 44 dias de gestação; (B) feto 35 dias de gestação; (A, B) corte transversal do fêmur (A1, B1) Aumento da região de calcificação; (A2, B2) Aumento das fotos A1 e B1 respectivamente. 1. Região óssea; 2. Área de medula; 3; Área calcificada; 4. Fibras de cartilagem hialina Fonte: Leon, 2018.

Diferenças significativas para um $PV < 0.05$ nas medidas das regiões de calcificação do grupo de 35 e 44 dias de gestação foram observadas. O valor médio máximo para os 35 dias de gestação foi de 277.458 μm , enquanto que o valor para os 44 dias foi 684.398 μm , percebendo um aumento no diâmetro de calcificação óssea aos 44 dias de gestação. À análise intragrupos foi identificada semelhança estatística entre os 4 animais do grupo início. No grupo complementar, existiam semelhanças entre os animais 5-6 e 7-8, em contrapartida, observamos diferenças significativas entre os dois grupos estudados.

Tabela 1: Análise estatística para valores de medida de ossificação do Rádio (Anova fatorial, 95% de confiança).

ANOVA fatorial					
Fonte	Somatória de Quadrados	GL	Quadrado	Coincidência	P-Valor
Entregupo	993117	7	141874	21.35	0.0000
Intragrupos	372042	56	6643.61		
Total Cor.	136516E6	63			
Resumo Estatístico					
Código	Frequência	Média	Contraste	Máximo	Rango
A1-35 dias	8	127.043	A	191.05	121.408
A2-35 dias	8	158.503	A	277.458	161.165
A3-35 dias	8	166.722	A	244.131	121.364
A4-35 dias	8	161.079	A	235.85	128.495
A5-44 dias	8	362.443	B	489.443	186.18
A6-44 dias	8	317.654	BC	385.175	123.976
A7-44 dias	8	464.517	CD	650.481	296.79
A8-44 dias	8	411.772	D	684.398	467.423

Fonte: Leon, 2018.

Mediante a técnica de Alizarina Red (Figura 3) foi possível identificar os pontos formação de cartilagem (coloração azulada) e o processo de ossificação (roxo-avermelhada). Os detalhes das áreas anatômicas aparecem na Figura 4. Na cabeça, os ossos frontal, parietal, occipital e mandibular foram identificados marcados por uma coloração roxa para as três idades. Outros ossos como escápula, úmero, rádio e costelas apresentavam variação na coloração (Figura 4). Por exemplo: no esterno e nas vértebras de fetos de 55 dias de gestação, notou-se alguns leves pontos de ossificação (roxo-avermelhada), não ocorrendo assim entre os 35 e 44 dias onde observou-se pontos de cartilagem (coloração azulada).

Esta técnica também permitiu diferenciar que nos ossos longos dos membros pélvicos e torácicos, o processo de ossificação ocorre das diáfises para as epífises, já nas falanges de fetos de 35 dias, os pontos de ossificação encontravam-se na região de diáfise e os pontos de cartilagem nas regiões epifisárias. Aos 55 dias de gestação, as falanges encontravam-se totalmente ossificadas. Uma particularidade encontrada foi que o osso peniano de 55 dias de gestação, encontrava-se composto por cartilagem, ressaltando que seu processo de ossificação ocorre após o nascimento.

Figura 4: Fotografia macroscópica com Técnica de alizarina mostrando detalhes anatômicos de fetos com idades compreendidas de 35 e 55 dias de gestação. (A.1-E.1) feto de 35 dias; (A.2-E.2) feto de 44 dias; (A.3-E.3) Feto de 55 dias; (A) Foto lateral da cabeça (B) Foto lateral do tórax; (C) Foto ventral do tórax; (D) Foto lateral do membro torácico; (E) Foto ventral do membro pélvico 1. Osso Nasal; 2. Osso mandibular; 3. Osso frontal; 4. Osso incisivo; Osso parietal; 6. Esterno; 7. Vértexes Lombares; 8 e 10. Apófises transversas e espinhosas das vértebras; 9. Costelas; 11. Úmero; 12. Rádio-Ulna; 13. Escápula; 14. Fêmur; 15. Tíbia-fíbula; 16. Osso peniano; 17. Coxal; 18. Vértexes coccígeas. Fonte: Leon, 2018.

Ao realizar o exame radiográfico, foi possível observar claras diferenças em relação à mineralização e ossificação em diferentes idades gestacionais (Tabela 3). Nos fetos de 35 dias de gestação, não foi possível observar imagem radiográfica opaca para osso. Já em relação aos fetos de 44 dias, eles tinham imagens radiopacas, permitindo a visualização radiográfica das

estruturas ósseas mineralizadas, porém com alguns ossos incompletos (osso nasal, osso mandibular e vértebras cervicais e lombares).

Nas imagens radiográficas e tomográficas de fetos de 55 dias, foi identificada toda a estrutura óssea dos fetos, demonstrando os ossos frontal, parietal, occipital, ossos que compõem o membro torácico (escápula, úmero, ulna do rádio), ossos do membro pélvico (fêmur, tíbia - fíbula, cóccix), além das costelas, permitindo a identificação de detalhes anatômicos, como os processos espinhais das vértebras lombares e a calota craniana com a fontanela aberta. A TC também facilitou a reconstrução de estruturas calcificadas em uma conformação do esqueleto tridimensional fetal (3D), enfatizando a conformação integral do feto e o desenvolvimento do mesmo aos 55 dias de gestação (Figura 5).

Tabela 3: Comparação da identificação óssea entre as idades gestacionais utilizando Raios-X e TC, com valores de intensidade do raio.

Bone	Raio-X			TC
	35 dias	44 dias	55 dias	55 dias
O. Frontal	*	18743	18833	616
O. Parietal	*	17365	17589	560
O. Incisivo	*	17978	17467	473
O. Occipital	*	17810	17423	416
O. Nasal	*	17110	19677	243
O. Mandibular	*	17773	17774	240
Costelas	*	17632	16141	318
Esterno	*	*	*	129
Vértebra cervical	18480	17584	17452	621
Vértebra torácica	17754	17269	16869	390
Vértebra Abdominal	*	18350	17620	385
Escápula	*	17858	17262	468
Úmero	*	18115	17813	550
Rádio-ulna	*	21139	20584	393
Falanges	*	*	*	*
Fêmur,	*	18149	18141	392
Tíbia-fíbula	*	18149	32653	353
Coxal	*	20513	17379	392
Osso peniano	*	*	*	*

Fonte: Leon, 2018

* (não é observado)

Figura 5: Imagens computadorizadas de radiografias e tomografias computadorizadas de fetos de cães. (C-H) raios-X; (C-H) tomografia computadorizada, (A-D) feto de 55 dias; (E, F) Feto 44 dias; (G, H) Feto 35 dias. (B, D, F, H) Vista lateral; (A, C, E, G) vista ventral. CB. Cabeça; TX. Tórax; AB. Abdômen; MP. Membros pélvicos; MT Membros torácicos; CV. Coluna vertebral; 1. osso nasal; 2. osso frontal; 3. osso parietal; 4. osso occipital; 5. osso mandibular; Vértébras cervicais; Vértébras torácicas; 8. vértebras lombares; 9. úmero; 10. Ulna-Rádio; 11. Fêmur; 12. Costelas. Fonte: Leon, 2018.

Discussão

Segundo Gutierrez Trujillo *et al.* (2012) o sistema esquelético origina-se de células do mesoderma da crista neural, do tecido conjuntivo mesenquimal (observado nos resultados em idades compreendidas entre 22 e 25 dias de gestação) e cartilaginoso (do tipo hialina observada nos resultados aos 28 dias de gestação). Nos humanos, a formação do tecido mesenquimal ocorre durante a formação de somitos que encontram-se inteiramente relacionados com a estruturação da futura coluna vertebral (O'RAHILLY e MALER, 1986). Processo ilustrado na histologia de embriões de cães compreendidos entre os 22 e 28 dias de gestação.

Os primeiros brotos dos membros torácicos e pélvicos são moldes de cartilagem do tipo hialina formados pela diferenciação de fibroblastos, os quais futuramente irão calcificar (Gutierrez Trujillo *et al.*, 2012), situação semelhante aos achados na coloração de Tricômio de Masson e Ferro Coloidal dos resultados nos embriões de 28 dias de gestação. Retzer (2008), descreve que a formação óssea começa aos 28 dias com a diferenciação e ossificação da mandíbula, maxila e osso frontal, e que o esqueleto de cães é visto como uma estrutura hiperecoica aproximadamente aos 34 dias de gestação. Tal achado diverge dos encontrados na literatura, pois a Microscopia de Luz permitiu identificar a presença da mandíbula, maxila e osso frontal com existência do esqueleto de forma cartilaginosa aos 28 dias de gestação sem ossificação. No entanto, mediante a técnica de Alizarina se obteve uma descrição completa do esqueleto aos 35 dias de gestação.

A técnica de Alizarina foi descrita por Webb e Byrd (1994) e é amplamente utilizada na descrição do desenvolvimento ósseo, ajudando na caracterização da mineralização, pois é uma técnica de dupla coloração onde a Alizarina Red marca o osso enquanto que o Alcian Blue, marca cartilagem (YOUNG *et al.*, 2000). Esta técnica de dupla coloração foi utilizada por autores como Lee e Leichter (1983) na identificação de centros de ossificação nos membros Torácicos e Pélvicos em fetos de ratas suplementadas com etanol, e por Monsefi *et al.* (2012) na descrição da calcinogêneses em ratos suplementados por romã. Gutierrez Trujillo *et al.* (2012) demonstraram a deposição de cálcio e potássio em fetos bovinos, na qual inicia-se pelas diáfises e estendem-se até as epífises nos ossos longos, situação estabelecida de igual forma nos cães estudados por Alizarina, agregando que estudos em embriões e fetos humanos (BAREGGI *et al.*, 1993) já mostravam a importância da técnica na descrição morfológica de detecção fácil e precisa de toda a coluna vertebral, descrevendo centros de ossificação nos corpos vertebrais e arcos neurais.

Sobre a calcificação, Gutierrez Trujillo *et al.* (2012) descreveram que a mesma ocorre no centro de ossificação primária por depósitos de fósforo e cálcio no interior dos condrócitos na matriz óssea, os quais se degeneram e produzem o infiltrado nos interstícios das células adjacentes. Disso resulta a posterior formação de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (ENMI *et al.*, 2017). Conforme Roa (2014), os primeiros ossos a completar a calcificação em todas as espécies são a clavícula e a mandíbula.

Nos cães estudados, foi demonstrado que a ossificação ocorre aos 44 dias de gestação, baseado em estudos como Enmi *et al.* (2017) utilizaram tecnologias como micro-tomografia computadorizada (micro-CT) e MEV para descrever o desenvolvimento do osso mandibular de rato identificando aumento da área óssea (similar ao diâmetro de calcificação dos fêmures de cães na MEV) com aumento da radiopacidade do osso paralelamente ao desenvolvimento ósseo mandibular (processo identificado nos esqueletos dos cães nas radiografias). Sobre o qual Roa (2014) descreveu que o crescimento dos ossos ocorre longitudinalmente, e que a ossificação dos mesmos nos mamíferos produz o crescimento do diâmetro e espessamentos dos mesmos, semelhante aos nossos resultados.

As Radiografias proporcionaram imagens radiopacas de tecido ósseo calcificado, isso encontra-se descrito desde 1895 por Wilhelm Konrad Roentgen, quem descobriu o uso médico dos Raios-X, apresentando imagens de ossos da mão humana (STERNBACH E VARON, 1993). Essa tecnologia tem sido utilizada na identificação da calcificação óssea (CARVALHO *et al.*, 2015) para padronizar a idade gestacional mediante a avaliação dos membros torácicos de golfinhos, assim como na determinação da idade cronológica de crianças humanas por Knapik *et al.* (2018). As radiografias nos últimos anos foram essenciais na determinação de idade gestacional dos mamíferos mediante a avaliação radiológica da maturidade esquelética, assim como as alterações morfológicas nos ossos da mão e vértebras cervicais (FRANK *et al.*, 2018). Nos cães, pouco é conhecido quanto ao desenvolvimento do esqueleto por radiografias, alguns estudos como os de Modina *et al.* (2017) descrevem o desenvolvimento ósseo pós-natal de cães de pequeno e médio porte. Os autores obtiveram como resultados, que ossificações de determinadas áreas ocorrem após o nascimento, como por exemplo o púbis, que se encontra ossificado logo após o nascimento em raças de pequeno porte, enquanto que em raças de médio e grande porte, a ossificação ocorre na terceira semana de vida.

A junção das técnicas de Alizarina e Radiografia, facilitam a descrição do processo de calcificação óssea, ambas técnicas foram utilizadas por Abreu *et al.* (2011) para descrever a

ossificação e desenvolvimento ósseo em gatos, e identificaram que aos 33 dias de gestação, observa-se: ossificação nasal, incisiva, palatina, zigomática, parietal, costelas e vários ossos longos (úmero, rádio, ulna, fêmur, tíbia e fíbula); identificaram também, diáfise calcificada em ossos longos (rádio, ulna, tíbia e fíbula), costelas e falanges distais, e diferenciação dos ossos da cabeça. Esta descrição específica do esqueleto foi visualizada tanto na radiografia como no TC aos 55 dias de gestação. Ressaltamos, que não existem estudos na descrição óssea pré-natal utilizando tomografias magnéticas. No entanto, alguns autores como Thompson *et al.* (2018), descreveram a densidade mineral do tecido ósseo no crânio por micro-TC magnéticas de camundongos durante o desenvolvimento embrionário, identificando variações no entorno da carga, origem embrionária e o modo de ossificação. Nas últimas décadas, micro-TC tem sido amplamente utilizadas na geração de imagens 3D de alta resolução de animais pequenos especialmente para tecidos esqueléticos mineralizados (SILVENT *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018).

Conclusões

Concluimos que o processo de constituição óssea inicia-se aos 22 dias de idade gestacional pela diferenciação de somitos e, que à formação do esqueleto aos 28 dias de gestação, ocorre pela presença de tecido cartilaginoso. A mineralização e calcificação óssea, ambas ocorrem entre os 35 e 44 dias de gestação, através dos ossos mandibulares, coluna vertebral e costelas, e em contrapartida, os ossos penianos e carpos ossificam-se após o nascimento.

Referências

- ABREU, D. K.; RODRIGUES, E. A. F.; MONTEIRO, J. M.; FRANCIOLLI, A. L.; COSTOLA-SOUZA, C.; ROBALLO, K. C. S.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Estudo microscópico e macroscópico, com enfoque radiográfico e de alizarina, no desenvolvimento embrionário e fetal de gatos domésticos (*Felis catus*) em diferentes idades gestacionais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. SUPPL. 1, p. 57–66, 2011.
- BAREGGI, R.; GRILL, V.; SANDRUCCI, M.; BALDINI, G.; DE POL, A.; FORABOSCO, A.; NARDUCCI, P. Developmental pathways of vertebral centra and neural arches in human embryos and fetuses. *Anat Embryol (Berl.)*, v. 187 (2), p. 139–44, 1993.

BATENBURG, J.J., KLAZINGA, W., AND VAN GOLDE, L. M. Regulation of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol synthesis in alveolar type II cells isolated from adult rat lung. FEBS letters, v. 147, n. 2, p. 171–4, 1982.

BOUZOUGGAR, A HUMPHREY, L.; BARTON, N.; PARFITT, S.; CLARK BALZAN, L SCHWENNINGER, J.; EL HAJRAOUI, MA NESPOULET, R.; BELLO, S. 90,000 year-old specialised bone technology in the Aterian Middle Stone Age of North Africa. PLoS One., v. 13 (10), 2018.

CARVALHO, A.; DE LIMA, M.; YWASAKI, J. Ossification Pattern of Estuarine Dolphin (*Sotalia guianensis*) Forelimbs , from the Coast of the State of Espírito Santo , Brazil. p. 1–10, 2015.

CASTRO, B. K. De. Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo : revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças ósseas metabólicas. 2008.

DYCE, KEITH M.; WENSING, CORNELIUS JG; SACK, W. O. Tratado de anatomia veterinaria. [s.l: s.n.]

ENMI, A. H.; KATA, H. O.; IKAMI, Y. M.; ASANO, Y. S. Calcification in rat developing mandibular bone demonstrated by whole mount staining , micro-computed tomography and scanning electron micro - scopy with energy dispersive X-ray spectroscopy. v. 38, n. 5, p. 277–284, 2017.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. Anatomia, Histologia, Embryologia, v. 2, n. 1, p. 11–45, 1973.

FRANK, D.; RILL, L.; KOLAROVSZKI, B.; NAGY, Á. Classical and modern methods for the assessment of skeletal maturation and pubertal growth spurt. Orv Hetil., v. 159 (35), p. 1423–1432, 2018.

GUNN, H. J.; DAY, M. J.; TAYEBI, M.; RYAN, S. D. ScienceDirect Immunohistochemical Validation of Spontaneously Arising Canine Osteosarcoma as a Model for. Journal of Comparative Pathology, v. 157, n. 4, p. 256–265, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.07.005>>.

GUTIERREZ TRUJILLO, H. A.; VILIA ALBERTO, M. L.; DE LIMA WILL, S. E. A.; BAPTISTA SALVADORI, M. L.; KFOURY, J. R.; AMBROSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Desenvolvimento embriológico ósseo e cartilágneo em bovinos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*, v. 34, n. 4, p. 361–367, 2012.

HYTTEL, P., SINOWATS, F. AND VEJLSTED, M. Essential of Domestic Animal Embryologi, *Jornual of Chemical information and Modeling*. [s.l: s.n.]

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. Essential of Domestic Animal Embryology. [s.l: s.n.]v. 53

KIM, H.; PARK, K.; TAK, H.; WOOK, J.; KANG, S.; PARK, W. Three-dimensional growth pattern of the rat mandible revealed by periodic live micro-computed tomography. *Archives of Oral Biology*, v. 87, n. October 2017, p. 94–101, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.12.012>>.

KNAPIK, D. M.; SANDERS, J. O.; GILMORE, A.; WEBER, D. R.; COOPERMAN, D. R.; LIU, R. W. CHILDREN ' S ORTHOPAEDICS A quantitative method for the radiological assessment of skeletal maturity using the distal femur. *Bone Joint J.*, p. 1106–1111, 2018.

KNOSPE, C. Periods and stages of the prenatal development of the domestic cat. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, v. 31, n. 1, p. 37–51, 2002.

LEE, M.; LEICHTER, J. Skeletal development in fetuses of rats consuming alcohol during gestation. *Growth*, v. 47 (3), p. 254–62, 1983.

LERCH, C.; SHROFF, R.; WAN, M.; REES, L.; AITKENHEAD, H.; BULUT, K.; THURN, D.; KARABAY BAYAZIT, A.; NIEMIRSKA, A.; CANPOLAT, N.; DUZOVA, A.; AZUKAITIS, K.; YILMAZ, E.; YALCINKAYA, F.; HARAMBAT, J.; KIYAK, A.; ALPAY, H.; HABBIG, S.; ZALOSZYC, A. Effects of nutritional vitamin D supplementation on markers of bone and mineral metabolism in children with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.*, 2018.

MECHICA, B. Raquitismo e Osteomalacia. v. 25, 1999.

MODINA, S. C.; VERONESI, M. C.; MOIOLI, M.; MELONI, T.; LODI, G.; BRONZO, V.; GIANCAMILLO, M. Di. Small-sized newborn dogs skeletal development: radiologic ,

morphometric , and histological findings obtained from spontaneously dead animals. p. 1–10, 2017.

MONSEFI, M.; PARVIN, F.; TALAEI-KHOZANI, T. Effects of pomegranate extracts on cartilage , bone and mesenchymal cells of mouse fetuses. p. 683–690, 2012.

NEMSI, H.; BEN DAYA, M.; SALEM, N.; MASMOUDI, F.; BOUANÈNE, I.; MAATOUK, F.; AISSAOUI, A.; CHADLY, A. Applicability of Willems methods and Demirjian's four teeth method for dental age estimation: Cross sectional study on Tunisian sub-adults. *Forensic Sci Int.*, v. 291, p. 281, 2018.

O'RAHILLY, R.; MALER., F. Somitic-Vertebral Correlation and Vertebral Levels in the Human Embryo. v. 19, p. 3–19, 1986.

PIERI, N.; SOUZA, a F.; CASALS, J. B.; ROBALLO, K.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S. Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs and Cats. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, v. 50, n. 4, p. 625–31, 2015.

PRETZER, S. D. Canine embryonic and fetal development: A review. *Theriogenology*, v. 70, n. 3, p. 300–303, 2008.

ROA, I.; SMOK, C.; ROJAS, M. Desarrollo Fetal Mamíferos. n. April, 2014.

SAAD, E. S.; MILLEY, K. M.; NIMMO, J. S.; BACCI, B. ScienceDirect Canine Mixed Mammary Tumour as a Model for Human Breast Cancer with Osseous Metaplasia. *Journal of Comparative Pathology*, v. 156, n. 4, p. 352–365, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.03.005>>.

SATO, A.; OCHI, H.; HARADA, Y.; YOGO, T.; KANNO, N.; HARA, Y. Domestic Animal Endocrinology Bone morphogenetic protein 4 and bone morphogenetic protein receptor expression in the pituitary gland of adult dogs in healthy condition and with ACTH-secreting pituitary adenoma. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 58, p. 126–133, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.09.004>>.

SHI, Y.; ZHANG, B.; KONG, F.; LI, X. Prenatal limb defects: Epidemiologic characteristics and an epidemiologic analysis of risk factors. *Medicine*, v. 28, p. 1–8, 2018.

SILVENT, J.; AKIVA, A.; BRUMFELD, V.; REZNIKOV, N.; REHAV, K.; YANIV, K.; ADDADI, L.; WEINER, S. Zebrafish skeleton development : High resolution micro-CT and FIB-SEM block surface serial imaging for phenotype identification. p. 1–19, 2017.

STERNBACH, G.; VARON, J. ELM KONRAD ROENTGEN : A NEW KIND OF RAYS. v. 11, p. 743–745, 1993.

THOMPSON, K. D.; WEISS-BILKA, H. E.; MCGOUGH, E. B.; MATTHEW, J.; DAME, N.; DAME, N.; DAME, N. Bone Up: Craniomandibular Development and Hard-Tissue Biomineralization in Neonate Mice. HHS Public Access, p. 51–60, 2018.

WEBB, GN. BYRD, R. Simultaneous differential staining of cartilage and bone in rodent fetuses: an Alcian Blue and Alizarin Red S procedure without glacial acetic acid. Biotechnol Histochem, v. 69, p. 181–185, 1994.

YOUNG, A. D.; PHIPPS, D. E.; ASTROFF, A. B. Large-Scale Double-Staining of Rat Fetal Skeletons Using Alizarin Red S and Alcian Blue. v. 276, n. June 1999, p. 273–276, 2000.

4. Lipídios: O papel no desenvolvimento embrionário e fetal.

León, M.; Rodrigues, A.C.B. ; Turqueti, A. ; Cereta, A.D ; Melo, L.F; Barreto, R. ; Miglino, MA.

Departamento de Cirurgia, Área de Anatomia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

Resumo:

Os lipídios são substâncias orgânicas insolúveis em água, divididas em várias classes, tais como Ácidos Graxos, Glicolipídios, Fosfolipídios, Ceramidas, Esfingolipídios e Estereolipídios. Participam dos processos de metabolismo celular e desenvolvimento embrionário; desempenham um papel importante na sinalização, proliferação, migração e maturação celular, atuam em processos de desenvolvimento, como calcificação e mineralização óssea, maturidade pulmonar, diferenciação e sobrevivência neuronal, na formação de polaridade de células epiteliais e na migração sinalizadora e celular na formação muscular. Além disso, vinculavam-se à proteção e vitalidade embrionária. Existe uma grande variabilidade na interação dos lipídios durante o desenvolvimento embrionário, podendo atuar diretamente como veículos de transporte ou indiretamente através de seus precursores enzimáticos e proteicos (como a colina quinase), na biotransformação de substâncias ou em sinergismo com outras moléculas. No entanto, o lipídio desempenha um papel específico na formação de estruturas, nas quais os fosfolipídios, como um grupo majoritário, participam mais regularmente no metabolismo embrionário e/ou fetal.

Palavras chaves: Formação óssea, Calcificação Óssea, Maturidade Pulmonar, Diferenciação Neuronal, Formação de Tecidos.

Introdução

As células de animais mamíferos contém mais de 1000 espécies diferentes de lipídios, que se distribuem nas membranas celulares e participam em processos de síntese, degradação, migração e comunicação celular (KAINU *et al.*, 2008).

Lipídios são substâncias orgânicas insolúveis em água, divididas em várias classes, sendo as mais estudadas: ácidos graxos, glicolipídios, fosfolipídios, esfingolipídios, estereolipídios (MATEOS *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2010). Os fosfolipídios são a classe com maior número de moléculas, subdivididos em quatro grupos: os que contém colina, como: fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina (SM), e os contendo aminofosfolipídios, tais como: fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) (Figura 1). Ambos estão distribuídos de

forma assimétrica na célula (SHER *et al.*, 2006).

Figura 1: Estrutura química e tridimensional dos principais fosfolípidios. Fonte: Leon, 2018.

Embora desempenhem um papel importante na embriogênese, cada classe de lipídio atua em diferentes processos durante o desenvolvimento embrionário, participando da gênese e prevenindo defeitos na formação do organismo (SUDANO *et al.*, 2016). Nos últimos anos, foram-lhes atribuídas funções importantes como mediadores de formação e transporte em membranas como vias de sinalização associadas para proliferação celular, migração e adesão de células e substâncias. Em alguns casos, eles podem auxiliar na estruturação de certos órgãos (PARK *et al.*, 2010).

Portanto, nosso objetivo será revisar o papel de diferentes classes de lipídios no desenvolvimento embrionário e fetal de mamíferos, destacando sua participação na formação de diferentes sistemas.

Participação de lipídios na letalidade embrionária

Os lipídios atuam no desenvolvimento embrionário de várias maneiras. Podem participar diretamente na captação de substâncias ou ativando enzimas e / ou proteínas chaves na sinalização celular ou indiretamente através de seus precursores proteicos e enzimáticos

(BIONDI, 2004).

Uma revisão anterior de (VANCE e VANCE, 2009) descreveu como a alteração das vias biosintéticas dos fosfolipídios (como a falta de colina quinase (CK) α , fosfocolina citidililtransferase (CTP) e fosfatidilserina descarboxilase) pode produzir letalidade embrionária em camundongos. Por exemplo, a colina quinase α (CK- α) é uma proteína biotransformadora essencial na síntese de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (lipídios essenciais da membrana celular) (AOYAMA et al., 2004); portanto, a falta de CK- α produz instabilidade de membrana e desequilíbrio da barreira lipídica dos blastocistos, produzindo letalidade embrionária precoce (WU et al., 2008, 2010).

Adicionando que, a ausência de fosfocolina citidililtransferase (catalisador que fornece a velocidade de biossíntese de fosfocolina e fosfatidiletanina) em embriões de camundongos, inibe a transformação do zigoto em blastocisto que impede a implantação de embriões e provoca letalidade precoce, enquanto que em fetos e adultos apenas reduz a atividade enzimática dos tecidos em 50% (WANG et al., 2005). Por outro lado, a fosfatidilserina descarboxilase é essencial para a síntese da fosfatidiletanolamina (PE) nas mitocôndrias (KOJIMA et al., 2016). Um estudo realizado por (STEENBERGEN et al., 2005) demonstrou a alteração deste processo em camundongos mutantes, o que produz redução da PE nas células causando fragmentação e deformidade da mitocôndria, elevando, porém, a letalidade dos embriões entre 8 e 10 dias de gestação.

Outra participação importante dos fosfolipídios (especificamente a fosfoetanolamina) são estruturas de ancoragem à parede da membrana celular para algumas proteínas, como o Glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Figura 2), (MUNDAY e LÓPEZ, 2007), sobre a qual BUDIRAHARDJA et al. (2015) revelaram que alterações ou mutações na funcionalidade da GPI produzem letalidade embrionária precoce em camundongos; Isso ocorre devido a redução da superfície das células embrionárias, pela interrupção da fase de alongamento da morfogênese e/ou por rupturas das células epidérmicas da membrana. Isso sugere um enfraquecimento da membrana epitelial e a conexão do córtex, relacionada à síndrome de múltiplas malformações congênitas e anormalidades renais congênitas em humanos.

Figura 2. Ancorando o glicosilfosfatidilinositol na membrana celular. O glicosilfosfatidilinositol (GPI) é uma modificação pós-transducional que resulta na ligação de proteínas modificadas à lâmina externa da membrana plasmática. Experiências de cultura de tecidos mostraram que as proteínas ancoradas a GPI (GPI-AP) atingem a membrana apical das células epiteliais. Fonte: Leon, 2018

Outro caso de letalidade embrionária é a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (uma doença hereditária humana, com um modelo de estudo em camundongos (YANG et al., 2013). Essa deficiência produz aumento da atividade da fosfolipase A2 (iPLA), com diminuição de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) que juntamente com alta peroxidação lipídica e com aumento de lisoglicerofosfolípides, produzem letalidade embrionária em *Caenorhabditis elegans*, devido defeitos na permeabilidade, na polaridade e da citocinese na membrana celular impedindo a eclosão (CHEN et al., 2017).

Outro processo importante é a expansão e contração da membrana plasmática. No embrião, ocorre através do acoplamento actina-miosina, a função lipídica da membrana plasmática e o uso de fosfoinositídeos (PI) (JANETOPOULOS e DEVREOTES, 2006; COMER e PARENT, 2007; FIGARAR *et al.*, 2013), o que produz a ativação de mudanças na diferenciação celular (remodelação morfológica) (FIGARAR *et al.*, 2013). REVERSI *et al.* (2014) determinaram que o aumento dos níveis de IP provoca contração prematura e encurtamento de células, enquanto o aumento de IP produz expansão e contratilidade precoces, alterações que causam variação na forma celular durante a morfogênese que produz letalidade embrionária.

Além disso, o mecanismo de regulação metabólica em ácidos graxos livres (AGL) regulados por sintetases acil-CoA (ACS) por esterificação de AGL para Coenzima (KNIAZEVA *et al.*, 2012). KNIAZEVA *et al.* (2012) sugerem que a atividade metabólica da acil-CoA sintetase-1 participa da cadeia C17ISO afeta o conteúdo de lipídios maternos. Assim a transdução de sinal e desenvolvimento em embriões de *Caenorhabditis elegans* regula a composição lipídica não-zigótica, demonstrando que uma variação deste mecanismo causa exocitose e citocinese levando a uma letalidade embrionária precoce em os humanos.

Em adição (WANG *et al.*, 2007) descreveu que o transporte defeituoso de ceramida (através da ausência de ceramida transferase) em camundongos vivos pode estressar o retículo endoplasmático e afetar a viabilidade da célula e de todo o organismo, afetando o desenvolvimento embrionário e crescimento através de uma alteração de proliferação e diferenciação aberrante, produzindo letalidade iminente devido à excessiva morte celular.

Participação de lipídios na mineralização e formação óssea

A mineralização e calcificação do osso e cartilagem é um processo essencial para o desenvolvimento do esqueleto no final da gestação. Há algumas décadas, os lipídios foram ligados à calcificação e à mineralização óssea, através da identificação de fosfolipídios, colesterol e glicerol, no desenvolvimento da cartilagem epifisária (PERESS *et al.*, 1974; MEROLLI e SANTIN, 2009). Da mesma forma, outras estruturas químicas lipídicas são identificadas como pequenas vesículas ricas em esfingomiélin, fosfatidilserina e colesterol (WUTHIER, 1975).

ELASHRY *et al.* (2018) demonstraram que a aplicação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ASCs) melhora a calcificação, proliferação e diferenciação da osteopenia em equinos. ASCs humanos (hCsCs) têm sido usados nos últimos anos em engenharia de tecido ósseo (DUFRANE, 2017; ELASHRY *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2019). GOJANOVICH *et al.*, (2018) demonstraram que são células ricas em vacúolos lipídicos, transportadores de Triglicerídeos no Complexo de Golgi (HESSE *et al.*, 2013), e lipídios nucleares como ácidos graxos e colesterol (LAYERENZA *et al.*, 2013), que desempenham um papel fundamental no manuseio e transporte na célula membrana. Estas células possuem um alto potencial de diferenciação osteogênica com a participação das proteínas quinases e da inibição da ativação do sinal extracelular, que produz osteogênese e deposição de cálcio (LIU

et al., 2009) (embora esse mecanismo ainda esteja sendo estudado) e alterações nos genes relacionados à autofagia na diferenciação e mineralização das ASC (LI et al., 2016).

Desde 1975, sabe-se participação de lipídios no desenvolvimento ósseo e na mineralização. WUTHIER (1975) mostrou que a composição de lipídios no osso seria distribuída na membrana celular (lipídios não polares, principalmente esfingomielina, fosfoglicérides, triglicerídeos, ésteres do colesterol e colesterol livre e ácidos graxos) e vacúolos extracelulares (maior quantidade de fosfolipídios e colesterol).

O crescimento celular e a proliferação nos ossos começam pela ativação dos sinais intracelulares (Figura 3), que ativam a quinase para gerar metabólitos fosfolipídicos. Inicia-se pela formação de vacúolos lipídicos na matriz óssea (osteóide) dentro do osso neoformado, com a liberação de cálcio produzido pela ação da fosfolipase C- γ 1 (PLC- γ 1) (enzima responsável pela hidrólise do fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato), que libera cálcio do retículo endoplasmático para produzir fosfato de cálcio amorfo (CROOKE et al., 2009). Para que a mineralização ocorra, é necessária uma força motriz que transporte os minerais e o cálcio para um centro composto de um complexo de cálcio-fosfato-lítio (CPLX - fosfato de cálcio amorfo e fosfatidilserina) e Anexina A5 (uma proteína e lipídios dependentes de Ca^{2+} GENG; WU; WUTHIER, 2007) Posteriormente, inicia-se o acúmulo de cristais, importantes na integridade esquelética, na formação, no endurecimento e na rotação óssea (HOUSTON et al., 2004)

Figura 3: O papel dos lipídios na calcificação óssea. Calcificação e mineralização começam na diálise de ossos longos. Começa com a formação de vesículas lipídicas na matriz óssea (osteóide), seguida pela liberação de cálcio (CA) do retículo endoplasmático pela ação da fosfolipase C-γ1 (PLC-γ1) em 1. Cálcio livre no plasma celular. Pela ação de uma força motriz para um núcleo de ossificação e uma anexina A5 em 2. Posteriormente há um acúmulo de cristais, produção na matriz óssea. Fonte: Leon, 2018.

Como já mencionamos, a proteína CK participa da rota de Kennedy, catalisando a CDP-colina para a síntese de fosfatidilcolina (PC) com um papel importante na letalidade embrionária (AOYAMA et al., 2004; EBERLIN et al., 2010). Estudos recentes relacionam a inibição da CK e deficiência na síntese de PC com o desenvolvimento anormal de ossos em pavões e a remodelação óssea em ratos (GALLEGO-ORTEGA et al., 2011). Sobre o que (LI et al., 2014) na rota do CDP-colina, o que produz uma diminuição de 80% da PC, ilustrado pelo silenciamento da CK. Tal processo produz alterações ósseas com deformidade do antebraço (rádio e ulna), com zonas hipertróficas expandidas, sem proliferação de placas de crescimento e formação de centros de ossificação, devido à diminuição da proliferação e diferenciação dos condrócitos, pela extensa degradação da membrana celular (LIA et al., 2014).

Participação de lipídios no desenvolvimento do Sistema Nervoso

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso em animais, os lipídios participam da formação do tubo neural, evitando falhas durante o processo (ZURASHVILI et al., 2013). Um

exemplo é o fosfatidilinositol, que colabora com o GPI para funcionar como um receptor molecular para a epinefrina 1, 2 e 3 na superfície celular. Uma falha desse mecanismo no momento da neurulação (em camundongos) causaria a inibição do fechamento do tubo neural da medula espinhal, sem efeitos adversos sobre o crescimento ou a progressão do desenvolvimento embrionário (NORAISHAH et al., 2009). Fosfatidilinositol pode ser encontrado em níveis elevados no coração e cérebro do feto, níveis moderados no córtex, cerebelo, hipocampo e bulbo olfatório, e em baixos níveis no hipotálamo, cérebro médio, tronco cerebral e medula espinhal (MUNDAY e LÓPEZ, 2007).

Na morfogênese, estudos neuronais demonstram que o grupo fosfolipídico fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PI (3,4) P2) é necessário na agregação de ação e na promoção da neurogênese, que determina o aparecimento da neurita (necessária para o início do circuito neural) (ZHANG et al., 2017). Na formação do fosfatidilinositol, a fosfolipase C é uma enzima chave que participa na transdução de neurotransmissores e hormônios (RYOUL et al., 2015). Desde 1991, tinha-se o conhecimento de que a fosfolipase C está presente em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos como ativador do fosfato de inositol fosfatidilinositol e glicerol, juntamente com o fosfatidilinositol-3-fosfato ativa o processo de neuroexocitose (MIZUGUCHI et al., 1991).

Na formação do sistema nervoso, aproximadamente metade dos neurônios gerados entra em apoptose, apenas aqueles com sinapses corretamente formadas e funcionais permanecem ativos. O fosfatidilinositol nesse processo de apoptose participa da cascata de sinalização que inclui o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), que atua como um receptor sináptico presente no corpo celular e nas fendas sinápticas. Este processo também é regulado pela proteína quinase que inibe a apoptose dos neurônios (BRUNET et al., 2001). A proteína quinase 1 dependente de fosfoinositídeos (PDK1) é ativada em resposta à ligação de fosfoinositídeo 3-quinase e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, que produz uma ativação da cadeia da família quinase para interromper a interação do domínio PDK1 com fosfoinositido, regulando assim a apoptose neural. Outros estudos, como os de BIEBERICH em 2011, demonstraram que as ceramidas e seu derivado esfingosina-1-fosfato (S1P) são fundamentais para a diferenciação de células-tronco neurais e apoptose, que atuam na diferenciação de células embrionárias.

Uma revisão de LO VASCO (2012) narra como o fosfatidilinositol regula a concentração de cálcio no desenvolvimento do sistema de transmissão do sinal do sistema

nervoso por meio de enzimas da família da fosfolipase C. Foi elaborado pelo autor que a participação na formação de morfologia dendrítica e axônios.

O cérebro de embriões e fetos, assim como adultos, sintetiza colesterol localmente. Embora esse mecanismo ainda seja um processo em estudo, acredita-se que os neurônios corticais precisam de uma biossíntese indispensável do colesterol para sua manutenção e sobrevivência. O cérebro em formação, precisa de uma demanda maior de colesterol para manter o crescimento de neuritos, o número de cones de crescimento funcional e diferenciação neuronal. Esses neurônios em formação toleram apenas uma leve alteração na biossíntese do colesterol, que pode ter implicações neurodegenerativas (FUNFSCHILLING et al., 2012). O colesterol foi identificado em embriões de camundongos (devido à presença de enzimas colesterogênicas) nos derivados da crista neural, do tubo neural, do cérebro, da cauda e das extremidades (LAUBNER et al., 2003; ROUX et al. 2018).

Os lípidos cerebrais, como esfingomielina, gangliosídeo GM1 e derivados esfingolipídicos, têm função de sinalização celular ("lípidios bioativos"). Estes, atuam por associações e / ou ligação de proteínas, na formação de ligações lipídicas que regulam a atividade de proteínas sinalizadoras celulares e como mensageiras no balanço energético para a diferenciação de células-tronco neurais (NSCs) (BIEBERICH, 2012). Uma revisão realizada por RYU et al. (2017), descreve como os gangliosídeos estão envolvidos na diferenciação precoce, desenvolvimento e maturação cerebral embrionária, na formação de sinapses cerebrais e formação dos processos neuronais.

Participação dos lipídios no desenvolvimento pulmonar e na sua maturação

Lipídios, principalmente glicéridos ou fosfogliceróis, também estão relacionados ao desenvolvimento do sistema respiratório em mamíferos, estando associados ao desenvolvimento (fosfatidilinositol e fosfatidilglicerol) e à maturação pulmonar (mioinositol) (BLEASDALE et al., 1982; HALLMAN et al., 2002).

O surfactante pulmonar é uma substância presente na superfície alveolar do pulmão e impede seu colapso na expiração (BATENBURG et al., 1982). Esta substância protetora é composta principalmente de fosfolipídios, principalmente a fosfatidilcolina, que se forma no final da gestação durante a maturação pulmonar, aumentando sua síntese conforme o avanço da gestação (ROONEY et al., 1979).

A fosfatidilcolina (PC) é o principal fosfolípido da membrana celular na maioria dos animais, responsável por cerca de metade dos fosfolípidos nas células e mais da metade dos fosfolípidos séricos. Tem um papel estrutural nas membranas celulares, onde forma a matriz da bicamada. Além de ser um componente essencial do surfactante pulmonar, auxilia no transporte de colesterol através do organismo (KENT, 1991).

Além da fosfatidilcolina, o surfactante também é rico em fosfatidilglicerol, outro componente ativo de superfície, assim como enzimas envolvidas na síntese de fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol, como a fosfocolintransferase (ROONEY et al., 1979). No pulmão fetal, a porcentagem de fosfatidilinositol aumenta concomitantemente com a fosfatidilcolina, enquanto o fosfatidilglicerol aparece mais tarde na gestação (BATENBURG et al., 1982).

A produção destes compostos é realizada por três mecanismos: Pelo aumento do glicerolfosfato microssomal que ativa a fosfatidiltransferase e reduz o aumento do fosfatidilglicerol; pela diminuição do soro de inositol no final da gestação, que produz redução do fosfatidilinositol e aumento do fosfatidilglicerol; e pela síntese de fosfatidilglicerol que é ativada pelo aumento de fosfatidilcolina (BATENBURG, J. J., KLAZINGA, W., e VAN GOLDE, 1982).

Participação de lipídios na formação de tecidos orgânicos

Células epiteliais dentro do tubo digestivo ou dos rins, em alguns casos, podem transportar solutos, proteínas ou metabólitos, e, algumas dessas células formam microvilosidades em sua superfície apical. Alguns estudos mostraram a presença de fosfatidilinositol-3,4,5-tris-fosfato, ligado à migração celular direcionada ao estabelecimento de polaridade em células epiteliais (PINAL et al., 2006).

Nas fibras musculares, alguns estudos relacionam a deficiência de "colina quinase β " com fraqueza muscular em seres humanos. No entanto, outros estudos descrevem que a sua ausência em neonatos produz doenças caracterizadas por fraqueza muscular progressiva e incapacidade grave com morte embrionária frequente (SHER et al., 2006; WU et al., 2009). WANG *et al.*, (2007) descreveram que o transporte defeituoso da ceramida produz defeitos no coração durante o desenvolvimento, tais como: *truncus arteriosus* e em geral paredes finas, transparentes e espessas, ou ventrículo primitivo com maior densidade e cavidade ventricular aumentada com paredes finas.

A sinalização e transporte de substâncias pelo citoesqueleto regulado pela ação dos fosfoinosítídeos são derivados do fosfatidilinositol. A diminuição desses fosfoinosítídeos no desenvolvimento embrionário, produz redução do peso ao nascimento, retardo na ossificação e alterações no metabolismo da glicólise (MUNDAY; LÓPEZ, 2007).

Altos níveis de fosfatidilinositol são encontrados no coração e no cérebro do feto com níveis moderados no córtex, cerebelo, hipocampo e bulbo olfatório, e níveis menores no hipotálamo, mesencéfalo, tronco cerebral e medula espinhal. Outros órgãos como: fígado, músculo esquelético, testículos, pulmão, glândula mamária e baço apresentam baixos níveis de fosfatidilinositol (MUNDAY; LÓPEZ, 2007).

A fosfatidilcolina também desempenha um papel crucial na manutenção da integridade da membrana celular, participando da tradução do sinal. É um fosfolipídio predominante em lipoproteínas plasmáticas, bÍlis e surfactante pulmonar. Seu papel específico no metabolismo hepático implica a formação de lipoproteínas e secreção biliar. A manutenção de lipídios constantes no fígado, produzidos pelo fluxo constante de lipídios para dentro e para fora dos hepatócitos, garante as funções hepáticas, a redução do colesterol e a fosfatidilcolina plasmática (MUNDAY; LÓPEZ, 2007).

Tabela 1: Resumo do papel dos lipídios no metabolismo celular do desenvolvimento.

Papel	Lipídio	Ação	Referências
Letalidade Embrionária	PC; PE; PS; PI; FFA	Instabilidade e desequilíbrio da membrana celular. Interrupções da morfogênese	(Wang <i>et al.</i> , 2005; Wu <i>et al.</i> , 2008, 2010; Kniazeva <i>et al.</i> , 2012; Budirahardja <i>et al.</i> , 2015; Chen <i>et al.</i> , 2017)
	Ceramidas	A proliferação e diferenciação aberrante.	(Wang <i>et al.</i> , 2007)
	PE	Deformidade mitocondrial	(Steenbergen <i>et al.</i> , 2005; Kojima <i>et al.</i> , 2016)
	FFA, PI	Causas de exocitose e citocinese	(Figarar <i>et al.</i> , 2013)
Mineralização óssea	TR; FFA, Colesterol;	Crescimento celular e proliferação	(Hesse <i>et al.</i> , 2013; Layerenza <i>et al.</i> , 2013)
	PS, TR, FFA, Cholesterol	Ativação e Transporte de sinal intracelular	(Wuthier, 1975)
	TR; SM; PS; PI; Colesterol	Vacúolos lipídicos na matriz óssea	(Wuthier, 1975)(Peress <i>et al.</i> , 1974; Crooke, Pozzi e Carpenter, 2009; Merolli e Santin, 2009)
Formação do sistema nervoso.	PI	Apoptose neural.	(Brunet <i>et al.</i> , 2001)
	PI; SM	Formação de sinapses e neuroexocitose	(Ryoul <i>et al.</i> , 2015)

	PI; Colesterol	Proliferação e migração celular	(Noraishah <i>et al.</i> , 2009; Funfschilling <i>et al.</i> , 2012; Zurashvili <i>et al.</i> , 2013)
Desenvolvimento pulmonar.	PG; PI	Maturação pulmonar. Surfactante Pulmonar	(Batenburg and Klazinga, 1982; Bleasdale, Maberry and Quirk, 1982; Hallman <i>et al.</i> , 2002).
Rins	PI	Migração celular, Direcionada no estabelecimento da polaridade nas células epiteliais	(Pinal <i>et al.</i> , 2006)
Formação muscular	Ceramidas	Afetando de energético metabólico, por desordens nas células mitocondriais	(Sher <i>et al.</i> , 2006; Wang <i>et al.</i> , 2007)

Legenda: PC (fosfatidilcolina); PE (fosfatidiletanolamina); PS (fosfatidilserina); PG (fosfoglicidos); Ceramidas (CR); TR (Triglicerídeos); SM (Espingolípídios); FFA (Ácidos Graxos Livres); PI (fosfatidilinositol).

Conclusão

Existe uma grande variabilidade na interação do papel dos lipídios com o desenvolvimento embrionário. Estes grupos de moléculas, em sua maior parte, se estudaram através de seus mediadores moleculares como enzimas e sintetizadores de biotransformação, como a fosfolilcitidiltransferase e a fosfolipase C, e / ou proteínas precursoras, como a colina quinase. Cada grupo específico de lipídios tem um papel importante na formação do organismo; e eles atuam como agentes de sinalização, como receptores de membrana, como amplificação de sinal e como transportadores de substâncias.

Maioritariamente ligados à manutenção da integridade da membrana celular em blastocistos, antes da implantação; no transporte de cálcio para células nervosas e ósseas e no apoptose neural; no trânsito epitelial e na maturação pulmonar. Além de estar ligado a alterações na membrana celular, retardo de crescimento e deformidades de desenvolvimento (coração, osso, cérebro, etc.).

Referências

AOYAMA, C.; LIAO, H.; ISHIDATE, K. Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. v. 43, p. 266–281, 2004.

BATENBURG, J.J., KLAZINGA, W., AND VAN GOLDE, L. M. Regulation of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol synthesis in alveolar type II cells isolated from adult rat lung. FEBS letters, v. 147, n. 2, p. 171–4, 1982.

BATENBURG, J. J.; KLAZINGA, W. Regulation of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol alveolar type II cells isolated from adult rat lung. *FEBS letters*, v. 147, n. 2, p. 171–174, 1982.

BIEBERICH, E. There is more to a lipid than just being a fat: sphingolipid-guided differentiation of oligodendroglial lineage from embryonic stem cells. *Neurochem Res.*, v. 36, n. 9, p. 1601–1611, 2011.

BIEBERICH, E. It's a lipid's world: Bioactive lipid metabolism and signaling in neural stem cell differentiation. *Neurochem Res*, v. 37, n. 6, p. 1208–1229, 2012.

BLEASDALE, J. E.; MABERRY, M. C.; QUIRK, J. G. Myo-inositol homeostasis in foetal rabbit lung. *The Biochemical journal*, v. 206, n. 1, p. 43–52, 1982. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1158547&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BRUNET, A.; DATTA, S. R.; GREENBERG, M. E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current opinion in neurobiology*, v. 11, n. 3, p. 297–305, 2001.

BUDIRAHARDJA, Y.; DOAN, T. D.; ZAIDEL-BAR, R. Glycosyl Phosphatidylinositol Anchor Biosynthesis Is Essential for Maintaining Epithelial Integrity during *Caenorhabditis elegans* Embryogenesis. p. 1–25, 2015a.

BUDIRAHARDJA, Y.; DOAN, T. D.; ZAIDEL-BAR, R. Glycosyl Phosphatidylinositol Anchor Biosynthesis Is Essential for Maintaining Epithelial Integrity during *Caenorhabditis elegans* Embryogenesis. p. 1–24, 2015b.

CHEN, T.; YANG, H.; HUNG, C.; OU, M.; PAN, Y.; CHENG, M.; STERN, A. Impaired embryonic development in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient *Caenorhabditis elegans* due to abnormal redox homeostasis induced activation of calcium-independent phospholipase and alteration of glycerophospholipid metabolism. *Nature Publishing Group*, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.463>>.

COMER, F. I.; PARENT, C. A. Phosphoinositides specify polarity during epithelial organ development. *Cell.*, v. 128, n. (2):, p. 239–40., 2007.

CROOKE, C. E.; POZZI, A.; CARPENTER, G. F. PLC- γ 1 regulates fibronectin assembly and cell aggregation. *Experimental Cell Research*, v. 315, n. 13, p. 2207–2214, 2009.

DUFRANE, D. Impact of Age on Human Adipose Stem Cells for Bone Tissue Engineering. v. 26, n. 9, p. 1496–1504, 2017.

ELASHRY, M. I.; BAULIG, N.; HEIMANN, M.; BERNHARDT, C.; WENISCH, S.; ARNHOLD, S. Research in Veterinary Science Osteogenic differentiation of equine adipose tissue derived mesenchymal stem cells using CaCl₂. *Research in Veterinary Science*, v. 117, n. December 2016, p. 45–53, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.11.010>>.

FIGARAR, L.; XU, H.; GARCIA, H. G.; GOLDING, I.; SOKAC, A. M. The plasma membrane flattens out to fuel cell surface growth during *Drosophila* cellularization. *Dev Cell.*, v. 27, n. 6, p. 648–655, 2013.

FUNFSCHILLING, U.; JOCKUSCH, W. J.; SIVAKUMAR, N.; MOBIUS, W.; CORTHALS, K.; SAILI; QUINTES, S.; KIM, Y.; SCHAAP, I. A. T.; RHEE, J.-S.; NAVE, K.-A.; SAHER, G. Critical Time Window of Neuronal Cholesterol Synthesis during Neurite Outgrowth. *Development/Plasticity/Repair*, v. 32, n. 22, p. 7632–7645, 2012.

GENGE, B. R.; WU, L. N. Y.; WUTHIER, R. E. Kinetic analysis of mineral formation during in vitro modeling of matrix vesicle mineralization: Effect of annexin A5, phosphatidylserine, and type II collagen. *Analytical Biochemistry*, v. 367, n. 2, p. 159–166, 2007.

GOJANOVICH, A. D.; GIMENEZ, M. C.; MASONE, D.; RODRIGUEZ, T. M.; DANI, C. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem / Stromal Cells Handling Protocols . Lipid Droplets and Proteins Double-Staining. v. 6, n. April, p. 1–16, 2018.

HALLMAN, M.; SLIVKA, S.; WOZNIAK, P.; SILLS, J. Perinatal Development of Myoinositol Uptake into Lung Cells: Surfactant Phosphatidylglycerol and Phosphatidylinositol Synthesis in the Rabbit. v. 20, n. 2, p. 179–185, 2002.

HESSE, D.; JASCHKE, A.; CHUNG, B.; SCHURMANN, A. Trans -Golgi proteins participate in the control of lipid droplet and chylomicron formation. *Biosci. Rep.*, p. 1–10, 2013.

HOUSTON, B.; STEWART, A. J.; FARQUHARSON, C. PHOSPHO1 - A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralisation in bone and cartilage. *Bone*, v. 34, n. 4, p. 629–637, 2004.

JANETOPOULOS, C.; DEVREOTES, P. Phosphoinositide signaling plays a key role in cytokinesis. v. 174, n. 4, p. 485–490, 2006.

KENT, C. REGULATION OF PHOSPHATIDYLCHOLINE : Choline. *Prog. Lipid Res*, v. 29, p. 87–105, 1991.

KNIAZEVA, M.; SHEN, H.; EULER, T.; WANG, C.; HAN, M. Regulation of maternal phospholipid composition and IP 3 -dependent embryonic membrane dynamics by a specific fatty acid metabolic event in *C. elegans*. p. 554–566, 2012.

KOJIMA, R.; ENDO, T.; TAMURA, Y. A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed in vitro. *Nature Publishing Group*, n. July, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep30777>>.

LAUBNER, D.; BREITLING, R.; ADAMSKI, J. Gene Expression Pattern E mbryonic expression of cholesterologenic genes is restricted to distinct domains and colocalizes with apoptotic regions in mice. v. 115, p. 87–92, 2003.

LAYERENZA, J. P.; GONZÁLEZ, P.; BRAVO, M. M. G. De; POLO, M. P.; SISTI, M. S.; VES-LOSADA, A. Biochimica et Biophysica Acta Nuclear lipid droplets : A novel nuclear domain. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1831, n. 2, p. 327–340, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.10.005>>.

LEE, Y.; LEE, S.; CHEOL, S.; SUNG, J.; KADAM, A. A. Surface functionalization of halloysite nanotubes with supermagnetic iron oxide , chitosan and 2-D calcium-phosphate nano flakes for synergistic osteoconduction enhancement of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 173, n. August 2018, p. 18–26, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.045>>.

LI, Y.; GUO, T.; ZHANG, Z.; YAO, Y.; CHANG, S.; NÖR, J. E.; CLARKSON, B. H.; NI, L.; LIU, J. Autophagy Modulates Cell Mineralization on Fluorapatite-Modified Scaffolds. 2016.

LIU, Q., CEN, L., ZHOU, H., YIN, S., LIU, G., LIU, W., ... CUI, L. NExtracellular Signal-Related Kinase Signaling Pathway in Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells and in Adipogenic Transition Initiated by Dexamethasone. o Title. Tissue Engineering Part A, v. 15, n. 11, p. 3487–3497, 2009.

LO VASCO, V. R. Phosphoinositide pathway and the signal transduction network in neural development. Neuroscience Bulletin, v. 28, n. 6, p. 789–800, 2012.

MATEOS, G.; REBOLLAR, P.; MEDEL, P. Utilización de grasas y productos lipídicos en alimentación animal: grasas puras y mezclas. Mundo Veterinario, v. 4, n. 2, p. 78–88, 2000.

MEROLLI, A.; SANTIN, M. Role of phosphatidyl-serine in bone repair and its technological exploitation. Molecules, v. 14, n. 12, p. 5367–5381, 2009.

MIZUGUCHI, M.; YAMADA, M.; I, S. U. K.; RHEE, S. G. Phospholipase C isozymes in neurons and glial cells in culture: an immunocytochemical and immunochemical study. Brain Research, v. 548, p. 35–40, 1991.

MUNDAY, A. D.; LÓPEZ, J. A. Posttranslational protein palmitoylation: Promoting platelet purpose. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v. 27, n. 7, p. 1496–1499, 2007.

NORAISHAH, A.; M TURMAINE, M.; GREENE, N. D. E.; COPP, A. J. EphrinA-EphA receptor interactions in mouse spinal neurulation : implications for neural fold fusion. v. 568, n. January, p. 559–568, 2009.

PARK, H.; HAYNES, C. A.; NAIRN, A. V.; KULIK, M.; DALTON, S.; MOREMEN, K.; MERRILL, A. H. Transcript profiling and lipidomic analysis of ceramide subspecies in mouse embryonic stem cells and embryoid bodies. Journal of Lipid Research, v. 51, n. 3, p. 480–489, 2010.

PERESS, N. S.; ANDERSON, H. C.; SAJDERA, S. W. The lipids of matrix vesicles from bovine fetal epiphyseal cartilage. Calcified Tissue Research, v. 14, n. 1, p. 275–281, 1974.

PINAL, N.; GOBERDHAN, D. C. I.; COLLINSON, L.; FUJITA, Y.; COX, I. M.; WILSON, C.; PICHAUD, F. Regulated and polarized PtdIns(3,4,5)P₃ accumulation is essential for apical membrane morphogenesis in photoreceptor epithelial cells. Current Biology, v. 16, n. 2, p. 140–149, 2006.

REVERSI, A.; LOESER, E.; SUBRAMANIAN, D.; SCHULTZ, C.; RENZIS, S. De. Plasma membrane phosphoinositide balance regulates cell shape during *Drosophila* embryo morphogenesis. *J Cell Biol.*, v. 205, n. 3, p. 395–408, 2014.

ROONEY, S. GOBRAN, L. MARINO, A. MANISCALCO, W. GROSS, I. Effects of betamethasone on phospholipid content, composition and biosynthesis in the fetal rabbit lung. v. 572, p. 64–76, 1979.

ROUX, C.; WOLF, C.; MULLIEZ, N.; GAOUA, W.; CORMIER, V.; CHEVY, F.; CITADELLE, D. Role of cholesterol in embryonic development 1 – 4. v. 71, n. March, p. 1270–1279, 2018.

RYOUL, Y.; KANG, D.; LEE, C.; SEOK, H.; FOLLO, M. Y.; COCCO, L.; SUH, P. Advances in Biological Regulation Primary phospholipase C and brain disorders. *Advances in Biological Regulation*, p. 1–6, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbior.2015.11.003>>.

RYU, J. A. E. S.; KO, K.; KO, K.; KIM, J. I. S. U.; KIM, S. U. N. U. K. Roles of gangliosides in the differentiation of mouse pluripotent stem cells to neural stem cells and neural cells (Review). p. 987–993, 2017.

SHER, R. B.; AOYAMA, C.; HUEBSCH, K. A.; JI, S.; KERNER, J.; YANG, Y.; FRANKEL, W. N.; HOPPEL, C. L.; WOOD, P. A.; VANCE, D. E.; COX, G. A. A rostrocaudal muscular dystrophy caused by a defect in choline kinase beta, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 8, p. 4938–4948, 2006.

STEENBERGEN, R.; NANOWSKI, T. S.; BEIGNEUX, A.; KULINSKI, A.; YOUNG, S. G.; VANCE, J. E. Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 48, p. 40032–40040, 2005.

SUDANO, M. J.; RASCADO, T. D. S.; TATA, A.; BELAZ, K. R. A.; SANTOS, V. G.; VALENTE, R. S.; MESQUITA, F. S.; FERREIRA, C. R.; ARAÚJO, J. P.; EBERLIN, M. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology*, v. 86, n. 2, p. 472–484, 2016.

VANCE, D. E.; VANCE, J. E. Physiological consequences of disruption of mammalian phospholipid biosynthetic genes. *Journal of Lipid Research*, v. 50, n. Supplement, p. S132–S137, 2009. Disponível em: <<http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R800048-JLR200>>.

WANG, L.; MAGDALENO, S.; TABAS, I.; JACKOWSKI, S. Early embryonic lethality in mice with targeted deletion of the CTP: phosphocholine cytidylyltransferase α gene (*Pcyt1a*). *Molecular and cellular biology*, v. 25, n. 8, p. 3357–3363, 2005. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/content/25/8/3357.short>>.

WANG, X.; RAO, R. P.; KOSAKOWSKA-CHOLODY, T.; MASOOD, M. A.; SOUTHON, E.; ZHANG, H.; BERTHET, C.; NAGASHIM, K.; VEENSTRA, T. K.; TESSAROLLO, L.; ACHARYA, U.; ACHARYA, J. K. Mitochondrial degeneration and not apoptosis is the primary cause of embryonic lethality in ceramide transfer protein mutant mice. v. 184, n. 1, p. 143–158, 2007.

WU, G.; AOYAMA, C.; YOUNG, S. G.; VANCE, D. E. Early embryonic lethality caused by disruption of the gene for choline kinase α , the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 3, p. 1456–1462, 2008.

WU, G.; SHER, R. B.; COX, G. A.; VANCE, D. E. Understanding the muscular dystrophy caused by deletion of choline kinase beta in mice. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1791, n. 5, p. 347–356, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.02.006>>.

WU, G.; SHER, R. B.; COX, G. A.; VANCE, D. E. *Biochimica et Biophysica Acta* Differential expression of choline kinase isoforms in skeletal muscle explains the phenotypic variability in the rostrocaudal muscular dystrophy mouse. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1801, n. 4, p. 446–454, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.12.003>>.

WUTHIER, R. E. Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, v. 409, n. 1, p. 128–143, 1975.

YANG, H.; CHEN, T.; WU, Y.; CHENG, K.; LIN, Y.; CHENG, M.; HO, H.; LO, S. J.; CHIU, D. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency enhances germ cell apoptosis and causes defective embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. 2013.

ZHANG, L. Q.; HAANDEL, L. Van; XIONG, M.; HUANG, P.; HERUTH, D. P.; BI, C.; GAEDIGK, R.; JIANG, X.; LI, D.; WYCKOFF, G.; GRIGORYEV, D. N.; GAO, L.; LI, L.; WU, M.; LEEDER, J. S.; YE, S. Q. Metabolic and molecular insights into an essential role of nicotinamide phosphoribosyltransferase. v. 8, n. 3, p. e2705-11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.132>>.

ZURASHVILI, T.; CORDON-BARRIS, L.; RUIZ-BABOT, G.; ZHOU, X.; LIZCANO, J. M.; GOMEZ, N.; GIMENEZ-LLORT, L.; BAYASCAS, J. R. Interaction of PDK1 with Phosphoinositides Is Essential for Neuronal Differentiation but Dispensable for Neuronal Survival. *Molecular and Cellular Biology*, v. 33, n. 5, p. 1027–1040, 2013. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01052-12>>.

5. Metabólitos e Lipídios Associados à Anatomia de Suínos Fetais por Ionização por Electrospreiamento por Dispersão - Imageamento por Espectrometria de Massa

Marisol L. Cabrera¹, Christina Ramires Ferreira², Livia S. Eberlin³, Alan K. Jarmusch⁴, Valentina Pirro², Ana Clara Bastos Rodrigues¹, Phelipe Oliveira Favaron⁵, Maria Angelica Miglino¹, R. Graham Cooks².

¹Surgery Department, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil.

²Department of Chemistry and Center for Analytical Instrumentation Development, Purdue University, West Lafayette, IN, United States.

³Department of Chemistry, The University of Texas at Austin, Austin, Texas, United States.

⁴Collaborative Mass Spectrometry Innovation Center, Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California, San Diego, La Jolla, California, United States.

⁵State University of Londrina, Paraná, 86051-990, Brazil.

Resumo

A imagem química por espectrometria de massa (MS) tem sido amplamente utilizada para estudar doenças em animais e humanos, especialmente câncer em humanos; no entanto, esta tecnologia foi minimamente explorada para estudar as complexas alterações químicas associadas ao desenvolvimento fetal. Neste trabalho, relatamos a imagem química histologicamente compatível de pequenas moléculas por dispersão e ionização por electrospreiamento (DESI) - MS (2D e 3D) de um feto suíno completo aos 50 dias de gestação. A morfologia dos tecidos não foi alterada pela análise, permitindo a detecção de uma ampla gama de moléculas pequenas em cortes de tecido minimamente processados. Observou-se a localização de lipídios dependentes do órgão. Os resultados mostraram uma grande diversidade de lipídios de fosfatidilserina no cérebro em comparação com outros órgãos, bem como metabólitos como ácido N-acetil-aspartico no sistema nervoso em desenvolvimento e N-acetil-L-glutamina no coração. Alguns lipídios foram abundantes nos pulmões, como PC (32: 0), PC (36: 1), PI (34: 1), PI (38: 3), PS (36: 1) e PS (40: 6), os quais foram coincidentes com a composição do surfactante relatada anteriormente. Os dímeros e sulfatídeos do ácido graxo estavam altamente concentrados no fígado do feto, enquanto as hexoses eram pouco detectadas nesse órgão, mas abundantes no pulmão e no coração. A combinação de informações químicas registradas via imagem DESI-MS acoplada à avaliação anatômica tradicional é uma poderosa fonte de informação bioanalítica que revela as alterações químicas associadas ao desenvolvimento embrionário e fetal e, que quando perturbadas, causam doenças congênitas, como defeitos cardíacos congênitos, espinha bífida e fenda palatina.

Introdução

As características moleculares e anatômicas estão interligadas. No entanto, eles são frequentemente estudados independentemente uns dos outros, em grande parte devido às limitações das ferramentas analíticas disponíveis. Modelos animais são essenciais para o entendimento de doenças, incluindo o desenvolvimento de novas terapias na medicina translacional. Como existem numerosas semelhanças anatômicas, fisiológicas e moleculares entre suínos e humanos e porque os suínos são frequentemente usados como fonte de transplante de órgãos (1), o estudo da ontogenia do porco é uma opção atraente para a pesquisa em biologia do desenvolvimento.

Os lipídios desempenham um papel importante na fisiologia celular e estão implicados em doenças do desenvolvimento, como diabetes tipo I (2,3), doença de Niemann-Pick (4,5) e doença de Gaucher (5,6). As consequências fisiológicas de interromper os genes responsáveis pelos genes do metabolismo lipídico são frequentemente problemas graves de desenvolvimento, incluindo alterações no desenvolvimento neural, distrofia muscular, deformidade óssea, problemas de desenvolvimento de cartilagem, desenvolvimento alterado do sistema respiratório, disfunções gonadais e reprodutivas, insuficiência hepática e letalidade embrionária. (7–13). O papel de pequenos metabólitos e os processos que governam sua formação, distribuição e papéis são igualmente importantes e críticos para o desenvolvimento anatômico e fisiológico adequado.

A espectrometria de massa é um método que fornece informações espaciais e químicas, colmatando a lacuna entre a anatomia e a fisiologia. Esta combinação permite a aquisição de dados morfológicos e químicos abrangentes e tem o potencial de contribuir para reduzir o número de animais necessários na pesquisa. A ionização por eletropulverização por dispersão - espectrometria de massa (DESI-MS) é um método de imagem química simples e livre de matriz que pode ser usado para mapear pequenas moléculas em seções de tecido não modificadas. Numa experiência de imagiologia DESI-MS, um spray de gotículas de solvente carregadas é rastreado através da superfície de uma amostra (tal como uma secção de tecido colocada numa lâmina de vidro) e as moléculas são dissolvidas na mancha de solvente num microfilme. O spray DESI é acelerado por uma corrente de gás nitrogênio tipicamente a 120psi que conduz as gotas de solvente em direção à amostra. As gotículas subsequentes impactam a mancha líquida e liberam micro gotas secundárias contendo as moléculas dissolvidas e as direcionam para a entrada do espectrômetro de massa, onde o solvente evapora gerando íons

de fase gasosa livre. (14–16.). A aplicação de DESI-MS para o análises de tecido beneficia a utilização de combinações de solventes compatíveis com a histologia, tais como acetonitrilo e dimetilformamida misturadas em quantidades iguais. Tais solventes mantêm a integridade do tecido e a morfologia celular quando usados como o solvente de pulverização na análise DESI-MS (17). Perfis de imagem DESI-MS morfologicamente favoráveis metabolizam e lipídios presentes em amostras de tecido sem afetar a localização ou natureza das proteínas. A preservação da morfologia permite a histoquímica (como a coloração com hematoxilina e eosina (H & E)) ou a avaliação imuno-histoquímica para uma correspondência inequívoca entre a informação química e a morfológica (30,31).

O perfil lipídico e imagiologia, é a detecção de lipídios não direcionada e a quantificação relativa, foram explorados por DESI-MS e por ionização por de absorção a laser assistida por matriz (MALDI) MS em bovinos, murganhos, peixes e suínos. No entanto, esses estudos restringiram-se a estágios embrionários precoces (pré-implante) ou a implantação de útero embrionário (16,18–27). O uso da imagem DESI-MS para análise de corpo inteiro foi relatado por Perez et al. (2016) (28) para descrever a localização de líquidos iônicos tóxicos em áreas específicas do peixe-zebra adulto. O DESI-MS permitiu o mapeamento da localização em domínios espaciais 2D e 3D para uma ampla gama de espécies lipídicas, como ácidos graxos livres (AGL), glicerofosfolipídios, glicerolipídeos e esfingolipídios (20,29).

Nesta pesquisa, aplicamos imagens DESI-MS para caracterizar a localização de ácidos graxos livres (AGL) e alguns fosfatidilinositol (PI) lipídios em todo o corpo de dois ácidos graxos livres (FFA) e alguns fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), sulfatida (ST) e fosfatidilinositol (PI) em fetos suínos de avançado estágio de desenvolvimento (por volta do dia 50) quando a organogênese pode ser observada. A localização das moléculas selecionadas foi estudada nas imagens 2D e 3D. Como exemplos, o ácido palmítico, ácido oleico, PC (36:1) / PE (40:4) e PE (40:3) estavam presentes em todos os órgãos. O sistema nervoso apresentou alta abundância de uma série de lipídios PI e PS, enquanto os sulfatida foram detectados principalmente no sistema gastrointestinal, enquanto o ácido N-acetil-L-glutâmico foi detectado apenas no coração, e o N-acetil-aspartato foi localizado especificamente em o tecido cerebral. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo descrevendo a localização de lipídios e metabólitos em um estágio avançado de desenvolvimento fetal. A imagem de DESI-MS é altamente aplicável para entender processos complexos de desenvolvimento e deve ser útil para estudar doenças do desenvolvimento.

Materiais e métodos

Químicos

Quando não indicado em contrário, os reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Amostras

O fluxo de trabalho experimental está resumido na Figura 1. Para experiências com DESI-MS, dois fetos suínos congelados por volta do dia 50 da gravidez foram obtidos de um fornecedor comercial (Animal Technologies, Inc.). Agentes fixadores não foram utilizados, a amostra foi congelada e embebida em composto de temperatura ótima de corte (OCT) para cortar seções de 15 µm de espessura usando um criótomo (criostato Shandon SME Cryotoma GMI, Inc., Ramsey, MN, EUA). As seções do corpo inteiro foram montadas em lâminas de vidro planas (Erie Scientific, Portsmouth, NH). Nenhum agente fixador foi usado antes ou depois do fatiamento. Após o seccionamento, as amostras foram armazenadas a -80 ° C até a análise, quando foram deixadas secar em dessecador por min 15 min. Todos os experimentos de DESI-MS foram realizados na Purdue University, IN.

Imagem DESI-MS e análise de dados

As experiências foram realizadas no modo de íons negativos aplicando uma voltagem de pulverização de 5 kV à agulha da seringa utilizada para administrar o solvente de pulverização. O solvente (32) de dimetilformamida-acetonitrilo (1: 1) (v / v) foi pulverizado a uma taxa de 1,5 µl / min sob 180 psi de pressão de gás nebulizador (N₂). Os espectros de massa foram adquiridos de m / z 150 a 1.000 a partir de diferentes seções representando todo o corpo do feto suíno. Um ângulo de incidência de 51° para o plano de superfície e cerca de 2 mm de distância da entrada do instrumento foi usado para o spray DESI. O emissor de spray DESI consistia em um capilar interno com diâmetro interno (DI) de 50 µm e diâmetro externo (DO) de 150 µm, e um capilar externo com ID de 250 µm e OD de 350 µm. O espectrômetro de massa utilizado foi um espectrômetro de massa de captura iônica linear LTQ controlado pelo software Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA). Os tecidos foram digitalizados usando um estágio de movimento 2D construído em laboratório com linhas horizontais separadas por uma etapa vertical de 300 µm. Um programa interno permitiu a conversão dos arquivos de espectro de massa do XCalibur 2.0 (. raw) em um formato compatível com o Biomap (freeware, <http://www.maldi-msi.org>), em que imagens

especialmente resolvidas foram montadas e exibidas no modo interpolado. As espécies lipídicas foram putativamente identificadas por comparação dos dados MS / MS gerados (espectros de íons do produto) com dados da literatura suplementados por alta resolução de massa obtida pelo direcionamento manual do spray DESI em órgãos específicos usando um espectrômetro de massa Orbitrap (Exactive, Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). Após a imagem DESI-MS, as secções de tecido de todo o corpo foram coradas com H & E e as imagens morfológicas foram sobrepostas manualmente com as imagens de íons DESI-MS utilizando software power point. O BioMAP (Novartis, Basel, Suíça) foi usado para a visualização de imagens de íons 2D e uma rotina de processamento de dados baseada em MATLAB para imagens de espectrometria de massa 3D (29).

Figura 1. Fluxo de trabalho de imagens DESI-MS de um feto de porco inteiro. (A) as amostras foram seccionadas usando um criótomo e montadas em lâminas de vidro. O volume total do feto suíno foi seccionado em 45 fatias usando 300 μm de resolução lateral (**Figura S1**). (B) as lâminas de vidro foram armazenadas a -80°C e antes da análise foram descongeladas e colocadas em um dessecador por ~ 15 min. (C) as imagens de DESI-MS foram adquiridas num espectro de massa de armadilha de *is*, equipado com um estio de movimento interno incorporado. (D) As imagens de íons foram visualizadas usando o BioMAP 3.7.5.5 fornecido pelo Novartis Institutes for

BioMedical Research (freeware). (E) os dados espectrais foram calculados através de uma linha inteira de uma imagem iônica (linha vermelha pontilhada) e o espectro de massa DESI-MS resultante foi exibido, mostrando a faixa de massa a carga (m/z) onde classes lipídicas específicas aparecem.

Resultados e discussão

Avaliação anatômica das seções do tecido suíno fetal

A avaliação macroscópica foi utilizada para determinar a idade gestacional. Os fetos suínos utilizados para este estudo tinham 37 mm de nádega indicando uma idade gestacional de aproximadamente 50 dias (33). O estágio de organogênese foi determinado pela morfologia como descrito em (34) e apoiado pela formação completa dos olhos, coração, cérebro, pulmões, fígado estômago e rins. Avaliações posteriores revelaram regiões cefálicas, olhos com retinas pigmentadas, pálpebras superiores e inferiores, orelhas externas e membros com dígitos queratinizados e separados. Detalhes adicionais sobre a avaliação morfológica são descritos nas **Figuras S2-S3**.

Diferenças Composicionais Gerais em Lipídios e Metabólitos entre os Principais Órgãos

A **Tabela 1** lista um conjunto de lipídios e metabólitos, organizados por classe química, que foram detectados no sistema nervoso (cérebro e medula espinhal), no sistema cardiopulmonar (coração e pulmões) e nos sistemas gastrointestinal e urinário (fígado, intestinos e rins). Os lipídeos, detectados no modo de íons negativos, incluíram fosfatidilserinas (PS), sulfatídeos (ST), fosfatidilinositóis (PI), esfingomielina (SM), fosfatidilcolinas (PC) e ácidos graxos livres (FFA), todos com estrutura e papéis de sinalização nas células. Espectros de massa ilustrativos para cada órgão são mostrados na **Figura 2**. As diferenças nas abundâncias relativas detectadas pela imagem DESI-MS entre o feto, coração, fígado, rim, cérebro, medula espinhal e intestino do feto suíno foram avaliadas qualitativamente e estão tabuladas na Tabela 1. As intensidades mais baixas até as mais altas foram classificadas como +, +1, +2, +3, respectivamente. As anotações metabólicas e lipídicas putativas foram baseadas na literatura do DESI-MS e foram corroboradas pela SM de alta resolução (**Tabela S1**).

Figura 2. Espectros de massa representativos de alguns dos órgãos (indicados na mesma secção de tecido corada com H & E utilizada para a imagiologia de DESI-MS) e imagens de íons selecionadas. (A) H & E; (B) cérebro; (C) fígado; (D) intestino; (E) coração; (F) pulmões; (G) rim.

Tabela 1. Abundância relativa de lipídios e metabólitos detectados por órgão. As intensidades qualitativas foram classificadas como +, +1, +2, +3, baixa a alta, respectivamente.

Anotação	Nomina <i>m/z</i>	Pulmão	Coração	Fígado	Rim	Cérebro	Medula Espinal	Intestinos
N-acetil-aspartato	174			+		+	+	
Ácido ascórbico	175	+	+		+1	+3	+	+2
Hexosa (C6 açúcar)	179	+2	+3		+1	+	+	+1
N-acetil-glutamina	187	+	+3		+	+		+
Ácido palmitoleico (C16:1)	253	+	+	+3	+2	+2	+2	+3
Ácido Palmítico (C16:0)	255	+	+	+3	+3	+3	+2	+3
Ácido Linoleico (C18:2)	279	+	+	+3	+3	+2	+2	+3
Ácido Oleico (C18:1)	281	+2	+2	+2	+2	+2	+3	+2
Ácido Estearico (C18:0)	283			+1	+2	+3	+2	+2
Ácido Araquidônico (C20:4)	303			+	+2	+2	+	+2

Ácido Eicosatriênico (C20:3)	305	+	+	+2	+2	+3	+2	+3
Ácido docosaexaenoico - DHA (C22:6)	327	+	+	+3	+1	+2	+	+1
AG dímero	509			+3	+	+		+
AG dímero	535			+3	+1	+1		+1
AG dímero	537			+3	+	+		+
AG dímero	563			+3	+1	+1		+
AG dímero	611			+		+	+	+
PA(36:2)	699			+1		+		+2
PC(36:1) ou PE(40:4)	794	+1	+1	+1	+2	+3	+	+2
PC (32:0) ou PE (38:3)	768	+2	+2	+	+2	+2	+	+2
PE(40:3)	796	+1	+1	+1	+2	+2	+1	+2
PEp(34:1)	700			+		+	+	+3
PEp(36:2)	726							+2
PEp(36:4)	722							+1
PEp(38:4)	750	+	+		+	+	+	+
PEp(40:6)	774	+1	+1	+3	+2	+2	+1	+2
PG(34:1)	747			+	+	+	+	+
PG(40:6)	821	+	+	+3	+2	+3	+1	+1
PI(34:1)	835	+	+	+1	+1	+3	+2	+1
PI(36:4)	857			+1				+
PI(38:3)	887	+	+	+3	+1	+3	+3	+
PI(38:4)	885	+	+	+3	+2	+3	+1	+1
PS(34:1)	760	+	+	+1	+2	+3	+3	+
PS(36:1)	788	+2	+1	+1	+3	+2	+2	+3
PS(38:2)	814	+	+	+	+	+2	+2	+
PS(38:3)	812	+	+	+	+2	+3	+2	+
PS(38:4)	810	+	+	+1	+	+3	+2	+
PS(40:4)	838	+	+	+	+	+2	+1	+

PS(40:6)	834	+	+	+1		+3	+	
ST(22:0)	862	+	+	+2	+	+2	+2	+
ST(24:0)	890			+1		+	+	
ST(24:1)	888			+2	+	+1	+	+1
ST(26:1)	916			+				
ST(h18:0)	806	+	+	+1	+	+1	+	+
ST(h22:0)	878							+2
ST(h24:0)	906							+1
ST(h24:1)	904			+				
ST(h26:0)	934			+				
ST(h26:1)	932	+	+	+1	+	+	+	+

As **Figuras 3 e 4** representam imagens iônicas de lipídios selecionados na ordem em que são mencionados no texto. Intensidades de íons nas imagens são codificadas por cores. As intensidades são escalonadas em cada imagem iônica para otimizar o contraste e facilitar a comparação com a distribuição morfológica. Hexose, ácido palmitoleico (C16: 1), ácido palmítico (C16: 0), ácido linoleico (C18: 2), ácido oleico (C18: 1), ácido eicosatrienóico (C20: 3), DHA (C22: 6), PC (36: 1) / PE (40: 4), PC (32: 0) / PE (38: 3), PE (40: 3), PEp (40: 6), PG (40: 6), PI (34: 1), PI (38: 3), PI (38: 4), PS (34: 1), PS (36: 1), PS (38: 2), PS (38: 3), PS (38 : 4), PS (40: 4), PS (40: 6), ST (22: 0) e ST (h18: 0) foram detectados em todo o corpo, mas principalmente abundantes no fígado e sistema nervoso, como ilustrado **em Figura 3 e Tabela 1**. A distribuição de lipídios mostra abundâncias distintas e distribuições de acordo com o órgão ou sistema é descrito e discutido abaixo.

Figura 3. Imagens iônicas de lipídios selecionados distribuídos em todo o corpo do feto suíno com anotação putativa e valor m/z indicado. A abundância em cada imagem iônica é escalada independentemente usando a escala de cores do jato. Todos os íons são versões desprotonadas das moléculas $[M-H]^-$, exceto para lipídios PC, que foram detectados como modo de cloro $[M+Cl]^-$.

Composição Lipídica e Metabólica do Sistema Nervoso Fetal Suíno

O sistema nervoso, particularmente o cérebro, tem sido extensivamente estudado usando imagens de espectrometria de massa (DESI e MALDI). A composição lipídica do cérebro é diferente entre as espécies (36,37), mas é nominalmente consistente dentro de cada espécie. O sistema nervoso apresentou uma grande variedade de metabólitos, ácidos graxos como ácido palmitoleico (C16: 1), ácido palmítico (C16: 0), ácido linoleico (C18: 2), ácido oleico (C18: 1), ácido esteárico (C18: 0), ácido araquidônico (C20: 4), ácido eicosatrienico (C20: 3) e glicerofosfolípidios tais como PG (34: 1), PI (34: 1), PI (38: 3), PI (38: 4) PS (34: 1), PS (36: 1), PS (38: 2), PS (38: 3), PS (38: 4) e ST (22: 0). Esses lipídios também foram observados em outros órgãos, mas foram mais abundantes no cérebro e medula espinhal do sistema nervoso (**Figuras 3 e 4** e na **Tabela 1**). Alguns desses lipídeos, como ácido

araquidônico (C20: 4), ácido esteárico (C18: 0), PG (34: 1) e PS (36: 1), foram identificados por MALDI-MS por Burnum et al. (2009) (18) durante o implante uterino do embrião de camundongo. Esses autores correlacionaram a localização dos lipídios PI durante a implantação embrionária de camundongos com a diferenciação e proliferação de células no embrião de camundongo (rearranjo do citoesqueleto, tráfico de vesículas intracelulares). O feto suíno apresentou distribuição diferencial de lipídeos PI através dos diferentes órgãos, mas no geral esses lipídios foram abundantes no sistema nervoso e no fígado (**Tabela 1**). Girod et al. (2010) detectaram distribuição diferencial de PI (38: 4) e PS (36: 1) por DESI-MS nas áreas de cérebro branco e substância cinzenta e na medula espinal de ratos adultos. Com base na literatura e em nossos resultados, assumimos que lipídios específicos de PS e PI desempenham um papel fundamental na formação do sistema nervoso.

N-acetil-aspartato (m / z 174) foi mais abundante no sistema nervoso em comparação com os outros órgãos (Figura 4). O N-acetil-aspartato é a segunda molécula mais concentrada no cérebro após o aminoácido glutamato. (24) esse metabólito foi detectado no cérebro humano e no tecido cerebral murinho e pode ser usado como um biomarcador do tecido cerebral saudável quando se visualizam tumores cerebrais (24,39).

Diferenças na abundância de lipídios foram identificadas para o cérebro e medula espinal. O cérebro mostrou maior abundância do que a medula espinal para o ácido ascórbico (**Figura 4**), DHA (C22: 6), PC (36: 1) / PE (40: 4), PC (32: 0) / PE (38: 3), PE (40: 3), PEp (40: 6), PG (40: 6), PI (38: 4), PS (40: 4) e PS (40: 6) (**Figura 3**). Também os dímeros de FA (que normalmente se formam durante o processo de ionização DESI-MS) de m / z 509, m / z 535, m / z 537, m / z 563 e PA (36: 2) de m / z 699 (**Figura 4**) estavam visivelmente mais presentes no cérebro do que na medula espinal. No geral, o sistema nervoso mostrou alta abundância para seis dos sete lipídios PS observados, o que pode estar relacionado à apoptose neuronal, que é um mecanismo chave na organogênese cerebral (12,13). Especificamente, PS (38: 3) e PS (40:4) foram associados a tumores cerebrais humanos por Eberlin et al. (2013) (40) usando o DESI-MS e este é um achado interessante, uma vez que a tumorigênese do glioblastoma tem sido relacionada à desdiferenciação celular a estados embriológicos (41).

Figura 4: A primeira figura é uma micrografia H & E com números que indicam a localização do órgão: 1. Prosencéfalo, 2. Meneencéfalo, 3. Rombencéfalo, 4. Coração, 5. Rim, 6. Fígado 7. Pulmões, 8. Sistema Digestivo. As imagens iônicas selecionadas mostram a distribuição de ácidos graxos, metabólitos e lipídios específicos no corpo total do feto. * comentar em escala de cores e valores aqui se diferentes métodos usados antes.

Composição Lipídica e Metabólica de Sistema Cardiopulmonar Suíno

As hexoses eram mais evidentes no coração do que em outros órgãos e mal detectadas no fígado (**Figura 3**). A N-acetil-glutamina era notavelmente abundante no coração em comparação com qualquer outro órgão (**Figura 4**). A concentração de N-acetil-glutamina no tecido cardíaco pode estar relacionada à atividade enzimática da acetilquinase nesse órgão. A ausência desta enzima causa atrofia e fraqueza do músculo cardíaco (42). Até onde sabemos, esta é a primeira vez que se sabe que a N-acetil glutamina está concentrada no tecido cardíaco em desenvolvimento em comparação com outras partes do corpo.

Os compostos detectados no sistema cardiopulmonar foram ácidos ascórbico, palmítico (C16: 0), palmitoleico (C16: 1) linoleico (C18: 2), oleico (C18: 1), eicosatriônico

(C20: 3), DHA (C22: 6) (**Figuras 3 e 4**) no entanto, nenhum dímero de FA era evidente. Em comparação com os outros órgãos, menor variabilidade de PE, PI, PS e ST lipídios foram detectados no coração e nos pulmões (**Tabela 1**). Ácido esteárico, ácido araquidônico, PEP (34: 1), PEP (36: 2), PEP (36: 4), PG (34: 1), PI (36: 4), ST (24: 0), ST (24: 1), ST (26: 1), ST (h22: 0), ST (h24: 1) e ST (h26: 0) foram detectados na maioria dos órgãos, mas não no sistema cardiopulmonar (**Figura 4 e Tabela 1**). No geral, o lipídio de maior abundância para os pulmões foi PS (36: 1) e PC (32: 0) / PE (38: 3) (**Figura 3**). Alguns dos lipídios presentes nos pulmões poderiam se relacionar com o surfactante pulmonar que começa a ser sintetizado nessa época de desenvolvimento fetal. Especificamente PS é importante para a maturação pulmonar e para evitar o colapso dos alvéolos na expiração (43,44). Segundo Sozo et al. (2017) (45), o surfactante pulmonar é composto principalmente de fosfolipídios como PC (32: 0), PC (36: 1), PI (34: 1), PI (38: 3), PS (36: 1) e PS (40: 6). Assim, exceto PI (34: 1) e PS (40: 6), todos esses lipídios foram detectados nos pulmões fetais de suínos. Curiosamente, os surfactantes suínos e humanos apresentam composições similares e esse fato permitiu o uso de surfactante suíno para o tratamento da doença da membrana hialina em recém-nascidos pré-termo (46-48).

Composição Lipídica e Metabólica do Sistema Gastrointestinal e Urinário do Feto Suíno

O fígado mostrou especificamente as maiores abundâncias no corpo fetal dos dímeros FA de m / z 509, m / z 535, m / z 537 e m / z 611, bem como PA (36: 2), ST (22: 0), ST (24: 0), ST (26: 1), ST (h24: 1) e ST (h26: 0) (**Figuras 3 e 4**). O fígado também apresentou alta abundância de vários AGL, como ácido palmitoleico (C16: 1), ácido oleico (C18: 1), ácido linoléico (C18: 2) e glicerofosfolipídeos, como PI (34: 1), PI (38: 3), PI (38: 4) e ST (24: 1), todos também localizados em outros órgãos (**Figura 3 e 4**). Como mencionado anteriormente, a hexose mal foi detectada no fígado. Alguns desses lipídios, como PI (34: 1), PI (38: 4) e PA (36: 2) também foram detectados em oócitos de suínos por DESI-MS (21).

Observou-se que os intestinos tinham sinal abundante para ácido ascórbico m / z 175, palmítico (C16: 0), palmitoleico (C16: 1), esteárico (C18: 0), oleico (C18: 1), linoleico (C18: 2), ácido esteárico (C18: 1), araquidônico (C20: 3) e eicosatrienoico (C20: 4) (**Figuras 3 e 4**). Os intestinos eram únicos para PEP (36: 2), PEP (36: 4) e ST (h22: 0) (**Figura 4**). PI (36: 4) também foi detectado nos intestinos, mas ausente no sistema renal. Especificamente, (49) Inglese et al. (2017) identificaram PG (40: 6) a m / z 821 e PI (38: 4) a m / z 885 em biópsia de adenocarcinoma colo-retal humano por 3D-DESI-MS.

Todos os AGL foram detectados nos rins com alta abundância de íons. Glicerofosfolipídios como PG (40: 6), PI (34: 1), PI (38: 3), PI (38: 4), PS (34: 1) e PS (36: 1) (**Figura 3**) também detectado nos rins. (20) Dill e colaboradores (2010) mapearam PI (38: 4) e PS (36: 1) em carcinomas de células renais humanos. (50) Pirro et al. (2012) relataram a presença de PI (38: 4) e PS (36: 1) como marcadores de câncer em bexiga humana, rim, células germinativas e câncer de próstata. Não fomos capazes de observar glândulas suprarrenais totalmente desenvolvidas em fetos suínos, mas os lipídios observados também foram identificados com alta abundância nas glândulas suprarrenais adultas de suínos (51) Wu et al. (2010) usando DESI-MS. Outros lipídios como o PI (34: 1), PG (34: 1) foram associados a carcinomas de células humanas por (52) Woolman et al. (2013) usando DESI-MS.

Imagens tridimensionais de DESI-MS do suíno fetal

A distribuição volumétrica 3D, incluindo (45) cortes de tecido, imagens 2D de um dos fetos suínos (**Figura 5**) mostra a localização do dímero FA de C16: 0 e C18: 1, de m/z 537 e PS (36: 1) de m/z 788. O uso de resolução lateral para os experimentos de imagem do DESI-MS foi de 300 μ m, o que permitiu que a maioria dos órgãos fosse evidente, mantendo um tempo razoável de aquisição de dados de 3h para as maiores imagens 2D do corpo inteiro. Como observado nas imagens 2D, para o modelo 3D, maiores abundâncias de íons para o dímero FA foram encontradas no fígado e massa proencefálica (diencéfalo e telencéfalo) do sistema nervoso, bem como nos intestinos, enquanto o PS (36:1) é distribuído volumetricamente por todo o corpo, exceto os intestinos. A criação de imagens 3D a partir das imagens 2D DESI ilustra o poder da imagem MS para estudos morfológicos e de desenvolvimento, fornecendo mapeamento químico complementar completo. Em comparação com as imagens 2D, a visualização 3D fornece informações sobre como a distribuição composta é alterada sobre o volume do corpo. Exemplos de reconstrução 3D de imagens 2D por dados DESI-MS são mostrados por (29,53) Eberlin et al. (2010) e Xiong et al. (2012) para cérebro de camundongo. (26) Dueñas et al. (2017) relataram imagens 3D de peixe-zebra por MALDI-MS.

Figura 5. Imagens de espectrometria de massa 3D de dímero C18: 1 e C16: 0 FA (m/z 537) PS (36: 1) de m/z 788 geradas pelo alinhamento de imagens de íons 2D de 45 cortes de tecido para ilustrar a distribuição dessas moléculas no feto inteiro. Estas imagens foram obtidas usando o pacote de software descrito anteriormente (29)..

Conclusão

Pequenas moléculas detectadas pelo DESI-MS em cortes de tecido de fetos suínos inteiros demonstraram a distribuição lipídica nos órgãos, onde foram observadas: N-acetilglutamina no coração; ST (ht22: 0) nos intestinos; dímeros de FA e PA (36: 2) no fígado; e um número de lipídios PS no sistema nervoso. É intrigante que, diversos lipídios de sinalização, que foram relatados na literatura ao investigar a metabólica de tumores cerebrais e renais por DESI-MS, também tenham sido encontrados nos órgãos em desenvolvimento do feto suíno. As informações químicas fornecidas pela imagem do DESI-MS refletem a fisiologia e adicionam informações complementares aos estudos anatômicos. Em combinação, a capacidade do DESI-MS e a análise morfológica para explorar e entender os processos de desenvolvimento, parece ser imensa.

Referências

1. Bendixen, E., Danielsen, M., Larsen, K. & Bendixen, C. Advances in porcine genomics and proteomics-a toolbox for developing the pig as a model organism for

- molecular biomedical research. *Briefings Funct. Genomics Proteomics* **9**, 208–219 (2010).
2. Falasca, M. *et al.* The role of phosphoinositide 3-kinase C2 α in insulin signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 28226–28236 (2007).
 3. van der Veen, J.N., Lingrell, S., and Vance, D. E. The membrane lipid phosphatidylcholine is an unexpected source of triacylglycerol in the liver. *J Biol Chem* **287**, 23418–23426 (2012).
 4. Lloyd-Evans, E. *et al.* Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat. Med.* **14**, 1247–1255 (2008).
 5. Choudhury, A. *et al.* Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J. Clin. Invest.* **109**, 1541–1550 (2002).
 6. Brady, R. O., Johnson, W. G. & Uhlendorf, B. W. Identification of heterozygous carriers of lipid storage diseases. *Am. J. Med.* **51**, 423–431 (1971).
 7. Steenbergen, R. *et al.* Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. *J. Biol. Chem.* **280**, 40032–40040 (2005).
 8. Wang, L., Magdaleno, S., Tabas, I. & Jackowski, S. Early embryonic lethality in mice with targeted deletion of the CTP: phosphocholine cytidyltransferase α gene (Pcytl1a). *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3357–3363 (2005).
 9. Wu, G., Aoyama, C., Young, S. G. & Vance, D. E. Early embryonic lethality caused by disruption of the gene for choline kinase α , the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 1456–1462 (2008).
 10. Merolli, A. & Santin, M. Role of phosphatidyl-serine in bone repair and its technological exploitation. *Molecules* **14**, 5367–5381 (2009).
 11. Ross, I. A. *et al.* Free fatty acids profile of the fetal brain and the plasma, liver, brain and kidneys of pregnant rats treated with sodium arsenite at mid-organogenesis. *Toxicol. Ind. Health* **26**, 657–666 (2010).

12. Lo Vasco, V. R. Phosphoinositide pathway and the signal transduction network in neural development. *Neurosci. Bull.* **28**, 789–800 (2012).
13. Zurashvili, T. *et al.* Interaction of PDK1 with Phosphoinositides Is Essential for Neuronal Differentiation but Dispensable for Neuronal Survival. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 1027–1040 (2013).
14. Wiseman JM, Ifa DR, Song Q, C. R. Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 7188–92 (2006).
15. Wu C, Dill AL, Eberlin LS, Cooks RG, I. D. Mass spectrometry imaging under ambient conditions. *Mass Spectrom Rev* **32**, 218–43 (2013).
16. Eberlin, L. S., Ferreira, C. R., Dill, A. L., Ifa, D. R. & Cooks, G. R. Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Lipid Characterization and Biological Tissue Imaging. *Biochem Biophys Acta* **1811**, 946–960 (2011).
17. Eberlin LS, Ferreira CR, Dill AL, Ifa DR, Cheng L, C. R. Nondestructive, histologically compatible tissue imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chembiochem.* **12**, 2129–32. (2011).
18. Burnum, K. E. *et al.* Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation. *J. Lipid Res.* **50**, 2290–2298 (2009).
19. Laskowski, D., Andersson, G., Humblot, P., Sirard, M.A., Sjunnesson, Y., Ferreira, C.R., Pirro, V., and Båge, R. V., and Båge, R. Lipid profile of bovine blastocysts exposed to insulin during in vitro oocyte maturation. *Reprod Fertil Dev. doi* **10.**, 1071/RD17248. (2018).
20. Dill, A. L. *et al.* Multivariate statistical differentiation of renal cell carcinomas based on lipidomic analysis by ambient ionization imaging mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 2969–2978 (2010).
21. Pirro, V. *et al.* Lipid characterization of individual porcine oocytes by dual mode DESI-MS and data fusion. *Anal. Chim. Acta* **848**, 51–60 (2014).
22. Onjiko, R.M., Moody, S.A., and Nemes, P. Single-cell mass spectrometry reveals

- small molecules that affect cell fates in the 16-cell embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112**., 6545–50 (2015).
23. Gonçalves, R. F. *et al.* Analysis and characterisation of bovine oocyte and embryo biomarkers by matrix-assisted desorption ionisation mass spectrometry imaging. *Reprod. Fertil. Dev.* **28**, 293–301 (2016).
 24. Jarmusch, A. K. *et al.* Lipid and metabolite profiles of human brain tumors by desorption electrospray ionization-MS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 1486–1491 (2016).
 25. Onjiko, R.M., Morris, S.E., Moody, S.A., and Nemes, P. Single-cell mass spectrometry with multi-solvent extraction identifies metabolic differences between left and right blastomeres in the 8-cell frog (*Xenopus*) embryo. *Analyst*. **141**., 3648–56. (2016).
 26. Dueñas, M. E., Essner, J. J. & Lee, Y. J. 3D MALDI Mass Spectrometry Imaging of a Single Cell: Spatial Mapping of Lipids in the Embryonic Development of Zebrafish. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
 27. Onjiko, R.M., Plotnick, D.O., Moody, S.A., and Nemes, P. Metabolic Comparison of Dorsal versus Ventral Cells Directly in the Live 8-cell Frog Embryo by Microprobe Single-cell CE-ESI-MS. *Anal Methods*. **9**., 4964–4970 (2017).
 28. Perez, J. C., Tata, A., de Campos, M. L., Peng, C., Ifa, D. R. Monitoring Toxic Ionic Liquids in Zebrafish (*Danio rerio*) with Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging (DESI-MSI). *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **28**, 1136–1148. (2016).
 29. Xiong, X. *et al.* Data processing for 3D mass spectrometry imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. **23**, 1147–1156 (2012).
 30. Köfeler, H. C., Fauland, A., Rechberger, G. N. & Trötz Müller, M. Mass spectrometry based lipidomics: An overview of technological platforms. *Metabolites* **2**, 19–38 (2012).
 31. Muro, E., Atilla-Gokcumen, G. E. & Eggert, U. S. Lipids in cell biology: how can we understand them better? *Mol. Biol. Cell* **25**, 1819–1823 (2014).
 32. Eberlin, L. S., Ferreira, C. R., Cooks, R. G., Lafayette, W. & Ms, D.-. Three- -

- Dimensional Chemical Imaging of a Whole Swine Fetus Using Desorption Ionization Mass Spectrometry 3D Chemical Models. 47907 (2011).
33. Evans, H. E. & Sack, W. O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. *Anat. Histol. Embryol.* **2**, 11–45 (1973).
 34. Hyttel, P., Sinowats, F. and Vejlsted, M. *Essential of Domestic Animal Embryologi, Jornual of Chemical information and Modeling.* (2013).
 35. Pirro, V., Guffey, S.C., Sepúlveda, M.S., Mahapatra, C.T., Ferreira, C.R., Jarmusch, A.K., and Cooks, R. G. Lipid dynamics in zebrafish embryonic development observed by DESI-MS imaging and nanoelectrospray-MS. *Mol Biosyst.* **12**., 2069–79. (2016).
 36. Chirkovskaia EV, Pomazanskaia LF, K. V. Comparative study of phospholipids in the neurons and glial cells of the brains of mammals, birds and reptiles. *Zh Evol Biokhim Fiziol.* **14**, 225–9. (1978).
 37. Pomazanskaia LF, K. V. Comparative study of the fatty acid makeup of the neuronal and glial cell phospholipids in the brain of reptiles, birds and mammals. *Zh Evol Biokhim Fiziol* **14**, 327–33. (1978).
 38. Girod, M., Shi, Y., Cheng, Y.J., Cooks, R. G. Desorption Electrospray Ionization Imaging Mass Spectrometry of Lipids in Rat Spinal Cord. *J Am Soc Mass Spectrom.* **21**., 1177–89. (2010).
 39. Marcucci F, M. E. A method for the gas-chromatographic analysis of N-acetyl-aspartic acid in brain. *J Chromatogr.* **25**, 11–4 (1966).
 40. Eberlin, L.S., Norton, I., Orringer, D., Dunn, I.F., Liu, X., Ide, J., Jarmusch, A. K., Ligon, K. L., Jolesz, F. A., Golby, A. J., Santagata, S., Agar, N. Y. R., and Cooks, R. G. Ambient mass spectrometry for the intraoperative molecular diagnosis of human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**., 161 (2013).
 41. Zong, H. & Verhaak, Roel GW; Canoll, P. The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. **6**, 247–253 (2009).
 42. Sher, R. B. *et al.* A rostrocaudal muscular dystrophy caused by a defect in choline kinase beta, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **281**,

- 4938–4948 (2006).
43. Batenburg, J.J., Klazinga, W., and Van Golde, L. M. Regulation of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol synthesis in alveolar type II cells isolated from adult rat lung. *FEBS Lett.* **147**, 171–4 (1982).
 44. Hallman, M., Slivka, S., Wozniak, P., and Sills, J. Perinatal Development of Myoinositol Uptake into Lung Cells : Surfactant Phosphatidylglycerol and Phosphatidylinositol. *Synth. Rabbit.* **20**, 179–185. (2002).
 45. Sozo, F., Ishak, N., Bhatia, R., Davis, P. G. & Harding, R. Surfactant phospholipid composition of gastric aspirate samples differs between male and female very preterm infants. *Pediatr. Res.* **82**, 839–849 (2017).
 46. Acosta Díaz, R., Arronte Millo, J. & Cabrera Domínguez, N. Evaluación del surfacén en el síndrome de dificultad respiratoria del prematuro. *Rev. Cubana Pediatr.* **72**, 287–294 (2000).
 47. Freddi, N. A., Proença Filho, J. O. P. & Fiori, H. H. Terapia com surfactante pulmonar exógeno em pediatria. *J. Pediatr. (Rio. J).* **79**, S205–S212 (2003).
 48. Sánchez-Mendiola, M., Martínez-Natera, O. C., Herrera-Maldonado, N. & Ortega-Arroyo, J. Estudio controlado del tratamiento de la enfermedad de membrana hialina del recién nacido pretérmino con surfactante pulmonar exógeno (porcino vs. bovino). *Gac. Med. Mex.* **141**, 267–271 (2005).
 49. Inglese, P. *et al.* Deep learning and 3D-DESI imaging reveal the hidden metabolic heterogeneity of cancer. *Chem. Sci.* **8**, 3500–3511 (2017).
 50. Pirro, V., Eberlin, L. S., Oliveri, P. & Cooks, R. G. Interactive hyperspectral approach for exploring and interpreting DESI-MS images of cancerous and normal tissue sections. *Analyst* **137**, 2374–2380 (2012).
 51. Wu, C., Ifa, D. R., Manicke, N. E. & Cooks, R. G. Molecular imaging of adrenal gland by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* **135**, 28–32 (2010).
 52. Woolman, M., Tata, A., Dara, D., Meens, J., D’Arcangelo, E., Perez, C.J., Saiyara, Prova, S., Bluemke, E., Ginsberg, H.J., Ifa, D., McGuigan, A., Ailles, L., and Zarrine-Afsar, A. Rapid determination of the tumour stroma ratio in squamous cell carcinomas

with desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS): a proof-of-concept demonstration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, 1611–1616. (2013).

53. Eberlin, L.S., Ifa, D.R., Wu, C., and Cooks, R. G. Three-dimensional visualization of mouse brain by lipid analysis using ambient ionization mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl.* **49**, 873–6. (2010).

Material Suplementar do artigo

Figura 1S. Quarenta e cinco imagens de íons sobrepostas em 2D usadas para criar um modelo 3D do feto de porco.

Figura 2S: Microscopia de luz do feto suíno com 50 dias de gestação. [A]: ossificação dos ossos do crânio (sb), que é circundada por tecido mesenquimal (mt). **[B-D]:** durante a ossificação dos corpos vertebrais (vb), os condroblastos arredondados em forma com núcleos centrais foram identificados. O mesênquima foi ricamente vascularizado pelos vasos sanguíneos (bv). **[E e F]:** olho. Nota: humor vítreo (vh), lente (l), saco conjuntival (cs), córnea (c), retina (r) e camada pigmentada da retina (pr).

Figura 3S: Microscopia de luz do feto suíno com 50 dias de gestação. [A e B] câmara ventricular (vc) e [C] câmara atrial (ac). Observe o endocárdio (en), miocárdio (mi) e pericárdio (pe). [D]: Numerosos bronquíolos (br) e estruturas alveolares (al) foram apresentados no parênquima pulmonar. [E e F]: o estômago em desenvolvimento mostrou as camadas típicas do trato gastrointestinal: mucosa (mc), lâmina própria (lp), muscular (m) e serosa (s). Além disso, observe a relação do estômago e do fígado (li). ve = veia. [G]: Hepatoblastos (seta) dispersos no parênquima hepático. [H]: rim mostrando túbulos contorcidos proximais (pct) e distais (dct).

Tabela 1S. A tabela mostra dados de EM de alta resolução (medidas foram feitas a partir de manchas individuais no tecido) com a correspondente fórmula molecular prevista, erro em

ppm (delta ppm) e atribuição de ácidos graxos e fosfolipídios detectados no modo de íon negativo.

Ion	High mass res.	System	Ion Molecular formula	Delta ppm	Attribution
303.58	303.23209	Nervous	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	-2.848	C20:4 (arachidonic acid)
305.67	305.24757		C ₂₀ H ₃₃ O ₂	-3.386	C20:3 (eicosatrienoic acid)
810.52	810.52678		C ₄₄ H ₇₇ O ₁₀ NP	-2.810	PS (38:4)
812.52	812.54265		C ₄₄ H ₇₉ O ₁₀ NP	-2.532	PS (38:3)
834.52	834.52706		C ₄₆ H ₇₇ O ₁₀ NP	-2.393	PS (40:6)
838.51	838.55827		C ₄₆ H ₈₁ O ₁₀ NP	-2.489	PS (40:4)
281.67	281.24764	Digestive	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	-3.426	C18:1 (oleic acid)
509.25	509.45580		C ₃₂ H ₆₁ O ₄	-3.403	FA dimer
535.26	535.47139		C ₃₄ H ₆₃ O ₄	-3.350	FA dimer
537.26	537.48701		C ₃₄ H ₆₅ O ₄	-3.393	FA dimer
563.25	563.50259		C ₃₆ H ₆₇ O ₄	-3.361	FA dimer
887.65	887.56368*		C ₄₇ H ₈₄ O ₁₃ P	-2.053	PI (38:3)
179.42	179.05529	Circulatory	C ₆ H ₁₁ O ₆	-4.558	C6 sugar
187.33	187.07122		C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₄	-6.469	N-Acetyl-L-Glutamine

Fonte: Artigo original.

6. Considerações gerais

A utilização de várias tecnologias na descrição do desenvolvimento embrionário e fetal dos cães, permitiu: caracterizar estruturas de forma completa, gerar novos dados na determinação da idade gestacional, tanto pela descrição morfológica como pela mineralização óssea, vincular a presença dos grupos lipídicos com processos de contração miocárdica e desmonstrar a formação de surfactante pulmonar e trânsito de metabólitos das células epiteliais, o que conjuntamente com a revisão de literatura, pôde-se concluir que os lipídios participam indistintamente na biologia do desenvolvimento, ocupando funções de sinalização, transporte e suporte celular durante a formação dos mamíferos. Além disso, foi desmonstrada as distribuições específicas em alguns órgãos, como: N-acetilglutamina no coração; ST (ht22: 0) nos intestinos; AG dímeros no fígado; e um amplo número de lipídios PS no sistema nervoso. Concluindo, a modo geral, que existe grande variabilidade na interação do papel dos lipídios com o desenvolvimento embrionário.

Referências

BATENBURG, J.J., KLAZINGA, W., AND VAN GOLDE, L. M. Regulation of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol synthesis in alveolar type II cells isolated from adult rat lung. FEBS letters, v. 147, n. 2, p. 171–4, 1982.

BENDIXEN, E.; DANIELSEN, M.; LARSEN, K.; BENDIXEN, C. Advances in porcine genomics and proteomics-a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular

biomedical research. Briefings in Functional Genomics and Proteomics, v. 9, n. 3, p. 208–219, 2010.

HYTTEL, P., SINOWATS, F. AND VEJLSTED, M. Essential of Domestic Animal Embryologi, Jornual of Chemical information and Modeling. [s.l: s.n.]

KERSTIN L.T, CLAIRE M.W, T. S. . (2005) ‘Genome sequence, comparative analy an haplotype structure of the dog.’, Natura, 7069(803–819).

KNOSPE, C. Periods and stages of the prenatal development of the domestic cat. Anatomia, Histologia, Embryologia, v. 31, n. 1, p. 37–51, 2002.

LINDBLAND-TOH, C.M WADE, T.S MIKKELSEN, , E.K KARLSSON, D.B JAFFE, M. KAMAL, E. . L. (2005) ‘Genome sequence, comparative analysis and haplotype strecture of the domestic dog.’, Natura, 463, pp. 803–819.

MARTÍNEZ, F.; ESPINOSA-GARCÍA, M. T.; MALDONADO, G.; URIBE, A.; FLORES, Ó.; MILÁN, R.; GARCÍA, C. En colesterol es esencial en el desarrollo embrionario y en el crecimiento celular. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM, v. 44, n. 4, p. 168–176, 2001.

MARTINS, A. A. *et al.* (2016) ‘Development of the cardiorespiratory system in dogs from days 16 to 46 of pregnancy’, *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 51(5), pp. 804–812. doi: 10.1111/rda.12759

MEROLLI, A.; SANTIN, M. Role of phosphatidyl-serine in bone repair and its technological exploitation. Molecules, v. 14, n. 12, p. 5367–5381, 2009.

MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. dos S.; WENCESLAU, C. V.; PFARRER, C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. Theriogenology, v. 66, n. 6–7, p. 1699–1702, 2006.

MOORE, K.L, PERSAUD, V. (2007) ‘Embriologia clinica’, *Elseiver*, p. 536.

NODEN, D.M., LAHUNTA, A. (2001) *The embryology of domestic animals, Development*

PERESS, N. S.; ANDERSON, H. C.; SAJDERA, S. W. The lipids of matrix vesicles from bovine fetal epiphyseal cartilage. Calcified Tissue Research, v. 14, n. 1, p. 275–281, 1974.

PIERI, N.; SOUZA, a F.; CASALS, J. B.; ROBALLO, K.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S. Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs and Cats. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, v. 50, n. 4, p. 625–31, 2015.

SCHNEIDER, M. R.; WOLF, E.; BRAUN, J.; KOLB, H. J.; ADLER, H. Canine embryo-derived stem cells and models for human diseases. *Human Molecular Genetics*, v. 17, n. R1, p. 42–47, 2008.

SUDANO, M. J. et al. (2016) ‘Lipidome signatures in early bovine embryo development’, *Theriogenology*. Elsevier Inc, 86(2), pp. 472–484. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.03.025.

VANCE, D. E. AND VANCE, J. E. (2009) ‘Physiological

VANCE, D. E.; VANCE, J. E. Physiological consequences of disruption of mammalian phospholipid biosynthetic genes. *Journal of Lipid Research*, v. 50, n. Supplement, p. S132–S137, 2009. Disponível em: <<http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R800048-JLR200>>.

ZURASHVILI, T.; CORDON-BARRIS, L.; RUIZ-BABOT, G.; ZHOU, X.; LIZCANO, J. M.; GOMEZ, N.; GIMENEZ-LLORT, L.; BAYASCAS, J. R. Interaction of PDK1 with Phosphoinositides Is Essential for Neuronal Differentiation but Dispensable for Neuronal Survival. *Molecular and Cellular Biology*, v. 33, n. 5, p. 1027–1040, 2013. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01052-12>>.