

ANÁLISE MACROSCÓPICA DO ESTÁGIO DE OSSIFICAÇÃO DO GAMBÁ (*DIDELPHIS SP.*) EM DIFERENTES ESTÁGIOS FETAIS ATRAVÉS DA DIAFANIZAÇÃO E DO EXAME RADIOGRÁFICO

FERNANDA FIGUEIREDO GARCIA¹, CELINA ALMEIDA FURLANETTO MANÇANARES², MARIA ANGÉLICA MIGLINO³, CARLOS EDUARDO AMBRÓSIO², JEFFERSON DOUGLAS SOARES ALVES², RICARDO ALEXANDRE ROSA⁴, ANA FLÁVIA DE CARVALHO²

- 1- Graduanda do curso de Medicina Veterinária UNIFEOP, São João da Boa Vista/SP
- 2- Professor do curso de Medicina Veterinária UNIFEOP, São João da Boa Vista/SP
- 3- Professor Titular – Universidade de São Paulo-FMVZ-USP, São Paulo/SP
- 4- Técnico laboratorial UNIFEOP, São João da Boa Vista/SP

RESUMO: Os gambás (*Didelphis sp.*) são marsupiais que possuem um período de gestação muito curto, portanto, suas proles nascem imaturas e terminarão seu desenvolvimento no marsúpio da mãe. Por serem muito precoces em seu desenvolvimento, no estágio fetal desses animais, eles já possuem um crescimento prematuro dos seus órgãos e tecidos como um todo. O objetivo deste trabalho foi descrever os estágios de ossificação dos fetos de gambá (*Didelphis sp.*) em diferentes fases do pós-natal, através da diafanização e do exame radiográfico. Foi utilizado um animal de cada idade (5 dias, 15 dias, 22 dias e 35 dias) para a verificação da ossificação e conseqüente comparação com outras espécies domésticas. Os resultados indicam uma prematura ossificação da espécie em estágio fetal, diferentemente dos animais domésticos.

PALAVRAS-CHAVE: marsupial, ossificação, gambá

INTRODUÇÃO

Marsupiais são vivíparos, porém diferentes dos eutérios (placentários). Embora se forme uma placenta (cório-vitelina) com saco vitelino, a gestação é muito breve (média entre 12 a 13 dias) e as proles nascem em uma condição extremamente imaturas (o recém nascido do *Didelphis virginiana* mede 12,5 mm de comprimento e pesa 0,13g), portanto a mãe os mantém no marsúpio onde os amamentam e permitem a continuação de seu desenvolvimento, pode-se dizer até que os marsupiais trocam a placenta pelo teto da mãe (CURTIS *et al.*, 2000; BEHRINGER *et al.*, 2006; HULSEY *et al.*, 1975).

Os marsupiais apresentam características que lhes fazem modelos ideais para estudar o desenvolvimento. São diferentes dos mamíferos eutérios em sua modalidade da reprodução e de sua dependência maior do teto e da glândula mamária do que da placenta para o desenvolvimento. Nasce um jovem altricial que termina seu desenvolvimento quando unido fortemente a um teto, geralmente dentro do marsúpio. O neonato marsupial tem os sistemas circulatório, digestivo e respiratório bem desenvolvidos, porém as gônadas e genitálias ainda são indiferenciadas (RENFREE *et al.*, 2001).

Para lidar com este prematuro nascimento, os marsupiais neonatos são também precoces para certos aspectos do seu desenvolvimento. Por exemplo, eles têm um suficiente desenvolvimento neuromuscular nos braços e nos ombros para conseguirem mover-se até os tetos da mãe. Eles também podem respirar e realizar a digestão do leite (GARCIA *et al.*, 2007).

HULSEY *et al.* (1975) publicaram que, o mais velho mamífero existente nativo das Américas, o gambá, tem mudado pouco durante os últimos 80 milhões de anos. Não só o físico, mas também os aspectos comportamentais do gambá atestam para a origem primitiva. O gambá tem sido estudado extensamente em consideração a anatomia, embriologia e fisiologia assim como hábitos de vida e o nicho que ocupa em relação a outros animais.

ALMEIDA (1999) descreveu que a placenta a qual é formada nos marsupiais, chama-se cório vitelina, sendo o mais primitivo tipo de placenta. A diversidade nas espécies animais influencia na variabilidade do período gestacional, além disso, o número de filhotes geralmente está associado também à variabilidade do período de gestação, de modo que, quanto maior o número de indivíduos, menor o tempo de gestação.

GONÇALVES (2005) relatou que Didelphidae é uma família muito importante dentre os marsupiais, pois além de conter muitas espécies, representa o modelo do grupo marsupial. Ancestrais marsupiais, do período Cretáceo, apresentavam características morfológicas muito parecidas às dos gambás neotropicais de hoje. Por isso suas adaptações reprodutivas são consideradas diretamente relacionadas a marsupiais primitivos, e tal semelhança é de grande interesse para o estudo comparativo de sua biologia reprodutiva.

O começo da organogênese do gambá *Didelphis virginiana* ocorre durante os últimos três dias de gestação. Durante este período de três dias, a organogênese do embrião em formação prossegue em uma taxa surpreendente, resultando em um feto viável e capaz de sobreviver no ambiente externo e de migrar independente para a bolsa. Os membros torácicos estão presentes como brotos durante o começo do décimo dia pré-natal, a flexura cervical ocorre na região da cabeça em formação, e um coração em desenvolvimento é claramente visível. No contraste à região cranial ou da cabeça, a metade caudal do dorso do gambá tem aparência alongada e lisa e não exhibe nenhuma evidência externa sugestiva de desenvolvimento dos membros pélvicos. No décimo dia os brotos dos membros pélvicos em formação são visíveis pela primeira vez. O focinho, a boca, e a língua tornam-se bem definidos durante o 11º dia pré-natal e pelo 12º dia pré-natal, os dígitos dos membros torácicos possuem garras decíduas. No contraste, os membros pélvicos são como “pás” na estrutura e mostram somente os estágios iniciais da formação dos dígitos na hora do nascimento (GARCIA *et al.*, 2007).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a identificação das características macroscópicas da ossificação dos fetos de *Didelphis sp.* em diferentes fases no desenvolvimento pós-natal, foram utilizados 4 animais de diferentes idades. Estes animais já estavam mortos e fixados em formaldeído a 10% em solução aquosa. A idade estimada dos fetos foi calculada segundo dados relacionados ao Snout-rump (SR) (CUTTS *et al.*, 1978). Um animal de cada idade (5 dias, 15 dias, 22 dias e 35 dias) foi designado para diafanização segundo o método de Dingerkus (modificado) onde segue o protocolo: Os animais estavam fixados em formaldeído a 10%, seus órgãos internos, a pele e o tecido adiposo foram retirados e assim permaneceram na água destilada por 72 horas (sendo que esta foi trocada a cada 24 horas). Os animais foram colocados em uma solução de 10 mg de corante Alcian blue, 80 ml de álcool etílico 95% e 20 ml de ácido acético glacial, depois de colocado o ácido, os animais permaneceram refrigerados por 48 horas, assim, foram transferidos para o álcool etílico 95%. O álcool foi trocado três vezes por dia durante três dias. Os fetos foram submetidos a uma reidratação alcoólica, assim, passados para o álcool 90%, em seguida 80%, depois 70%, 40%, 15% e finalmente para a água destilada. As peças foram mudadas de solução cada vez que afundavam. Quando os fetos pararam de ficar imersos na parte superior do recipiente, ou seja, somente afundavam, foram colocados em uma solução saturada de 30 ml de borato de sódio e 70 ml de água destilada durante 72 horas. As peças foram transferidas para uma solução de 5 gramas de hidróxido de potássio, 100 ml de água destilada e 5mg do corante Alizarina Red. Os fetos permaneceram nesta solução durante cinco horas e depois foram transferidos para uma solução de glicerina e água destilada, sendo que a primeira solução tinha a proporção de glicerina-água (1:3), a segunda solução utilizada tinha a proporção (1:1), a terceira (3:1) e por último, glicerina pura. As peças foram mudadas de solução cada vez que afundavam e por último estocadas em glicerina pura com cristais de timol. Resultado: regiões coradas em vermelho (pontos de ossificação) e regiões coradas em azul (cartilagem). Juntamente com esta técnica, um animal de cada grupo foi destinado ao exame radiográfico, exceto o animal de 5 dias de idade, o qual não possuía tecidos ósseos suficientes para a realização do exame radiográfico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ANÁLISE DO ESTÁGIO DE OSSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS ATRAVÉS DA RADIOGRAFIA

A primeira técnica utilizada foi a radiografia, onde imagens de uma tonalidade mais radiopaca representa a ossificação (TICER, 1984).

Em vista ventro-dorsal, o animal de 35 dias apresentou a região da cabeça, coluna e parte proximal da cauda em tonalidade radiopaca. O restante do corpo apareceu com discreta radiopacidade. O animal de 22 dias apresentou a região da cabeça e coluna em tonalidade radiopaca, o restante do corpo quase não demonstrou ossificação. O feto de 15 dias mostrou somente a região da cabeça em tonalidade mais radiopaca na posição ventro-dorsal. O

restante do corpo não demonstrou indícios de ossificação. No feto de 5 dias não foi possível a realização da radiografia, pois os recém-nascidos não apresentaram tecidos ósseos suficientes para a realização do exame radiográfico.

Em uma vista lateral, o jovem marsupial de 35 dias apresentou maior radiopacidade em região da cabeça, dentes, coluna vertebral e parte proximal dos membros. O animal de 22 dias apresenta uma radiopacidade diminuída devido a uma maior quantidade de tecido cartilaginoso. Em vista lateral, a região de cabeça e coluna representa uma radiopacidade marcante. No marsupial de 15 dias, a radiopacidade diminui, pois o animal apresenta uma quantidade maior de tecido cartilaginoso. Temos a presença de uma tonalidade cinza escura correspondente aos tecidos moles e uma discreta radiopacidade das vértebras.

ANÁLISE DO ESTÁGIO DE OSSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS ATRAVÉS DA DIAFANIZAÇÃO

A segunda técnica realizada foi a de diafanização segundo o método de Dingerkus (modificado), o qual utiliza os corantes Alcian blue (azul) para colorir as cartilagens e Alizarina (vermelho) para colorir os centros de ossificação.

Quanto à diafanização, o feto de 35 dias apresentou a maior parte de seu corpo corado de vermelho, isto indica que nesta fase o animal já mostra a cabeça, a coluna e os membros em início de ossificação. A região da cartilagem xifóide se mostrou em coloração azul, isto indica que esta região permanece em estágio de desenvolvimento.

O jovem gambá de 22 dias mostrou certas regiões em coloração azul, como a região do focinho, falange proximal, média e distal dos membros pélvicos e início da cauda. Isto indica que as regiões citadas não começaram seu estágio de ossificação. Ao contrário das costelas, ossos longos e coluna as quais apresentaram indícios de ossificação pela coloração vermelha.

O feto de 15 dias mostrou certas regiões em coloração azul, como a região da cartilagem xifóide e início da cauda. Isto indica que as regiões citadas não começaram seu estágio de ossificação. Ao contrário das costelas, ossos longos, coluna e escápula, as quais apresentaram indícios de ossificação pela coloração vermelha.

O feto de 5 dias apresentou macroscopicamente todas as regiões do corpo em coloração azul e os dígitos não se encontram separados. As vértebras torácicas e lombares da coluna vertebral apareceram coloridas de um vermelho muito claro, diferente dos discos intervertebrais os quais apareceram em coloração azul. Esta diferença de coloração entre as diferentes idades (cor vermelho claro e vermelho escuro) indica pequenos pontos de ossificação distribuídos pelo corpo do recém-nascido de 5 dias. A coloração vermelha clara apareceu de maneira irregular em alguns pontos do crânio e região de mandíbula, levemente nas costelas e nos ossos dos membros torácicos.

CONCLUSÃO

Os fetos de gambá apresentam um desenvolvimento ósseo bastante precoce, após estes resultados, podemos concluir que a espécie *Didelphis* sp. tem o começo da organogênese durante os últimos três dias de gestação e este desenvolvimento prossegue em uma taxa surpreendente, resultando em um feto viável e capaz de sobreviver no ambiente externo e de migrar independente para a bolsa. Portanto, podemos afirmar o importante desenvolvimento neuromuscular e ósseo de estruturas como a cabeça e o membro torácico devido à dependência nutricional do feto no momento de se arrastar até o teto em busca da amamentação que perdura por meses sem interrupção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. M. **Embriologia veterinária comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 176 p.

BEHRINGER, R. R.; EAKIN, G. S.; RENFREE, M. B. Mammalian diversity: gametes, embryos and reproduction. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 99-107, 2006.

CURTIS, H.; BARNES, N. S.; SCHNEK, A.; FLORES, G. **Biología**. 6.ed. Madrid: Panamericana, 2000. Cap. 34, p. 912-937.

CUTTS, J. H.; KRAUSE, W. J.; LEESON, C. R. General observations on the growth and development of the young pouch opossum, *Didelphis virginiana*. **Biol. Neonate**, v. 33, p. 264-272, 1978.

GARCIA, F. F.; MANÇANARES, C. A. F.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; ROSA, R. A.; CARVALHO, A. F. **Estudos bibliográficos relacionados à embriologia do gambá (*Didelphis sp.*)**. 8º encontro de produção acadêmica de medicina veterinária. São João da Boa Vista: Unifeob, 2007. DVD.

GONÇALVES, N. J. N. **Estudo morfofuncional do aparelho reprodutor feminino do gambá (*Didelphis sp.*)**. 47p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Fundação de Ensino Octávio Bastos, Faculdade de Ciências Biológicas, São João da Boa Vista, 2005.

HULSEY, T. K.; PALOTAY, J. L.; DHINDSA, D. S. Development of the neonate opossum (*Didelphis virginiana*). **Biol. Neonate**, v. 27, p. 177-183, 1975.

RENFREE, M. B.; PASK, A. J.; SHOW, G. Sex down under: the differentiation of sexual dimorphism during marsupial development. **Reproduction Fertility and Development**, v. 13, n. 7-8, p. 679-690, 2001.

TICER, J. W. **Técnicas radiológicas na prática veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 1984. 523p.