

ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DAS MEMBRANAS EMBRIONÁRIAS E FETAIS DE EQUINOS¹

PRISCILA LEAL DO NASCIMENTO²; CELINA DE ALMEIDA FURLANETTO MANÇANARES³; MARIA ANGELICA MIGLINO⁴; CARLOS EDUARDO AMBROSIO⁵; ANA FLÁVIA DE CARVALHO³.

¹ Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP- Bolsa de Iniciação Científica Processo 08/50257-0

² Graduando do 2º ano de Medicina Veterinária do Centro Universitário Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos, s/nº, São João da Boa Vista/SP, 13874-159 – Bolsista Fapesp

³ Docente do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos, s/nº, São João da Boa Vista/SP, 13874-159.

⁴ Professora Titular da USP- Universidade São Paulo, Cidade Universitária, São Paulo.

⁵ Jovem Pesquisador (USP)- Universidade São Paulo, Cidade Universitária, São Paulo.

RESUMO: Para desenvolver esta pesquisa foram utilizados 13 úteros gestantes, dos quais foram obtidas 13 placentas divididas em grupos nas diferentes fases de desenvolvimento. O material foi retirado de éguas adultas, sem raça definida e em diferentes períodos de gestação até 120 dias sendo destinados à análise ultra-estrutural. Os resultados obtidos na MEV (microscopia eletrônica de varredura) foram semelhantes aos encontrados por ASSIS-NETO (2005), em membranas bovinas. O alantóide apresentou células cuja superfície apresentava delimitações por microvilos, formando imagens poliédricas, também foram observadas estruturas salientes em forma de “botão”. No âmnio observou-se uma superfície semelhante ao do alantóide, tendo toda a sua extensão recoberta por microvilos. No cório, a superfície apical das células são arredondadas e recobertas por microvilos. O saco vitelino apresentou gotículas de secreção no ápice das células indicando exocitose. Até o momento conclui-se que a placenta da égua é do tipo corioalantóica, epiteliocorial, difusa, não-decídua e vilosa.

PALAVRA-CHAVE: equino, placenta, placentação, microscopia eletrônica, placentária

INTRODUÇÃO

O cavalo (*Equus caballus*, Linnaeus 1758) é um mamífero ungulado de porte grande, pertencente ao reino: *Animalia*, filo: *Chordata*, classe: *Mammalia*, ordem: *Perissodactyla*, família: *Equidae*, gênero: *Equus* e espécie: *Equus caballus* (THENIUS, 1990 e ALLEN, 2001).

No Brasil, dentre as várias atividades no setor pecuário, a equideocultura vem alcançando relevante destaque nos últimos anos. O cavalo é hoje, para o homem, um animal destinado à reprodução, esporte e lazer (CARVALHO et al., 2001; BRACHER et al., 1996).

WELLS et al., (1999) acrescentam a importância de estudos relativos ao desenvolvimento e as funções placentárias têm como alvo melhorar a manutenção de conceitos mais saudáveis em gestações de monta natural. Para tal feito, é indispensável que se estabeleça a caracterização do desenvolvimento normal do processo de placentação inicial em gestações que ocorrem por meio de concepção natural ou inseminação artificial.

A placenta da égua, conforme a descrição de SILVA (1971), BANKS (1992) e DANTZER (1999), são do tipo corioalantóica, epiteliocorial, difusa, não-decídua e vilosa, e o período de gestação é quase 340 dias. Apresentam vilosidades coriônicas vascularizadas que permitem as trocas materno-fetais (AMOROSO, 1952; CUPPS, 1991).

Existem quatro diferentes estruturas membranosas que estão envolvidas no desenvolvimento da placenta; cório, âmnio, alantóide e o saco vitelino. O cório é uma camada epitelial derivada da parede externa do blastocisto, o trofoblasto. Durante o curso de implantação ele é completado pela camada interna do mesênquima derivado do embrião (LEISER; KAUFMANN, 1994). É uma película delgada que envolve os outros anexos embrionários, sendo a membrana extra-embriônica mais externa, envolvida no intercâmbio gasoso respiratório, nutrição e eliminação de resíduos (WOLPERT et al., 2000 *apud* MANÇANARES, 2007).

O âmnio é uma camada derivada do dobramento (mamíferos) do ectoderma embrionário, constituído por uma fina membrana que delimita uma bolsa repleta de líquido – o

líquido amniótico que tem função de proteger o embrião contra choques mecânicos (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O alantóide surge de uma invaginação da parte posterior do intestino do embrião (LEISER; KAUFMANN, 1994), é uma bexiga urinária extra-embriônica. Nos mamíferos associa-se ao cório para formar a placenta e o cordão umbilical (WOLPERT et al., 2000 *apud* MANÇANARES, 2007), além de contribuir para a formação da bexiga e útero no embrião (GARCIA et al., 1991 *apud* MANÇANARES, 2007).

O saco vitelino se desenvolve como uma estrutura anexa do intestino médio embrionário, e consiste de uma camada do endodérmico seguindo de mesenquima fetal vascularizado (LEISER; KAUFMANN, 1994). Sua principal função é armazenar reservas nutritivas, além de ser responsável pela produção das hemácias (PALIS; YODER, 1998; GODIN; CUMANO, 2002 *apud* MANÇANARES, 2007). Nos mamíferos placentários é reduzido, visto que a nutrição ocorre via placentária (SANTOS; AZOUBEL, 1996 *apud* MANÇANARES, 2007). Sendo sua parte dorsal ser incorporada e formar o revestimento epitelial do intestino (GARCIA et al., 1991 *apud* MANÇANARES, 2007).

MATERIAL E MÉTODO

Para desenvolver esta pesquisa foram utilizados 13 úteros gestantes, dos quais foram obtidas 13 placentas e 13 embriões/fetos divididos em grupos nas diferentes fases de desenvolvimento (Tabela 1). Tal material foi retirado de éguas adultas, sem raça definida e em diferentes períodos de gestação até 120 dias, provenientes de montas naturais e obtidos no Frigorífico Miramar sediado na cidade de Pelotas – R.S.. Os 13 exemplares foram destinados à análise ultra-estrutural.

Com o auxílio de paquímetro digital (Digimess[®]) foram mensurados os comprimentos do embrião/feto. Para a mensuração do comprimento do embrião foi tomada como referência ápice sacral (A.S.) da extremidade da cabeça a última vértebra sacral na extremidade oposta (crânio-caudal) (“Crow-Rump” - CR). Às medidas do CR foram utilizadas para definir os períodos gestacionais. A idade fetal será confirmada a partir da tabela sugerida por EVANS e SACK (1973).

Microscopia eletrônica de varredura

Após a lavagem com solução salina (solução fisiológica 0,9%) as membranas foram perfundidas com solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4) (ASSIS –NETO, 2005).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados nas placentas bovinas por Assis-Neto (2005) até o momento.

O alantóide quando observado ao MEV (microscopia eletrônica de varredura) apresentou característica levemente rugosa, com células cuja superfície apresentava delimitações por microvilos, formando imagens pentagonais, hexagonais e heptagonais. Além destas células alantóicas, também foram observadas estruturas salientes em forma de “botão” (Figura 1A).

O âmnio quando observado de MEV apresentou uma superfície semelhante ao do alantóide, as células variaram no formato de tetragonal até heptagonal e delimitações por cordões de microvilos, tendo toda a sua extensão recoberta por microvilos (Figura 1B).

O cório apresentou superfície apical das células arredondadas e recobertas por numerosos microvilos, quando observado no MEV, a presença de vilosidades coriônicas repleta de seus vasos coriônicos, que se assemelham aos achados de AMOROSO, (1952); CUPPS,(1991) (Figura 1C).

O saco vitelino apresentou gotículas de secreção no ápice das células indicando excitose. A superfície era irregular devido aos grânulos de secreção (Figura 1D).

Conclusão

Concluiu-se que os achados para as membranas cório, alantóide e âmnio são semelhantes as descritas para outros ungulados. Já os resultados aqui obtidos para o saco vitelino não puderam ser comparados a de outros ungulados.

REFERENCIAS

ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, v. 121, p. 513-527, 2001.

AMOROSO, E.C. Placentation. In: **Marshall's Physiology of Reproduction**, 3rd Ed., A.S. Parkes, ed. Longmans Green, London, p. 127-311, 1952.

ASSIS NETO, A. C. **Desenvolvimento placentário em bovinos obtidos por gestações naturais e por fecundação *in vitro***. 2005. 223 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BANKS W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**, 2nd edição, Editora Manole Ltda, São Paulo-SP, 1992, p. 579-584.

BRACHER V., MATHIAS S., ALLEN W. R. Influence of chorionic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. **Equine Veterinary Journal**, 28: p. 180-188, 1996.

CARVALHO, F.S.R.; MIGLINO, M.A.; SEVERINO, R.S.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, C.G.; SANTOS, T.C. Aspectos microscópicos do funículo umbilical em eqüinos (*Equus caballus* – Linnaeus, 1758). **Braz J Vet Res Anim Sci**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 66-68, 2001.

CUPPS, P.T. **Reproduction in domestic animals**. 4 ed. San Diego: Copyright, p.316-356, 1991.

DANTZER, V.; Epitheliochorial Placentation. In: KNOBIL, E., NEILL, J. D. **Encyclopedia of Reproduction**, San Diego: Academic Press, v. 2, p. 18-28, 1999

EVANS, H.E.; SACK, W.O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anat Histol Embriol**, v. 2, p.11-45, 1973.

LEISER, R.; KAUFMAM, P. Placenta structure: in a comparative aspect. **Experimental clinic of endocrinology**, v.102, n.3, p.122-134, 1994.

MANÇANARES, C.A.F. **Análise morfológica da área de transição do intestino primitivo para o saco vitelino em embriões e fetos bovinos (24 a 50 dias de gestação)**. 2007. 115 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

THENIUS, E. Even-toed ungulates. In: **Grzimek's Encyclopedia of mammals**. London: McGraw-Hill, v. 5, p. 4-7, 1990

SILVA, D.F.A.P. **Placenta**. 1971. 101 f. (Monografia em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1971.

WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; TERVIT, H.R. Production of cloned calves following nuclear transfer with culture adult mural granulose cells. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 996-1005, 1999.

Tabela 1: Divisão dos embriões em grupos conforme CR mensurado.

Grupo	Idade em dias	Comprimento da coluna (cm)
I	15 a 47	2,0 a 4,9
II	53 a 57	5,0 a 7,9
III	71 a 88	8,0 a 14,9
IV	94 a 100	15,0 a 22,0

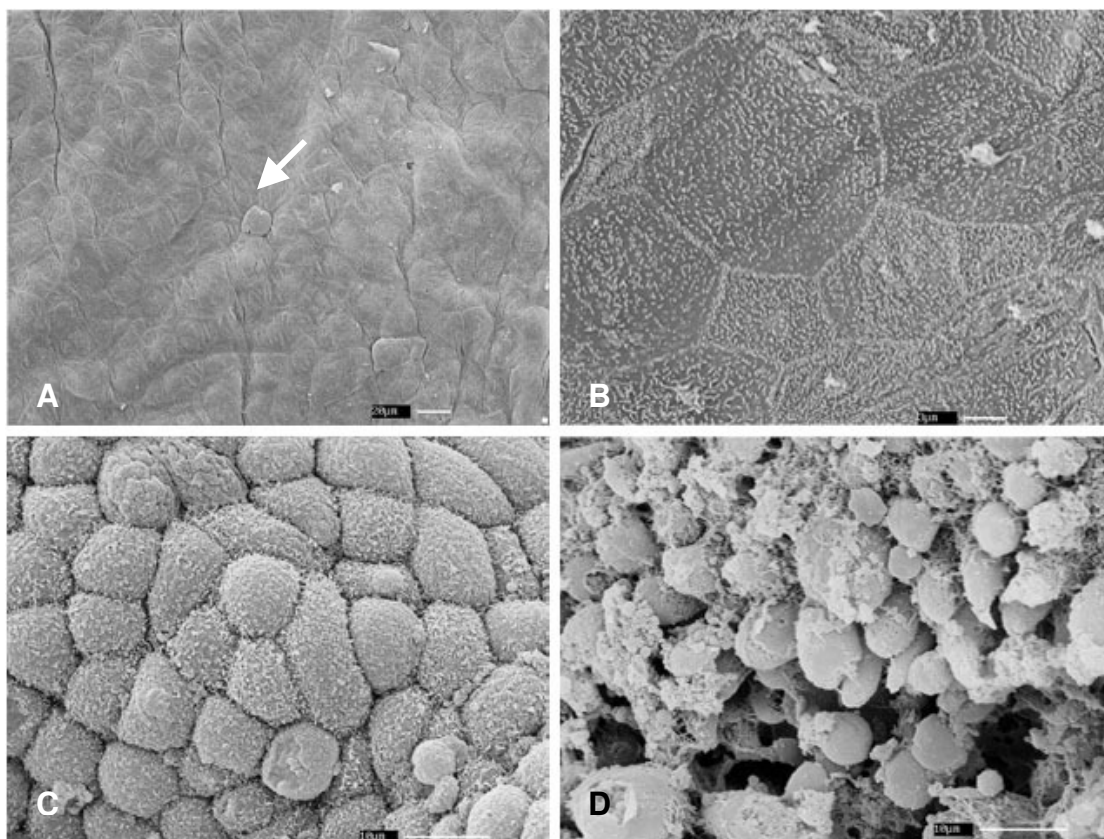


FIGURA 1 – MEV – Microscopia eletrônica de varredura. Em A Superfície das células alantóicas, exibindo áreas levemente irregulares, com formato apical pentagonais, hexagonais e heptagonais. Observar estrutura saliente semelhante a um “botão”. Em B superfície do âmnio ápice das células poliédricas, delimitadas por elevações microvilosas. Os microvilos estavam presentes nas bordas e em todo ápice celular. Em C superfície do cório, evidenciando a superfície apical das células arredondadas e recobertas por numerosos microvilos. Em D observar as inúmeras gotículas de secreção das células vitelinas indicando elevada síntese.