

ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS ANEXOS EMBRIONÁRIOS E FETAIS DE EQUINOS EM ATÉ 107 DIAS DE GESTAÇÃO¹ (*Equus caballus*, Linneaus 1758)

ANA CLAUDIA CRISTIANE FERRAZ²; CELINA DE ALMEIDA FURLANETTO MANÇANARES³; MARIA ANGÉLICA MIGLINO⁴; CARLOS EDUARDO AMBRÓSIO⁴; ANA FLÁVIA DE CARVALHO³

¹ Projeto de Pesquisa – Bolsa de Iniciação Científica FAPESP (Proc. 08/50521-9)

² Graduando 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.

³ Docente do Centro Universitário Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos, s/nº, São João da Boa Vista/SP, 13874-1593

⁴ Docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Orlando Marques Paiva, 87. Cidade Universitária, São Paulo/SP.

RESUMO: O cavalo (*Equus caballus*, Linneaus 1758) é um mamífero ungulado de porte grande, da família Eqüidea, uma das sete espécies modernas do gênero *Equus*. Domesticado há milhares de anos é um animal inigualável, de beleza incomum, graça, sensibilidade e habilidade atlética; um animal fascinante para estudo, como descrevem Evans et al. (1990); Ginther (1992) e Dantzer et al. (1998). Por não se tratar de um modelo simples, oferece um leque abrangente para pesquisa e desafia os cientistas. A placentação eqüina e seu desenvolvimento embrionário são alguns dos assuntos a serem desbravados. Sendo assim, este trabalho objetivou descrever microscopicamente os anexos embrionários do embrião/feto de eqüinos nos primeiros quatro meses de gestação. Para desenvolver esta pesquisa foram coletadas 37 placentas de éguas adultas, sem raça definida e divididas em grupos nas diferentes fases de desenvolvimento, seguindo a metodologia empregada por EVANS SACK (1973), até 107 dias de gestação, e foram posteriormente, destinadas à microscopia de luz. Os fragmentos das membranas (cório, alantóide, âmnio e saco vitelino) foram fixados em formol a 10% e Bouin seguido de processamento rotineiro em parafina (TOLOSA et al; 2003). Foram obtidos cortes seriados com espessura de 5µm em micrótomo (Leica 2165[®]) os quais foram submetidos à coloração pelos métodos de hematoxilina e eosina, picrossírius, azul de Toluidina e Tricrômio de Masson (TOLOSA et al; 2003). Nos quatro grupos o âmnio apresentou-se com um epitélio pavimentoso simples e mesênquima sem nenhuma vascularização, apenas a vascularização era evidente quando o âmnio se fusionou com o alantóide que também é um epitélio pavimentoso simples. O cório apresentou vilos com o um epitélio colunar baixo e com bordas em escova, células uni e binucleadas, altamente vascularizado, e diferenciando-se em relação aos grupos o tamanho e quantidade de vilos. O saco vitelino apresentou epitélio cujas células eram grandes e globosas apoiadas sobre o mesênquima formando ilhas vasculares repletas de hemangioblastos, sendo inexistente nos animais de 47 a 107 dias de gestação.

PALAVRAS-CHAVE: embrião de eqüino, membranas embrionárias, microscopia, placenta.

INTRODUÇÃO

O cavalo (*Equus caballus*, Linneaus 1758) é um mamífero ungulado de porte grande, da família Eqüidea, uma das sete espécies modernas do gênero *Equus*. Domesticado há milhares de anos é um animal inigualável, de beleza incomum, sensibilidade e habilidade atlética, como descrevem (DANTZER et al; 1988; EVANS et al; 1990 e GINTHER 1992)

Tradicionalmente, a égua é considerada um animal de eficiência reprodutiva baixa, As perdas gestacionais tardias podem estar relacionadas com enfermidade no feto, deficiência orgânica da placenta ou enfermidade na égua, sendo um problema na reprodução eqüina. As melhorias nas técnicas de diagnóstico e os avanços no conhecimento da embriologia reprodutiva aumentaram significativamente as taxas de prenhez (BRACHER et al; 1996; TROEDSSON e SAGE, 2001).

Em várias espécies o processo de placentação envolve a aproximação das membranas embrionárias externas e do epitélio uterino, seguido da junção entre o concepto e os tecidos maternos, com a migração de células coriônicas para o estroma endometrial (KING, 1993;

WILSHER e ALLEN, 2002). A principal função da placenta consiste em regular a troca fisiológica entre o feto e a mãe, embora também atue como importante órgão endócrino durante a gestação. Os tecidos placentários, em especial os de origem fetal, estabelecem uma barreira para evitar a mistura do sangue fetal e materno (NODEM e DE LA HUNTA, 1990 *apud* ITURRIZAGA, 2005).

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 e KAUFMANN, 1994).

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 tem função de proteger o embrião contra choques mecânicos (LEISER e KAUFMANN, 1994). O alantóide surge de uma invaginação da parte posterior do intestino do embrião (LEISER e KAUFMANN, 1994), é uma bexiga urinária extra-embrionária. O saco vitelino se desenvolve como uma estrutura anexa do intestino médio embrionário, e consiste de uma camada do endodérmico seguindo de mesênquima fetal vascularizado (LEISER e KAUFMANN, 1994). Sua principal função é armazenar reservas nutritivas, além de ser responsável pela produção das hemácias (MANÇANARES, 2007). A placenta da égua é classificada, conforme a descrição de Silva (1971), Banks (1992) e Dantzer (1999), do tipo corioalantóica (formada pela fusão do mesoderma alantoideano com o mesoderma coriônico), epiteliocorial (o epitélio coriônico e o uterino estão em contato íntimo, sem perda de tecido materno), difusa (as vilosidades coriônicas estão presentes sobre toda a superfície desta membrana), não-decídua (não há perda dos elementos da mucosa uterina durante o parto) e vilosa (projeções coriônicas se interdigitam com as criptas maternas), microcotiledonária e o período de gestação é quase 340 dias. A placenta tem como suas estruturas o âmnio, alantóide, cório, saco vitelino. O âmnio é uma membrana transparente, ou esbranquiçada constituída por um epitélio estratificado simples e não há vascularização. O alantóide possui vasos preenchidos com eritrócitos e contém células alongadas que formam um epitélio estratificado simples (BARBOSA et al., 2008). O cório possui um epitélio constituído por uma camada simples de células colunares, com núcleos esféricos, denominando epitélio trofoblástico no qual encontra-se outro tipo celular, as células trofoblásticas gigantes com dois ou mais núcleos. A superfície externa do cório é repleta de vilosidades ramificadas que penetram em invaginações correspondentes do endométrio, formando pequenas estruturas globulares conhecidas como microcotilédones. Os microcotilédones, que são uma característica diferencial da placenta equina madura, estão completamente formados ao redor do quinto mês de gestação. Dentro de cada microcotilédone, os epitélios coriônicos e uterinos estão em íntimo contato, e uma junção microvilosa se forma na transição materno-fetal (BARBOSA et al; 2008; HAFEZ, 1995). O saco vitelino é uma membrana opaca que desaparece durante a gestação, é a única membrana que não esta em contato com as outras e apresentam três tipos diferentes de células que dão forma a três camadas distintas, o endoderma, mesotélio e mesênquima. O endoderma visceral do saco vitelino forma um epitélio colunar com bordas em escova, estas células sintetizam proteínas do sangue e transportam macromoléculas, derivadas funções que mais tarde será suprida pelo fígado e intestinos. (MCGRATH; PALIS, 2005; BARBOSA et al., 2008; MANÇANARES, 2007).

MATERIAL E MÉTODO

Foram coletados 37 úteros gestantes, de éguas adultas, sem raça definida e em diferentes períodos de gestação de até 107 dias de prenhez, originárias do frigorífico Miramar, sediado na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. Os embriões e fetos foram divididos em 4 grupos conforme os dias de gestação.

ESTUDO MACROSCÓPICO

Para a mensuração do comprimento do embrião foi tomada como referência ápice sacral (A.S.) ("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). Grupo I com idade entre 15 a 47 dias; grupo II com idade entre 53 a 57 dias; grupo III com idade entre 71 a 88 dias e grupo IV com idade entre 94 a 100 dias.

ESTUDO MICROSCÓPICO

As membranas fetais foram colocadas em solução fixadora de formoldeído 10% e Bouin. Após a fixação o material foi desidratado em uma série de etanóis em ordem crescente (70% a 100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em parafina, foram obtidos cortes com espessura de 5 µm em micrótomo, submetidos em coloração de Hematoxilina e eosina, Picrosírius, Azul de Toluidina e ácido periódico Shiff (PAS) para descrição (TOLOSA et al., 2003). Após a coloração, as laminas foram montadas com lamínulas, utilizando-se Entelan.

RESULTADO E DISCUSSÃO

O grupo 01 de 15 a 47 dias de gestação o cório apresentou epitélio colunar baixo com bordas em escova e poucos vilos. Foram encontradas células uni e binucleadas, o tecido conjuntivo (mesênquima) era altamente vascularizado. O saco vitelino apresentou epitélio cujas células eram grandes e globosas apoiadas sobre o mesênquima formando ilhas vasculares repletas de hemangioblastos, assim como descrito por Leiser e Kaufmann (1994). O âmnio possuía células pavimentosas e mesênquima sem nenhuma vascularização. O alantóide era constituído por epitélio pavimentoso variando a colunar com células fortemente marcadas pelos corantes convencionais de HE. Assis Neto (2005) em bovinos descreve que o âmnio tem um epitélio simples pavimentoso, não havendo variações.

O grupo 2 de 53 a 57 dias de gestação apresentou o cório com vilos mais desenvolvidos que o grupo I. Barbosa et al. (2008) cita que em búfalas o cório é constituído por uma camada de células arredondadas, dispostas em formato linear de maneira muito regular e homogênea, aspecto esse semelhante ao epitélio simples cúbico e que geralmente apresenta uma camada simples de células, mas algumas vezes essa membrana pode apresentar mais uma camada. O alantóide apresentou células pavimentosas variando a cúbicas apoiadas sobre o mesênquima, algumas vezes fusionadas ao cório formando a membrana córioalantóide. O âmnio apresentou células pavimentosas apoiadas sobre o mesênquima, que quando fusionadas com o cório formavam a membrana amniocoriônica. As mesmas características foram apresentadas no grupo 3 que são de 71 a 88 dias de gestação, sendo que, a única diferença observada foi na maior quantidade visual de vilos coriônicos também descrito por Leiser e Kaufmann (1994) devido à demanda fetal.

O Grupo 4 apresentou maior desenvolvimento do cório (trofoblasto e mesênquima) tendo sido evidenciada maior quantidade de vasos na região mesênquimal, demonstrando um maior aporte sanguíneo para suprir as necessidades fetais, compartilham com a mesma descrição Assis Neto (2005) com a placenta de bovino, bem como o Barbosa et al. (2008) com a descrição em búfalas e Iturrizaga (2005) em lhamas. O âmnio possuía células pavimentosas sem nenhuma vascularização. Os vasos nesta região só eram observados quando esta membrana se fusionava com o cório (mesênquima) ricamente vascularizado nesta fase. O alantóide era idêntico ao descrito no grupo III (LEISER e KAUFMANN, 1994; ASSIS NETO, 2005; ITURRIZAGA, 2005; BARBOSA et al., 2008;).

CONCLUSÕES

As membranas embrionárias e fetais de equino são similares a outras membranas embrionárias e fetais de outras espécies de ungulados como suínos, ruminantes (bovino, ovino) e camelídeos (lhamas).

REFERÊNCIAS

- 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, pág. 579-584.

- BARBOSA., P.L.G; MELNIC, R.V; MORINI, A.C; JUNIOR, J.C.M; FRANCIOLLI, A. L. R; MARTINS, D. S; PEREIRA, F.T. V; FAVARON, P. O; AMBRÓSIO, C. E; MIGLINO, M. A. Caracterização das membranas fetais em búfalas no terço inicial da gestação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p. 437-435, 2008.
- BRACHER V., MATHIAS S., ALLEN W. R. Influence of chorionic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v.28, p. 180- 188, 1996.
- DANTZER, V.; LEISER, R.; KAUFMANN, P.; LUCKHARDT, M. Comparative morphological aspects of placental vascularization. **Trophoblast Research**, v. 3 p. 235-260, 1988.
- EVANS, H.E.; SACK, W.O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anatomy Histology and Embryology**, v. 2, p. 11-45, 1973.
- GUINThER, O. J. Reproductive biology of the mare- Basic and applied aspects. Chapter: 12, "**Placentation and Embryology**", United States- USA, p. 315- 352, 1992.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 513p, 1995.
- ITURRIZAGA, D. M, **Estudo micro-estrutural, histoquímico e imunohistoquímico da placenta de lhama (*Lama guanicoe glama*)**. 2005. 147 f. (Dissertação de Mestrado) – Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- KING, G.J.; Comparative placentation in ungulates; **The Journal of experimental zoology**, v. 266, pág. 588-602, 1993.
- 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.
- MCGRATH, K.E; PALIS, J. Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. **Experimental hematology**. V. 33. p.1021 – 1028. 2005.
- 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, 19971.
- TOLOSA, E.M.C; RODRIGUES,C.J;BEHMER,O.A; FREITAS NETO,A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2.ed. São Paulo, Manole. 331p.
- TROEDSSON, M.; SAGE, A.M. Evaluación del feto y de la placenta en la yegua In: **Recent Advances in Equine Reproduction**, B.A. Ball (Ed.), Pub: Int Vet Info Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA, (17-May-2001), Dept Clinical and Pop Sci, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, USA.
- WILSHER, S.; ALLEN, W.R. The influences of maternal size, age and parity on placental and fetal development in the horse. **Theriogenology**, v. 58, pág. 833-835, 2002.