

MEMBRANAS EMBRIONÁRIAS E FETAIS DE EQUINOS SOB ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO¹

PRISCILA LEAL DO NASCIMENTO²; CELINA DE ALMEIDA FURLANETTO MANÇANARES³; MARIA ANGELICA MIGLINO⁴; CARLOS EDUARDO AMBROSIO⁴; ANDRÉ LUIS REZENDE FRANCIOLLI; ANA CLÁUDIA CRISTIANE FERRAZ; ANA CAROLINA F. MANÇANARES; ANA FLÁVIA DE CARVALHO³

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

² Graduando em 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 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 Docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Orlando Marques Paiva, 87 - Cidade Universitária, São Paulo/ SP.

RESUMO: Para desenvolver esta pesquisa foram utilizados 16 úteros gestantes, dos quais foram obtidas 16 placentas divididas em grupos de diferentes fases de desenvolvimento. O material foi coletado de éguas adultas, sem raça definida de até 100 dias de gestação. As membranas foram destinadas à análise ultra-estrutural e os resultados obtidos sob microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram semelhantes aos encontrados por ASSIS-NETO (2005), em membranas bovinas, e ITURRIZAGA (2005), em Ihamas. As membranas fetais não apresentaram diferenças estruturais relevantes nos diferentes períodos estudados. O cório apresentou epitélio colunar; tecido mesenquimal rico em fibras colágenas, sendo as células trofoblásticas uni, binucleadas e raramente trinucleadas. Grande quantidade de mitocôndrias estava presente principalmente no ápice das células. O alantóide apresentou epitélio simples colunar com núcleos globosos e grande concentração de mitocôndrias no ápice celular, na base celular havia grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso. O âmnio apresentou epitélio simples pavimentoso sendo que no ápice celular havia grande quantidade de grânulos eletrondensos recobertos por um halo arredondado. O epitélio do saco vitelino apresentou-se variando de globoso a colunar, com células uni ou binucleadas em uma única camada, com grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, distribuída uniformemente. Entre as células endodérmicas foram encontrados espaços intercelulares. Até o momento conclui-se que a placenta da égua é do tipo corioalantóide, epiteliocorial, difusa, não-decídua e vilosa, possuindo células do cório e saco vitelino com características de secreção protéica, enquanto que o âmnio apresentou vesículas de secreção, porém com menor quantidade de retículo endoplasmático rugoso.

PALAVRAS-CHAVE: equino, placenta, placentação, microscopia eletrônica, morfologia

INTRODUÇÃO

O cavalo 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. 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 corioalantóide, 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 e 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).

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 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-embriônica. Nos mamíferos associa-se ao cório para formar a placenta e o cordão umbilical (WOLPERT et al., 2000), além de contribuir para a formação da bexiga e úraco no embrião (GARCIA et al., 1991).

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 (PALIS e YODER, 2001). Nos mamíferos placentários é reduzido, visto que a nutrição ocorre via placentária (SANTOS; AZOUBEL, 1996). Sendo sua parte dorsal ser incorporada e formara o revestimento epitelial do intestino (GARCIA et al., 1991).

No 25º dia de gestação, uma banda de células especializadas denominadas de cintura coriônica forma-se entre o saco vitelino e o alantóide em expansão (HAFEZ e HAFEZ, 2004), esta é uma característica notável da embriogênese do eqüino. Células da cintura coriônica irão formar os cálices endometriais, que produzem a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), estes podem proteger a placenta contra um ataque imune de origem materna (HAFEZ e HAFEZ, 2004; ALLEN e STEWARTT, 2001). A cinta coriônica e os cálices endometriais degeneram e desaparecem no terço médio da gestação (SOUT et al., 2002).

MATERIAL E MÉTODO

Para desenvolver esta pesquisa foram utilizados 16 úteros gestantes, dos quais foram obtidos fragmentos das membranas embrionárias e fetais. Tal material foi retirado de éguas adultas, sem raça definida e em diferentes períodos de gestação até 100 dias, provenientes de montas naturais e obtidos no Frigorífico Miramar sediado na cidade de Pelotas, RS. Os 16 exemplares foram destinados à análise ultra-estrutural. 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.

Microscopia eletrônica de transmissão. 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).

Microscopia eletrônica de transmissão (MET). Após a fixação, e coleta das membranas os fragmentos foram lavados em tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,4 por três vezes durante dez minutos e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora. Após novas lavagens em tampão fosfato os fragmentos das membranas foram desidratados em álcool etílico a 50%, 70%, 90% e 100% e lavados em óxido de propileno. Por 12 a 16 horas o material permaneceu sob rotação em 1:1 de óxido de propileno e resina e mais 4 a 5 horas em resina pura por imersão. As amostras foram embebidas com resina pura em moldes em estufa a 69°C por 72 horas para consolidar a polimerização. Os blocos foram cortados em ultramicrótomo (Leica ULTRACUT UCT®) em cortes semifinos com 1µm de espessura e corados a quente com solução de borato de sódio a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de Toluidina para observação sob microscópio de luz das áreas desejadas. Os cortes ultrafinos de cerca de 50nm de espessura foram colhidos sobre telas de cobre e contrastados pelo acetato de uranila a 2% em água destilada, por 5 min, e pelo citrato de chumbo a 0,5% em água destilada, durante 10min. As observações e eletromicrografias subcelulares foram realizadas no microscópio eletrônico (FP 5005 Morgagni Series).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

O cório quando observado por microscopia eletrônica de transmissão (MET) apresentou epitélio simples colunar; as células trofoblásticas uni, bi ou trinucleadas, apresentavam-se organizadas e apoiadas sob o tecido mesenquimal rico em fibras colágenas assemelhando aos achados de Barbosa, et al., (2008) em búfalos. Na maioria das células foi possível observar núcleos de forma circular e contendo áreas de cromatina densa e frouxa como descrito por Iturrizaga (2005) no cório de lhama. No citoplasma foi encontrada uma grande quantidade de mitocôndrias nos ápices celulares, vesículas eletrodensas e Golgi. A superfície coriônica apresentou numerosas projeções arredondadas com formato pregueado em direção ao endométrio, o mesmo foi observado nos camelídeos (FOWLER e BRAVO, 1998; FOWLER e OLANDER, 1990 *apud* ITURRIZAGA, 2005). A membrana citoplasmática da célula trofoblástica apresenta delicados microvilos de forma alongada na região apical da célula. Observou-se uma grande quantidade de vasos sanguíneos, evidenciando se a proximidade dos capilares fetais com as células trofoblásticas onde as membranas basais se tocavam. O alantóide era constituído por epitélio simples colunar e membrana basal, cujas células tinham núcleos globosos. O citoplasma destas células apresentava clara divisão entre ápice e base. No ápice grande concentração de mitocôndrias e na base celular grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso. O âmnio quando observado por MET era constituído por epitélio simples pavimentoso assim como descrito por Barbosa et al. (2008) em búfalos. O epitélio amniótico estava apoiado no mesênquima. Apresentou na região apical da célula uma grande quantidade de grânulos eletrondensos recobertos por um halo de formato arredondado. Assis Neto (2005) relata esta grande quantidade de grânulos eletrondensos na região apical do epitélio do alantóide e não do âmnio. O epitélio do saco vitelino apresentou-se variando de globoso a colunar simples com células uni ou binucleadas apoiadas no mesênquima. Observou-se grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso distribuído uniformemente. Foi observada uma pequena quantidade de vesículas no citoplasma, as mitocôndrias estavam localizadas entre o núcleo e o ápice celular e entre as células endodérmicas foram encontrados espaços intercelulares como o observado em bovinos (MANÇANARES, 2005).

CONCLUSÃO

Conclui-se que os achados para as membranas cório, alantóide, âmnio e saco vitelino são semelhantes às descritas para outros ungulados e são semelhantes em todos os períodos gestacionais observados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. R. Feto maternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, v. 121, p. 513-527, 2001.
- ALLEN, W. R.; STEWART, F. Equine placentation. **Reproduction, Fertility and Development**. Vol. 13, p. 623-634, 2001.
- AMOROSO, E.C. Placentation. In: **Marshalls 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.
- BARBOSA, P. H. 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 búfalos no terço inicial da gestação**. Pesquisa veterinária brasileira, v. 28, n.9, p. 437-445, 2008.

- BRACHER V., MATHIAS S., ALLEN W. R. Influence of chorionic degenerative endometritis (endometriosis) 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). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 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. **Anatomy Histology Embriology**, v. 2, p.11-45, 1973.
- GARCIA, S. M. L.; JECKEL NETO, E.; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia**. 1. ed. Porto Alegre: Artes Medicas Sul, 1991. 350 p.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal. 7. ed. São Paulo: Manole, 513p, 2004.
- ITURRIZAGA, D.M. **Estudo micro-estrutural, histoquímico e imunoistoquímico da placenta de lhama (*Lama guanicoe glama*)**. 2005. 147f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo,
- 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 morfológico 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.
- PALIS, J.; YODER, M. Y. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. **Experimental Hematology**, v. 29, p. 927- 936, 2001.
- THENIUS, E. Even-toed ungulates. In: **Grzimek's Encyclopedia of mammals**. London: McGraw-Hill, v. 5, p. 4-7, 1990
- SANTOS, H. S. L.; AZOUBEL, R. **Embriologia comparada**. Jaboticabal: Funep, 1996, 188p.
- 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.
- SOUT, S.S; STEWART, F.; ALLEN, W.R. The role of allantoicmesenchyme in the formation of the equine chorionic girdle. **Theriogenology**, v. 58, pág. 813-815, 2002.
- WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R.; BROCKES, J.; JESSELL, P. L.; MEYEROWITZ, E. **Biologia do desenvolvimento**. 1. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, 484p.
- 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.