

# ANÁLISE MICROSCÓPICA E ULTRAESTRUTURA DO SACO VITELINO DE EQUINOS ATÉ 47 DIAS DE GESTAÇÃO<sup>1</sup> (*Equus caballus*, Linneaus 1758)

Ana Claudia Cristiane Ferraz<sup>2</sup>; Priscila Leal do Nascimento<sup>2</sup>; Celina de Almeida Furlanetto Mançaneres<sup>3</sup>; André Luis Rezende Francioli<sup>6</sup>; Maria Angélica Miglino<sup>4</sup>; Carlos Eduardo Ambrósio<sup>5</sup>; Ana Flávia de Carvalho<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>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.

<sup>3</sup> 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, 13874-1593

<sup>4</sup>Docente da USP - Universidade de São Paulo, Cidade Universitária, São Paulo/SP.

<sup>5</sup>Docente da USP- Universidade de São Paulo, Pirassunuga-SP.

<sup>6</sup>Doutorando da USP - Universidade de São Paulo, Cidade Universitária, São Paulo/SP.

**RESUMO:** Este trabalho objetivou descrever microscopicamente o saco vitelino de eqüinos até 47 dias de gestação. Para desenvolver esta pesquisa foram coletadas 37 placentas e embriões de 15 a 47 dias de gestação. O material foi retirado de éguas adultas, sem raça definida em matadouro frigorífico. A idade embrionária foi estimada seguindo a metodologia empregada por EVANS SACK (1973). Os embriões foram destinados à análise microscópica. Para análise sob microscopia de luz os fragmentos das membranas de saco vitelino foram fixados em formaldeído a 10% e Bouin seguidos de processamento rotineiro em parafina (TOLOSA *et al*; 2003). Foram obtidos cortes seriados com espessura de 5µm em micrótomo (Leica 2165<sup>®</sup>) os quais foram submetidos à coloração pelos métodos de hematoxilina e eosina, picrossírius, azul de Toluidina e Tricrômio de Masson (TOLOSA *et al*; 2003). Outra parte do material foi submetida à microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. 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 endoplasmática rugoso, distribuída uniformemente, o epitélio apoiado sobre o mesênquima formando ilhas vasculares repletas de hemangioblastos, sendo inexistente nos animais de idade superior a 47 dias de gestação; e características de secreção protéica.

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

## INTRODUÇÃO

O cavalo (*Equus caballus*, Linneaus 1758) é um mamífero ungulado de porte grande, da família Eqüídea, 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 GUINTHER 1992).

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).

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; KAUFMANN, 1994). Sua principal função é armazenar reservas nutritivas, além de ser responsável pela produção das hemácias (MANÇANARES, 2007).

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).

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; HAFEZ, 2004), esta é uma característica notável da embriogênese do equino. Células da cintura coriônica irão formar os cálices endometriais, que produzem a gonadotrofina coriônica equina (eCG), estes podem proteger a placenta contra um ataque imune de origem materna (HAFEZ; HAFEZ, 2004; STEWARTT, 2001). A cinta coriônica e os cálices endometriais degeneram e desaparecem no terço médio da gestação (SOUT *et al.*, 2002).

## **MATERIAL E MÉTODO**

Foram coletados 37 úteros gestantes, de éguas adultas, sem raça definida e em diferentes períodos de gestação, originárias do frigorífico Miramar, sediado na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. Os embriões que foram utilizados neste trabalho foram os que tinham 15 a 47 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) com idade entre 15 a 47 dias.

### **ESTUDO MICROSCÓPICO**

As membranas fetais foram colocadas em solução fixadora de formaldeído 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 5µm em micrótomo LEICA 2165, submetidos a coloração de hematoxilina e eosina, Picrosírius, azul de Toluidina e reação histoquímica de PAS (ácido periódico Shiff) para descrição (TOLOSA *et al.*, 2003). Após a coloração, as lâminas foram montadas com lamínulas, utilizando-se Entelan.

### **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) seguindo-se a metodologia de processamento utilizada por ASSIS-NETO, (2005).

### **MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSÃO (MET)**

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).

Após a fixação e coleta das membranas os fragmentos foram lavados em tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,4 e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%. Após novas lavagens em tampão fosfato os fragmentos das membranas foram desidratados em álcool etílico (50% até 100%) e lavados em óxido de propileno. O material permaneceu em overnight em 1:1 de óxido de propileno e resina e mais cinco horas em resina pura por imersão. As amostras foram embebidas com resina pura em moldes em estufa a 69°C 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, e pelo citrato de chumbo a 0,5% em água destilada. As observações e eletromicrografias subcelulares foram realizadas no microscópio eletrônico (FP 5005 Morgagni Series).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Sob análise de microscopia de luz, 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; Kaufmann, (1994) em bovinos.

Na microscopia eletrônica de varredura o saco vitelino apresentou gotículas de secreção no ápice das células indicando exocitose. A superfície era irregular devido aos grânulos de secreção.

O saco vitelino na microscopia eletrônica de transmissão 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, e 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).

## CONCLUSÕES

O saco vitelino de eqüino apresentou-se similar outras espécies de ungulados como suínos, ruminantes (bovino, ovino) e camelídeos (Ilhamas).

Suas células possuem aspecto secretor indicando que o embrião pode depender exclusivamente deste suprimento nesta fase.

A placenta eqüina é uma placenta vitelina nesta fase do desenvolvimento embrionário.

## 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.
- ALLEN, W. R.; STEWART, F. Equine placentation. **Reproduction, Fertility and Development**. Vol. 13, p. 623-634, 2001.
- 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, 2008.
- DANTZER, V.; LEISER, R.; KAUFMANN, P.; LUCKHARDT, M. Comparative morphological aspects of placental vascularization. **Trophoblast Research**, v. 3 p. 235-260, 1988.
- 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 and Embryology**, v. 2, p. 11-45, 1973.
- EVANS J. W.; BORTON A.; HINTZ H. F.; VLECK L.D. V. **The Horse**, 2nd ed, W. H. Freeman and Company - New York, pág. 340-349, 1990.
- 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**. 7. ed. São Paulo: Manole, 513p, 2004.
- 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.
- 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, 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.
- 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.