

HUGO ANDRÉS GUTIÉRREZ TRUJILLO

Formação e desenvolvimento dos membros de embriões e fetos bovinos

São Paulo
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

HUGO ANDRÉS GUTIÉRREZ TRUJILLO

Formação e desenvolvimento dos membros de embriões e fetos bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Arani Nanci Bomfim Mariana

São Paulo
2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1907
FMVZ

Gutiérrez, Hugo Andrés Trujillo
Formação e desenvolvimento dos membros de embriões e fetos bovinos
/ Hugo Andrés Gutiérrez Trujillo. – São Paulo: H. A. T. Gutiérrez, 2007.
66 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Arani Nanci Bomfim Mariana.

1. Embrião. 2. Bovino. 3. Ossificação endocondral. 4. Calcificação
óssea. I. Título.



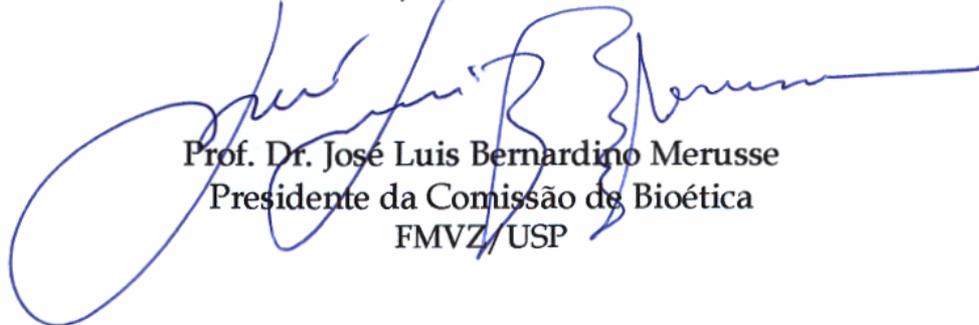
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Formação e desenvolvimento dos membros de embriões e fetos bovinos", protocolado sob o nº1105/2007, utilizando 30 (trinta) vacas (peças de matadouro), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Arani Nanci Bomfim Mariana, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/05/07.

(We certify that the Research "Formation and development of the members of embryos and fetuses bovine", protocol number 1105/2007, utilizing 30 (thirty) bovines (parts of slaughterhouse), under the responsibility Profa. Dra. Arani Nanci Bomfim Mariana, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 05/23/2007).

São Paulo, 24 de maio de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GUTIÉRREZ, Hugo Andrés Trujillo

Título: Formação e desenvolvimento dos membros de embriões e fetos bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedicatória

A Míryan,

Pelos momentos de Amor, incentivo e compreensão.

Aos Meus Pais, Isabel Trujillo e Aristides Gutiérrez (*in memoriam*).

Por se fazerem sempre presentes, a pesar da distância.
Por todo o apoio, incentivo e carinho.

Tio Jorge,

Pelo apoio na vida profissional.

Aos meus Irmãos que me incentivaram e me apoiaram para a concretização desta.

BOM MESMO É IR À LUTA COM DETERMINAÇÃO, ABRAÇAR A VIDA E VIVER COM PAIXÃO, PERDER COM CLASSE E VIVER COM OUSADIA. POIS O TRIUNFO PERTENCE A QUEM SE ATREVE, E A VIDA É MUITO BELA PARA SER INSIGNIFICANTE.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A DEUS, por estar sempre comigo.

A Prof. Dra. Maria Angélica Miglino pela oportunidade.

A David Montes, pela grande colaboração para poder chegar aqui ao Brasil.

A todos os professores pelos ensinamentos.

Aos AMIGOS, que de alguma forma fizeram parte desta caminhada.

Aos técnicos Índio, Sandra e Diogo, que colaboraram nos processos laboratoriais.

Aos funcionários Jaque, Maycon e cauê por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

À CAPES, por ter contribuído para o desenvolvimento deste trabalho com uma bolsa de estudos.

Ao Frigorífico de Poços de Caldas – Frigonossa, que contribuiu em grande parte do trabalho, estando sempre de portas abertas para nos receber.

A todos, muito obrigado pela ajuda e compreensão durante todo este período.

Derrota após derrota até a vitória final.

Ernesto Che Guevara

RESUMO

RESUMO

GUTIÉRREZ, H. A. T. **Formação e desenvolvimento dos membros de embriões e fetos bovinos** [Formation and development of limbs of bovine embryos and fetuses]. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O período embrionário apresenta maior susceptibilidade a teratógenos, sendo a fase que as primitivas camadas germinativas e rudimento dos órgãos são formados. Cada órgão tem uma fase crítica de desenvolvimento e os processos bioquímicos envolvidos no crescimento e diferenciação tem uma seqüência ordenada, controlada por vários genes. A ossificação endocondral tem início sobre um molde de cartilagem hialina, com formato semelhante ao osso que irá se originar, sendo o principal responsável pela formação dos ossos curtos e longos. Assim, julgamos ser de grande valia um estudo embasado no desenvolvimento normal dos membros de embriões e fetos bovinos provenientes de vacas criadas em ambiente natural, através de estudos em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. No processo de formação, desenvolvimento e ossificação dos membros observamos a formação de tecido mesenquimal condensado em embriões por volta da quarta semana gestacional, passando pelo processo de diferenciação em células cartilaginosas. Ao redor da sétima semana gestacional inicia-se o processo de calcificação da cartilagem com depósitos de cálcio e fósforo para formação de tecido ósseo, seguido de morte dos condrócitos.

Palavras-chave: Embrião. Bovino. Ossificação endocondral. Calcificação óssea.

ABSTRACT

ABSTRACT

GUTIÉRREZ, H. A. T. **Formation and development of limbs of bovine embryos and fetuses**. [Formação e desenvolvimento dos membros de embriões e fetos bovinos]. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The embryony period presents a bigger susceptibility to theratogens, being the phase in which the primitive germinative layers and rudiment of organs are been formed. Each organ has a critical phase of development and the biochemical processes involved in growing and differentiation have an ordered sequence, controlled by several genes. The endochondrial ossification has begun over a hyaline cartilage mould, having a shape similar to the bone that will be grow, being the principal responsible for the short and long bones formation. Thus, we think it is much valid a study based on normal development of bovine embryos and fetuses' limbs coming from cows bred in a natural environment, through studies in light microscopy and transmission electronic microscopy. In the process of formation, development and ossification of limbs, we saw condensed mesenchymal tissue formation in the embryos at around the gestational fourth week, passing through differentiation process in cartilaginous cells. At around the gestational seventh week, it has begun the calcification process of cartilage with calcium and phosphorous deposits to the bone tissue formation, followed by chondrocytes death.

Key words: Embryo. Bovine. Endochondrial ossification. Bone calcification.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Fotomicrografia e Eletromicrografia de mesênquima precursor de tecido cartilaginoso em embrião bovino (Crow Rump = 12,0 mm) | 40 |
| Figura 2 - Fotomicrografia e Eletromicrografia de mesênquima precursor de tecido cartilaginoso em embrião bovino (Crow Rump = 20,0 mm) | 41 |
| Figura 3 - Fotomicrografia e Eletromicrografia de mesênquima em diferenciação para formação do molde cartilaginoso de osso longo de embrião bovino (Crow Rump = 25,0 mm) | 42 |
| Figura 4 - Eletromicrografia de célula mesenquimal formadora de tecido cartilaginoso em osso longo de embrião bovino (Crow Rump = 25,0 mm) | 43 |
| Figura 5 - Fotomicrografia e Eletromicrografia de molde cartilaginoso hialino precursor na formação do osso longo de feto bovino (Crow Rump = 30,0 mm) | 44 |
| Figura 6 - Fotomicrografia e Eletromicrografia de cartilagem seriada precursora na formação do osso longo de feto bovino (Crow Rump = 76,0 mm) | 45 |
| Figura 7 - Fotografia de embrião bovino (Crow rump = 28,0 mm) e Fotomicrografia de moldes cartilaginosos para formação dos membros | 47 |
| Figura 8 - Fotografia de feto bovino (Crow rump = 35,0 mm) e Fotomicrografia de molde cartilaginoso para formação dos membros | 48 |
| Figura 9 - Fotografia de feto bovino (Crow rump = 50,0 mm) e Fotomicrografia de molde cartilaginoso para formação dos membros | 49 |
| Figura 10 - Fotomicrografia de molde cartilaginoso em ossificação endocondral de feto bovino (Crow rump = 51,0 mm) | 50 |
| Figura 11 - Fotomicrografia de molde cartilaginoso em ossificação endocondral de feto bovino (Crow rump = 76,0 mm) | 51 |
| Figura 12 - Fotomicrografia do osso de membro de feto bovino (Crow rump = 100,0 mm) | 52 |

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

| | |
|----------|--|
| ATP | Adenosina trifosfato |
| CR | Crow Rump |
| °C | grau Cécius |
| FMVZ/USP | Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo |
| µm | micrômetros |
| mg | miligrama |
| mm | milímetro |
| MG | Minutosas Gerais |
| % | porcentagem |
| SP | São Paulo |

SUMÁRIO

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 | OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 24 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 25 |
| 3.1 | DESENVOLVIMENTO E HISTOGÊNESE DA CARTILAGEM E DOS OSSOS..... | 26 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODO | 33 |
| 4.1 | ESTUDOS MACROSCÓPICOS: PREPARO DO MATERIAL..... | 34 |
| 4.2 | ESTUDO MICROSCÓPICO | 34 |
| 4.2.1 | Processamento Microscopia de Luz | 35 |
| 4.2.2 | Processamento Microscopia Eletrônica de Transmissão | 35 |
| 5 | RESULTADOS | 37 |
| 5.1 | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO | 38 |
| 5.2 | MICROSCOPIA DE LUZ..... | 46 |
| 6 | DISCUSSÃO | 53 |
| 7 | CONCLUSÃO | 59 |
| | REFERÊNCIAS | 62 |
| | ANEXO | 66 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os bovinos domésticos pertencem a família Bovidae, estando divididos em duas espécies principais: *Bos indicus* e *Bos taurus* (HAFEZ; HAFEZ; 2004).

Diferenças relacionadas ao aspecto reprodutivo vêm sendo apontadas entre vacas zebus e européias, no entanto, a maioria das investigações ligadas a tecnologia de embriões e seu desenvolvimento tem sido destinada a raças européias, sendo restrita as informações relacionadas a animais zebuínos (PINTO NETO et al., 1999).

Moore et al., (2002) descrevem a formação dos membros em humanos a partir da quarta semana gestacional, sob a forma de pequenas elevações na parede ventrolateral do corpo. Um espessamento do ectoderma na extremidade distal do broto do membro exerce uma influência indutora sob o mesênquima dos brotos dos membros promovendo seu crescimento e desenvolvimento.

Grüneberg e Huston (1965) e Noden e de Lahunta (1990) afirmam ainda que as malformações e disfunções dos membros se encontram entre os defeitos congênitos que com maior frequência afetam os animais domésticos. Em parte, devem-se a sensibilidade dos tecidos e as modificações tanto genéticas (intrínsecas) como ambientais (extrínsecas) das interações celulares que intervêm em seu desenvolvimento.

Sabemos ainda que o período embrionário é o de maior susceptibilidade a teratógenos, sendo a fase em que as primitivas camadas germinativas e rudimento dos órgãos são formados. Cada órgão tem uma fase crítica de desenvolvimento e os processos bioquímicos envolvidos no crescimento e diferenciação tem uma seqüência ordenada, controlada por vários genes (ARTHUR; 1979; MOORE; PERSAUD; 2004).

Há um tempo, a embriologia restringia seu campo de ação ao estudo dos fenômenos e processos da vida intra-uterina, sem preocupar-se muito como o que ocorreria após o nascimento. No entanto, a própria investigação do desenvolvimento embrionário e fetal levou ao descobrimento de que os eventos evolutivos dentro do útero são fundamentais para o nascimento de crias normais.

Assim, sendo escassa a literatura sobre organogênese comparada, achamos de grande valia um estudo embasado no desenvolvimento normal dos membros de

embriões e fetos bovinos provenientes de vacas criadas em ambiente natural, gerando assim um comparativo para o entendimento das inúmeras deformidades e anomalias mais freqüentes, ocorridas em animais nascidos de vacas submetidas as variadas condições climáticas, pastagem, manejo; ou genéticas, como Fertilização *in vitro* e Transferência nuclear.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Estudar a formação e desenvolvimento dos membros pélvico e torácico de embriões e fetos bovinos provenientes de monta natural, correlacionando a idade gestacional estimada ao estágio de desenvolvimento durante o período compreendido entre 20 e 80 dias.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o desenvolvimento morfológico dos membros torácico e pélvico de embriões e fetos bovinos;
- Identificar tecidos e células precursoras no início do desenvolvimento e formação dos membros através estudos microscópicos (Microscopia Eletrônica de Transmissão) e marcar início de ossificação endocondral no período fetal (Microscopia de Luz).

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

O sistema esquelético origina-se de células do mesoderma e da crista neural. Quando a notocorda e o tubo neural se formam, o mesoderma intra-embriônico lateral a estas estruturas, se espessam, formando duas colunas de mesoderma paraxial. Ao final da terceira semana, estas colunas tornam-se segmentadas em blocos de tecido mesodérmico, os somitos. Externamente, os somitos aparecem como elevações arredondadas ao longo da superfície dorsolateral do embrião (DANILOVA, 1963; MOORE; PERSAUD, 2004; NODEN; DE LAHUNTA, 1990). Os primeiros somitos formam-se por volta do 19º dia de gestação nos bovinos (EVANS; SACK, 1973; HAFEZ; HAFEZ, 2004) e sua porção medial se desorganiza e invade as células esclerotomais, migrando medialmente para circundar a notocorda (GASSER, 1979).

3.1 DESENVOLVIMENTO E HISTOGÊNESE DA CARTILAGEM E DOS OSSOS

O broto dos membros é formado quando o mesoderma somático induz a proliferação da placa mesodérmica lateral, constituindo as primeiras condensações de células mesenquimais que constituíram o modelo dos futuros ossos (LARSEN, 1997). A condensação marca o início da atividade seletiva dos genes, que precede a diferenciação celular (HALL; MIYAKE, 1995).

No processo de osteogênese intramembranosa os ossos chatos são formados no mesênquima, enquanto que na osteogênese endocondral os modelos mesenquimais transformam-se em moldes cartilagosos dos ossos (MOORE; PERSAUD, 2004). Células mesenquimais responsável pelo mecanismo de formação dos membros são organizadas de maneira que originem cartilagem inicial, músculo e tendão, e a partir destes se desenvolverá o futuro membro (CAPLAN, 1991; WOLPERT, 1976). Wolpert (1994) sugere ainda que o desenvolvimento dos membros dos vertebrados gera um modelo determinante, onde cartilagem e músculo se desenvolvem, e linhagens celulares se diferenciam em membros torácicos e pélvicos.

Sadler (2005) explica tal modelo determinante citado Wolpert (1994) descrevendo a regulação molecular no desenvolvimento dos membros em humanos, onde a posição dos membros ao longo do eixo craniocaudal nas regiões do flanco do embrião é regulada pelos genes HOX (homeobox) expressos ao longo do eixo. Esses genes homeobox são expressos em padrões que se superpõem da cabeça à cauda, tendo alguns deles limites mais cranianos do que outros. O limite craniano da expressão de HOXB8 é na borda cefálica do membro superior e a expressão incorreta desse gene altera a posição desses membros. Uma vez determinada a posição ao longo do eixo cefalo-caudal, o crescimento deve ser regulado ao longo dos eixos próximo-distal, ântero-superior e dorsoventral. O crescimento dos membros, que ocorre primeiro, é desencadeado pelo FGF-10 segregado pelas células do mesoderma da placa lateral. Uma vez iniciado este crescimento, as proteínas morfogenéticas ósseas (*BMP*), expressas no ectoderma ventral, induzem a formação da CEA por sinalização pelo gene homeobox *MSX2*. A expressão do gene *Radical fringe*, na metade dorsal do ectoderma do membro, restringe a localização da CEA à extremidade dorsal dos membros.

Tal gene induz a expressão de *Ser-2* na borda entre as células que expressam o *Radical fringe* e aquelas que não o expressam. É nessa borda que a CEA é estabelecida. O crescimento distal do membro é efetuado por uma rápida proliferação celular, sob a influência dos FGFs. Durante o crescimento, as células mesenquimais na extremidade proximal da zona de progresso se distanciam mais da crista e de sua influência e começam a reduzir sua velocidade de divisão e a se diferenciar (SADLER, 2005).

O eixo dorsoventral também é regulado pelas PMO no ectoderma ventral, as quais induzem a expressão do fator de transcrição *EN1*. O *EN1*, por sua vez, reprime a expressão de *WNT7a*, restringindo-o ao ectoderma dorsal do membro. O *WNT7a* é um fator segregado que induz a expressão de *LMX1* um fator de transcrição contendo um homeodomínio, no mesênquima dorsal. O *LMX1* especifica que as células sejam dorsais, estabelecendo os componentes dorsoventrais. De fato todos os genes de padronização nos membros têm alças de *feedback* (ou retroalimentação). Portanto os FGFs na CEA ativam o *SHH* na ZAP, enquanto o *WNT7a* mantém o sinal de *SHH*. Os fatores que determinam o membro superior e o inferior são os fatores de transcrição *TBX5* (membros superiores) e *TBX4* (membros inferiores) (SADLER, 2005).

Fletcher e Weber (2004) e Moore e Persaud (2004) afirmam que a cartilagem se desenvolve a partir do mesênquima e aparece, pela primeira vez, nos embriões durante a quinta semana gestacional. Nas áreas onde a cartilagem irá desenvolver-se, o mesênquima se condensa para formar centros de formação de cartilagem. As células mesenquimais proliferam e tornam-se arredondadas. As células formadoras de cartilagem (condroblastos) secretam fibrilas de colágeno e substância fundamental da matriz. Subseqüentemente, fibras colágenas e/ou elásticas são depositadas na substância intercelular, ou matriz. O modelo cartilaginoso é cercado por tecido fibroso pericondral.

A cartilagem cresce devido à diferenciação de fibroblastos, que se encontram numa membrana de tecido conjuntivo envolvente, denominada pericôndrio. Células periféricas do pericôndrio, os fibroblastos, se transformam gradualmente em células arredondadas, os condroblastos, que geram células alongadas, os condrócitos (JUNQUEIRA, 2005), os quais apresentam grânulos eletrodensos e mitocôndrias, quando analisados em microscopia eletrônica de transmissão por Brighton e Fetter (1985).

Daniels e Solursh (1991) estudaram a modulação da condrogênese pelo citoesqueleto e matriz extracelular e acrescentam que durante os eventos iniciais *in vivo*, o mesênquima precursor forma condensações celulares adquirindo um formato arredondado. Daí surge os condrócitos alinhados dentro de lacunas, formados pela secreção da matriz extracelular da cartilagem, incluindo secreção de moléculas de proteoglicanas, colágeno tipo II e glicoproteínas como a condroitina. (DANIELS; SOLURSH, 1991; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MONTENEGRO et al., 2004).

O osso se forma a partir de dois tipos de tecido conjuntivo, mesênquima e cartilagem. Do mesmo modo que a cartilagem, o osso é constituído por células e uma substância intercelular orgânica: a matriz óssea, a qual é constituída por fibrilas de colágeno contidas em um componente amorfo (MOORE; PERSAUD, 2004).

Segundo Pizauro Jr., Ciancaglini e Macari (2004) o disco de crescimento na ossificação endocondral é composto de cartilagem, formando uma estreita faixa de ligação entre a epífise e a diáfise, e pode ser dividida em várias regiões anatômicas: zona de reserva, que contém condrócitos aparentemente dispersos e inativos; zona de proliferação, onde a maioria das divisões celulares ocorre. Esta região contém células precursoras dos condrócitos (células progenitoras) em forma de disco. O nascimento de células jovens que se diferenciam em condrócitos acarreta um

acúmulo de novas células que são deslocadas para baixo, formando uma coluna ao longo da zona proliferativa.

Noden e de Lahunta (1990) sugerem que o esboço dos membros cresce distalmente, ao mesmo tempo o mesênquima do interior do esboço se dispõe em duas populações morfológicamente distintas: uma proximal de citodiferenciação condrogênica, escápula ou pelve, depois úmero e fêmur e assim sucessivamente; outra população mais distal se localiza imediatamente abaixo da crista ectodérmica apical e permanece citologicamente homogênea. Esta população distal proporciona a formação, em sentido crânio caudal, dos segmentos intermédios (radio – ulna ou tibia – fíbula), distais (carpo ou tarso) e finalmente as falanges digitais.

Os esboços das extremidades em seu crescimento se fazem aplanado em sentido dorso ventral e sua porção distal adquire uma forma de placa correspondente à mão ou pé. Ao mesmo tempo se encurvam ventralmente, de tal maneira que a superfície ventral original passa a ser medial. Mais tarde, as extremidades sofrem uma rotação, levando a borda cranial da porção distal situar-se em posição medial. Isso explica o primeiro dedo, que nos quadrúpedes está situado medialmente (COSTA, 1957; NODEN; DE LAHUNTA, 1990)

Em bovinos a maioria dos órgãos e partes do corpo é formada entre a segunda e sexta semana de gestação (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Winters et al., (1942) descrevem o desenvolvimento pré-natal dos bovinos em dias e horas, e afirmam que o broto dos membros torácicos aparecem ao 24º dia e 2 horas de gestação, brotos dos membros pélvicos tornam-se visíveis com 27 dias e 14 horas. Aos 32 dias e 14 horas os brotos dos membros ainda estão se especializando para o período fetal e uma extensa área em ossificação foi observada nos ossos longos dos fetos com 59 dias de gestação.

Alberto et al., (2006); Evans e Sack (1973) estudaram o desenvolvimento morfológico pré-natal dos animais domésticos e relatam que a presença inicial dos brotos dos membros aparece no 24º dia de gestação nos bovinos, e aos 30 dias de gestação a placa dos membros torácicos já está formada. Por volta do 34º dia torna-se visível os raios digitais e separação dos dígitos distais ocorre com 45 dias de gestação. Com 60 dias de gestação formam-se os cascos, tornando-se firmes e opacos aos 100 dias e mais duros com 150 dias de gestação.

Em embriões humanos com 24 dias de gestação aparecem os brotos de membro superior através de uma leve elevação ventrolateral. Aos 28 dias tornam-se

mais elevados, com aparecimento dos vasos sanguíneos responsáveis pela futura vascularização. Com 32 dias, aparece um “cone” de células mesenquimais mais abaixo dos membros superiores, e reconhece-se a palma das mãos e aos 41 dias estão visíveis os raios digitais e acontecendo a histogênese da cartilagem nos brotos dos membros superiores e inferiores (O’RAHILLY; GARDNER, 1975; RODRIGO-VÁSQUEZ, 2005).

Yukawa et al., (1999) estudou o tempo e a seqüência do aparecimento de centros de ossificação em fetos de *Mongolian gerbil* e constatou que os mesmos surgem aos 19 dias de gestação no úmero, ulna, rádio, fêmur, tíbia e fíbula, aos 21 dias no terceiro metacarpo, 23 dias no segundo e quarto metacarpo, 25 dias o quinto metacarpo, e falanges no 22º dia de gestação. Strong (1925) descreve ainda que a ossificação ocorre muito mais cedo no homem que no rato, iniciando-se no segundo mês de vida embrionária, sendo que no rato a primeira ossificação acontece em menos de uma semana antes do nascimento.

De acordo com Serrano et al., (2006) a ossificação endocondral, típica do crescimento mamífero, envolve processo influenciados por vários fatores, como endócrinos, nutricionais, celulares, histológicos e bioquímicos. Moore, Persaud (2004) complementa afirmando que este tipo de formação de osso dá-se dentro de moldes de cartilagem preexistentes. Em um osso longo, o centro primário de ossificação aparece na diáfise, situado entre suas duas extremidades constituindo o corpo do osso. Nesta região, as células cartilaginosas aumentam de tamanho (hipertrofiam), a matriz torna-se calcificada e as células morrem. Ao mesmo tempo, uma camada delgada de osso é depositada sob o pericôndrio, que envolve a diáfise; deste modo, o pericôndrio se transforma em periósteo.

A calcificação inicial acontece na zona hipertrófica, dentro da matriz, sendo suas vesículas estruturas muito pequenas, cercadas por uma membrana trilaminar produzidas pelos condrócitos. As vesículas da matriz são ricas em fosfatase e acumulam cálcio, tornando-a relativamente impermeável a metabólitos (BRIGHTON; FETTER, 1985).

Na zona de calcificação, os condrócitos sofrem degeneração, ocorrendo depósitos de fósforo de no interior das vesículas (que surgem por brotamento das superfícies laterais dos condrócitos), e posteriormente se extravasam infiltrando nos interstícios das colunas de célula adjacentes (PIZAURO JR; CIANCAGLINI; MACARI, 2004).

Larsen (1997) sugere ainda que o processo de ossificação inicia-se numa região do osso denominada centro de ossificação primária. Inicialmente células mesenquimais do pericôndrio diferenciam-se em osteoblastos, em resposta a um fator de crescimento ósseo. Estas células secretam matriz de sais de cálcio e formam um colar ósseo primário.

Os três componentes principais do osso maduro são as células osteogênicas, a matriz orgânica e os minerais. As células osteogênicas incluem os osteoblasto, osteócitos e osteoclastos, sendo que a matriz consiste predominantemente de colágeno e proteoglicanas, constituindo aproximadamente um terço da massa do osso, já o mineral que compõe aproximadamente dois terços do osso é composto de cristais de fosfato de cálcio depositados como hidroxiapatita (FETTER; RHINELANDER, 1995).

O regulamento ou diferenciação dos condrócitos no modelo cartilaginoso dá-se por microfilamentos. Das placas de adesão e matriz extracelular até a membrana plasmática inicia uma cascata de eventos que culmina com uma alteração na expressão dos genes e fenótipos da célula. Assim, podem ser transmitidas composições ou pequenas alterações para o interior da célula, sinalizando o modelo de tecido a ser formado (DANIELS; SOLURSH, 1991).

A cartilagem é fragmentada pela invasão de tecido conjuntivo vascular proveniente do periósteo. Algumas células invasoras se diferenciam em células hemopoiéticas, responsáveis pela formação das células do sangue e da medula óssea. Outras células invasoras se diferenciam em osteoblastos, que depositam matriz óssea sobre as espículas de cartilagem calcificada. Este processo avança em direção às epífises ou extremidades do osso. As espículas ósseas são remodeladas pela ação dos osteoclastos e osteoblastos (MOORE; PERSAUD, 2004; SADLER, 2004).

O crescimento longitudinal (alongamento) dos ossos longos ocorre na junção diáfise-epifisária. O alongamento do osso depende das placas de cartilagem epifisárias (cartilagem de conjugação, ou placas de crescimento), cujos condrócitos proliferam e participam da formação endocondral do osso. As células cartilaginosas da região diáfise-epifisária proliferam por mitose. No lado voltado para a diáfise, as células cartilaginosas se hipertrofiam e a matriz se calcifica, sendo fragmentada em espículas pelo tecido vascular da medula óssea, ou cavidade medular (LARSEN, 1997; MOORE; PERSAUD, 2004; JUNQUEIRA, 2005).

A ossificação dos ossos dos membros começa ao final do período embrionário e, daí em diante, necessita do suprimento materno de cálcio e fósforo. A região de formação óssea no centro da diáfise de um osso longo constitui o centro primário de ossificação, diferentemente das epífises que ossificam mais tarde (FLETCHER; WEBER, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004; SADLER, 2004).

No nascimento, as diáfises estão bastante ossificadas, mas a maior parte das extremidades, ou epífises, ainda é cartilaginosa. Grande parte dos centros secundários de ossificação aparece nas epífises durante os primeiros anos após o nascimento. As células da cartilagem epifisária se hipertrofiam, e há invasão desta cartilagem por tecido conjuntivo vascular. A ossificação se espalha em todas as direções, e somente persiste cartilagem na superfície (cartilagem articular) e em uma placa transversal, a cartilagem de conjugação, ou disco epifisário (GILBERT; 1994; MOORE; PERSAUD; 2004).

Martin e Mackay (2003) estudaram o desenvolvimento dos membros de *Monodelphis domestica* (marsupial) e constataram que mudanças mais significativas se iniciam no dia 0 (zero) do período pós-natal, estando correlacionado às demandas funcionais dos membros durante esta fase. *Monodelphis* nascem com membro torácico mais desenvolvido que membro pélvico, o qual não tem função nesta fase, mas na maioria das vezes as proporções dos membros são invertidas, estando o membro pélvico pronto para locomoção. Surgem inicialmente condensações mesenquimais derivadas de mesoderma, e secundariamente os centros de ossificação se apresentam nos ossos longos e falanges distais do membro torácico, já, falanges proximais e metacarpos medianos iniciam o processo de ossificação no dia 6. No entanto, os centros de ossificação do carpo não foram observados até o 56º dia pós-natal.

Martiniaková et al., (2006) estudaram a microestrutura do tecido compacto de fêmur de vacas (*Bos taurus*) adultas e constataram que a camada interna do fêmur, que circunda a porção medular, é constituída por uma zona de tecido avascular contendo lamelas concêntricas e osteócitos com ausência de canais vasculares primários e secundários.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

As coletas de úteros gestantes foram realizadas em frigoríficos e abatedouros da região de Poços de Caldas-MG. Obteve-se uma coleta de 30 embriões e fetos, em diferentes estágios gestacionais.

Os úteros foram abertos, os embriões e fetos fixados em solução de formol tamponado a 10% e líquido de Bouin. O material coletado foi transportado para Laboratório de Anatomia e Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/FMVZ – USP.

Os períodos gestacionais foram estimados conforme metodologia preconizada por Evans e Sack (1973); Noden e Lahunta (1990) e Winters et al., (1942), com mensurações de distância occípito-sacral da cabeça, tomando como referência a crista nugal numa extremidade e a última vértebra sacral na extremidade oposta (Crow-Rump / CR). Após tal procedimento, os embriões e fetos foram fotografados.

4.1 ESTUDOS MACROSCÓPICOS: PREPARO DO MATERIAL

Os úteros foram dissecados e em seguida realizou-se uma incisão dorsal ao cérvix para avaliações macroscópicas dos embriões e fetos. Para os embriões pequenos foram utilizadas lupas estereomicroscópicas¹ e lupa cirúrgica².

4.2 ESTUDO MICROSCÓPICO

O estudo microscópico foi realizado através de técnicas de inclusão, com cortes semi e ultrafinos.

¹ Zeiss, Stemi DV4

² Leica

4.2.1 Processamento Microscopia de Luz

Os embriões foram colocados em solução fixadora de Bouin/Formol tamponado a 10%, onde permaneceram embebidos por 24 horas, até sua completa fixação. Já para os fetos, os membros foram dissecados e separados do restante do corpo para uma melhor penetração do fixador. Após este processo, o material foi desidratado em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 50 a 100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em paraplast®³.

Foram realizados cortes consecutivos de 5 a 6µm de espessura, corados por métodos de rotina: Hematoxilina e Eosina, para marcar área de mesênquima e cartilagem e coloração de Von Kossa (ANEXO A) para marcação de cálcio e fósforo, responsável pela ossificação dos moldes de cartilagem, posteriormente os resultados foram descritos e documentados.

4.2.2 Processamento Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os moldes dos membros dos embriões foram previamente fixados em glutaraldeído 2,5%⁴ em tampão fosfato 0,1M, PH 7,2. Ao término da fixação o material foi lavado em tampão fosfato de sódio a 0,1M, PH 7,4 por três vezes durante 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%⁵ por 1 hora. Após novas lavagens em tampão fosfato os fragmentos de embriões foram desidratados em álcool etílico a 50%, 70%, 90%, 100% e lavados em óxido de propileno⁶.

³ Paraplast Embedding Media_Paraplast Plus, Sigma, Oxford Lab., USA

⁴ Glutaraldehyde grade I: 70% aquoso solution – Sigma chemical Co., USA

⁵ Osmium tetroxide 4% w/w solution in water – polyscience, Inc., USA

⁶ Propylene oxide EM Grade, Polysciences, Inc, USA

Por um tempo de 12 a 16 horas os fragmentos permaneceram sob rotação a 1:1 de óxido e propileno e resina⁷. Na seqüência, essa mistura foi substituída por resina pura por 4 a 5 horas. Após este período foram embebidas com resina pura em moldes. Uma vez incluídos, permaneceram em estufa a 69°C por 72 horas para consolidar a polimerização da resina.

Os blocos foram cortados em ultra-micrótomo⁸. Cortes semi finos de 1µm de espessura foram obtidos corando-se a quente com solução de borato de sódio a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de Toluidina para observação ao microscópio de luz.

Os cortes ultrafinos de cerca de 60nm de espessura foram colhidos em telas de cobre e contrastados pelo acetato de uranila 2% em água destilada por 5 minutos e pelo citrato de chumbo 0,5% em água destilada durante 10 minutos. As observações e eletromicrografias sub-celulares foram realizadas no microscópio eletrônico⁹.

⁷ Araldite – 502 EMBEDDING, Kit-Electron Microscopy Sciences, USA

⁸ Leica ULTRACUT UCT®

⁹ MORGAGNI – modelo 268D, Microscópio Eletrônico de Transmissão – Philips

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Optamos por separar em dois tópicos diferentes a descrição dos resultados, sendo que a microscopia eletrônica de transmissão apresentará o início da formação e desenvolvimento dos membros de embriões bovinos juntamente da sua constituição celular. A microscopia de luz mostrará o período em que se inicia os depósitos de grupamentos de cálcio e fósforo responsáveis pela ossificação endocondral durante o período fetal.

5.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Condensações de células mesenquimais formam centros cartilagosos que vão se diferenciando até o início da ossificação. Embriões com CR de 9,0 mm e idade gestacional estimada de três semanas apresentam células organizadas uniformemente, próximas umas as outras constituindo tecido mesenquimal condensado. Observamos pequena área de matriz extracelular, células com núcleo alongado, nucléolo e grânulos de cromatina dispersos por todo o núcleo (eucromatina) e pequenas condensações (heterocromatina). Dentre as organelas citoplasmáticas evidenciamos retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Figura 1).

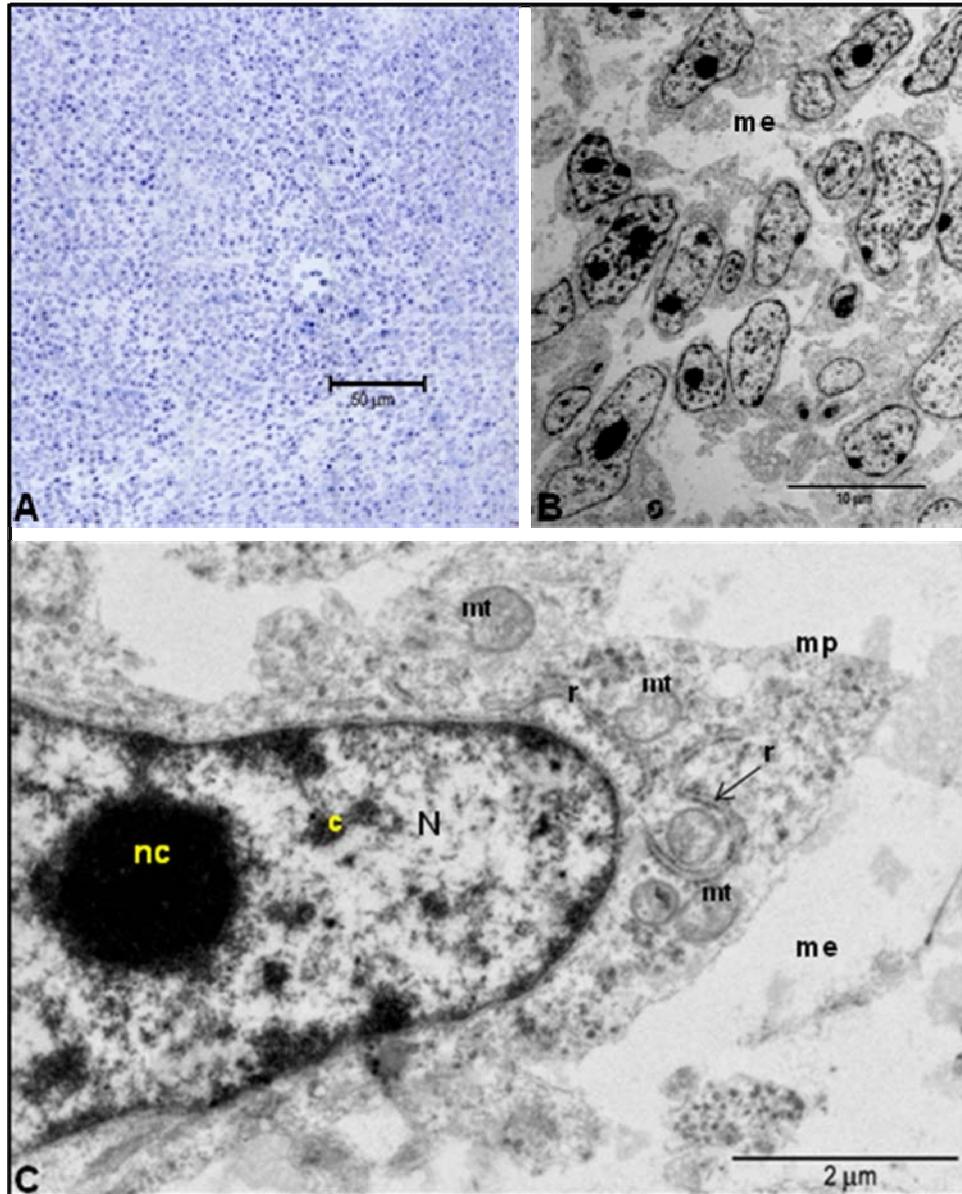
Por volta da quarta semana gestacional (CR de 20,0 mm) as células mesenquimais estão diferenciadas em condroblastos passando a apresentar formato mais globoso em alguns pontos e maior área de matriz extracelular. Notamos ainda que o núcleo acompanha o formato da célula e nucléolo localiza-se próximo ao envoltório nuclear, grânulos de cromatina estavam presentes e no citoplasma observamos retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e estruturas eletrodensas (Figura 2).

As células mesenquimais tornam-se mais globosas e se agrupam de maneira que constituem dois moldes cartilagosos primordiais, circundados por células mais alongadas e com pequena área de matriz extracelular em embriões com CR de 25,0 mm, ao redor da sexta semana gestacional. Observamos retículo endoplasmático rugoso mais extenso e projeções de membrana plasmática conferindo a

comunicação entre células. Na matriz extracelular estavam presente fibras colágenas (Figuras 3 e 4).

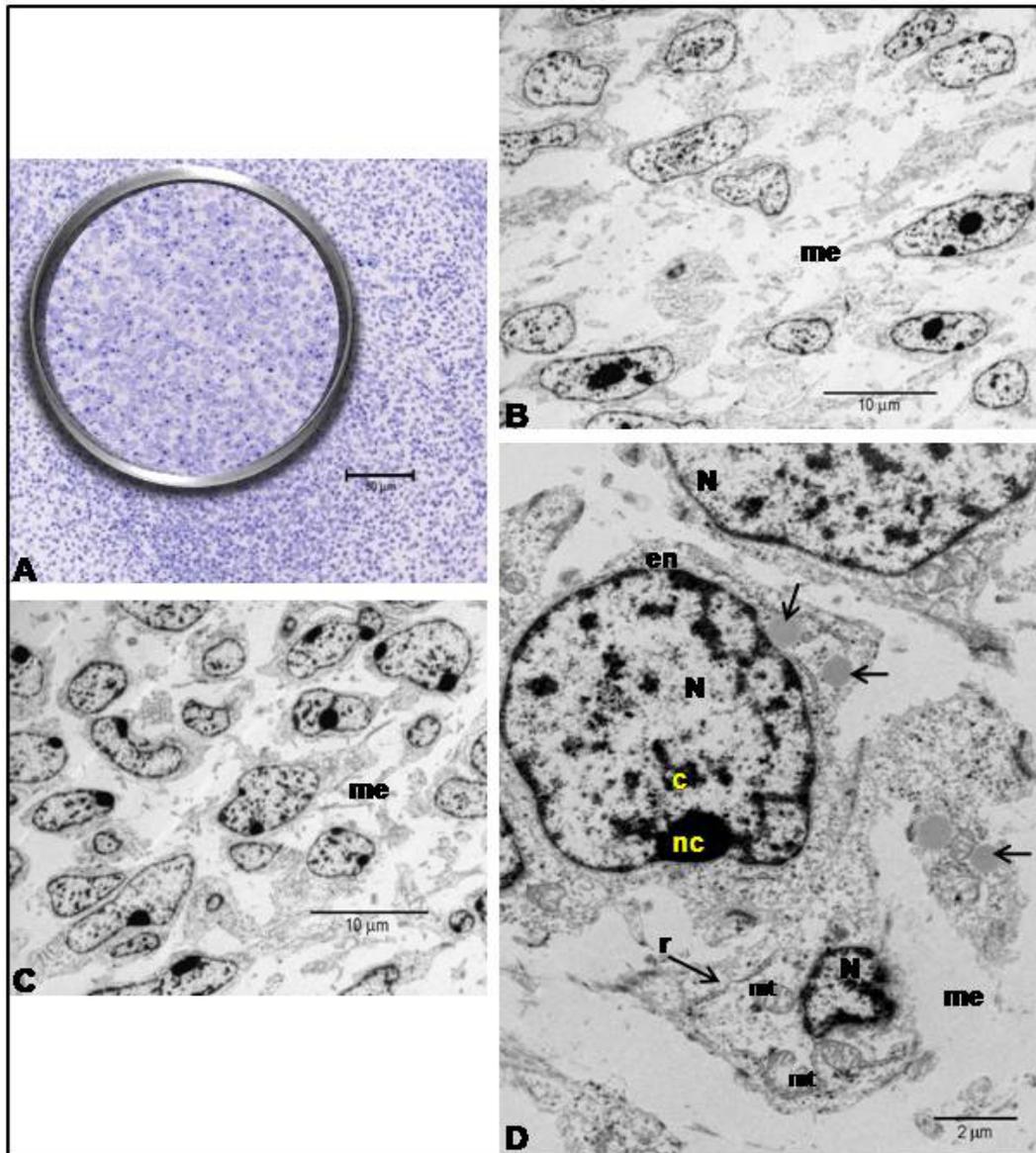
Fetos com CR de 30,0 mm (sétima semana gestacional) apresentam molde cartilagenoso hialino precursor na formação de osso longo. Pudemos observar condroblastos com aspecto globoso, e espaço entre eles, sem apresentarem interdigitações de membrana. Os núcleos possuem formato estrelado, o citoplasma contém retículo endoplasmático rugoso em maior quantidade quando comparado a célula mesenquimal precursora e delimitado da matriz extracelular pela membrana plasmática que apresentava pequenas projeções. Ao redor da matriz cartilaginosa visualizamos pericôndrio, com células alongadas e pequena área de matriz extracelular (Figura 5).

Cartilagem hipertrófica foi observada em fetos com CR de 76,0 mm (décima semana gestacional). Os condrócitos apresentaram formato alongado, com projeções de membrana proporcionando aspecto estrelado. Extensos retículos endoplasmáticos rugoso foram encontrados no citoplasma em grande quantidade, quando comparado aos condroblastos e presença de estruturas eletrodensas (Figura 6).



Legenda: Em A Fotomicrografia de corte semi fino de mesênquima precursor na formação de tecido cartilaginoso. Observar células organizadas uniformemente, próximas umas às outras. Coloração: Azul de toluidina.
 B: Eletromicrografia da área mostrada em A, onde podemos notar células com formato alongado, e pequena área de matriz extracelular (me).
 C: Eletromicrografia de célula mesenquimal em maior aumento, notamos a presença de um núcleo (N) alongado, acompanhando o formato da célula, nucléolo (nc) e grânulos cromatina (c) dispersos por todo o núcleo (eucromatina) contendo pequenas condensações (heterocromatina). No citoplasma verificamos a presença de retículo endoplasmático rugoso (r), mitocôndrias (mt), membrana plasmática (mp) delimitando meio interno da matriz extracelular (me)

Figura 1 – Fotomicrografia e Eletromicrografia de mesênquima precursor de tecido cartilaginoso em embrião bovino (Crow Rump = 12,0 mm)



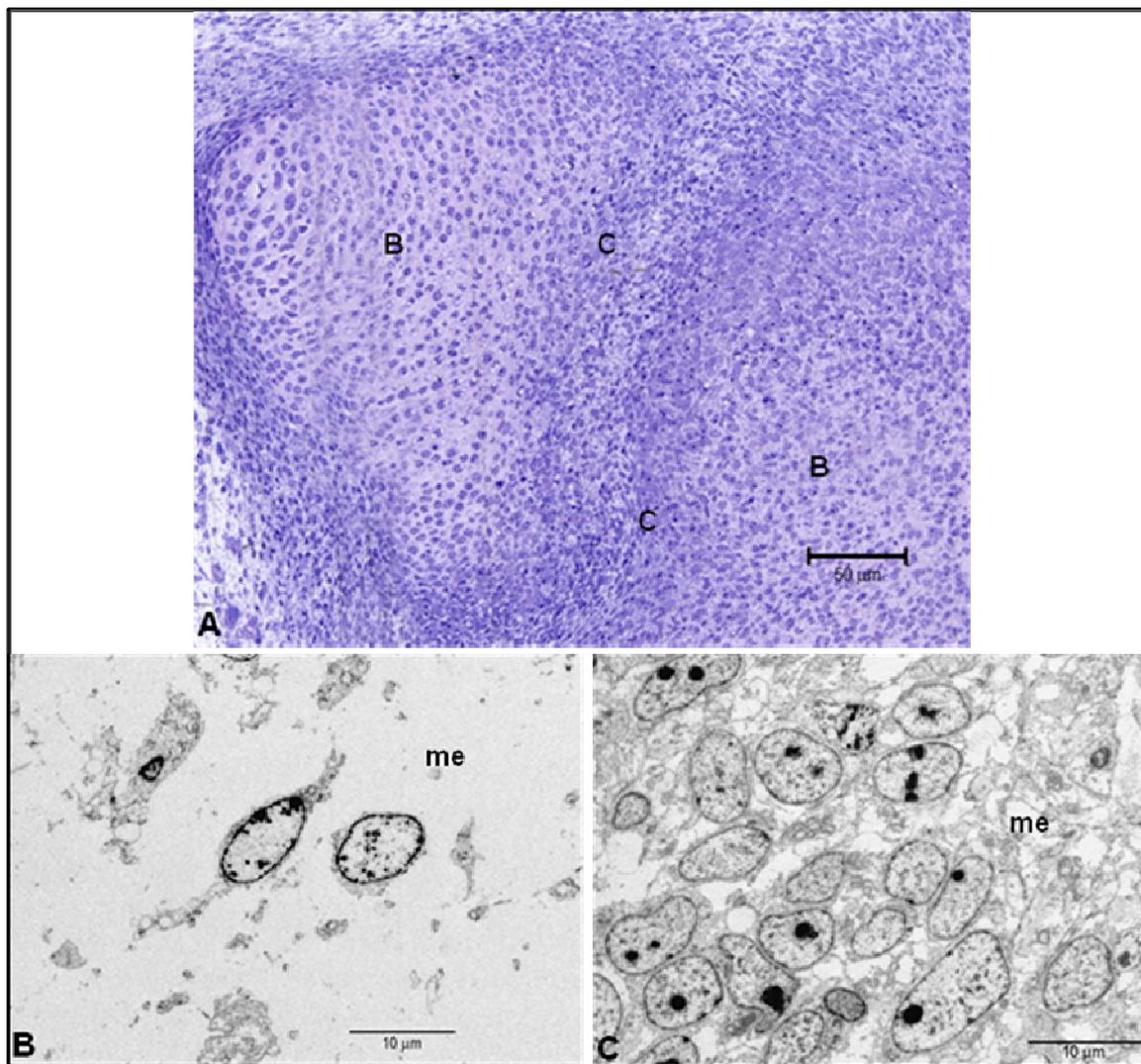
Legenda: Em A Fotomicrografia de corte semi fino de mesênquima precursor na formação de tecido cartilaginoso. Observe que as células estão organizadas uniformemente, próximas umas às outras, apresentando-se mais globosas na área demarcada pela circunferência. Coloração: Azul de toluidina.

B: Eletromicrografia mostrando a área demarcada em A, onde podemos notar seu formato alongado, e maior área de matriz extracelular (me).

C: Eletromicrografia mostrando região adjacente a área demarcada em A, menor distância entre as células, portanto menor área de matriz extracelular (me).

D: Eletromicrografia de célula mesenquimal em maior aumento. Núcleo (N) presente acompanhando o formato da célula, nucléolo (nc) próximo ao envoltório nuclear (en) e grânulos cromatina (c) dispersos por todo o núcleo (eucromatina), com pequenas condensações (heterocromatina). No citoplasma verificamos a presença de retículo endoplasmático rugoso (r), mitocôndrias (mt), estrutura eletrodensa (seta) e matriz extracelular (me)

Figura 2 – Fotomicrografia e Eletromicrografia de mesênquima precursor de tecido cartilaginoso em embrião bovino (Crow Rump = 20 mm)

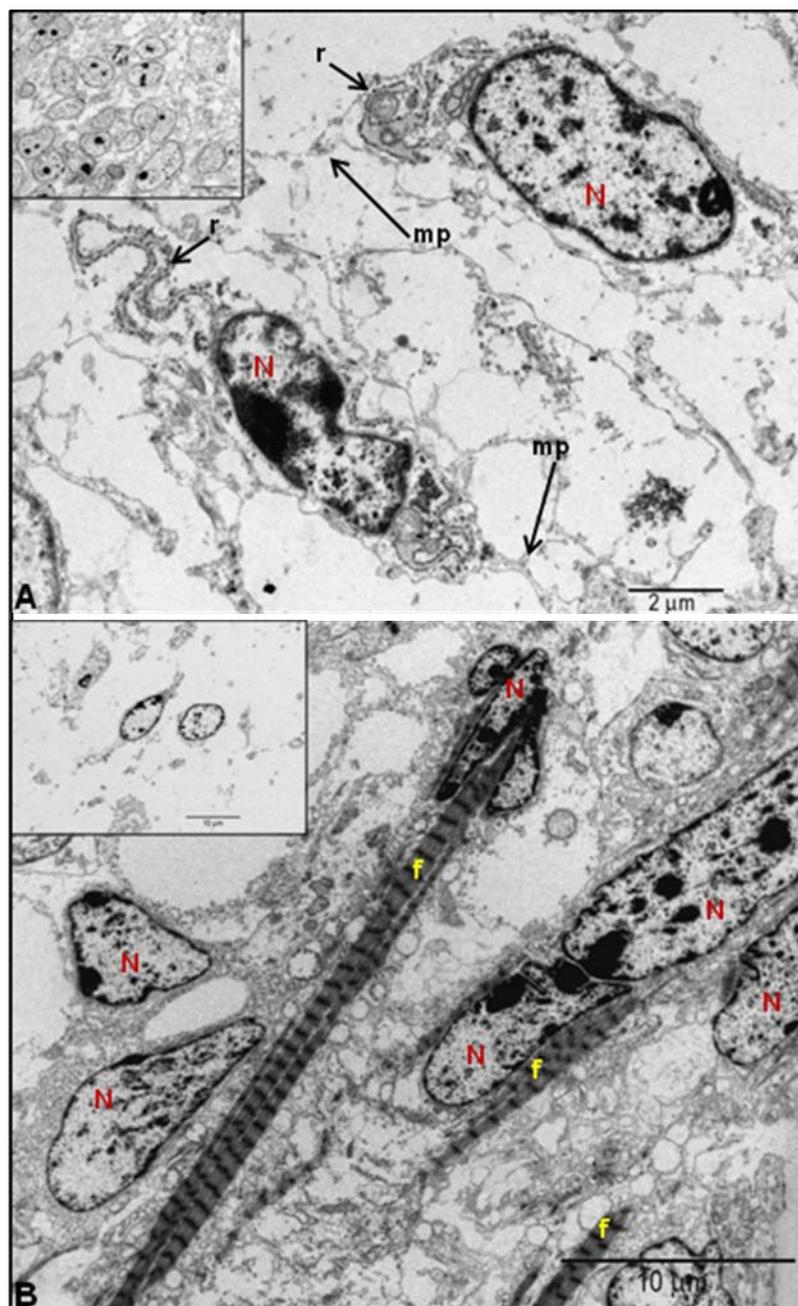


Legenda: Em A Fotomicrografia de corte semi fino de mesênquima em diferenciação para formação de tecido o cartilaginoso. Observe a organização das células tornando-se mais globosas e afastadas umas das outras (B), circundados por células mais alongadas e unidas (C). Coloração: Azul de toluidina.

B: Eletromicrografia mostrando células globosas e espaçadas em A, sendo vasta a área de matriz extracelular (me).

C: Eletromicrografia mostrando células em maior aumento da região apresentada em A. Visualizar menor distância entre as células e pequena área de matriz extracelular (me).

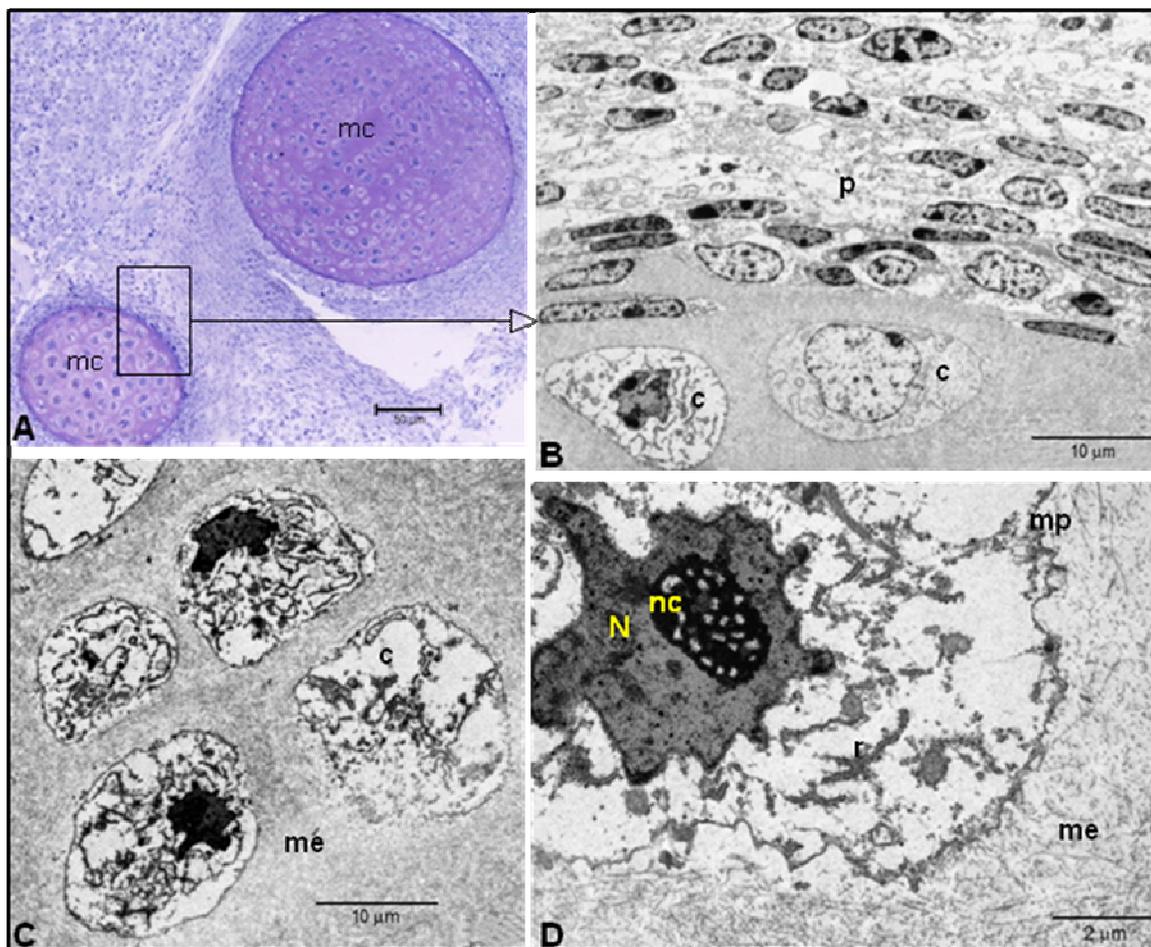
Figura 3 – Fotomicrografia e Eletromicrografia de mesênquima em diferenciação para formação de molde cartilaginoso do osso longo de embrião bovino (Crow Rump = 25,0 mm)



Legenda: Em A Eletromicrografia de célula mesenquimal apresentando núcleo(N) alongado acompanhando o formato da célula, grânulos cromatina (c) dispersos por todo o núcleo (euromatina), com pequenas condensações (heterocromatina). No citoplasma verificamos a presença de retículo endoplasmático rugoso (r) e projeções de membrana plasmática (mp), pequena área de matriz extracelular (me)

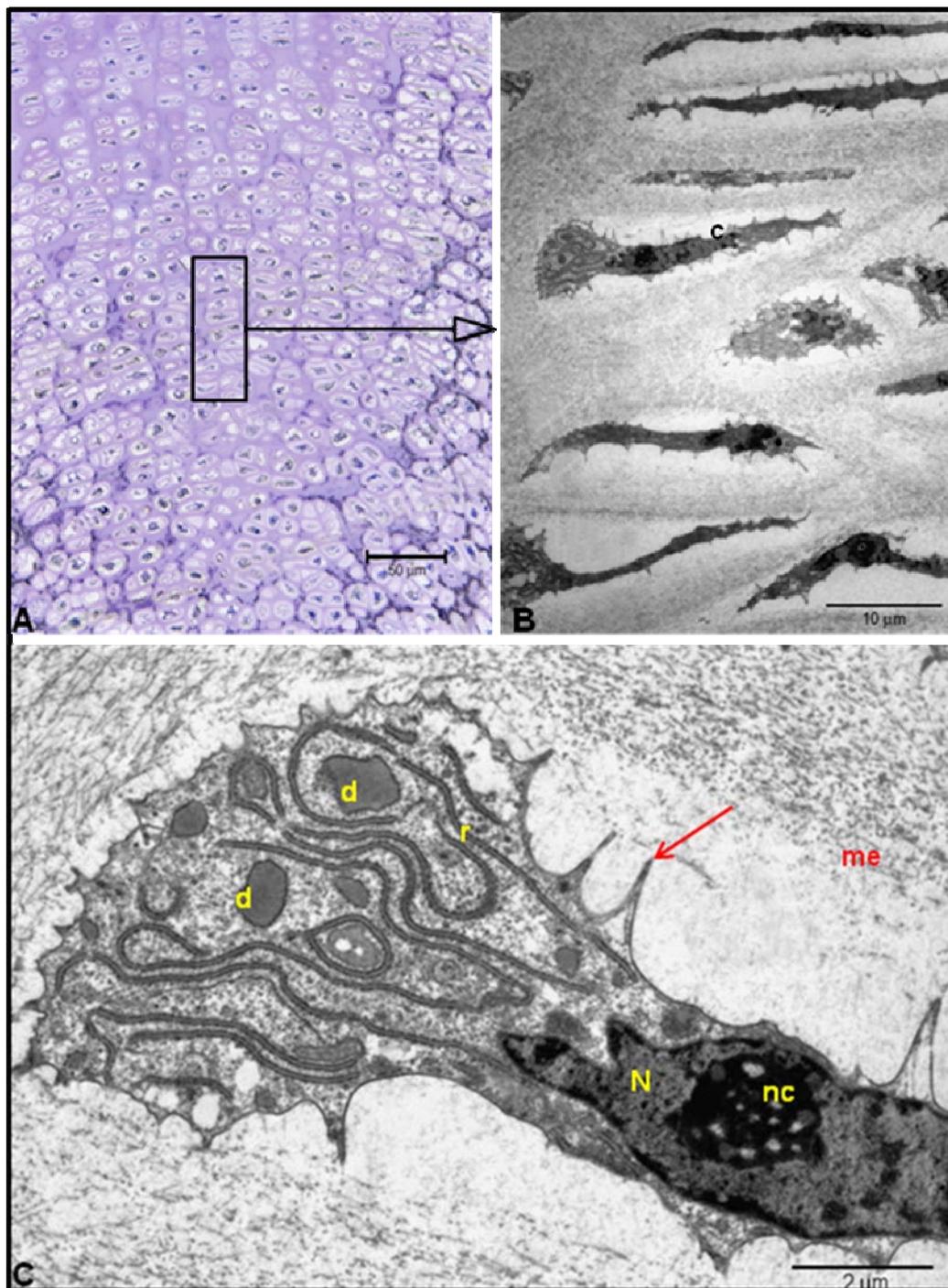
B: Eletromicrografia célula mesenquimal apresentando núcleo(N) contendo grânulos cromatina dispersos (euromatina), e grandes condensações (heterocromatina). Observar a presença de fibras colágenas (f)

Figura 4 – Eletromicrografia de célula mesenquimal formadora de tecido cartilaginoso em osso longo de embrião bovino (Crow Rump = 25,0 mm)



Legenda: Em A Fotomicrografia de corte semi fino de molde de cartilagem (mc) hialina primordiais na formação do osso. Área selecionada para eletromicrografia B. Coloração: Azul de toluidina.
 B: Eletromicrografia mostrando condroblastos (c) com formato globoso e espaçados uns dos outros, mais acima área de pericôndrio (p) com células alongadas e pequena área de matriz extracelular.
 C: Eletromicrografia mostrando condroblastos (c) constituintes de tecido cartilaginoso. Notar que as células não apresentam interdigitações, com formato arredondado e área de matriz extracelular (me).
 D: Condroblasto em maior aumento. Notar núcleo (N) estrelado e nucléolo (nc). O citoplasma da célula apresenta retículo endoplasmático rugoso (r), estando delimitado da matriz extracelular (me) pela membrana plasmática (mp) contendo pequenas projeções .

Figura 5 – Fotomicrografia e Eletromicrografia de molde cartilaginoso hialino precursor na formação do osso longo de feto bovino (Crow Rump = 30,0 mm)



Legenda: Em A Fotomicrografia de corte semi fino da zona de cartilagem hipertrófica. Área selecionada para eletromicrografia B. Coloração: Azul de toluidina.
 B: Eletromicrografia mostrando condrócitos (c) com formato alongado e estrelado.
 C: Eletromicrografia de condrócito. Observar: retículo endoplasmático rugoso, estruturas eletrodensas (d), núcleo (N) alongado e nucléolo (nc). Membrana plasmática apresenta projeções dando aspecto estrelado a célula (seta), separando-a do meio extracelular

Figura 6 – Fotomicrografia e Eletromicrografia de cartilagem seriada precursora na formação do osso longo de feto bovino (Crow Rump = 76,0 mm)

5.2 MICROSCOPIA DE LUZ

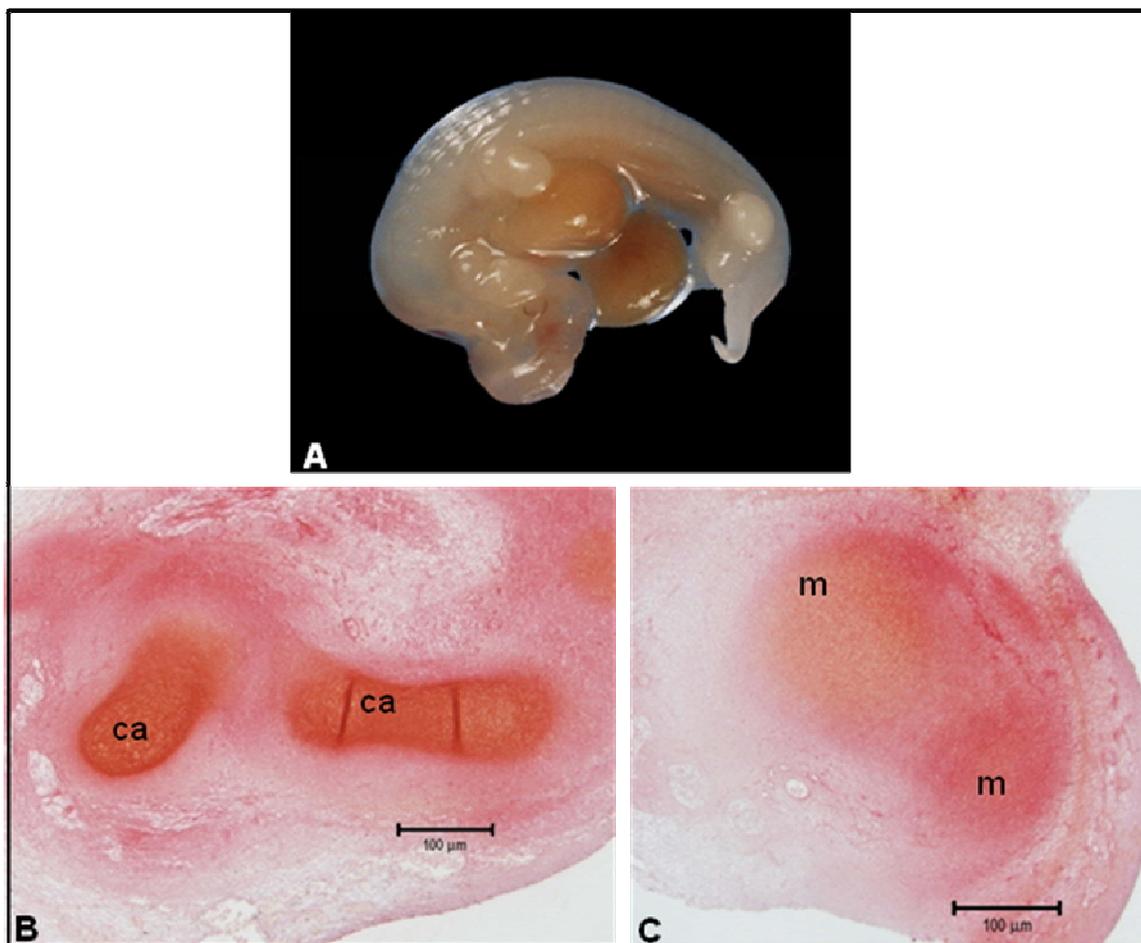
Os embriões bovinos com CR de 28,00 mm apresentam apenas um pequeno brotamento do membro pélvico enquanto que o membro torácico já se apresentava em forma de “placa”. Histologicamente foi verificada condensação de células mesenquimais nos brotos pélvicos e tecido cartilaginoso já formado, circundados por células mesenquimais, nos brotos de membros torácicos (Figura 7).

Por volta da sétima semana gestacional (CR de 35,0 mm) os membros torácicos e pélvicos dos fetos bovinos já haviam sofrido bipartição e ambos apresentavam moldes cartilagosos, com zonas de cartilagem em proliferação e cartilagem em repouso, pericôndrio e mesênquima ao redor (Figura 8).

Entre a sétima e oitava semana gestacional (CR de 50,0 mm) os moldes cartilagosos ainda apresentam mesênquima em diferenciação ao redor. A cartilagem inicia seu processo de hipertrofia e erosão, com depósitos de cálcio e fósforo que aparecem primeiro no centro (diáfise) do osso longo se espalhando para as extremidades (epífises) (Figuras 9 e 10).

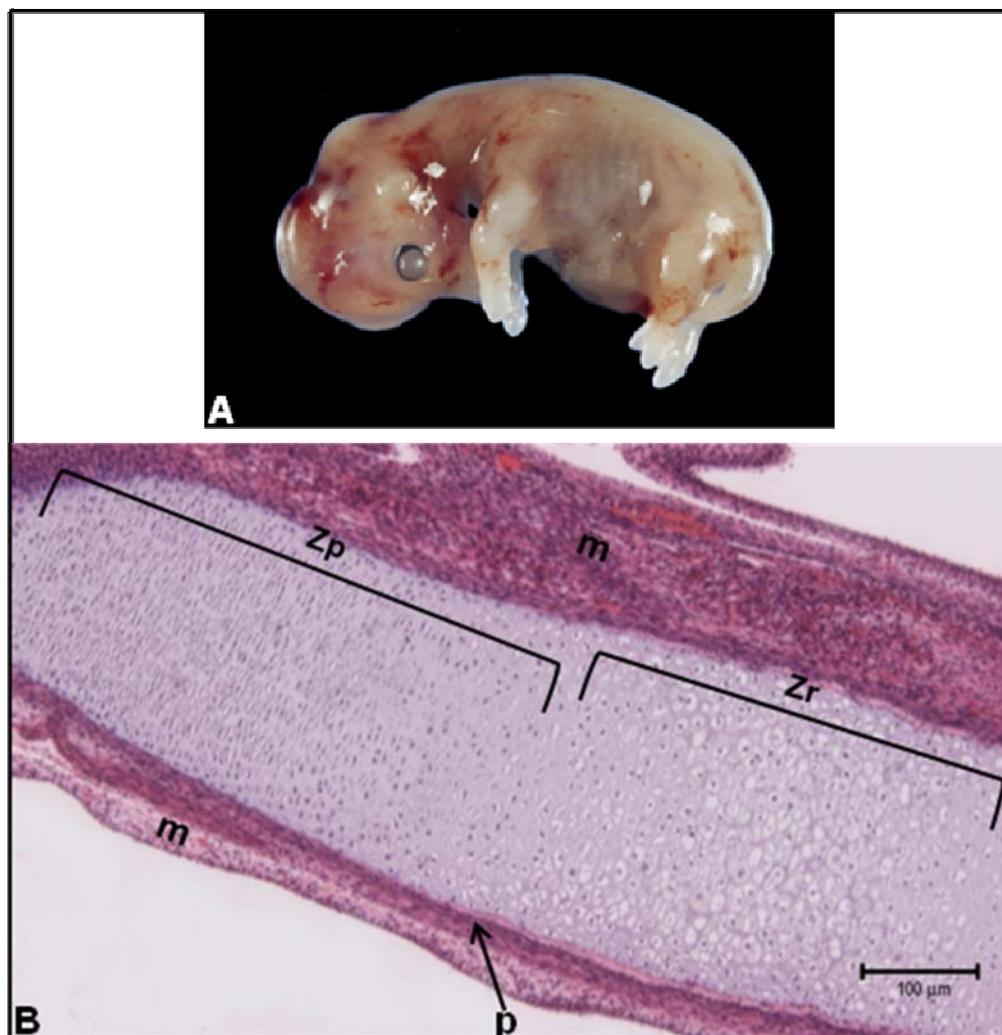
Ocorre hipertrofia da cartilagem e morte dos condrócitos, aumentando a área de depósito de cálcio e fósforo, tornando-se mais próximas das epífises dos ossos longos em feto com CR de 76,00 mm, por volta da décima semana gestacional (Figura 11).

Ao redor da 11ª semana de gestação (CR de 100,0 mm) os grupamentos de carbonato de cálcio e fósforo já se espalharam por todo osso. Células da medula óssea e células adiposas preenchem os espaços entre as travessas ósseas, e epífises apresentam-se ainda em tecido cartilaginoso (Figura 12).



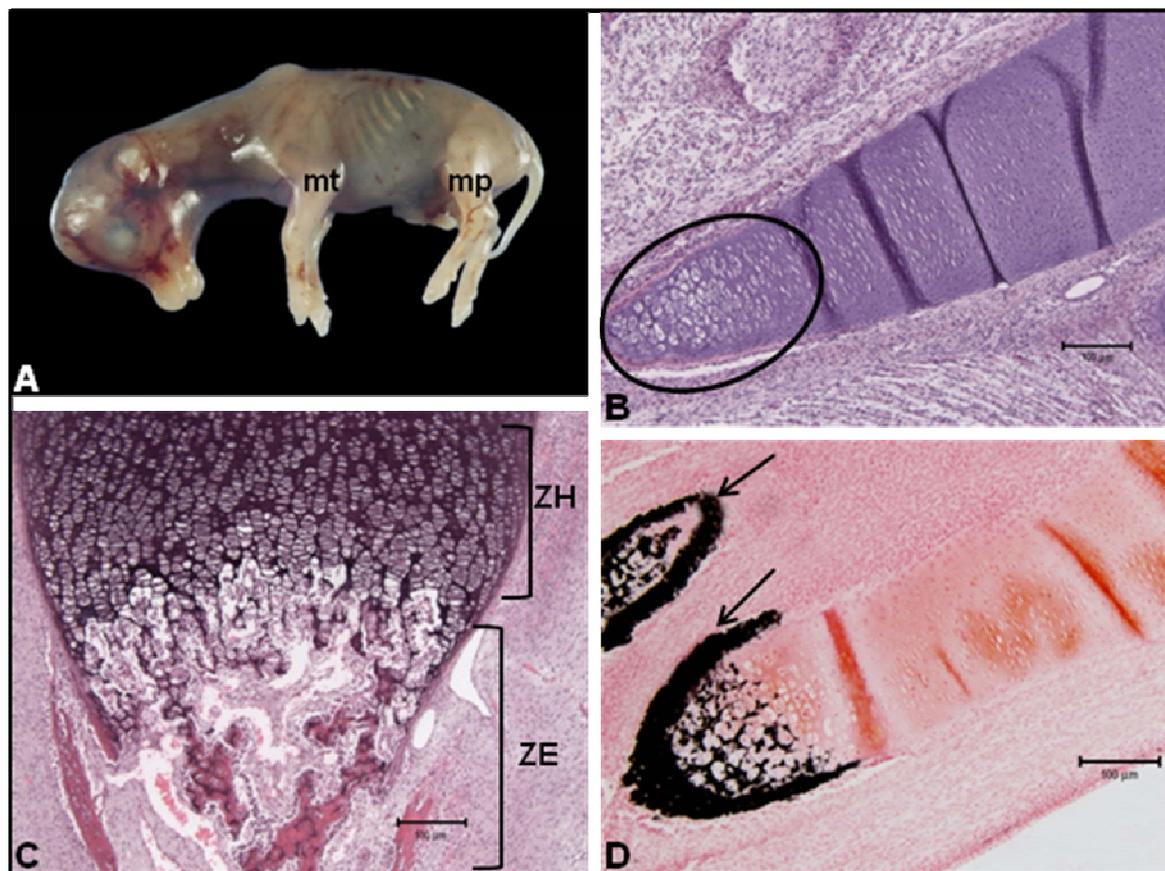
Legenda: Em A, observar fotografia de embrião bovino onde membro torácico (mt) apresenta-se em forma de "placa" e membro pélvico (mp) inicia seu brotamento
 B: Fotomicrografia de moldes cartilagosos (ca) para formação do membro torácico, circundado por mesênquima condensado (mc)
 C: Fotomicrografia de mesênquima (m) precursor para formação de molde cartilaginoso de membro pélvico. Coloração: Von Kossa

Figura 7 – Fotografia de embrião bovino (Crow rump = 28,0 mm) e Fotomicrografia de moldes cartilagosos para formação dos membros



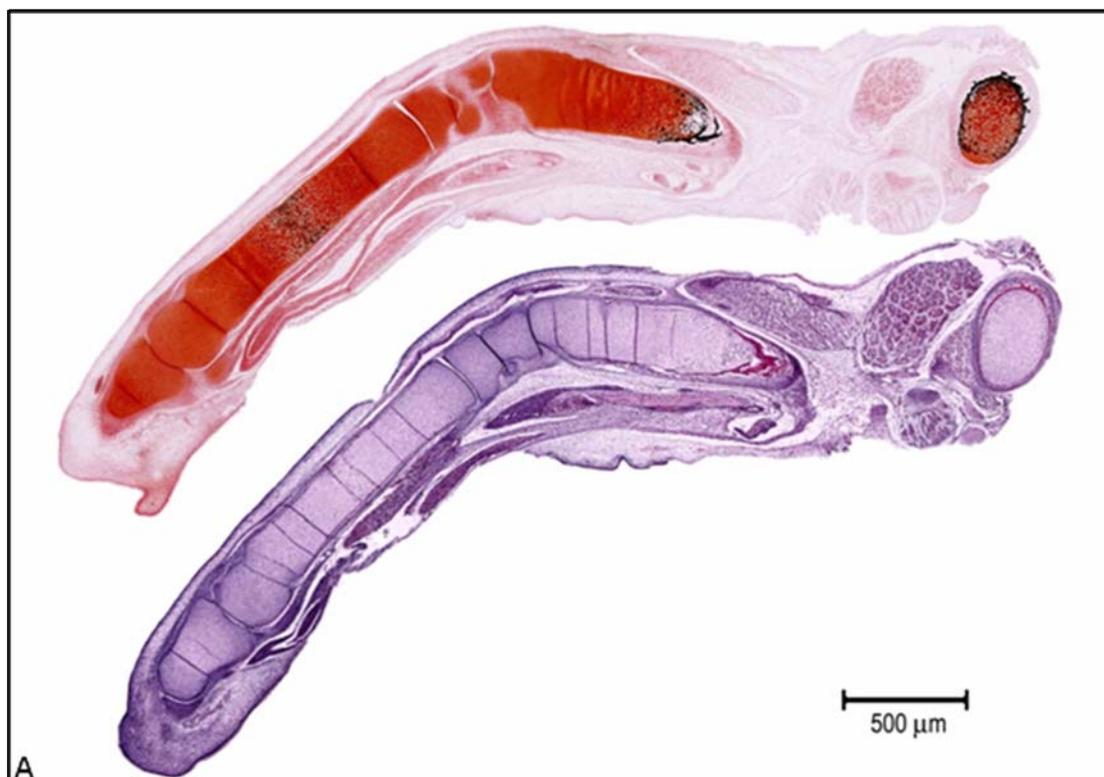
Legenda: Em A, observar fotografia de feto bovino evidenciando membro torácico (mt) e membro pélvico (mp) bipartido
B: Fotomicrografia de molde cartilaginoso para formação do membro, circundado por mesênquima (m). Notar pericôndrio (p) e molde de cartilagem dividido em duas áreas diferentes: Zona de repouso (Zr) e Zona de proliferação (Zp). Coloração: Hematoxilina e eosina

Figura 8 – Fotografia de feto bovino (Crow rump = 35,0 mm) e Fotomicrografia de molde cartilaginoso para formação dos membros



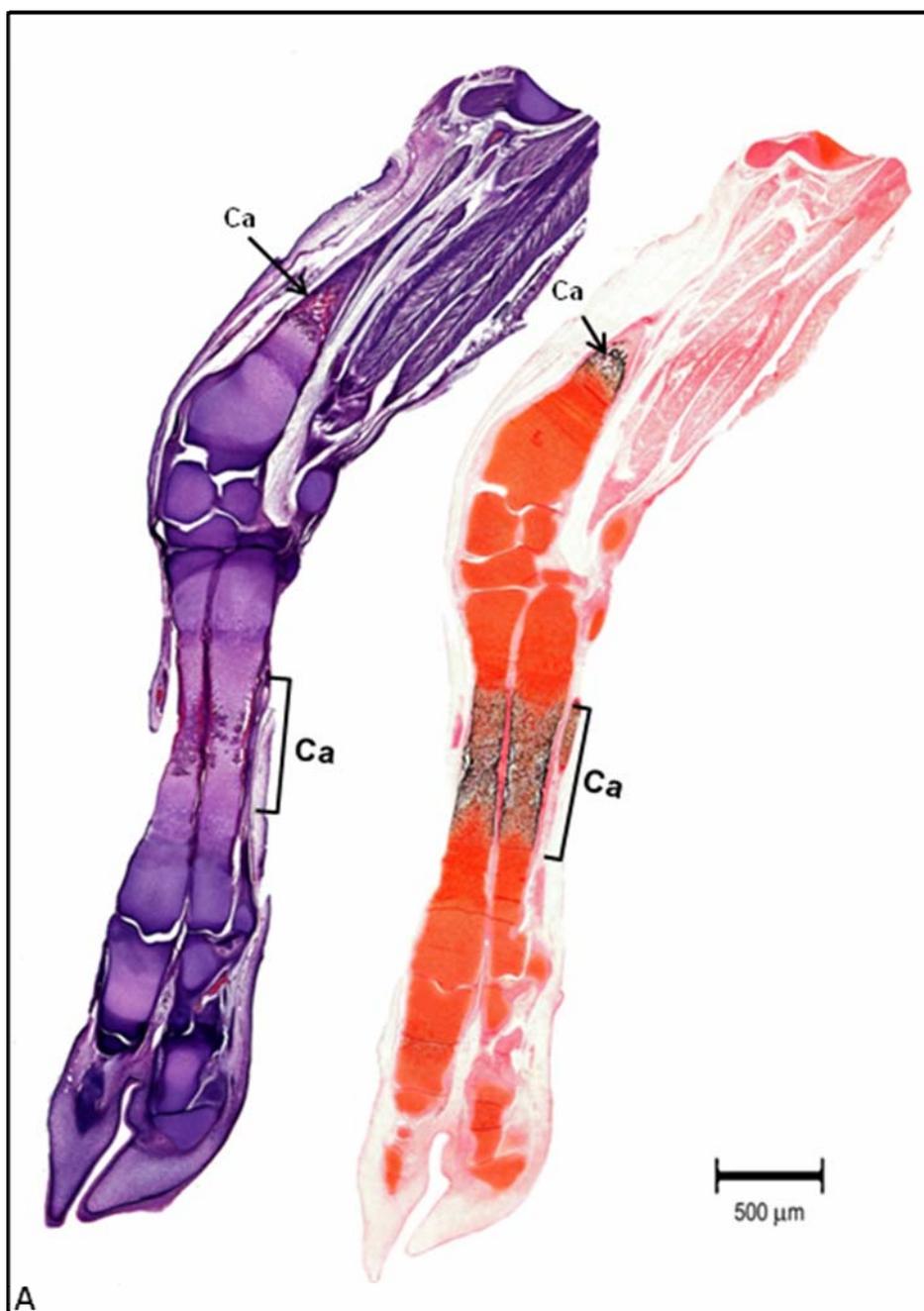
Legenda: Em A, observar fotografia de feto bovino evidenciando membro torácico (mt) e membro pélvico (mp), ambos bipartidos
 B: Fotomicrografia de molde cartilaginoso para formação do membro, circundado por mesênquima (m). Área marcada representa local de início de hipertrofia da cartilagem. Coloração: Hematoxilina e eosina
 C: Início de ossificação. Observar Zona hipertrófica e Zona de Erosão. Coloração: Hematoxilina e eosina
 D: Observar depósito de cálcio e Potássio corados em preto na Zona de erosão do molde cartilaginoso. Coloração; Von Kossa

Figura 9 – Fotografia de feto bovino (Crow rump = 50,0 mm) e Fotomicrografia de molde cartilaginoso para formação dos membros



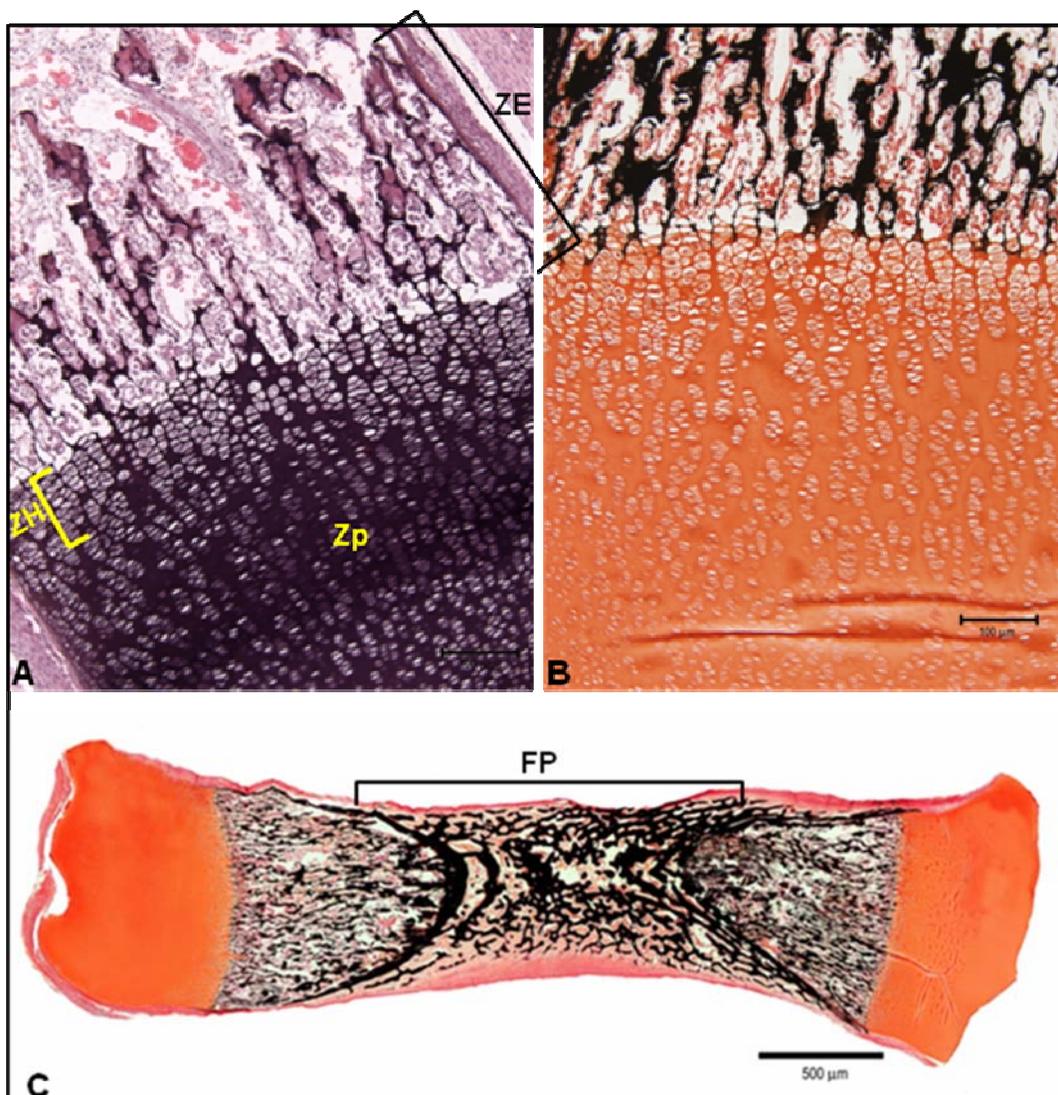
Legenda: Em A, observar nos membros em desenvolvimento com depósitos de cálcio e Potássio. Coloração preta mostra área em início de calcificação dos moldes. Von Kossa e Hematoxilina e Eosina

Figura 10 – Fotomicrografia de molde cartilaginoso em ossificação endocondral de feto bovino (Crow rump = 51,0 mm)



Legenda: Em A, observar maior área em calcificação (Ca) na diáfise dos moldes cartilagosos de osso longo, estando mais próximas da epífise. Hematoxilina e Eosina e Von Kossa

Figura 11 – Fotomicrografia de molde cartilaginoso em ossificação endocondral de feto bovino (Crow rump = 76,0 mm)



Legenda: Em A, fotomicrografia de disco epifisário apresentando a Zona de proliferação (Zp), Zona de cartilagem hipertrófica (Zh) e Zona de erosão (Ze). Coloração: Hematoxilina e eosina
 B: Notar que a Zona de erosão apresenta-se corada em preto marcando áreas de depósito de cálcio e Potássio responsáveis pela ossificação. Coloração; Von Kossa
 C: Calcificação de osso longo. Na diáfise observamos uma maior condensação de grupamentos de potássio e carbonato de cálcio (FP) formando tecido ósseo. Células da medula óssea e adiposas preenche os espaços (em vermelho) entre as traves ósseas. As epífises apresentam-se em tecido cartilaginoso. Coloração: Von Kossa

Figura 12 – Fotomicrografia do osso de membro de feto bovino (Crow rump = 100,0 mm)

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As primeiras condensações de células mesenquimais surgem quando o mesênquima somático induz a proliferação da placa mesodérmica lateral (LARSEN, 1997).

A cartilagem se desenvolve a partir do mesênquima e aparece pela primeira vez nos embriões durante a quinta semana gestacional (FLETCHER; WEBER, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004). Em nossos estudos, embriões bovinos com CR de 9,0 mm e idade gestacional estimada de três semanas apresentam áreas contendo células mesenquimais organizadas uniformemente, próximas umas as outras; com pequena área de matriz extracelular, núcleo alongado, com nucléolo e grânulos de cromatina dispersos por todo núcleo (eucromatina) e pequenas concentrações (heterocromatina), evidenciamos ainda retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias. Tais características nos levam a crer que estas células mesenquimais acabaram de sofrer diferenciação à parte do mesoderma, e estão em intensa atividade para constituir as futuras células cartilaginosas.

Devido ao tamanho do nucléolo acreditamos que esteja havendo intensa síntese de RNA ribossomal. Esses ribossomos constituem a formação do retículo endoplasmático rugoso das células, sendo responsável pela síntese de proteína necessária durante este período, além das mitocôndrias, que realizam a síntese de ATP necessária para atividade celular. Isso talvez explique o mencionado por Hall e Miyake (1995) e Wolpert (1994) ao descreverem que condensações de mesênquima marcam o início da atividade seletiva dos genes, e determinadas linhagens celulares se diferenciam em membros torácicos e membros pélvicos.

Ao redor da quarta semana gestacional (CR de 20,0 mm) as células mesenquimais passam a apresentar um formato mais globoso em algumas áreas, o núcleo acompanha o formato da célula e nucléolo localiza-se próximo ao envoltório nuclear, no citoplasma observamos retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e estruturas eletrodensas. Provavelmente, estas células mesenquimais estão diferenciando-se para formação de condroblastos.

Embriões com CR de 25,0 mm (sexta semana gestacional) as células estão ainda mais arredondadas, e se agrupam para constituir dois moldes cartilaginosos primordiais, circundados por células mais alongadas e pequena área de matriz

extracelular; vindo a confirmar os achados de Fletcher e Weber (2004) e Moore e Persaud (2004) ao descreverem que o mesênquima se condensa para constituir os centros de formação de cartilagem, as células mesenquimais proliferam-se e tornam-se arredondadas.

Acrescentam ainda que as células formadoras de cartilagem (condroblastos) secretam fibras de colágeno e substância fundamental da matriz, subseqüentemente fibras colágenas são depositadas na substância intercelular, e o modelo cartilaginoso é cercado por tecido fibroso pericondral (FLETCHER; WEBER, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004). Nossos resultados revelam presença de fibras colágenas na matriz extracelular juntamente aos condroblastos, vindo confirmar os achados dos autores citados acima, acrescentando ainda que a membrana plasmática da célula apresentava projeções, conferindo comunicação celular.

Células com formato alongado e pequena área de matriz extracelular circundam os moldes cartilagosos primordiais, o tecido fibroso pericondral, e de acordo com Junqueira (2005) eles são responsáveis pela diferenciação de célula mesenquimal em condroblasto, promovendo o crescimento da cartilagem. Isso ocorre quando as células periféricas do pericôndrio transformam-se gradualmente em células arredondadas, os condroblastos.

A partir da sétima semana gestacional, fetos com CR de 30,0 mm já apresentam molde cartilaginoso hialino, precursor na formação de osso longo. Nossos achados mostram condroblastos com aspecto globos e ausência de interdigitação de membrana. O núcleo possui formato em estrela e matriz citoplasmática contendo retículo endoplasmático rugoso em maior quantidade quando comparado a célula mesenquimal precursora, o que talvez indique que a célula aumente sua atividade para originar células alongadas, os condrócitos.

Circundando a matriz cartilaginosa encontramos pericôndrio, formados pelo mesênquima superficial. Sua função é nutrição, oxigenação e eliminação de metabólitos da cartilagem, porque neles estão localizados os vasos sanguíneos inexistentes no tecido cartilaginoso, além de ser uma fonte de novos condrócitos para o crescimento da cartilagem (JUNQUEIRA, 2005).

Cartilagem hipertrófica que marca o início da ossificação endocondral foi observada por nós em fetos com CR de 76,0 mm, décima semana gestacional. Os condrócitos apresentaram forma alongada, com projeções de membrana proporcionando aspecto estrelado, o que provavelmente se deve a uma retração

durante o processamento da técnica. No entanto, acredita-se que as saliências aumentem a superfície de contato, facilitando trocas com meio extracelular, sendo importante para nutrição da célula (JUNQUEIRA, 2005). Daniels e Solursh (1991); Montenegro et al., (2004) e Junqueira e Carneiro (2004), acrescentam ainda que os condrócitos são formados pela secreção da matriz extra celular da cartilagem, sendo responsáveis pela secreção de colágeno tipo II principalmente, proteoglicanas e glicoproteínas.

A matriz citoplasmática dos condrócitos apresentou extensos retículos endoplasmáticos rugoso e presença de estruturas eletrodensas. Brighton e Fetter (1995) confirmam nossos achados e acrescentam a presença de mitocôndrias na matriz citoplasmática.

Macroscopicamente, evidenciamos um pequeno broto do membro pélvico ao passo que o broto do membro torácico já apresentava-se em formato de “placa” em embriões com CR de 28,0 mm (quarta semana gestacional). Histologicamente encontramos condensações de células mesenquimais nos brotos dos membros pélvicos, e tecido cartilaginoso nos brotos do membro torácico. Nossos achados confirmam os estudos de Winters et al., (1942) e Evans e Sack (1973) ao afirmarem que o broto do membro torácico aparece no 24º dia de gestação nos bovinos e pélvicos tornam-se visíveis no 27º dia. Aos 30 dias as extremidades dos membros apresentam-se em forma de placa, se especializando para o período fetal.

Através de estudos embasados em microscopia de luz, observamos que o molde dos membros em fetos com CR de 35,0 mm (sexta semana gestacional) apresentam modelos cartilagosos com zonas de cartilagem em proliferação e repouso, pericôndrio e mesênquima superficial. Externamente, os membros torácicos e pélvicos estavam bem definidos, e já haviam sofrido bipartição de suas extremidades; confirmando assim os achados de Evans e Sack (1973) que relatam que aos 34 dias de gestação, tornam-se visível os raios digitais das extremidades dos membros de embriões bovinos e com 45 dias (sexta semana gestacional) já ocorreu a separação dos dígitos, tornando-se firmes e opacos aos 100 dias.

Assim como a cartilagem, o osso é constituído por células e uma substância intercelular orgânica: a matriz óssea, constituída por fibrilas colágenas e substância intersticial amorfa ou fundamental. Entre a sétima e oitava semana gestacional (CR de 50,0 mm), nossos estudos revelam que os moldes cartilagosos ainda apresentam mesênquima circundante. Larsen (1997) explica que células

mesenquimais do pericôndrio diferenciam-se em osteoblastos, em resposta a um fator de crescimento ósseo. Essas células secretam matriz de sais de cálcio e formam o colar ósseo primário.

Complementamos que neste mesmo período a cartilagem inicia seu processo de hipertrofia e erosão, com depósitos de cálcio e fósforo na região central do osso longo (diáfise) e a partir daí passará aos poucos para as extremidades (epífises). Moore e Persaud (2004) sugerem ainda que na diáfise as células cartilaginosas aumentam de tamanho, com a calcificação da matriz as células morrem. Winters et al., (1942) complementa que uma extensa área em ossificação foi observada em ossos longos de fetos bovinos com 59 dias de gestação.

A cartilagem segue seu processo de hipertrofia e calcificação em fetos com CR de 76,0 mm (décima semana gestacional). Neste período verificamos morte dos condrócitos e maior área de depósito de cálcio e fósforo se aproximando as extremidades craniais e caudais dos ossos longos. Brighton e Fetter (1995) explicam que a calcificação inicial acontece na zona hipertrófica, dentro da matriz, sendo suas vesículas estruturas muito pequenas cercadas por uma membrana trilaminar produzida pelos condrócitos. Essas vesículas são ricas em fosfatase e acumulam cálcio tornando a matriz impermeável a metabólitos.

Durante a 11ª semana de gestação (CR de 100,0 mm) os grupamentos de carbonato de cálcio e fósforo já se espalharam por todo osso, sendo ainda mais intenso na diáfise. Notamos que células da medula óssea e células adiposas preenchem os espaços entre as traves ósseas. Sadler (2004) complementa descrevendo que células invasoras se diferenciam em células hemopoiéticas responsáveis pela formação de células do sangue e da medula. Outras células invasoras se diferenciam em osteoblastos, depositando matriz óssea sobre as espículas de cartilagem calcificada, as espículas ósseas são remodeladas pela ação dos osteoblastos e osteoclastos.

Ao nascimento as diáfises estão bastante ossificadas, mas grande parte das extremidades (epífises) ainda é cartilaginosa. A maior parte dos centros secundários de ossificação aparece nas epífises durante os primeiros anos após o nascimento. As células da cartilagem epifisária se hipertrofiam, havendo invasão de tecido conjuntivo vascular. A ossificação se espalha em todas as direções, persistindo somente cartilagem na superfície (cartilagem articular) e uma placa transversal, a

cartilagem de conjugação, ou disco epifisário (GILBERT, 1994; MOORE; PERSAUD, 2004).

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos no presente estudo, julgamos poder concluir que:

- Região de tecido mesenquimal condensado para formação do membro torácico aparece em embriões com CR de 9,0 mm (terceira semana gestacional).
- Células mesenquimais diferenciam-se para formação de condroblastos em embriões com CR de 20,0 mm (quarta semana gestacional).
- Moldes cartilagosos primordiais aparecem em embriões com CR de 25,0 mm (sexta semana gestacional).
- Membro torácico apresenta-se em formato de placa e pequeno brotamento do membro pélvico em embriões com CR de 28,0 mm (sexta semana gestacional).
- Presença de molde cartilaginoso hialino, condroblastos e tecido pericondral ao redor em fetos com CR de 30,0 mm (sétima semana gestacional).
- Extremidade dos membros torácico e pélvico bipartidos, presença de zonas de cartilagem em proliferação e repouso em fetos com CR de 35,0 mm (sétima semana gestacional).
- Cartilagem com zonas de hipertrofia e erosão, com depósitos de cálcio e fósforo na diáfise dos ossos longos em fetos com CR de 50,0 mm (oitava semana gestacional).
- Morte de condrócitos, maior área de calcificação e matriz citoplasmática dos condrócitos apresentam extenso retículo endoplasmático rugoso em fetos com CR de 76,0 mm (décima semana gestacional).

- Grupamentos de cálcio e fósforo se espalharam por todo osso com células da medula óssea e adiposas preenchendo espaços entre as travessuras ósseas e epífises apresentam-se em tecido cartilaginoso em fetos com CR de 100,0 mm (11^a semana gestacional).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALBERTO, M. L. V. **Estudo do desenvolvimento do aparelho respiratório de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 60 dias.** 102 p, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ARTHUR, G. H. **Reprodução e obstetrícia em veterinária.** 4. ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 1979, 573 p.
- BRIGHTON, T. C.; FETTER, A. W. Normal bone function. **IVIS**, 1985. Disponível em: <http://www.ivis.org/special_books/ortho/chapter_01/01mast.asp>. Acesso em: 09 fev de 2007.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **J. Orthop. Res.** v. 9, p. 641 – 650, 1991.
- COSTA, A. C. **Manual de Embriologia.** 2. ed. Rio de Janeiro: [s. n.], 1957, 342 p.
- DANIELS, K.; SOLURSH, M. Modulation of chondrogenesis by the cytoskeleton and extracellular matrix. **J. Cell. Sci.**, v. 100, p. 249, 1991.
- DANILOVA, L. V. Somite differentiation in the Karakul sheep embryo. **Fed. Proc.**, v. 22, p. T677 – T689, 1963.
- EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anat, Histol., Embryol.**, v. 2, p. 11 - 45, 1973.
- FETTER, A. W.; RHINELANDER, F. W. Normal bone anatomy. **IVIS**, 1995. Disponível em: <http://www.ivis.org/special_books/ortho/chapter_02/02mast.asp>. Acesso em: 09 fev 2007.
- FLETCHER, T. F.; WEBER, A. F. **Veterinary developmental anatomy.** 1. ed. Minnesota: [s. n.], 2004, 76 p.
- GASSER, R. F. Evidence that sclerotomal cells do not migrate medially during normal embryonic development of the rat. **Am. J. Anat.** v. 154, p. 509 – 524, 1979.
- GILBERT, S. F. **Developmental biology.** 4. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1994, 894 p.
- GRÜNEBERG, H.; HUSTON, K. The development of bovine syndactylism. **J. Embryol. Exp. Morph.** v. 19, n. 2, p. 251 – 259, 1965.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal.** 7. ed. Rio de Janeiro: Manole, 2004, 513 p.

HALL, B. K.; MIYAKE, T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. **Int. J. Dev. Bio.** v. 39, p. 881, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 388 p.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Biologia estrutural dos tecidos histologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 225 p.

LARSEN, W. J. **Human embryology**. 2. ed. Hong Kong: Churchill Livingstone, 1997, 512 p.

MARTIN, K. E. A.; MACKAY, S. Postnatal development of the fore-and hindlimbs in the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. **J. Anat.** v. 202, p. 143 – 152, 2003.

MARTINIAKOVÁ, M.; GROSSKOPF, B.; VONDRÁKOVÁ, M.; OMELKA, R.; FABIS, M. Differences in femoral compact bone tissue microscopic structure between adult cows (*Bos taurus*) and pigs (*Sus scrofa domestica*). **Anat. Histol. Embryol.** v. 35, p. 167 – 170, 2006.

MONTENEGRO, M. A.; ROJAS, M.; DOMÍNGUEZ, S. Osteogénesis comparativa de los cartílagos secundários de la clavícula y placas epifisiarias de los huesos largos. **Int. J. Morphol.**, v. 22, n. 3, p. 201 – 206, 2004.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 609 p.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V.; SHIOTA, K. **Atlas colorido de embriologia clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 284 p.

NODEN, D. M.; de LAHUNTA, A. **Embriología de los animales domésticos** 1. ed. Zaragoza: Acribia, 1990, 399 p.

O'RAHILLY, R.; GARDNER, E. The timing and sequence of events in the development of the limbs in the human embryo. **Anat. Embryol.**, v. 148, p. 1 – 23, 1975.

PINTO NETO, A.; SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, J. F.; PALHARES, M. S.; COSTA, E. P. Taxa de gestação e morfologia de embriões bovinos da raça Nelore resfriados por 24 horas a 5°C em contêiner modelo Celle modificado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 51, n. 2, p. 37 – 41, 1999.

PIZAURO JUNIOR, J. M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, v. 4, n. 3, 2004.

RODRIGO-VÁSQUEZ, J. F. Development of the stapes and associated structures in human embryos. **J. of Anat.** v. 207, n. 2, p. 165, 2005.

SERRANO, E.; PÉREZ, J. M.; CHRISTIANSEN, P.; GÁLLAGO, L. Sex-difference in the ossification rate of the appendicular skeleton in *Capra pyrenaica* Schinz, 1838, and its utility in the sex identification of long bones. **Anat. Hist. Embryol.** v. 35, p. 69, 2006.

SADLER, T. W. **Langman embriologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 347 p.

STRONG, R. M. The order, time and rate of ossification of the albino rate (*Mus norvegicus albinus*) skeleton. **Am. J. Anat.** v. 36, p. 313 – 335, 1925.

WINTERS, L. M.; GREEN, W. W.; COMSTOCK, R. E. Prenatal development of the bovine. **Ag. Expt. Tech. Bull.**, n. 151, p. 1 - 50, 1942.

WOLPERT, L. Positional information and pattern formation in development. **Develp. Genet.** v. 15, p. 485 – 490, 1994.

WOLPERT, L. Mechanism of limb development and malformation. **Br. Med. Bull.** v. 32, p. 65 – 70, 1976.

YUKAWA, M.; HAYASHI, N.; TAKAGI, K.; MOCHIZUKI, K. The normal development of Mongolian gerbil fetuses and, in particular, the timing and sequence of the appearance of ossification centres. **Anat. Histol. Embryol.** v. 28, p. 319 – 324, 1999.

ANEXO A

VON KOSSA (PARA FOSFATOS E CARBONATOS DE CALCIO)

PROCEDIMENTO

1-Bateria de coloração

Xilol 1..... 10 minutos

Xilol 2..... 10 minutos

Álcool Absoluto..... 3 minutos

Álcool 95%..... 3 minutos

Álcool 70%..... 3 minutos

H₂O₂ Torneira..... 3 minutos

2- Lavar bem com água bidestilada e testar em solução de prata.

3- Deixar na solução de Nitrato de Prata, no meio ambiente, exposto à luz por 60 Minutos.

4- Enxaguar em hiposulfito de sódio e deixar a lâmina repousar por 30 segundos

5- Lavar bem com água corrente e contra corar por 30 segundos em safranina.

6- Diferenciar, desidratar, diafanizar e montar em bálsamo.

RESULTADOS

Os grupamentos fosfato e carbamato coram-se em preto.

Núcleos em vermelho.

Outros tecidos em vermelho pálido.

SOLUÇÕES

Solução aquosa de nitrato de prata a 5%

Solução aquosa de hiposulfito de sódio a 5%

Solução aquosa de safranina a 0,1%

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)