

Evolução morfométrica dos anexos embrionários e fetais bovinos obtidos por monta natural, com 10 a 70 dias da gestação¹

Antônio C. de Assis Neto^{2*}, José Antônio B. Morceli², Ricardo da Fonseca², Carlos Eduardo Ambrósio³, Flávia T.V. Pereira² e Maria Angélica Miglino³

ABSTRACT.- Assis Neto A.C., Morceli J.A.B., Fonseca R., Ambrósio C.E., Pereira F.T.V. & Miglino M.A. 2009. [Biometrics evolution of the embryonic and fetal annexes in cows obtained by natural mating, at 10 to 70 days of gestation.] Evolução morfométrica dos anexos embrionários e fetais bovinos obtidos por monta natural, com 10 a 70 dias da gestação. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(10):859-862. Faculdade de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unidade Experimental de Dracena, Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros Km 651, Dracena, SP 17900-000, Brazil. E-mail: antonioassis@dracena.unesp.br

The main goal of this morphometrical study was to characterize the development of the extra-embryonic membranes of 15 to 70-day-old bovine embryos obtained by natural mating. With a millimeter paquimeter the cranio-caudal, latero-lateral and dorso-ventral measurements of chorion and amnion were determined. The development of the cotyledons and weight of the gestational sac were observed and quantified. The weight of the gestational sac increased during gestation; however, the growth was faster then 20 to 30 days. The cranial-caudal and dorsal-ventral length of the chorionallantois and the amnion developed slowly and gradually with progress of the gestational period, and the cranio-caudal length decreased after 50 to 60 days of gestation, increasing in the next period. After 30 to 40 days of gestation, the first cotyledons were visualized and counted easily in the chorionic surface. The growth periods were the same of the main gestational losses in cattle. The parameters analyzed could be useful for investigations of extra-embryonic membranes in organisms manipulated in the laboratory.

INDEX TERMS: Placenta, bovine, extraembryonic membranes, amnion, chorion.

RESUMO.- O período inicial da gestação de bovinos é caracterizado por grandes perdas embrionárias. Considerando a importância deste fator no âmbito da reprodução animal foram estudados os anexos embrionários e fetais bovinos fecundados por monta natural de 15-70 dias de gestação, com o objetivo de estabelecer parâmetros morfométricos da placenta na fase inicial da gestação.

Com uso de um paquímetro foram realizadas mensurações do comprimento (crânio caudal), largura (latero lateral) e altura (dorso ventral) das membranas corioalantóide e amniótica. O início da formação dos cotilédones foi observado e quantificado, assim como, o peso placentário. O peso médio do saco gestacional aumentou com o evoluir da idade gestacional, entretanto, o crescimento foi acelerado a partir de 20-30 dias de gestação. O comprimento crânio caudal e dorso ventral da membrana corioalantóide e do âmnio apresentaram crescimento lento e gradual com o evoluir dos períodos gestacionais analisados. Com 30-40 dias de gestação, os primeiro cotilédones já eram visualizados e contatos com facilidade na superfície coriônica. Os períodos de crescimento coincidiram com os maiores índices de perdas gestacionais em bovinos. Os parâmetros aqui analisados poderão servir para futuras investigações dos anexos

¹ Recebido em 14 de outubro de 2008.

Aceito para publicação em 4 de agosto de 2009.

² Faculdade de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus Experimental de Dracena, Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros (SP-294), Km 651, Dracena, SP 17900-000, Brasil. *Autor para correspondência: antonioassis@dracena.unesp.br

³ Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-900, Brasil.

embrionários de organismos manipulados em laboratório.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Placenta, bovinos, membranas extra-embriônicas, âmnio, córioalantóide.

INTRODUÇÃO

O rebanho bovino é a maior soma de ruminantes explorados em condições extensivas no Brasil. Destaca-se a importância dos anexos embrionários para a implantação e sobrevivência dos embriões, uma vez que até 30% das gestações em estágio inicial não chegam a termo devido a problemas de formação nos anexos embrionários (Hill et al. 2000, Sartori 2004). Poucos são os relatos sobre os mecanismos que envolvem perdas embrionárias nos primeiros meses de gestação e as possíveis falhas do desenvolvimento das membranas extra-embriônicas e fetais bovina.

A importância de estudos relativos ao desenvolvimento e as funções placentárias, têm como alvo melhorar a manutenção de conceitos saudáveis em gestações oriundas de produção *in vitro* (Thompson & Peterson 2000, Bertolini & Anderson 2002, Facciotti et al. 2009) e clonagem (Stice et al. 1996, Wells et al. 1999, Wrenzycki et al. 2001, Bertolini et al. 2002, Edwards et al. 2003, Miglino et al. 2007, Arnold et al. 2008, Kohan-Ghadr et al. 2008, Rici et al. 2008). Para tal feito, é indispensável que tenhamos bem estabelecida uma caracterização do desenvolvimento normal do processo de implantação inicial em gestações que ocorrem por meio de concepção natural (Assis Neto et al. 2009) ou inseminação artificial. Estudos sobre a morfologia do conceito em bovinos têm sido realizados mediante avaliações ultra-sonográfica (Bertolini et al. 2002).

Informações sobre o desenvolvimento normal do conceito, contato materno-embriônico ou fetal, descrições morfométricas e macroscópicas das membranas extra-embriônicas são tratados de forma ineficiente e, às vezes, confusa na literatura. Tendo em vista os aspectos supracitados o objetivo deste trabalho foi de caracterizar morfometricamente a evolução das membranas extra-embriônicas e fetais bovinas nos períodos de 10-70 dias da gestação.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de embriões provenientes de monta natural

As coletas dos úteros gestantes foram realizadas em frigoríficos e Abatedouros da Região de Dracena-SP e Presidente Prudente-SP (Protocolo de Bioética Nº 631/2005 FMVZ/USP). Durante o período de coleta algumas informações foram obtidas na tentativa de identificar a raça do animal, a procedência e o tipo de manejo reprodutivo. Todos os úteros coletados eram de animais azebuados. Foram analisados 141 úteros em fase inicial de prenhez em diferentes períodos gestacionais.

Os períodos gestacionais foram estimados conforme metodologia preconizada por Winters et al. (1942) com mensuração da distância occípito-sacral ("Crown-Rump"/CR), tomando-se

como referência a crista nucal numa extremidade e a última vértebra sacral na extremidade oposta. Associados às medidas de CR foram avaliados as características morfológicas externa do desenvolvimento embrionário. As mensurações dos CR embrionários e fetais foram realizadas utilizando-se um paquímetro inoxidável com divisão em milímetros (150x0,02mm). Para mais informação relacionadas ao desenvolvimento placentário inicial em bovinos ver Assis Neto et al. 2009.

Parâmetros analisados: mensurações, observações macroscópicas e pesagens

Foram avaliados os parâmetros relativos ao tamanho e proporções dos embriões e anexos. Com auxílio de um paquímetro foram realizadas as medidas de comprimento (crânio caudal) e largura (lâtero-lateral) das membranas. O início de formação e distribuição dos cotilédones na superfície coriônica.

Os pesos dos sacos gestacionais foram tomados, utilizando-se balança eletrônica analítica (200g-0,001g).

Análise estatística

As variáveis utilizadas foram: comprimentos crânio-caudal e dorso-ventral do saco gestacional; comprimentos crânio-caudal, dorso-ventral e lâtero-lateral do âmnio; CR; peso do saco gestacional e contagens do número de cotilédones.

Os parâmetros foram analisados individualmente para os diferentes períodos gestacionais de monta natural por meio de "boxplots". Além disso, para todos os dados dos parâmetros, foram calculadas medidas de posição e dispersão (média, desvio padrão, coeficiente de variação, mediana, quartis e máximo e mínimo).

Os cálculos foram conduzidos utilizando o sistema para análise estatística R⁷ (R Development Core Team 2005).

RESULTADOS

"Crown-Rump" e peso do saco gestacional

As médias e desvio padrão das mensurações occípito-sacral ("Crown-Rump") para cada período gestacional, estão representadas no Quadro 1. Observou-se que durante 20-25 dias a 60-70 dias de gestação, o CR cresceu gradativamente de maneira quase linear.

Analisando-se os pesos médios dos sacos gestacionais (Quadro 1), observou-se que entre o período de 20-25 dias de gestação até o período de 20-30 dias de gestação, este aumentou seis vezes em relação ao seu peso.

Quadro 1. Médias e desvio padrão do "Crown-Rump" (CR), peso do saco gestacional e números médios de cotilédones de embriões e feto bovinos em diferentes períodos gestacionais

Período gestacional (dias)	CR (cm)	Peso (g)	Números de cotilédones
20-25n=26	0,71 ± 0,17	05,00 ± 03,31	00,00 ± 00,00
25-30n=23	1,23 ± 0,13	30,15 ± 20,17	00,32 ± 01,04
30-40n=25	1,90 ± 0,27	81,81 ± 45,82	09,39 ± 9,73
40-50n=24	2,79 ± 0,19	141,20 ± 80,06	29,56 ± 8,49
50-60n=21	3,76 ± 0,52	220,64 ± 101,08	42,44 ± 13,58
60-70n=22	6,75 ± 0,86	388,59 ± 136,74	71,95 ± 25,37

Quadro 2. Médias e desvio padrão do comprimento crânio caudal (CC) e dorso ventral (DV) do cório- alantoide, e crânio caudal (CC), latero lateral (LL) e dorso ventral (DV) do âmnio do saco gestacional de embriões e feto bovinos em diferentes períodos gestacionais

Período gestacional (dias)	Cório-alantoide CC (cm)	Cório-alantoide DV (cm)	Âmnio CC (cm)	Âmnio LL (cm)	Âmnio DV (cm)
20-25n=26	44,92 ± 16,42	01,84 ± 0,67	00,93 ± 0,45	0,34 ± 0,14	0,52 ± 0,30
25-30n=23	55,00 ± 16,76	03,00 ± 0,59	01,61 ± 0,44	0,81 ± 0,28	1,32 ± 0,29
30-40n=25	65,13 ± 12,08	03,28 ± 0,79	02,89 ± 0,95	1,39 ± 0,51	2,03 ± 0,49
40-50n=24	79,06 ± 10,83	04,44 ± 0,66	04,81 ± 0,77	2,44 ± 0,73	3,74 ± 0,62
50-60n=21	75,55 ± 11,57	05,37 ± 0,99	05,66 ± 1,04	3,02 ± 0,69	4,40 ± 0,62
60-70n=22	79,14 ± 12,98	07,64 ± 1,01	11,48 ± 2,44	4,91 ± 1,46	7,31 ± 1,05

Nos períodos de 20-30 dias de gestação, até 30-40 dias de gestação, os valores médios quase que triplicaram. Deste último período analisado, aos 40-50 dias de gestação, os pesos duplicaram. A partir de 50-60 dias de gestação, o crescimento esteve acelerado, similarmente ao crescimento que ocorre no período de 20-30 dias de gestação. O peso gestacional continuou a aumentar no período de 60-70 dias de gestação.

Comprimento da membrana cório-alantóide e âmnio

O comprimento crânio caudal e dorso ventral da membrana cório-alantóide, apresentou crescimento lento e gradual com o evoluir dos períodos gestacionais analisados. Entretanto, o comprimento crânio caudal sofreu uma discreta queda dos 50 aos 60 dias, retornando ao seu crescimento no período subsequente (Quadro 2).

Os comprimentos crânio caudal, dorso ventral e latero lateral do âmnio apresentaram crescimento gradual até o período de 40-50 dias de gestação, e, a partir do período de 50-60 dias, a vesícula amniótica cresceu mais aceleradamente (Quadro 2).

Números de cotilédones

Os números médios de cotilédones contados nos diferentes períodos gestacionais estão demonstrados no Quadro 1. Os cotilédones não foram observados nos períodos de 20-25 dias e 20-30 dias de gestação. Apareceram somente em duas amostras em números bem reduzidos (3 em uma amostra e 4 em outra). Aos 30-40 dias de gestação os primeiros cotilédones já eram visualizados e contados com facilidade na superfície coriônica, próximos do embrião. Aos 40-50 dias de gestação, o número médio de cotilédones triplicou em relação ao período anterior. Nas fases subsequentes, o número aumentou gradativamente.

DISCUSSÃO

As idades estimadas de acordo com o comprimento occipito-sacral ("Crown-Rump"/CR) dos embriões e fetos, seguiram metodologias adotadas por pesquisas que tiveram como parâmetros embriões bovinos da espécie *Bos taurus*. Os embriões utilizados neste trabalho foram agrupados em seis períodos gestacionais de acordo com suas medidas do CR. Consultando as tabelas de Evans & Sack (1973) e

Noden & Lahunta (1990), constata-se que as informações nelas contidas, apresentaram valores coincidentes aproximados das medidas de CR utilizadas no presente trabalho. A curva de crescimento do CR aumenta gradativa e linearmente em função da idade gestacional bovina, em conformidade com Reynolds et al. (1990), como também para embriões de búfalos (Barbosa et al, 2008).

Bertolini et al. (2002) observaram que o padrão de crescimento embrionário e fetal, foi significativamente diferente entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. No mesmo estudo, os conceitos dos embriões *in vitro* foram consideravelmente menores do que os conceitos *in vivo*. As nossas mensurações *in vivo* (monta natural), utilizando um paquímetro milimetrado aproximam-se das mensurações ultra-sonográficas utilizadas pelos autores nas gestações *in vivo* nos períodos de 37, 44, 51 e 58 dias.

O peso médio do saco gestacional cresceu conforme o desenvolvimento da prenhez, mas houve alguns pontos de maiores crescimentos. O primeiro deles ocorreu entre o período de 15-20 dias até 20-30 dias de gestação, o segundo crescimento foi observado a partir dos 50-60 dias de gestação. Este comportamento do crescimento do peso foi observado em cabra e ovelha durante o primeiro período da gestação, seguidos por um período de pouco desenvolvimento (Bryden et al. 1972). No período de 50-60 dias de gestação foi caracterizado a transição entre o final da fase embrionária e o início da fase fetal. A partir deste período inicia-se um crescimento mais acelerado do CR (3,76±0,52cm) e do peso do saco gestacional (220,64±101,08g). Um aumento simultâneo do peso dos envoltórios fetais, tamanho do alantocório, saco amniótico, da extensão do cordão umbilical e número de placentônios aumentaram durante o início e na metade da prenhez em búfalas (Ram & Chandra 1984), contudo, ao final da prenhez, o número de placentônios diminuíram.

As medidas das membranas cório-alantóide e amniótica apresentam um crescimento gradual com o evoluir da gestação. Poucas informações foram encontradas na literatura, sobre o dia exato em que a vesícula embrionária alcança as duas extremidades do corno uterino. No presente trabalho, o saco gestacional dos embriões de 15-20 dias de gestação, ocupava completamente um dos cornos do útero, e, em parte, o contralateral. Esta disposição do saco gestacional no útero se aproxima da caracterização

ultra-sonográfica realizada por Curran et al. (1986) em conceptos bovinos em um período correspondente. Os autores afirmam que o conceito já se encontra alongado, formando um pequeno saco gestacional, ocupando completamente um dos cornos do útero no dia 16,9±0,6 da gestação e no corno contralateral no dia 19,6±0,9. O padrão de crescimento crânio caudal da vesícula amniótica é similar às mensurações ultra-sonográficas realizadas por Bertolini et al. (2002), em embriões bovinos *in vivo*.

O número médio de cotilédones bovinos de monta natural aumenta com a idade gestacional. As primeiras formações cotiledonárias são visualizadas com 1,23±0,13cm de CR (20-30 dias), e o contato com a carúncula está mais evidente com 6,75±0,86cm de CR (60-70 dias), período de formação dos placentônios. Os primeiros cotilédones foram observados na ultra-sonografia dos 33 aos 38 dias da gestação (Curran et al. 1986).

Os dados morfométricos deste trabalho, têm a intenção de contribuir para futuros estudos relacionados ao desenvolvimento inicial da gestação, tanto nas gestações naturais, quanto naquelas que passaram por técnicas especializadas de reprodução, tais como a fecundação *in vitro* e a clonagem animal.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que, as mensurações occipto-sacrais ("Crow-Rump") de embriões de bovinos, o número de cotilédones e as medidas do comprimento crânio caudal da vesícula amniótica, podem ser utilizados como modelos a serem comparados em estudos do desenvolvimento embrionário e ultra-sonográficos no período inicial da gestação da espécie.

Podemos inferir que as primeiras formações cotiledonares foram identificadas próximas ao embrião com 20-30 dias, e o número de cotilédones aumentaram gradativamente a partir de 30-40 dias de gestação.

Os parâmetros aqui analisados poderão servir para investigações dos anexos embrionários de organismos manipulados em laboratório.

REFERÊNCIAS

- Arnold D.A., Fortier A.L., Lefebvre R., Miglino M.A., Pfarrer C. & Smith L.C. 2008. Placental Insufficiencies in Cloned Animals: A workshop report. *Placenta* 29:108-110.
- Assis Neto A.C., Pereira F.T.V., Santos T.C., Ambrósio C.E., Leiser R., & Miglino M.A. 2009: Morpho-physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. *Reprod. Domest. Anim.* Published Online: Mar 4 2009 10h18min PM. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01345.x
- Barbosa P.L.G., Melnic R.V., Morini A.C., Martins D.S., Morini-Junior J.C., Pereira F.T.V., Francioli A.L.R., Favaron P.O., Ambrósio C.E. & Miglino M.A. 2008. Caracterização das membranas fetais em búfalas no terço inicial da gestação. *Pesq. Vet. Bras.* 28:437-445.
- Bertolini M. & Anderson G.B. 2002. The placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology* 57:81-18.
- Bertolini M., Mason J.B., Beam S.W., Carneiro G.F., Sween M.L., Kominek D.J., Moyer A.L., Famula T.R., Sainz R.D. & Anderson G.B. 2002. Morphology and morphometry of *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology* 58:973-994.
- Bryden M.M., Evans H.E. & Binns W. 1972. Embryology of the sheep: Extraembryonic membranes and the development of body form. *J. Morphology* 138:169-185.
- Curran S., Pierson R.A. & Gintther O.J. 1986. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 10 through 20. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189:1289-1295.
- Edwards J.L., Schrick F.N., McCracken M.D., Van Amstel S.R., Hopkins F.M., Welborn M.G. & Davies C.J. 2003. Cloning adult farm animals: A review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50:113-123.
- Evans H.E. & Sack W.O. 1973. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. *Anat. Histol. Embryol.* 2:11-45.
- Facciotti P.R., Rici R.E.G., Maria D.A., Bertolini M., Ambrósio C.E. & Miglino M.A. 2009. Patterns of cell proliferation and apoptosis by topographic region in normal *Bos taurus* vs. *Bos indicus* crossbreeds bovine placentae during pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7:1-7.
- Hill J.R., Burghardt R.C., Jones K., Long C.R., Looney C.R., Shin T., Spencer T.E., Thompson J.A., Winger Q.A. & Westhusin M.E. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.* 63:1787-94.
- Kohan-Ghadr H.R., Lefebvre R.G., Fecteau G., Smith L.C., Murphy B.D., Suzuki Junior J., Girard C. & Hélie P. 2008. Ultrasonographic and histological characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. *Theriogenology* 69:218-230.
- Miglino M.A., Pereira F.T.V., Visintin J., Garcia J.M., Meirelles F.V., Rumpf R., Ambrósio C.E., Papa P.C., Santos T.C. & Carvalho A.F. 2007. Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. *Theriogenology* 68:604-617.
- Noden D.M. & Lahunta A. 1990. Embriologia de los Animales Domésticos: mecanismos de desarrollo y malformaciones. *Acribia, Zaragoza*, p.341-347.
- R Development Core Team 2005. A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em 11 nov. 2005.
- Ram R. & Chandra G. 1984. Macroscopic studies on the placenta of buffalo (*Bubalus bubalis*). *Indian Vet. J.* 61:458-462.
- Rici R.E.G., Facciotti P.R., Ambrósio C.E., Maria D.A., Kfoury J.R., Bertolini M. & Miglino M.A. 2008. Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placentae. *Anim. Reprod. Sci.* (Published on line 27 Nov.)
- Reynolds L.P., Millaway D.S., Kirsch J.D., Infeld J.E. & Redmer D.A. 1990. Growth and *in vitro* metabolism of placental tissue of cows from day 100 to 250 of gestation. *J. Reprod. Fertil.* 89:213-222.
- Sartori R. 2004. Fertilização e mortalidade em bovinos. *Act. Sci. Vet.* 32:35-50.
- Stice S.L., Strelchenko N.S., Keefer C.L. & Matthews L. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 54:100-110.
- Thompson J.G. & Peterson A.J. 2000. Bovine embryo culture *in vitro*: new developments and post-transfer consequences. *Hum. Reprod.* 15:59-67.
- Wells D.N., Misica P.M. & Tervit H.R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with culture adult mural granulosa cells. *Biology of Reproduction.* 60:996-1005.
- Winters L.M., Green W.W. & Comstock R.E. 1942. Prenatal development of the bovine. *Univ. Agric. Exp. Sta. Minnesota Techn. Bull.* 151:3-50.
- Wrenzycki C., Well D., Herrmann D., Miller A., Oliver J., Tervit R. & Niemann H. 2001. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 65:309-317.