

Ossificação endocondral em embriões e fetos de bovinos

[*Endocondral ossification in bovine embryos and fetus*]

H.A.G. Trujillo¹, M.L.V. Alberto¹, M.B.P. Braga^{1*}, S.E.A.L. Will¹, M.L.B. Salvadori¹,
C.E. Ambrósio², M.A. Miglino¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP
Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87
05508-270 – Cidade Universitária, SP

²Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP
Avenida Duque de Caxias, 225
13635-900 – Pirassununga, SP

RESUMO

Estudou-se a ossificação endocondral de 18 embriões e 12 fetos de até três meses de gestação, os quais foram coletados de úteros gestantes em frigoríficos e abatedouros. Os úteros foram dissecados e, em seguida, realizou-se uma incisão dorsal até o cérvix para avaliações macroscópicas dos embriões e fetos. Para o estudo microscópico foram realizadas técnicas de inclusão, seguidas de marcação dos depósitos de cálcio e fósforo, responsável pela ossificação dos moldes de cartilagem. Foram identificados hipertrofia da cartilagem e morte dos condrócitos e aumento da área de depósito de cálcio e fósforo, por volta da 10^a semana gestacional (74 dias). Durante a 11^a semana de gestação (81 dias), os grupamentos de carbonato de cálcio e fósforo espalharam-se por todo o osso, sendo mais intenso na diáfise.

Palavras-chave: bovino, osteogêneses, ossificação endocondral, cálcio, fósforo

ABSTRACT

The endocondral ossification process was analyzed in 18 embryos and 12 fetus until three months of pregnancy, which had been collected from pregnant uterus at slaughterhouse. Later, the uterus was separated followed by a dorsal incision from the cervix for better gross evaluations of the embryos and fetus. For the microscopical study, histological techniques had been performed followed by staining of the deposits of calcium and phosphorus match, responsible for the ossification of the cartilage casts, used as Von Kossa stain. Cartilage hypertrophy and death of chondrocytes, enlargement of the area of calcium and phosphorus deposit were found on the 10th week of pregnancy (74 d). During the 11th week of pregnancy (81 d), the calcium carbonate and phosphorus had spread to all bones, being more intense in diaphysis.

Keywords: bovine, osteogenesis, endocondral ossification, calcium, phosphorus

INTRODUÇÃO

O período embrionário apresenta maior susceptibilidade a teratógenos, sendo a fase em que as primitivas camadas germinativas e o rudimento dos órgãos são formados. Cada órgão tem uma fase crítica de desenvolvimento, e os processos bioquímicos envolvidos no crescimento e diferenciação tem uma sequência

ordenada, controlada por vários genes (Arthur, 1979; Moore e Persaud, 2004). Estudos do desenvolvimento embrionário, especialmente em animais, são de suma importância para compreensão da organogênese das prováveis causas das malformações congênicas (Cagnoto *et al.*, 2009).

Recebido em 31 de maio de 2010

Aceito em 6 de junho de 2011

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: michellebarbosa@usp.br

Moore *et al.* (2002) descreveram a formação dos membros em humanos a partir da quarta semana gestacional, sob a forma de pequenas elevações na parede ventrolateral do feto. Um espessamento do ectoderma na extremidade distal do broto do membro exerce influência indutora sob o mesênquima dos brotos dos membros promovendo seu crescimento e desenvolvimento. Gruneberg e Huston (1965) e Noden e de Lahunta (1990) afirmaram, ainda, que as malformações e disfunções dos membros se encontram entre os defeitos congênitos que mais afetam os animais domésticos. Em parte, são resultados da interação de inúmeros fatores intrínsecos, como hereditário, cromossomal ou alterações genéticas, e fatores extrínsecos, como agentes ambientais (Alberto *et al.*, 2008).

No processo de osteogênese intramembranosa, os ossos chatos são formados no mesênquima, enquanto na osteogênese endocondral os modelos mesenquimais transformam-se em moldes cartilagosos dos ossos (Moore e Persuad, 2004). Células mesenquimais responsáveis pelo mecanismo de formação dos membros são organizadas de maneira que origem cartilagem inicial, músculos e tendões, e, a partir destes, desenvolve-se o futuro membro (Wolpert, 1976; Caplan, 1991).

Wolpert (1994) sugeriu, ainda, que o desenvolvimento dos membros dos vertebrados forme um modelo determinante, em que cartilagem e músculos se desenvolvem, e linhagens celulares se diferenciam em membros torácicos e pélvicos. Fletcher e Weber (2004) e Moore e Persaud (2004) afirmaram 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 condensa-se para formar centros de formação de cartilagem. As células mesenquimais proliferam e tornam-se arredondadas, e as formadoras de cartilagem (condroblastos) secretam fibrilas de colágeno e substância fundamental da matriz. Subsequentemente, 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

em uma membrana de tecido conjuntivo envolvente, denominada pericôndrio. Células periféricas do pericôndrio, os fibroblastos, transformam-se gradualmente em células arredondadas, os condroblastos, que geram células alongadas, os condrócitos (Junqueira, 2005).

Segundo Pizauro Jr. *et al.* (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. Essa 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.

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

A embriologia restringia seu campo de ação ao estudo dos fenômenos e processos da vida intrauterina, sem se preocupar muito com 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. Assis Neto *et al.* (2010) afirmaram que diversas pesquisas em bovinos são de interesse para testes com novas técnicas de reprodução, como fertilização *in vitro*, transferência de embriões e clone.

Com vistas ao melhor entendimento da ossificação inicial e compreensão da embriologia e biologia do desenvolvimento em bovinos, procurou-se descrever dados morfofuncionais do desenvolvimento embriológico basal para futuras comparações com animais produzidos por meio de biotecnologia aplicada de embriões *in vitro* e transferência de nuclear.

MATERIAL E MÉTODO

Utilizaram-se 18 embriões e 12 fetos com até três meses, provenientes de úteros gestantes, obtidos em frigoríficos e abatedouros da região de Poços de Caldas, MG. Os úteros foram abertos, e os embriões e fetos fixados em solução de formol tamponado a 10% e solução de Bouin.

Os períodos gestacionais foram estimados conforme método preconizado por Winters *et al.* (1942), Evans e Sack (1973) e Noden e de Lahunta (1990), 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.

Os úteros foram dissecados e, em seguida, realizou-se uma incisão dorsal ao cervix para avaliações macroscópicas dos embriões e fetos. Para os embriões pequenos foram utilizadas lupas estereomicroscópicas (Zeiss, Stemi DV4) e lupa cirúrgica (Leica).

O estudo da microscopia de luz foi realizado por meio de técnicas de inclusão, com cortes semi e ultrafinos. Os embriões foram colocados em solução fixadora de Bouin/Formol tamponado a 10%, onde permaneceram embebidos por 24 horas, até sua completa fixação. 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® (Parablast Embedding Media_Paraplast Plus, Sigma, Oxford Lab., USA).

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, para marcação de cálcio e fósforo, responsável pela ossificação dos moldes de cartilagem.

RESULTADOS

Os embriões bovinos com CR de 28,00mm apresentaram apenas um pequeno brotamento do membro pélvico enquanto o membro torácico já se apresentava em forma de “placa”. Histologicamente foram verificadas condensações de células mesenquimais nos brotos pélvicos e tecido cartilaginoso já formado, circundados por células mesenquimais, nos brotos dos membros torácicos.

Por volta da sétima semana gestacional (CR de 35,0mm), 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.

Entre a sétima e a oitava semana gestacional (CR de 50,0mm), os moldes cartilagosos ainda apresentavam mesênquima em diferenciação ao redor. A cartilagem iniciou seu processo de hipertrofia e erosão, com depósitos de cálcio e fósforo, que apareceram primeiro no centro (diáfise) do osso longo e se espalharam para as extremidades (epífises) (Fig. 1).

Ocorreu hipertrofia da cartilagem e morte dos condrocitos, aumentando a área de depósito de cálcio e fósforo, tornando-se mais próxima das epífises dos ossos longos em feto com CR de 76,00mm, por volta da 10ª semana gestacional. Ao redor da 11ª semana de gestação (CR de 100,0mm), 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 traves ósseas, e epífises apresentam-se ainda em tecido cartilaginoso (Fig. 2).

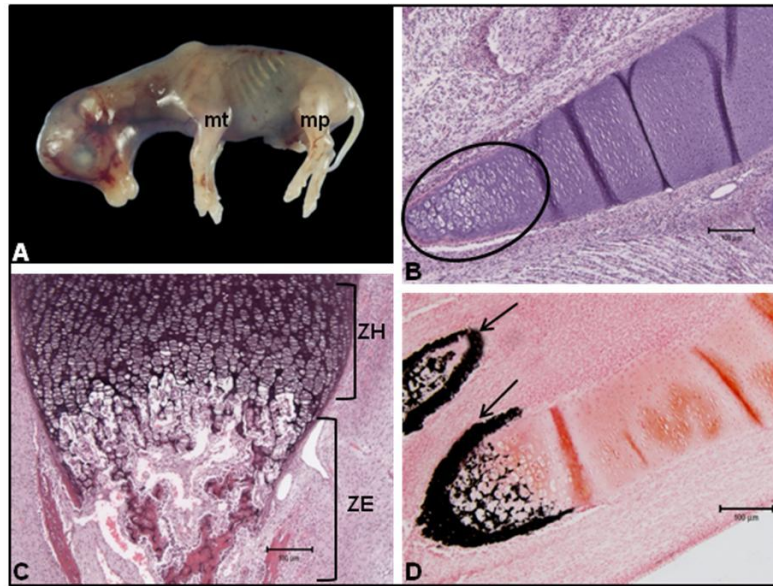


Figura 1. Fotografia de feto bovino (Crow rump = 50,0mm) e fotomicrografia de molde cartilaginoso para a formação dos membros. A: Observar fotografia de feto bovino evidenciando membro torácico (mt) e membro pélvico (mp), ambos bipartidos. B: Fotomicrografia de molde cartilaginoso para formação do membro, circundado por mesênquima (m); área marcada representa local de início de hipertrofia da cartilagem. C: Início de ossificação; observar zona hipertrófica (ZH) e zona de erosão (ZE). D: Observar depósitos de cálcio e potássio (setas) corados em preto na zona de erosão do molde cartilaginoso; coloração Von Kossa.

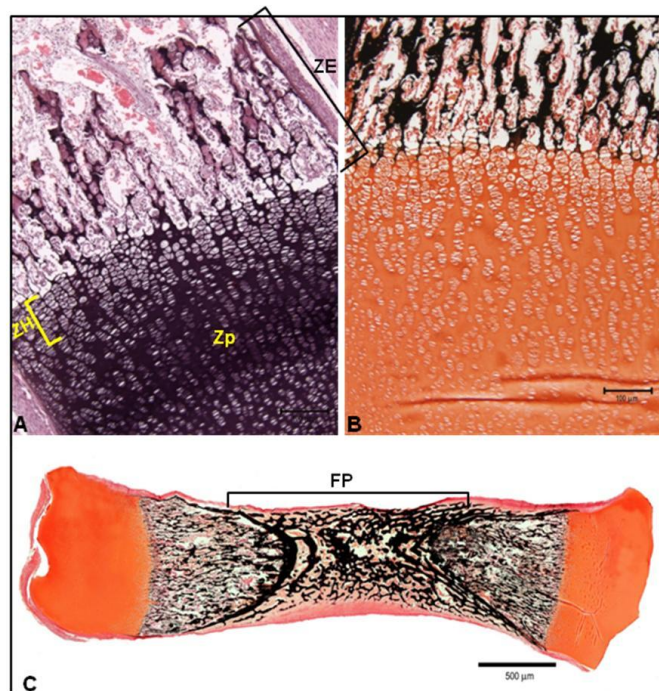


Figura 2. Fotomicrografia do osso do feto de bovino (Crow rump = 100,0mm)
A: Fotomicrografia de disco epifisário apresentando a zona de proliferação (Zp), zona de cartilagem hipertrófica (Zh) e zona de erosão (Ze). B: Notar que a zona de erosão apresenta-se corada em preto marcando áreas de depósito de cálcio e fósforo responsáveis pela ossificação. C: Calcificação de osso longo; na diáfise observa-se maior condensação de grupamentos de fósforo e carbonato de cálcio (FP) formando tecido ósseo; células da medula óssea e adiposas preenchem os espaços entre as travessas ósseas; epífises apresentam-se em tecido cartilaginoso.

DISCUSSÃO

Pelos resultados da microscopia de luz, observou-se que o molde dos membros em fetos com CR de 35,0mm (sexta semana gestacional) apresentaram 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 relataram que, aos 34 dias de gestação, os raios digitais das extremidades dos membros de embriões bovinos tornaram-se visíveis, 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 a oitava semana gestacional (CR de 50,0mm), os resultados revelaram que os moldes cartilagosos ainda apresentavam mesênquima circundante. Larsen (1997) explicou 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.

Este estudo mostrou que, neste mesmo período, a cartilagem iniciou seu processo de hipertrofia e erosão, com depósitos de cálcio e fósforo na região central do osso longo (diáfise) e, a partir daí, passou, aos poucos, para as extremidades (epífises). Moore e Persaud (2004) sugeriram, ainda, que na diáfise as células cartilagosas aumentam de tamanho; com a calcificação da matriz, as células morrem. Winters *et al.* (1942) verificaram 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 76,0mm (10ª semana gestacional). Neste período, verificaram-se morte dos condrócitos e maior área de depósito de cálcio e fósforo aproximando-se as extremidades craniais e caudais dos ossos

longos. Brighton e Fetter (1985) explicaram que a calcificação inicial acontece na zona hipertrófica, dentro da matriz, e que suas vesículas são 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 100,0mm), os grupamentos de carbonato de cálcio e fósforo já se espalharam por todo o osso, sendo ainda mais intensos na diáfise. Notou-se que células da medula óssea e células adiposas preencheram os espaços entre as traves ósseas. Sadler (2004) descreveu que células invasoras diferenciam-se em células hemopoéticas 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, e 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 hipertrofiaram-se, com invasão de tecido conjuntivo vascular. A ossificação espalha-se em todas as direções, persistindo somente cartilagem na superfície (cartilagem articular) e uma placa transversal, a cartilagem de conjugação, ou disco epifisário conforme verificaram Gilbert *et al.* (1994) e Moore e Persaud (2004).

CONCLUSÕES

O estudo demonstrou zonas de hipertrofia e erosão acompanhadas de depósitos de cálcio e fósforo na diáfise dos ossos longos em fetos com CR de 50,0mm (oitava semana gestacional), e grupamentos de cálcio e fósforo por toda a extensão óssea, com células da medula óssea e adiposas preenchendo os espaços entre as traves ósseas. Epífises apresentam-se em tecido cartilaginoso em fetos com CR de 100,0mm (11ª semana gestacional).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTO, M.L.V.; TRUJILLO, H.A.G.; RIVEROS, A.C.G. *et al.* Bovine meroanecephaly and gastroschisis: a macro and microscopy study. *Anat. Histol. Embryol.*, v.37, p.192-195, 2008.
- ARTHUR, G.H. *Reprodução e obstetrícia em veterinária*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. 573p.
- ASSIS NETO, A.C.; PEREIRA, F.T.V.; SANTOS, T.C. *et al.* Morpho-physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. *Reprod. Dom. Anim.*, v.45, p.760-772, 2010.
- BRIGHTON, T.C.; FETTER, A.W. Normal bone function. *IVIS*, 1985. Disponível em: <http://www.ivis.org/special_books/ortho/chapter_02/ivis.pdf> Acessado em: 09 fev. 2007.
- CAGNOTO, D.G.; GUERRA, R.R.; ALBERTO, M.V. *et al.* Morfologia e desenvolvimento ultraestrutural do sistema renal de embriões de bovinos com idade gestacional entre 10 e 50 dias. *Cienc. Rural*, v.39, p.2154-2161, 2009.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, v.9, p.641-650, 1991.
- 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.
- FLETCHER, T.F.; WEBER, A.F. *Veterinary developmental anatomy*. Minnesota: [s. n.], 2004, 76p.
- GILBERT, S.F. *Developmental biology*. 4.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1994. 894p.
- GRÜNEBERG, H.; HUSTON, K. The development of bovine syndactylism. *J. Embryol. Exp. Morphol.* v.19, p.251-259, 1965.
- 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. 512p.
- 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*. Zaragoza: Acribia, 1990. 399 p.
- PIZAURO JUNIOR, J.M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v.4, p.169-186, 2004.
- SADLER, T.W. *Langman embriologia médica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 347p.
- 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. Mechanism of limb development and malformation. *Br. Med. Bull.*, v.32, p.65-70, 1976.
- WOLPERT, L. Positional information and pattern formation in development. *Develp. Genet.*, v.15, p.485-490, 1994.