

Caracterização das membranas fetais em búfalas no terço inicial da gestação¹

Adriana C. Morini^{2*}, Pedro Luiz G. Barbosa², Rodrigo V. Melnic², João Carlos M. Junior², André Luis R. Francioli², Daniele S. Martins², Flávia T. Verechia Pereira³, Phelipe O. Favaron², Carlos E. Ambrósio² e Maria Angélica Miglino²

ABSTRACT.- 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. [Characterization of the fetal membranes in buffalo cows in the first three months of gestation.] Caracterização das membranas fetais em búfalas no terço inicial da gestação. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28(9):437-445. Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-900, Brazil. E-mail: drimorini@usp.br

The aim of the study was to characterize the fetal membranes in buffalo cows (*Bubalus bubalis*, Linnaeus 1758) in the first 3 months of the gestation. The fetal membranes were analyzed gross and microscopically (light and ultrastructural analysis). The corion is a simple layer of circle cells, with spherical nucleus, named trophoblastics; there is another cellular type, named trophoblastic giant cells, with two or more nucleus. Both of them have many cytoplasmic and reticule endoplasmic vesicles on transmission electron microscopy. The allantoic has many vessels filled with eritrocytes, elongated cells which form a stratified simple epithelium. The amnion is transparent or sometimes whitish, consisting of a stratified simple epithelium. The main difference between the allantoic and amnion is that the latter is avascular. The yolk sac is an opaque membrane that disappears during gestation, and is the only membrane that is not in contact with the others; it presents three different types of cells which form three distinct layers (endoderm, mesothelium and mesenquimal).

INDEX TERMS: Buffaloes, fetal membranes, morphology, placenta.

RESUMO.- Este estudo visou à caracterização das membranas fetais em búfalas (*Bubalus bubalis*, Linnaeus 1758) no terço inicial da gestação. As membranas fetais foram analisadas macroscópica e microscopicamente (luz e microscopia eletrônica de transmissão). O córion possui uma camada simples de células circulares, com núcleos

de forma esférica, denominadas trofoblásticas; há outro tipo celular, as células trofoblásticas gigantes, com dois ou mais núcleos. Ambas possuem uma grande quantidade de vesículas no citoplasma e retículo endoplasmático à microscopia de transmissão. O alantóide possui vasos preenchidos com eritrócitos, e contém células alongadas, que formam um epitélio estratificado simples. O âmnion é uma membrana transparente, ou esbranquiçada; constituído por epitélio estratificado simples. A diferença principal entre o alantóide e o âmnion é que o último é avascular. O saco vitelínico é uma membrana opaca que desaparece durante a gestação; é a única membrana que não está em contato com as outras e apresenta três tipos diferentes de células que dão forma a três camadas distintas (endoderma, mesotélio, mesênquima).

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bubalinos, membranas fetais, morfologia, placenta.

¹ Recebido em 10 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 15 de setembro de 2008.

² 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. *Autor para correspondência: drimorini@usp.br

³ Faculdade de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unidade Diferenciada de Dracena, Rodov. Comandante João Ribeiro de Barros (SP294 Km 651), Dracena, SP 17900-000, Brasil.

INTRODUÇÃO

Os búfalos são pertencentes à ordem dos Artiodáctilos Ungulados, subordem Ruminantia, família Bovidae e espécie *Bubalus bubalis bubalis* (Pereira 2001). Existem aproximadamente 130 milhões de bubalinos em todo o mundo, classificados como tipo Rio, o River buffalo, e tipo pântano, Swamp buffalo (Hafez & Hafez 2004).

No Brasil, a população de búfalos é cerca de 1,5-2,0 milhões de animais. Esses pertencem principalmente às raças Mediterrâneas, Carabao e seus mestiços, e estando 50% na região Norte, 15% no Sudeste, 14% no Nordeste, 12% no Centro-Oeste e 9% na região Sul (Baruselli et al. 1993).

As membranas extra-embrionárias são o elo de comunicação entre o feto e a mãe, que posteriormente irão formar a placenta. Existem quatro tipos de membranas fetais, o saco coriônico, o alantóide, o âmnion e o saco vitelínico (Wolf et al. 2003).

Em vista dos problemas relacionados à gestação em ruminantes encontram-se, na maioria das vezes, no início da gestação, mas só são diagnosticados tardiamente, tendo como conseqüências abortos, baixo peso fetal ao nascer, hidropsia de membranas fetais, entre outros, procuramos nesta oportunidade descrever a morfologia das membranas fetais para expandir o conhecimento nessa área e possibilitar estudos futuros sobre a fisiologia da reprodução nessa espécie animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados úteros de fêmeas bubalinas em início de gestação, provenientes de diversas propriedades e encaminhadas ao abatedouro por seus proprietários. O material foi retirado de abatedouros da região do Macapá, AP.

Análise macroscópica. Foi realizada incisão da cavidade abdominal da carcaça do animal, em seguida o material foi examinado e ao localizar o corpo lúteo em um dos ovários dos úteros coletado, promovia-se a abertura dos úteros por incisão dorsal à cervix. A abertura do mesmo foi amarrada com barbante e injetou-se solução de paraformaldeído 3%, formol tamponado 10%, glutaraldeído 2,5%, ou Bouin. O material foi mergulhado para ser fixado na mesma solução que preencheu seu interior.

Análise microscópica. As membranas fetais foram recortadas e colocadas em solução fixadora de paraformaldeído 4%. Após a fixação, o material foi desidratado em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70-100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em paraplast. Foram utilizados cortes de 5mm de espessura e corados por hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico-Schiff (PAS), azul de toluidina-fucsina e picrossírius (Tolosa et al. 2003). As lâminas foram montadas e após as análises, procederam-se as fotomicrografias.

RESULTADOS

Macroscopia

O córion é a membrana mais externa, presente na placenta bubalina, podendo, a partir do 30º dia de gestação, ser encontrada em ambos os cornos uterinos, gestante e não gestante (Fig.1G).

A membrana coriônica não é uma membrana lisa, macroscopicamente podemos observar pequenos botões, que irão formar as vilosidades coriônicas com a evolução da gestação. Nesse início de gestação não notamos a presença de grandes vasos irrigando o córion, provenientes do alantóide, no entanto, já é nítido seu contato com a membrana alantóide sendo muitas vezes impossível a separação dessas duas membranas devido à fragilidade do material (Fig.1B).

O alantóide, em embriões com tamanho inferior a 0,8cm tem um formato alongado e curvilíneo, direcionando sua porção côncava ao embrião e, conseqüentemente, sua face convexa encaminha-se ao córion para então se fundir a ele com a evolução da gestação (Fig.1A,C). A vascularização do alantóide é igualmente visualizada macroscopicamente em embriões com tamanho superior a 1,5cm. O mesmo apresenta uma grande quantidade de vasos, especialmente dois grandes que seguem paralelamente à base da membrana e se inserem no cordão umbilical (Fig.1E).

Conforme a evolução da gestação a membrana alantóideana une-se ao córion ficando difícil a percepção das duas em separado, no entanto, em embriões de tamanho equivalente a 2,0cm, nas extremidades do saco coriônico, podemos notar que a mesma ainda se encontra desconectada do córion (Fig.1G).

A extensão do córion e do alantóide partindo do embrião também ocorre de maneira concomitante, ao realizar dissecações nesta área vemos a bolsa que o córion forma ao redor do alantóide, envolvendo-o completamente e conseqüentemente envolvendo as demais membranas (Fig.1E).

O âmnio se apresenta intimamente ligado ao embrião sendo a primeira das membranas fetais, se considerarmos a ordem embrião-útero. Nela não são visíveis vasos, macroscopicamente, observa-se ainda uma coloração próxima ao transparente sendo em alguns casos levemente esbranquiçada (Fig.1D,F). Há entre a membrana e o feto, o líquido amniótico que é responsável pela proteção mecânica do mesmo, esse líquido é mais denso e viscoso que os demais fluidos encontrados entre as membranas (Fig.1D).

O âmnion acompanha o crescimento do embrião, no entanto não se prolonga como as demais membranas supracitadas. Possui um formato que varia de oval a arredondado, variando conforme a forma e posição do animal; na fase gestacional em que o embrião se curva tomando um formato de "C" (1,5-2,0cm de CR) o âmnion fica tão próximo ao mesmo que torna difícil sua remoção para estudo sem que a manobra comprometa a morfologia do concepto (Fig.1E,F).

O saco vitelínico é uma membrana de coloração mais opaca e amarelada que as demais supracitadas, nela não é possível notar a presença de vasos, a olho nu. Seu tamanho diminui conforme o crescimento do embrião, porém, a presença do mesmo foi confirmada até o tamanho de 1,5cm. Nessa fase o saco vitelínico se resume a dois

pequenos filamentos prolongados de comprimento inferior ao do embrião, muitas vezes, esses filamentos se dispõem de tal forma que se assemelham à presa das serpentes (Fig.1E).

Em animais com tamanho variando de 0,6-0,8cm o

saco vitelínico apresenta-se maior em comprimento e espessura em relação ao embrião (Fig.1A,B); nessa fase também é possível diferenciar a membrana em três porções distintas, sendo elas, porção central de formato globoso de onde partem dois longos filamentos cujas ex-

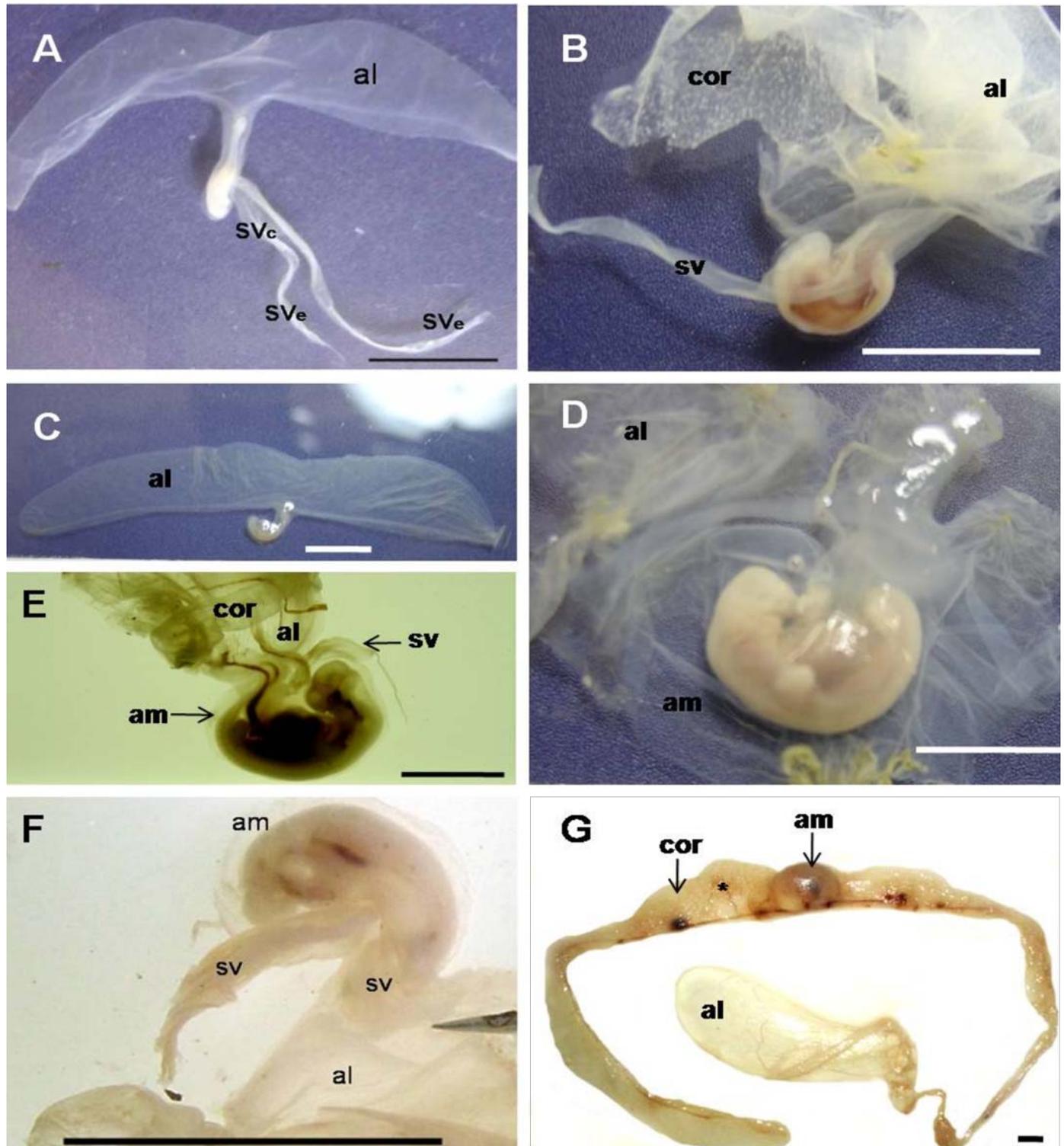


Fig.1. (A-G) Embriões e suas membranas fetais: (al) membrana alantoideana, (am) membrana amniótica, (cor) membrana coriônica, (sv) saco vitelínico, (SVc) porção central do saco vitelínico, (SVe) extremidade do saco vitelínico. Barra: 1cm.

tremidades vão se afilando até tornarem-se da finura de um fio de cabelo (Fig.1A).

Microscopia

O córion é constituído por uma camada de células ar-

redondadas, dispostas em formato linear de maneira muito regular e homogênea, aspecto esse semelhante ao epitélio simples cúbico.

Geralmente o córion apresenta uma camada simples de células, mas em algumas vezes essa membrana pode

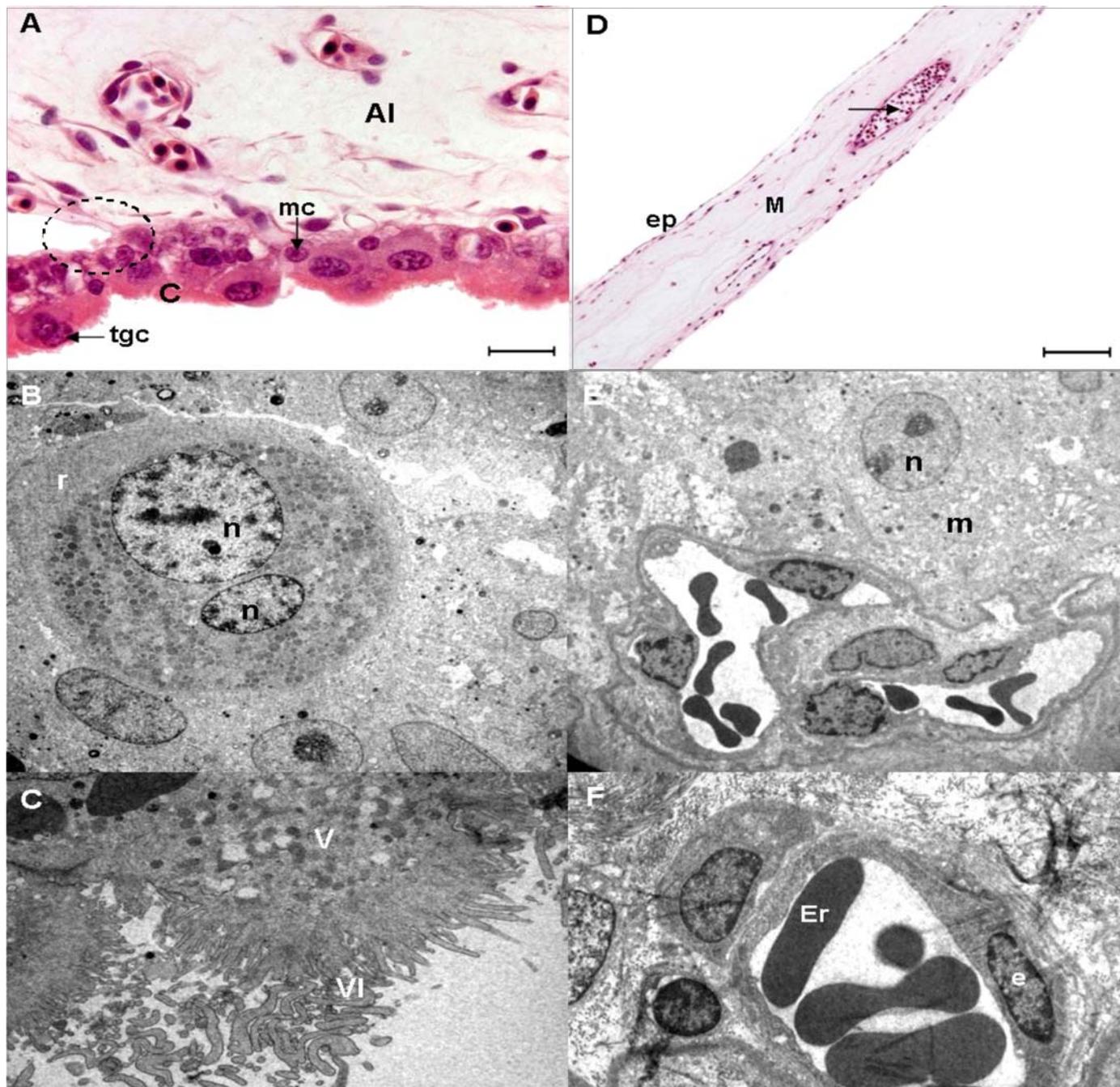


Fig.2. (A) Corioalantóide: (al) membrana alantoideana, (c) membrana coriônica, (mc) célula trofoblástica mononucleada; Notar a possível zona de junção do córion com o alantóide na área circulado e a (tgc) célula trofoblástica gigante, 40 μ m, HE. (B) Célula trofoblástica do corioalantóide do embrião bubalino; Notar as células com dois núcleos (n) e de retículo endoplasmático na região apical da célula (r), 2500x. (C) Célula coriônica mononucleada de embrião bubalino; Notar presença de microvilosidades (vi) na região apical da célula e de muitas vesículas no citoplasma (v), 5000x. (D) Alantóide: (M) mesênquima; (ep) epitélio pavimentoso, (seta) células eritoblásticas, 100 μ m (HE). (E) Vasos do alantóide de embrião bubalino; Notar presença de mesênquima com substância amorfa e poucas células (m) e com núcleo grande e dois nucléolos bem definidos (n), 1500x. (F) Notar a presença de eritrócitos (er) dentro dos vasos e das células endoteliais (e) dos vasos, 4000x.

apresentar mais de uma camada. Essas células, que, de modo geral, são marcadas fortemente pelas diferentes colorações, são cubóides, grandes, e globosas, com núcleo grande e material genético bem visível.

A essas células do córion dá-se o nome de células trofoblásticas; muitas delas são possuidoras de um núcleo globoso e repleto de grânulos, porém, nota-se também a presença de várias células de mesma origem, com

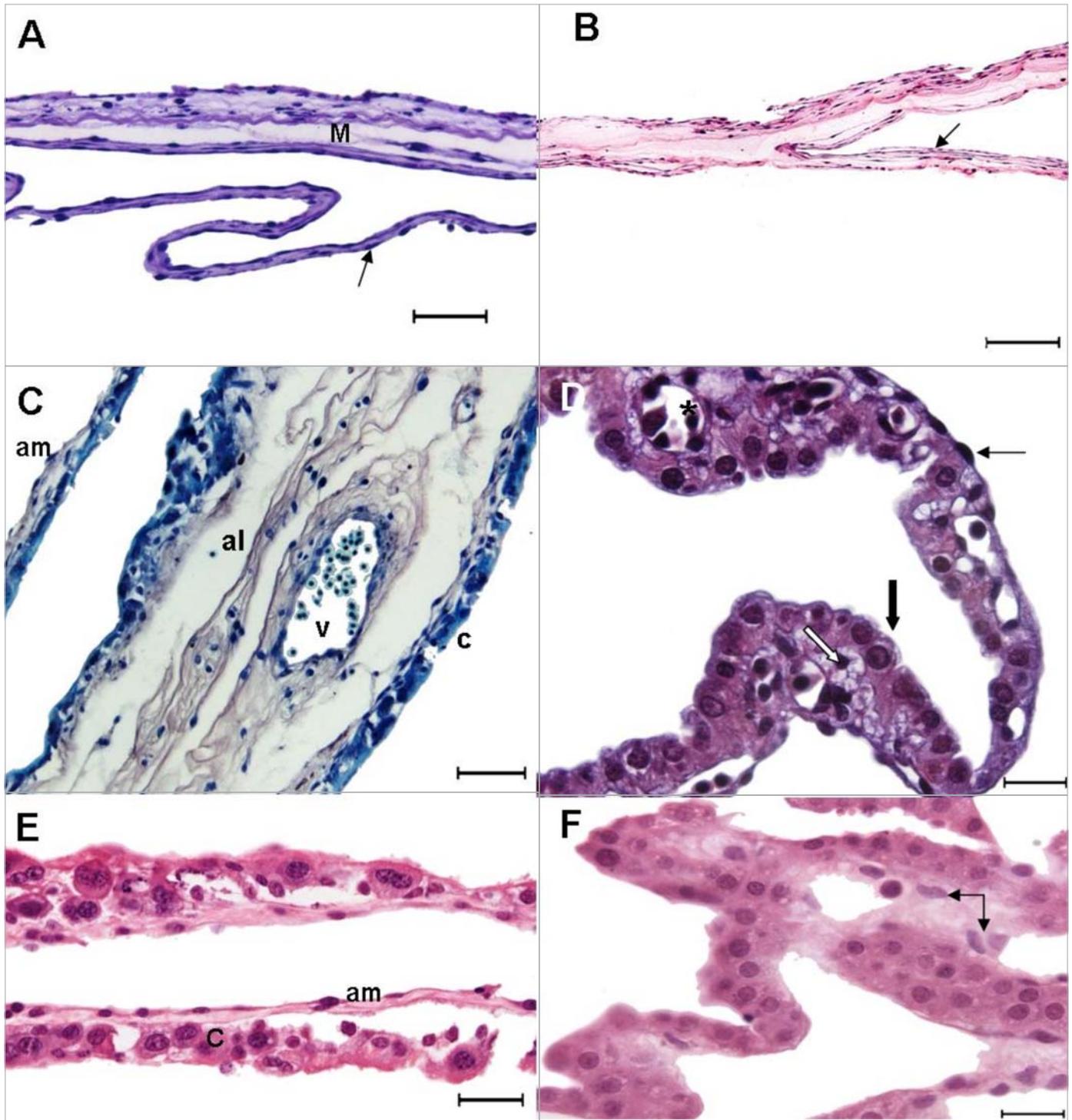


Fig.3. (A e B) Âmnion: (M) mesênquima, (seta) epitélio pavimentoso simples, 100µm, PAS e HE, respectivamente. (C) Amniocórnion: (co) membrana coriônica, (am) âmnion, (al) alantóide, (*) precursor do vaso sanguíneo, (seta) células eritoblásticas, 40µm, Azul de toluidina. (D) Saco vitelínico: (seta) mesotélio, (seta preta) células esféricas do endoderma, (seta branca) mesênquima, (*) ilhotas com células eritoblásticas, 20µm, Picosirius. (E) Âmnion e corioalantóide. Notar a membrana coriônica (c) e o âmnion (am), 50µm, HE. (F) Saco vitelínico. Notar os núcleos amorfos (seta dupla), 20µm, HE.

dois ou mais núcleos fundidos, o que as torna maiores do que as anteriores e as denomina células trofoblásticas gigantes (Fig.2A).

Notamos na maioria de nossas amostras a fusão do córion com a membrana seguinte, o alantóide, denominando a fusão de corioalantóide (Fig.2A), no entanto também visualizamos áreas onde as mesmas não se fundiram ou ao que parece estavam em processo de fusão.

Com a utilização da microscopia eletrônica de transmissão pudemos observar no citoplasma, a presença de uma grande quantidade de cisternas de retículo endoplasmático (Fig.8). Eram visíveis também muitas vesículas no citoplasma da célula (Fig.2B,C). Foi possível também analisar delicadas vilosidades presentes na região apical da célula, estas eram alongadas e possivelmente são formações dos cotilédones, onde haverá a junção com as carúnculas uterinas.

Encontramos em nosso trabalho uma grande quantidade de células trofoblásticas gigantes com dois ou mais núcleos. Pode-se notar que os núcleos destas células são bem globosos e que contêm áreas nas quais a cromatina se encontra mais densa e onde ela se encontra mais frouxa (Fig.2B).

O alantóide é uma membrana pouco celularizada, possui em suas extremidades, tanto a mais próxima ao embrião quanto a em contato com o córion, uma fina camada de epitélio simples pavimentoso, onde as células em sua maioria têm formato alongado tendendo muitas vezes a tornarem-se achatadas, tanto em relação ao núcleo quanto ao citoplasma destas (Fig.2D).

Logo abaixo do epitélio, observa-se uma generosa quantidade de mesênquima, essa distribuição da proporção de mesênquima pode ser maior ou menor dependendo da idade gestacional do embrião, sendo maior em casos de gestação mais avançada. No mesênquima observa-se uma pequena quantidade de células mais arredondadas com um arranjo frouxo entre elas. Há também presença de vasos repletos de eritroblastos (Fig.2D).

Os eritroblastos são células precursoras do sangue. Estas células apresentam-se arredondadas e fusiformes, com o núcleo bem evidente e fortemente corado. Em geral, observa-se nessas células que proporcionalmente o núcleo é mais desenvolvido quando comparado ao citoplasma.

No alantóide, visto sob microscopia eletrônica de transmissão, pode se observar vasos em diversos locais e a presença de um mesênquima pouco celularizado e com bastante quantidade de tecido conjuntivo amorfo. Observa-se uma célula endotelial com núcleo achatado recobrimdo todos os vasos e dentro destes, pode-se observar células sanguíneas, os eritrócitos (Fig.2E,F).

A membrana amniótica é composta por duas camadas distintas, a primeira dessas é constituída por uma fina e única camada de células achatadas, portanto, é um epitélio simples pavimentoso (Fig.3A,B). Na maioria das vezes, forma-se uma camada simples e contínua de células organizadas. Essa membrana, apesar de ser morfo-

logicamente semelhante ao alantóide, não apresenta as típicas estruturas precursoras dos vasos sanguíneos.

Essa membrana está geralmente apoiada no mesênquima, de forma que este promove a sua sustentação. O mesênquima é constituído de substância amorfa onde é observada pouca quantidade de células. Este não se distribui de forma regular ao longo de toda membrana amniótica de forma que em algumas regiões nota-se diferença na sua espessura (Fig.3A,B).

Em algumas regiões é passível de se encontrar fusão de âmnion e córion gerando o chamado amniocóron (Fig. 3C,E).

O saco vitelínico dos bubalinos é composto por três tipos celulares diferentes, formando três camadas distintas, o mesotélio, o endoderma e o mesênquima (Fig.3D).

O endoderma situa-se na porção voltada para a chamada cavidade celomática; o mesmo é composto por grandes células esféricas com núcleos redondos e basofílicos, a essas células dá-se o nome de hemangioblastos. Próximo ao núcleo foi encontrada células mononucleares, com núcleo fortemente marcado, e com tamanho inferior ao núcleo dos próprios hemangioblastos, essas células foram chamadas de tronco (Fig.3D).

A camada de endoderma apóia-se sobre o mesênquima, camada esta que é constituída por uma matriz extracelular, uma grande quantidade de vasos sanguíneos, e no interior desses vasos está presentes células eritroblásticas, a essas estruturas dá-se o nome de ilhas eritroblásticas. A última camada encontrada na membrana vitelínica é o mesotélio, este se encontra voltado para a cavidade vitelínica. É formado por um epitélio simples pavimentoso de células delgadas e de núcleo achatado (Fig.3D).

DISCUSSÃO

Durante a idade gestacional pesquisada não foram observados placentônios nem qualquer tipo de conexão entre o endométrio e o córion, porém foram encontrados pequenos botões que darão origem as vilosidades com o decorrer da gestação. Hafez (1954), com seu estudo histológico, descreveu que delicados vilos aparecem na superfície da membrana coriônica em oposição às carúnculas maternas. Provavelmente, essas diferenças entre as conexões do endométrio e o córion, observadas nos dois trabalhos, ocorreram devido ao fato dos estudos terem sido realizados em fases gestacionais diferentes.

No período gestacional estudado, não é nítida a presença de vasos provenientes do alantóide na membrana coriônica, porém, percebe-se um contato íntimo entre essas membranas em diversos locais. Kaufmann & Burton (1994) relataram em seu trabalho sobre a fisiologia geral da placenta em diversos mamíferos, que o córion é um tecido intrinsecamente avascular, sendo vascularizado por vasos do alantóide. Esses resultados indicam uma semelhança entre búfalos e as demais espécies de mamíferos.

Foi possível identificar em nosso estudo que a membrana coriônica é constituída por uma camada simples de células dispostas em formato linear. Estas células são

arredondadas, marcadas fortemente pela coloração e com núcleo grande. Quando a célula é mononucleada, é designada de célula trofoblástica, quando existem mais de um núcleo, identificamos como célula trofoblástica gigante. Kathiresan et al. (1992) caracterizaram o epitélio trofoblástico do córion em búfalas como sendo formado por uma camada simples de células cuboides marcadas fortemente, podendo apresentar duas ou mais camadas em alguns lugares. Assis Neto (2005) descreveu a membrana coriônica em bovinos e identificou que as células trofoblásticas estão entremeadas entre as células trofoblásticas gigantes, ambas as células são globosas com citoplasmas claros e bem granulares. Winsatt (1980) e Carvalho et al. (2006) observaram que as células binucleadas do córion em diferentes espécies são semelhantes entre si. Estas características morfológicas da célula trofoblástica mononucleada e da célula gigante indicam uma semelhança entre a membrana coriônica de bubalinos e de outras espécies de ruminantes.

Em nosso projeto foi possível encontrar no citoplasma uma grande quantidade de vesículas e de retículo endoplasmático rugoso (RER) o que indica que as células trofoblásticas gigantes têm grande atividade secretora. Carvalho et al. (2006), descrevem em seu trabalho uma grande quantidade de estruturas capazes de produzir e estocar proteínas, indicando a semelhança entre os resultados obtidos.

A membrana citoplasmática da célula trofoblástica coriônica apresentou delicados vilos de forma alongada na região apical da célula, estes provavelmente entrarão em contato com a carúncula uterina para a formação dos placentônios responsáveis pela grande maioria das trocas fisiológicas entre mãe e feto. Hafez (1954) também descreve os vilos como sendo delicados e localizados em oposição às carúnculas maternas.

Em relação ao núcleo das células do córion, foram encontradas células com até 3 núcleos. Winsatt (1980) descreve em ruminantes que encontrou células com até 7 núcleos. A abrangência de espécies e as diferentes fases estudadas por Winsatt (1980) podem ter sido a razão da diferença de números de núcleos encontrados entre os dois estudos.

Em nosso estudo foi observado que as paredes do alantóide em embriões bubalinos com menos de 0,8cm de CR (aprox. 21 dias de gestação) são finas e translúcidas, com um leve tom esbranquiçado e nelas não é possível detectar a presença de vasos. Marshall (1952) e Barone (1986) descreveram que, em outras espécies de ruminantes, essa estrutura apresenta paredes delgadas e transparentes. Esses resultados indicam que o alantóide bufalino é similar ao de outros ruminantes.

O alantóide bufalino observado é uma membrana pouco celularizada que possui em suas extremidades, tanto a mais próxima ao embrião quanto a em contato com o córion, uma fina camada de epitélio simples pavimentoso, onde as células em sua maioria têm formato alongado tendendo muitas vezes a tornarem-se achatadas, tanto em relação

ao núcleo quanto ao citoplasma. Essas células apóiam-se sobre um mesênquima próprio da membrana. Assis Neto (2005) observou que o alantóide bovino é constituído por uma delgada camada de células achatadas e pavimentosas que compõem a parte externa da membrana. Essas células são sustentadas por uma fina membrana basal e o mesênquima extra-embriônico. Analisando os dois resultados pode-se afirmar que essa membrana fetal apresenta semelhanças entre essas duas espécies.

O mesênquima alantoideano apresenta uma pequena quantidade de células mais arredondadas com um arranjo frouxo entre elas. A espessura desse mesênquima pode ser maior ou menor dependendo da idade gestacional do embrião, sendo maior em casos de gestação mais avançada. Segundo Bacha & Bacha (2000) o tecido mesenquimal é composto por células pálidas, com forma de estrelas se conectando por meio de processos citoplasmáticos formando dessa maneira um arranjo frouxo entre essas células. Estas células estão envoltas por uma substância com característica gelatinosa e amorfa que acumula fibras ao longo do desenvolvimento embrionário. Assim sendo, os resultados obtidos em nossa pesquisa apresentam-se parcialmente similares aos resultados apresentados por esse autor, podendo assim afirmar que esta membrana embrionária durante a fase inicial de gestação em búfalos é idêntica a dos demais ruminantes de grande porte.

O alantóide apresentou em nosso trabalho uma grande quantidade de vasos, estes vasos estavam apoiados sobre o mesênquima próprio da membrana e continham eritrócitos em seu interior. O mesênquima alantoideano era formado por tecido conjuntivo amorfo e poucas células. Bjorkman (1986) e Assis Neto (2005) descreveram o mesênquima de bovinos como sendo uma estrutura bastante vascularizada, assim como visto em nossos estudos com búfalos.

Pelo fato do âmnio ser uma membrana intimamente ligada ao embrião, não existem vasos na mesma, fazendo com que o âmnio seja uma membrana transparente. Estas características também são demonstradas nos estudos feitos por Schwarze (1972), Barone (1986) e Noden & Lahunta (1990), indicando que nesta fase gestacional a membrana do âmnio bubalino é semelhante a das demais espécies de ruminantes.

Em nossa pesquisa foi encontrado, dentro da cavidade amniótica, um líquido, o líquido amniótico. Este é responsável pela proteção mecânica do conceito, pois envolve o mesmo evitando o atrito com outras estruturas. Em bovinos, o líquido foi descrito de forma semelhante nos trabalhos de Schwarze (1972), Reeves et al. (1972) e Leiser & Kaufmann (1994) indicando assim uma semelhança entre a placenta de búfalos e a placenta de bovinos.

Quanto ao formato da membrana amniótica, notamos que esta possui uma pequena alteração descritiva variando do oval para arredondado, apresentando assim características próprias de acordo com a posição e tamanho do conceito. Para Schwarze (1972), o âmnio possui formato

de ovo alargado e esta membrana fetal pode variar de acordo com a progressão da gestação. Sendo assim verificamos que ocorre uma similaridade no desen-volvimento entre as membranas do âmnio na placenta de búfalas em início de gestação, por nós estudada, e na bovina.

Averiguamos que o âmnio é formado por duas camadas distintas. A primeira é formada por um epitélio pavimentoso contínuo e simples sendo este mais regular. A outra camada desta membrana é o mesênquima, o qual é responsável pela sustentação do âmnio e é formado por tecido conjuntivo. Assis Neto (2005) caracterizou as células da membrana amniótica de bovinos como sendo de morfologia uniforme e organizada, além de ser um epitélio pavimentoso simples e contínuo. Isto demonstra que as duas espécies têm membranas fetais parecidas.

Em nosso estudo observamos que em búfalos o tamanho do saco vitelínico diminui conforme o crescimento do embrião. Segundo Mossman (1987), Latshaw (1987) e Noden & Lahunta (1990) esta membrana involui em um curto período de tempo. Assim sendo, o desenvolvimento dessa membrana no decorrer da gestação ocorre de maneira similar às outras espécies de ruminantes.

Em nossa pesquisa os animais com tamanho variando entre 0,6 e 0,8cm de CR (aprox. 17-21 dias), o saco vitelínico apresentou-se maior em comprimento e espessura em relação ao embrião. Já em animais com 1,5cm de CR (aprox. 30 dias) essa membrana resume-se a dois pequenos filamentos prolongados, de comprimento inferior ao do embrião. Entretanto, Barone (1986) descreve que o saco vitelínico de outras espécies ruminantes é reduzido a um grupo sólido de células com poucos vasos sanguíneos na terceira semana de gestação, enquanto que Marshall (1952) e Bryden et al. (1972) observaram que isso ocorre nas ovelhas ao redor do 25º dia de prenhez. A diferença observada entre os estudos deve-se, provavelmente, às diferentes espécies animais analisadas por esses autores e ao fato do período gestacional ser diferente em cada uma delas.

Observamos que o saco vitelínico dos bubalinos é composto por três tipos celulares diferentes, formando três camadas distintas, o mesotélio, o endoderma e o mesênquima. Assis Neto (2005) observou que o epitélio do saco vitelínico dos bovinos é composto por três camadas: uma camada única de células endodérmicas (endoderme), revestindo a cavidade vitelínica; uma camada simples mesotelial, voltada ao exoceloma (mesotélio); e uma camada intermediária mesenquimal vascular (mesênquima). Kathleen (2005) descreveu o saco vitelínico em mamíferos como sendo uma estrutura em bicamada derivada das células do mesoderma e do endoderma. A discordância entre nossos resultados e de Kathleen (2005) é devido às diferenças morfológicas placentárias, pois dentre os mamíferos existem vários tipos placentários com características morfológicas diferentes. Enquanto que, quando comparados com os dados encontrados por Assis Neto (2005), podemos observar que há grande similaridade entre esta membrana fetal dessas espécies.

O endoderma vitelínico situa-se na porção voltada para a região da cavidade celomática; o mesmo é composto por grandes células esféricas com núcleos redondos e basofílicos. Assis Neto (2005) observou que o endoderma dessa membrana na espécie bovina apresenta células globosas e colunares e repousa sobre o mesênquima do saco vitelínico. Pode-se afirmar que essa paridade de resultados ocorre devido às grandes semelhanças reprodutivas encontradas entre bovinos e bufalinos.

O mesênquima do saco vitelínico é constituído por células com núcleos amorfos, dispersas sobre uma matriz extracelular, uma grande quantidade de vasos sanguíneos encontra-se na matriz, e no interior desses vasos estão presentes células eritroblásticas, a essas estruturas dá-se o nome de ilhas eritroblásticas. Assis Neto (2005) observou que, no mesênquima dessa membrana em embriões bovinos, é possível encontrar vasos e ilhas eritroblásticas primárias. A similaridade dos resultados indica, mais uma vez, a grande semelhança entre as membranas fetais dessas duas espécies.

A última camada encontrada na membrana vitelínica é o mesotélio, este se encontra voltado para a cavidade vitelínica. É formado por um epitélio simples pavimentoso de células delgadas e de núcleo achatado. Lee (1983) descreveu que, em cadelas, o mesotélio é composto por maior parte de células escamosas freqüentemente com sobreposições na borda lateral, e que nessa espécie, essa camada celular varia sua morfologia celular de acordo com o período gestacional. Devido principalmente às grandes variações morfológicas entre as espécies estudadas, não era esperado que houvesse paridade entre os resultados do nosso estudo com o de Lee (1983) com cães.

CONCLUSÕES

Do estudo realizado sobre a caracterização das membranas fetais em Búfalos (*Bubalus bubalis*, Linnaeus 1758) no terço inicial da gestação julgamos poder concluir que:

O córion é uma membrana especializada na produção e na secreção de proteínas, além de estar intimamente ligada ao alantóide desde as fases iniciais de gestação;

O alantóide é a membrana responsável pela vascularização do córion;

O âmnio e o alantóide são membranas com características morfológicas semelhantes;

O âmnio, através de seu líquido, é responsável pela proteção mecânica do embrião;

O saco vitelínico é a membrana responsável pela produção das primeiras células sanguíneas do concepto, persistindo por todo o período estudado neste trabalho.

As membranas fetais bubalinas são muito semelhantes quando comparadas às membranas fetais bovinas.

REFERÊNCIAS

Assis Neto A.C. 2005. Desenvolvimento placentário em bovinos obtidos por gestações naturais e por fecundação *in vitro*. Tese de Doutorado, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo.

- Bacha W.J. & Bacha L.M. 2000. Color Atlas of Veterinary Histology. 2nd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Barone R. 1986. Splanchnologie, p.579-605. In: ____ (ed.), Anatomie Comparée des Mammifères Domestiques. Tome 2. Vigot Frères, Paris.
- Baruselli P.S., Oliveira J.F.S., Mendes M.L.M., Jorge A.M., Fujii T. & Palazzo J.P.C. 1993. Diagnóstico da bubalinocultura no Vale do Ribeira. Doc. Téc. 94, CATI, Campinas, p.1.
- Björkman N. 1986. Placentation, p.351-369. In: Dellman H.D. & Brown E.M. (ed.), Textbook of Veterinary Histology. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Bryden M.M., Evans H.E. & Binns W. 1972. Embryology of the sheep: Extraembryonic membranes and the development of body form. J. Morphology 138(2):169-185.
- Carvalho A.F., Klisch K., Miglino M.A., Pereira F.T.V. & Belavilacqua E. 2006. Binucleated trophoblast giant cells in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). J. Morphology 267:50-56.
- Hafez E.S.E. 1954. Foetal-maternal attachments in buffalo and camel. Anat. Res. 25(2):109-115.
- Hafez E.S.E. & Hafez B. 2004. Reprodução Animal. 7^a ed. Manole, São Paulo.
- Kathleen E.M. & Athjames P. 2005. Hematopoiesis in the yolk sac: More than meets the eye. Exp. Hematol. 33:1021-1028.
- Kaufmann P. & Burton G. 1994. Anatomy and genesis of the placenta, p.441-484. In: Knobil E. & Neill J.D. (ed.), The Physiology of Reproduction. Vol.1. Raven, New York.
- Kathiresan R., Rajasundaram R.C. & Pattabiraman S.R. 1992. Histological and histochemical changes in the endometrium and placenta during different stages of gestation in buffaloes (*Bubalus bubalis*). Indian Vet. J. 69:326-328.
- Latshaw W.K. 1987. Veterinary Development Anatomy: A clinically oriented approach. Deker, Toronto, p.49-74.
- Lee S.Y., Anderson J.W., Scott G.L. & Mossman H.W. 1983. Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog. II. The yolk sac. Am. J. Anat. 166:313-327.
- Leiser R. & Kaufmann P. 1994. Placental structure in a comparative aspect. Exp. Clin. Endocrinol. 102:122-134.
- Marshall M.A. 1952. Marshall's Physiology of Reproduction. A.S. Parkes, London, p.189-211.
- Mossman H.W. 1987. Vertebrate fetal membranes. Rutgers University Press, New Brunswick.
- Noden D.M. & Lahunta A. 1990. Embriologia de los Animales Domésticos. Acribia, Zaragoza.
- Pereira F.T.V., Miglino M.A., Carvalho A.F. & Bevilacqua E. 2001. Development of placenton in water buffalo (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758). Buffalo Journal 17(2):217-229.
- Reeves J.T., Daoud F.S., Gentry M. & Eastin C. 1972. Changes in urinary flow in bovine fetuses during late gestation: Composition of amniotic and fetal body fluids. Am. J. Vet. Res. 33:2159-2167.
- Schwarze E. 1972. Kompendium der Geflügelanatomie von Erich Schwarze. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Tolosa E.M.C., Rodrigues C.J., Behmer O.A. & Freitas-Neto A.G. 2003. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. 2^a ed. Manole, São Paulo.
- Winsatt W.A. 1980. Observations on the morphogenesis, cytochemistry and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. Am. J. Anat. 159(2):209-243.
- Wolf E., Bauersachs G.J.A., Beier H.M., Blum H., Einspanier R., Frohlich T., Herrler A., Hiendleder S., Kolle S., Prella K., Reichenbach H.D., Stojkovic M., Wenigerkind H. & Sinowatz F. 2003. Embryo-maternal communication in bovine: Strategies for deciphering a complex cross talk. Reprod. Domestic Anim. 38:276-289.