

Morfologia e desenvolvimento ultraestrutural do sistema renal de embriões bovinos com idade gestacional entre 10 e 50 dias

Morphology and ultrastructural development of renal system in bovine embryos with gestational age between 10 and 50 days

Daniela Gomes Cagnoto¹ Ricardo Romão Guerra^{1*} Miryan Vila Alberto¹
Carlos Eduardo Ambrósio¹ José Manuel Santos¹ Maria Angélica Miglino¹

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo descrever o desenvolvimento dos sistemas renais de bovinos durante o período embrionário compreendido entre 10 e 50 dias. Embriões bovinos coletados em frigorífico foram fotografados e medidos utilizando-se o método Crow-Rump (CR) para estimar a idade gestacional. Os embriões destinados à microscopia óptica foram fixados em solução de Bouin para a avaliação do desenvolvimento do sistema renal, assim como suas estruturas. Alguns embriões também foram fixados em Glutaraldeído 2,5% e destinados à microscopia eletrônica de transmissão para o estudo ultraestrutural das células do sistema renal. Embriões entre o 14^o e o 15^o dia de desenvolvimento (E14-15) não apresentaram pronefro, mas apresentaram mesonefro, assim como indícios morfológicos que indicam sua atividade funcional. O mesonefro apresentou, no interior de suas células tubulares, inúmeras mitocôndrias e interdigitações, indicando uma alta atividade de transporte iônico. O metanefro, ou rim definitivo, iniciou seu desenvolvimento em E23-24. Os achados demonstram que a involução do mesonefro acontece simultaneamente com a diferenciação metanefrogênica. Em E45-46, já iniciando a fase fetal, o metanefro possuiu unidades filtradoras (néfrons), com seus respectivos glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais e alça de Henle. Nessa fase, o rim ainda não apresenta lobação externa.

Palavras-chave: rim bovino, desenvolvimento embrionário, morfologia, sistema renal.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the bovine renal system development, during the early embryonic period (10-50 days). Bovine embryos collected in abattoir were photographed and measured by Crow-Rump (CR) method to estimate the gestational age. The embryos destined to optical microscopy were fixed in Bouin solution for development evaluations of renal system, as well as its structures. Some embryos also were fixed in Glutaraldehyde 2.5% and destined

to transmission electron microscopy for ultrastructural study of renal system cells. In bovine embryos with gestational age of 14 to 15 days (E14-15) the presence of pronephro were not observed, however the mesonephro was found, as well as morphologic indications of its functional activity. Mesonephro presented, in the interior of its tubular cells, innumerable mitochondrias and interdigitations, indicating high activity of ionic transportation. The metanephro, or definitive kidney, initiates its development in E23-24. The study demonstrated that the involution of mesonephro happened simultaneously with the metanephrogenic differentiation. In E45-46, the embryos already initiated the fetal phase, and the metanephro possess the filter units (nephrons), with its respective glomeruli, proximal and distal convoluted tubules, and the loop of Henle.

Key words: bovine kidney, embryonic development, morphology, renal system.

INTRODUÇÃO

Existem poucas publicações envolvendo a descrição anatômica dos rins (CARVALHO et al., 2008), as quais são pouco detalhadas e limitadas a textos clássicos (SISSON, 1981; DYCE et al., 2004). Além disso, publicações envolvendo a descrição ultraestrutural do desenvolvimento do sistema renal em bovinos são inexistentes.

Estudos do desenvolvimento embrionário, especialmente em animais, são de suma importância para a compreensão da organogênese e das prováveis causas das má-formações congênitas (USHIZAWA et al., 2004), além de poderem gerar conhecimento para a utilização de órgãos oriundos de animais em modelos para terapias e técnicas experimentais. MOINZADEH et al. (2005a, b) utilizaram rins bovinos como modelo para desenvolvimento de técnicas urológicas e

¹Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Universidade de São Paulo (USP), 05508-270, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: rrguerra@usp.br. *Autor para correspondência.

CARVALHO et al. (2008) indicaram o uso de rins bovinos como modelo para nefrotectomia parcial laparoscópica.

A taxa de mortalidade embrionária e fetal no terço inicial da gestação de bovinos tornou-se uma das maiores causas de perdas econômicas relacionadas à produção animal (REICHENBACH et al., 2003), sendo necessários, desse modo, estudos que contemplem toda a organogênese durante esse período crítico do desenvolvimento. Esses estudos visariam a encontrar a(s) causa(s) para tal mortandade. Diante dos fatos mencionados, o presente estudo teve como objetivo descrever a morfologia e o desenvolvimento ultraestrutural do sistema renal bovino durante o período embrionário compreendido entre o 10^o e o 50^o dia de gestação.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Anatomia e Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo, e a metodologia seguiu os critérios estabelecidos pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo número 1065/2007).

Coleta de material

Os úteros bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) foram coletados em frigoríficos, nas cidades de Poços de Caldas, São Paulo (MG), e São José dos Campos, São Paulo (SP). Foram coletados 50 embriões em diferentes estágios de gestação sendo 46 embriões *Bos indicus* e 4 *Bos taurus*.

Estudos macroscópicos e grupos experimentais

Foram realizadas mensurações da distância occípito-sacral, tomando como referência a crista nugal e a última vértebra sacral, conforme a metodologia Crow-Rump (CR), preconizada por EVANS & SACK (1973) e NODEN & LAHUNTA (1990). Tal procedimento foi realizado com auxílio de um paquímetro digital e de lupa estereoscópica a fim de se estimar o período gestacional dos 50 embriões. Os mesmos foram alocados em oito grupos, segundo a estimativa da idade gestacional. Os embriões foram agrupados nos seguintes grupos: E14-15 (embriões entre o 14^o e o 15^o dia de gestação; CR de 3mm; n=6), E18-19 (CR de 8,3mm; n=6), E20-21 (CR de 9mm; n=7), E23-24 (CR de 9,5mm; n=6), E25-28 (CR de 10mm; n=6), E30-31 (CR de 16mm; n=6), E40-41 (CR de 23mm; n=7) e E45-46 (CR de 27mm; n=6). Os embriões coletados foram fixados em solução de Bouin (para microscopia óptica) ou glutaraldeído 2,5% (para microscopia de transmissão).

Microscopia óptica

A inclusão do embrião (posição de decúbito lateral) foi realizada em paraplast. Foram realizados cortes seriados dos embriões com 5µm de espessura. Coloração com hematoxilina e eosina foi realizada para descrever a localização e as características histológicas durante o desenvolvimento do pronefro, do mesonefro e do metanefro.

Microscopia eletrônica de transmissão

Os embriões foram previamente dissecados em lupa estereoscópica de modo a isolar a região na qual se encontrava o pronefro, o mesonefro e/ou o metanefro. As estruturas transitórias ou definitivas do sistema renal tiveram suas localizações identificadas primeiramente pela microscopia óptica. Após essa etapa, os sistemas renais foram dissecados e fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, lavados 3x em tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,4, durante 10min, e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por uma hora. A desidratação foi realizada em solução de álcool etílico crescente (50, 60, 70, 90, 95, 100%) e em óxido de propileno (100%). Por 12-16h, os fragmentos permaneceram sob rotação em óxido de propileno e resina. A mistura foi substituída por resina durante 4-5h e colocada nos moldes. Os cortes ultrafinos de aproximadamente 60nm de espessura foram colhidos em telas de cobre e contrastados pela solução de acetato de uranila 2% em água destilada por 5min e pela solução de citrato de chumbo 0,5% em água destilada durante 10min. Nas imagens obtidas dos sistemas renais nos diferentes grupos gestacionais, foram analisadas principalmente as características fenotípicas das células dos túbulos contorcidos, assim como suas organelas e suas junções intercelulares.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada a presença de pronefro nos grupos estudados. O rim mesonéfrico cresceu em uma progressão craniocaudal nos embriões bovinos desde o primeiro período estudado, ou seja, entre o 14^o e o 15^o dia do desenvolvimento embrionário (E14-15). O mesmo padrão é encontrado no rim mesonéfrico humano (BROWDER et al., 1991).

Em E14-15 (CR: 3mm), os túbulos do mesonefro ocupavam posição dorsal em relação ao coração e ao fígado (Figura 1A). Esses túbulos eram dotados de um epitélio cúbico simples e apresentavam aspecto retorcido (Figura 1B). Foi observada uma relação entre esses túbulos e os vasos sanguíneos ao seu redor, demonstrando atividade funcional da estrutura (Figura 1B).

Nos embriões entre E18-19 (CR: 8,3mm), foram identificados túbulos mesonéfricos definidos, formados por um epitélio cúbico simples ou colunar baixo. Assim como os achados de DAVIES (1951) para carneiros, observou-se nesse período a presença de um mesênquima frouxo e vascularizado (Figura 1C, D).

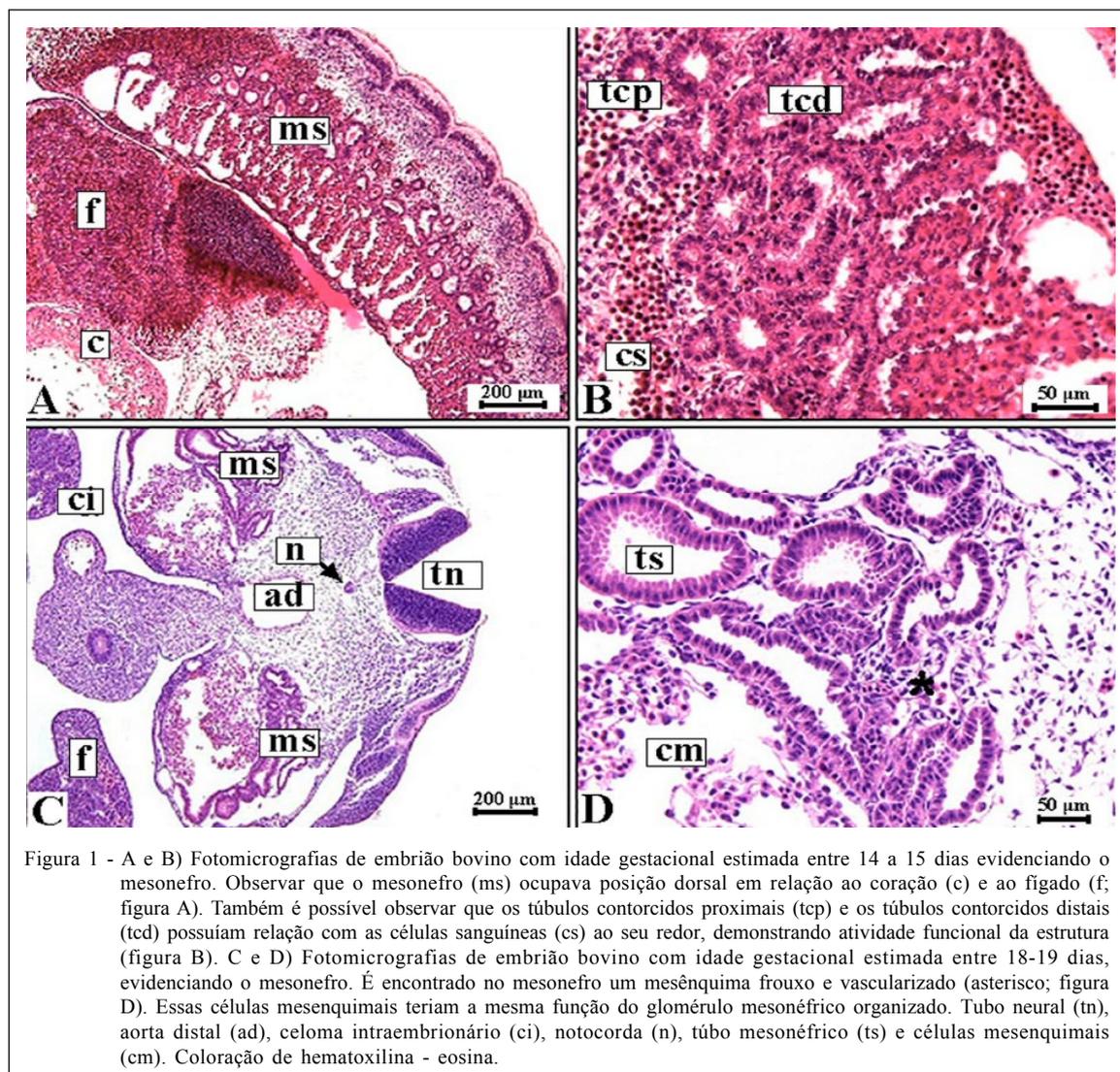


Figura 1 - A e B) Fotomicrografias de embrião bovino com idade gestacional estimada entre 14 a 15 dias evidenciando o mesonefro. Observar que o mesonefro (ms) ocupava posição dorsal em relação ao coração (c) e ao fígado (f; figura A). Também é possível observar que os túbulos contorcidos proximais (tcp) e os túbulos contorcidos distais (tcd) possuíam relação com as células sanguíneas (cs) ao seu redor, demonstrando atividade funcional da estrutura (figura B). C e D) Fotomicrografias de embrião bovino com idade gestacional estimada entre 18-19 dias, evidenciando o mesonefro. É encontrado no mesonefro um mesênquima frouxo e vascularizado (asterisco; figura D). Essas células mesenquimais teriam a mesma função do glomérulo mesonéfrico organizado. Tubo neural (tn), aorta distal (ad), celoma intraembrionário (ci), notocorda (n), túbo mesonéfrico (ts) e células mesenquimais (cm). Coloração de hematoxilina - eosina.

Entre E20-21 (CR: 9mm), o túbulo contorcido distal do mesonefro apresentou inúmeras mitocôndrias dispersas no citoplasma (Figura 2A, B). Na região basal da célula do túbulo mesonéfrico, foram encontradas inúmeras mitocôndrias, envolvidas por interdigitações de membrana e alguns vacúolos citoplasmáticos (Figura 2B).

O início do desenvolvimento do rim metanéfrico foi observado pela primeira vez em E23-24 (CR: 9,5mm). HAMMERMAN et al. (1992) afirmam que, em humanos, a formação do metanefro ocorre na quinta semana de gestação, em E12 em ratos e em E11 em camundongos.

As células dos túbulos mesonéfricos nessa fase já não conservavam sua arquitetura organizada, e um início de degeneração, principalmente em sua porção cranial, foi observado com o aumento da idade embrionária. Essa degeneração craniocaudal também foi descrita por SADLER (2005) em embriões humanos.

Esses resultados coincidem com estudos de SAXEN (1987) em ratos e camundongos, em que a involução dos mesonefros ocorreu simultaneamente à diferenciação metanefrogênica.

Em E25-28 (CR: 10mm), o mesonefro estava localizado ventralmente ao longo de 12 vértebras. A porção cranial do mesonefro estava próxima à borda do fígado, e a porção caudal junto ao metanefro. No mesonefro foi observado um aglomerado de células mesenquimais envolvidas por células sanguíneas e cercadas pelos túbulos mesonéfricos (Figura 3A, B). O metanefro, por sua vez, estava localizado caudal ao rim mesonéfrico. Os túbulos mesonéfricos possuíam lúmen maior e mais irregular do que o observado nos outros estágios. Notou-se um aglomerado de células mesenquimais na porção central do órgão (Figura 3A). Nessa fase, no metanefro, foi iniciada a formação dos túbulos e um arranjo celular formando possivelmente

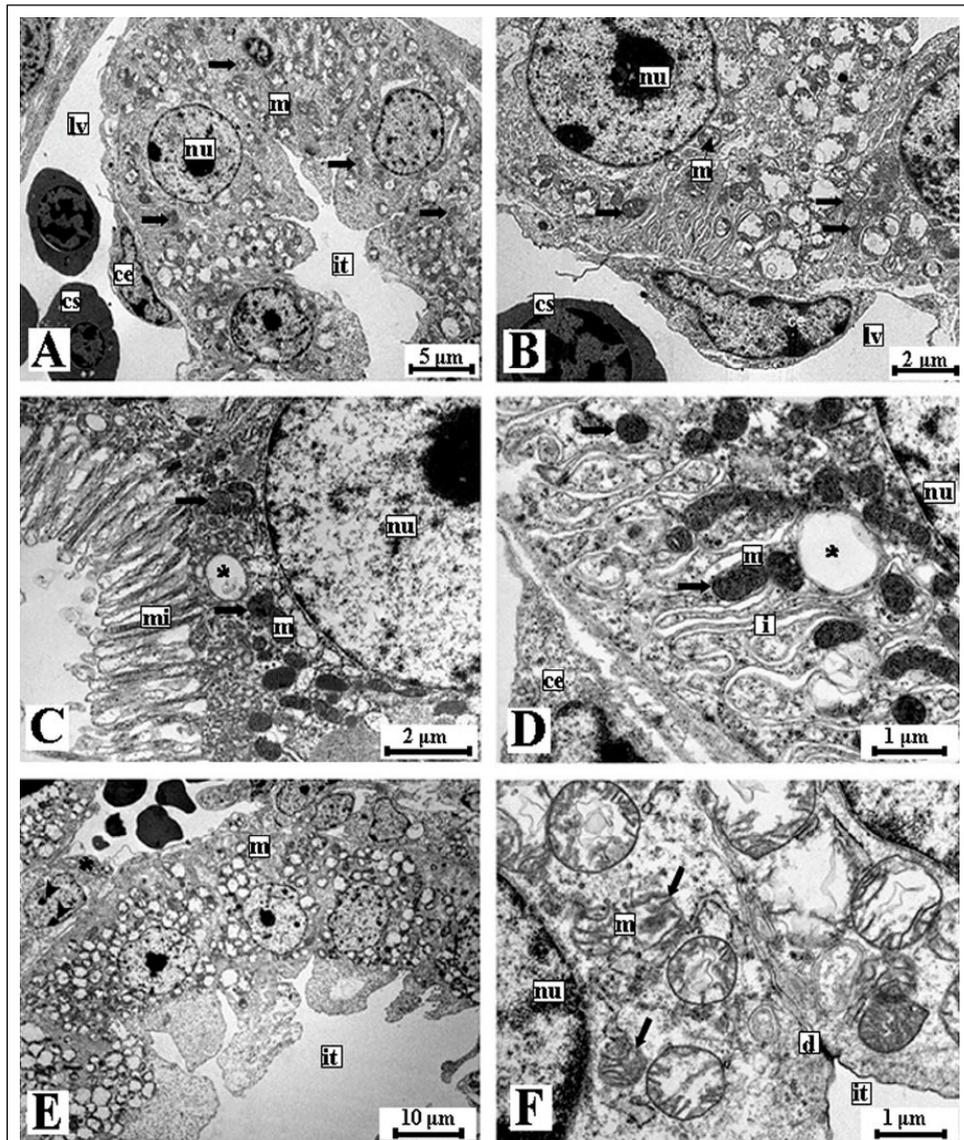


Figura 2 - A e B) Eletromicrografia do túbulo contorcido distal do mesonefro de embrião bovino com idade gestacional estimada entre 20 e 21 dias. As células do túbulo contorcido proximal apresentam inúmeras mitocôndrias dispersas no citoplasma (seta). C e D) Eletromicrografia do túbulo contorcido proximal do rim mesoneférico de embrião bovino com idade gestacional estimada entre 30 e 31 dias. Vacúolos citoplasmáticos (asterisco) e inúmeras mitocôndrias (seta) são encontradas na porção basal do túbulo contorcido proximal e microvilosidades no polo apical. E) Eletromicrografia de túbulo mesoneférico de embrião bovino com idade estimada entre 40 e 41 dias. É possível observar que as células mesenquimais (asterisco) próximas aos túbulos apresentavam núcleo contendo um ou dois nucléolos (ponta de seta) evidentes. F) Eletromicrografia da porção apical do túbulo contorcido distal de embrião bovino com idade gestacional estimada entre 45 e 46 dias. Nota-se a presença de mitocôndrias com a arquitetura desarranjada (seta) próximas ao núcleo na porção apical, assim como junções celulares desmossômicas. Mitocôndria (m), interdigitações (i), desmossomos (d), célula endotelial (ce), célula mesenquimal (cm), núcleo (nu), luz do vaso sanguíneo (lv), luz do túbulo (lt), célula sanguínea (cs), microvilosidades (mi) e vacúolos (v). Técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

os glomérulos foi encontrado. Os túbulos eram formados por células cubóides a colunares na direção da área basal à apical. O epitélio dos túbulos

mesoneféricos perdeu o aspecto uniforme e as células cubóides e colunares passaram a apresentar borda apical irregular (Figura 3C, D).

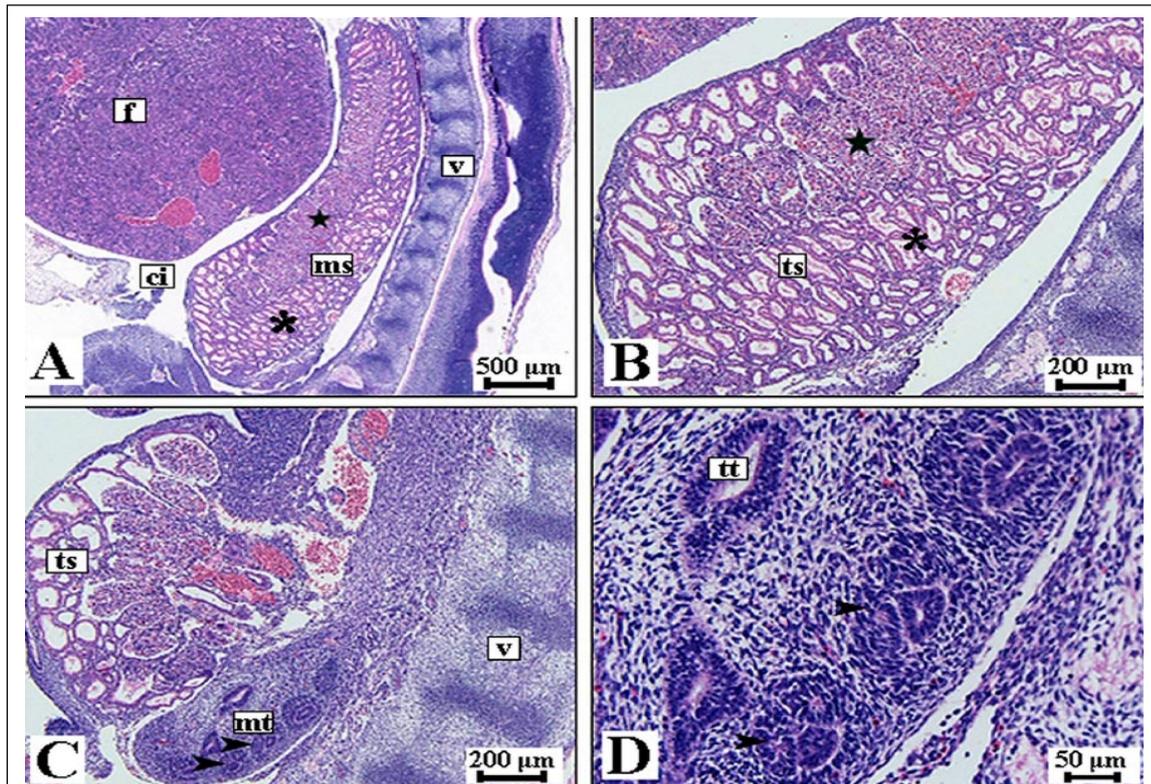


Figura 3 - Fotomicrografias de embrião bovino com idade gestacional estimada entre 25 e 28 dias, evidenciando mesonefro e metanefro. A e B) Observar no mesonefro um aglomerado de células mesenquimais envolvidas por células sanguíneas (estrela) e cercadas pelos túbulos mesonéfricos (asterisco). C e D) Porção caudal do mesonefro (3C, D) e metanefro (3D). No metanefro, foi iniciada a formação dos túbulos, e um arranjo celular formando possivelmente os glomérulos foi encontrado (ponta de seta). Mesonefro (ms), metanefro (mt), fígado (f), vértebra (v), celoma intraembrionário (ci), túbulos mesonéfricos (ts) e túbulos metanéfricos (tt). Coloração de hematoxilina - eosina.

Em E30-31 (CR: 16mm), foi observada uma continuidade no processo de modificação morfológica das células dos túbulos mesonéfricos. O arranjo tubular

foi parcialmente perdido (Figura 4A, B). Foi verificado que o epitélio dos túbulos mesonéfricos nessa fase apresentou microvilosidades (borda em escova) no pólo

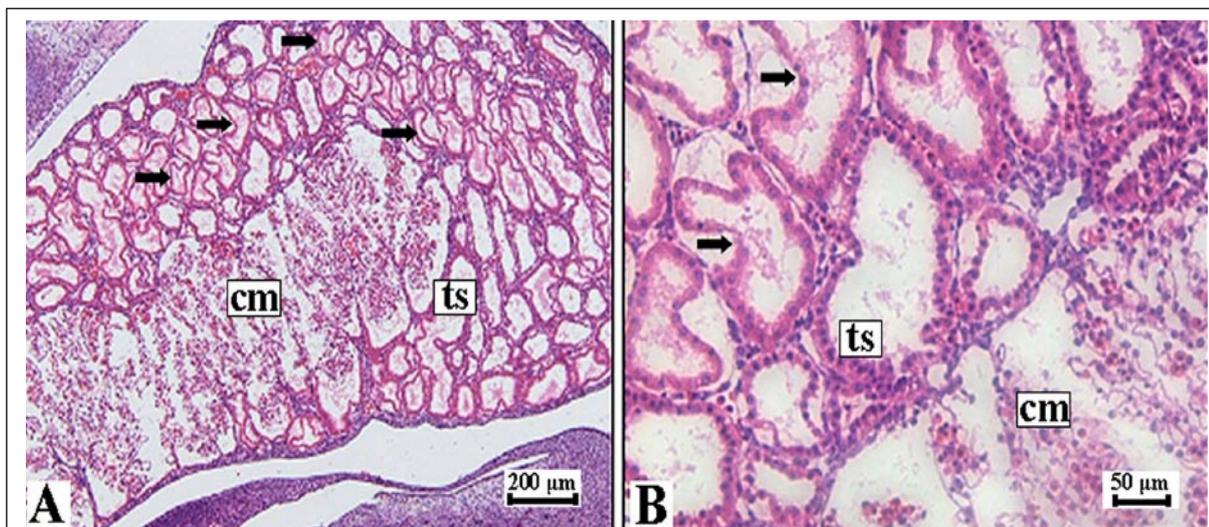


Figura 4 - A e B) Fotomicrografias de embrião bovino com idade gestacional estimada entre 30 e 31 dias, evidenciando o mesonefro cujo arranjo tubular é parcialmente perdido (seta). Túbulos mesonéfricos (ts) e células mesenquimais (cm). Coloração de hematoxilina - eosina.

apical e inúmeras mitocôndrias no pólo basal, indicando intensa atividade de absorção e transporte iônico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; Figura 2C, D). Visto que essas são características primordiais para a reabsorção de sais, pressupõe-se que, nessa fase do desenvolvimento, o rim estava em intensa atividade metabólica, contribuindo com a homeostasia do embrião (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Em suínos, essas características aparecem em E41 (TIEDEMANN, 1985).

Em E40-41 (CR:23mm), observou túbulos mesonéfricos formados por células epiteliais cúbicas contendo núcleo esférico e central, apresentando um nucléolo evidente e a cromatina formando grânulos eletrodensos dispersos no nucleoplasma. A membrana plasmática na porção apical tinha contorno irregular. No citoplasma das células epiteliais, notou-se a presença de inúmeras mitocôndrias. Junto às células

epiteliais, foram observados vasos sanguíneos contendo hemáceas no seu interior. As células mesenquimais próximas aos túbulos apresentavam núcleo contendo um ou dois nucléolos evidentes, e a cromatina estava dispersa e em forma de grânulos (Figura 2E).

Ao analisarem-se as imagens de microscopia eletrônica de transmissão, foi observada a ausência da alça de Henle no rim mesonéfrico, coincidindo com o relato de MARTINO & ZAMBONI (1966). Eles afirmaram que a alça de Henle está ausente nos mesonefros de embriões humanos, e estas dissimilaridades são evoluções claras da diferença de funcionalidade dos mesonefros e metanefros.

Em E45-46 (CR: 27mm), o mesonefro apresentou-se menor em relação às outras fases (Figura 5A, C). O metanefro apresentava um arranjo de túbulos

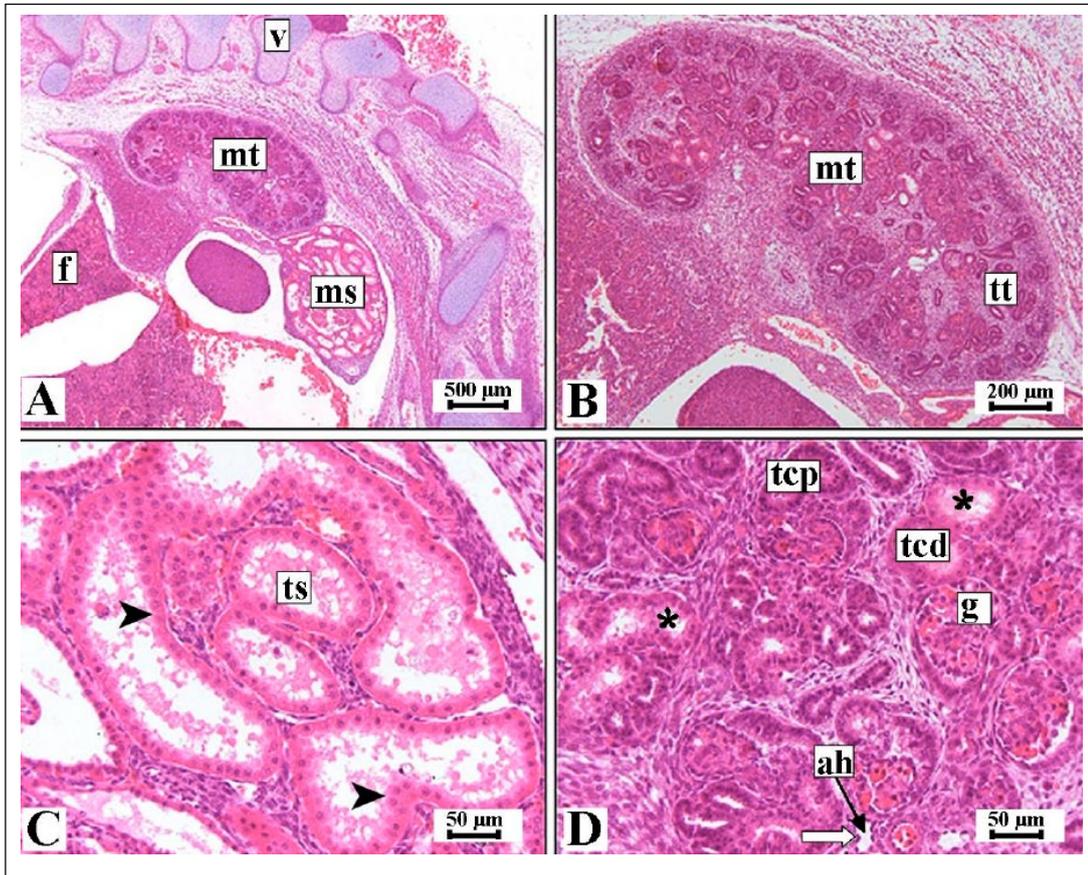


Figura 5 - Fotomicrografias de mesonefro e metanefro de embrião bovino com idade gestacional estimada entre 45 e 46 dias. A e C) A arquitetura celular do sistema tubular mesonéfrico nessa fase não estava mais preservada (ponta de seta). B e D) O metanefro apresentou um arranjo de túbulos bem definidos (asterisco) e sua arquitetura morfológica já estava estabelecida. O metanefro possuía unidades filtradoras (néfrons), com seus respectivos glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais e alça de Henle. O túbulo contorcido distal possuía um lúmen maior (asterisco) do que o túbulo contorcido proximal. A alça de Henle possuía lúmen largo e suas células eram achatadas (seta vazada). Mesonefro (ms), metanefro (mt), fígado (f), vértebra (v), túbulo metanéfrico (tt), túbulo mesonéfrico (ts), glomérulo (g), túbulo contorcido proximal (tcp), túbulo contorcido distal (tcd) e alça de henle (ah). Coloração de hematoxilina – eosina.

bem definidos e sua arquitetura morfológica já estava estabelecida (Figura 5B, D). A arquitetura celular do sistema tubular mesonéfrico nesta fase não estava mais preservada, apresentando células em processo de apoptose. O metanefro possuía unidades filtradoras (néfrons), com seus respectivos glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais e alça de Henle. O túbulo contorcido distal possuía um lúmen maior do que o túbulo contorcido proximal. A alça de Henle possuía lúmen largo e suas células eram achatadas (Figura 5C, D).

Nas células dos túbulos contorcidos distais dos embriões em E45-46 foi observada a presença de mitocôndrias com a arquitetura desarranjada próximas ao núcleo na porção apical, assim como junções celulares desmossômicas (Figura 2F). A presença de desmossomos entre as células epiteliais indica adesão entre as mesmas, e as interdigitações laterais e basais mostram uma relação íntima entre as células tubulares. Essas interdigitações estão presentes em maior número na porção basal de células dos túbulos contorcidos proximais do rim mesonéfrico. A lobação superficial nesta idade fetal ainda não é presente. Provavelmente esse evento ocorre num momento mais tardio da vida intrauterina. Nenhum dos embriões estudados apresentou má-formação ou alteração congênita do sistema renal.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que, em bovinos: 1) O pronefro não está presente em embriões entre E14-15 (CR: 3mm); 2) Em E14-15 (CR: 3mm), há um mesonefro formado e aparentemente funcional; 3) O mesonefro dos embriões não possui uma forma glomerular típica, e sim um aglomerado de células mesenquimais circundadas por vasos sanguíneos até seu desaparecimento; 4) As células dos túbulos mesonéfricos em E20-21 estão em íntimo contato umas com as outras, apresentando desmossomos e inúmeras interdigitações, indicando a existência de locais de comunicação celular; 5) O rim definitivo começa a se desenvolver em E23-24 (CR: 10mm); 6) A involução dos mesonefros ocorre simultaneamente com a diferenciação metanefrogênica em E23-24; 7) Não há formação da alça de Henle no rim mesonéfrico; 8) A lobação externa do rim não é observada até o início da fase fetal em E45-46 (CR: 27mm).

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este Projeto de Pesquisa foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da Prof. Dra. Maria Angelica Miglino.

REFERÊNCIAS

BROWDER, L. W. et al. **Developmental biology**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1991. 602p.

CARVALHO, F.S. et al. The bovine kidney as an experimental model in urology: external gross anatomy. **Cells Tissues Organs**, 2008 (In Press). Disponível em: <<http://content.karger.com/produktedb/produkte.asp?typ=fulltext&file=000159370>>. Acesso em: 14 mai. 2009. doi: 10.1159/000159370.

DAVIES, J. Nephric development in the sheep with reference to the problem of the ruminant pronephros. **Journal of Anatomy**, v.85, n.1, p.6-11, 1951. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/pagerender.fcgi?artid=1273608&pageindex=1>>. Acesso em: 14 mai. 2009.

DYCE, K. M. et al. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2004. 840p.

EVANS, H.E.; SACK, W.O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomy, Histology and Embryology**, v.2, p.11-45, 1973.

HAMMERMAN, M.R. et al. Growth factors and metanephrogenesis. **American Journal of Physiology**, v.262, p.523-532, 1992.

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

MARTINO, C.; ZAMBONI, L. A morphologic study of the mesonephros of the human embryo. **Journal of Ultrastructure Research**, v.16, p.399-427, 1966.

MOINZADEH, A. et al. Potassium-titanyl-phosphate laser laparoscopic partial nephrectomy without hilar clamping in the survival calf model. **Journal of Urology**, v.174, p.1110-1114, 2005a. Disponível em: <[http://www.jurology.com/article/S0022-5347\(01\)68534-3/abstract](http://www.jurology.com/article/S0022-5347(01)68534-3/abstract)>. Acesso em: 14 mai. 2009. doi:10.1097/01.ju.0000168620.36893.6c.

MOINZADEH, A. et al. Water jet assisted laparoscopic partial nephrectomy without hilar clamping in the calf model. **Journal of Urology**, v.174, p.317-321, 2005b.

NODEN, D.M.; DE LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos**. Zaragoza, Espanha: Acribia, 1990. 399p. Disponível em: <[http://www.jurology.com/article/S0022-5347\(05\)60122-X/abstract](http://www.jurology.com/article/S0022-5347(05)60122-X/abstract)>. Acesso em: 14 mai. 2009. doi:10.1097/01.ju.0000161587.95033.c9.

REICHENBACH, H-D. et al. Morte embrionária na TE: redução através da melhor compreensão dos mecanismos da comunicação materno-embrionária? **O embrião**, n.17, p.3-6, 2003.

SADLER, T.W. **Langman embriologia médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 347p.

SAXEN, L. **Organogenesis of the kidney**. Cambridge: Cambridge University, 1987. 256p.

TIEDEMANN, K. The pig mesonephros. III. Distal tubule, collecting tubule, and Wolffian duct: SEM and TEM studies. **Anatomy of Embryology**, v.172, p.123-132, 1985.

SISSON, S. Aparelho urogenital do ruminante. In: GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981. p.879-880.

USHIZAWA, K. et al. cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.77, n.2, p.1-16, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=15560851>>. Acesso em: 14 mai. 2009. doi: 10.1186/1477-7827-2-77.