**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

JOÃO CARLOS MORINI JUNIOR

Desenvolvimento Placentário em Quatis:
evolução filogenética em carnívoros?

**São Paulo
2011**

JOÃO CARLOS MORINI JUNIOR

Desenvolvimento Placentário em Quatis:

evolução filogenética em carnívoros?

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

Co-Orientadora:

Prof^a Dr^a Maria Angélica Miglino

SÃO PAULO

2011

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2514
FMVZ

Morini Junior, João Carlos

Desenvolvimento placentário em Quatis: evolução filogenética em
carnívoros? / João Carlos Morini Junior. -- 2011.
137 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

Co-orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Placenta. 2. *Nasua nasua*. 3. Carnívoros. I. Título.

DOCUMENTOS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento placentário em quatis (*Nasua nasua*, Linneaus, 1758)", utilizando 05 (cinco) quatis, protocolado sob o nº1598/2009, sob a responsabilidade do Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01/07/09.

We certify that the Research "Placental development in coatis (*Nasua nasua*, Linneaus, 1758)", utilizing 05 (five) coatis, protocol number 1598/2009, under the responsibility Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 07/01/09.

São Paulo, 13 de julho de 2009

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21030-1	Data da Emissão: 17/09/2010 14:35
Dados do titular	
Nome: João Carlos Morini Junior	CPF: 214.708.368-23
Título do Projeto: Desenvolvimento Placentário em Quatis: evolução filogenética em carnívoros?	
Nome da Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Primeira aquisição do material	06/2010	10/2010
2	Processamento e análise de dados	11/2010	02/2011
3	Análise dos resultados da primeira coleta	03/2011	05/2011
4	Segunda aquisição do material	06/2011	10/2011
5	Processamento e análise de dados	11/2011	02/2012
6	Análise dos resultados da segunda coleta	03/2012	04/2012
7	Elaboração e submissão de artigo científico para publicação	05/2012	06/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. identidade	Nacionalidade
1	Matheus Levi Tajra Feitosa	Médico veterinário (anestesista)	672.462.063-53	921882980 SSP-MA-MA	Brasileira
2	Dilayla Kelly de Abreu	Médica Veterinária Cirurgiã	225.369.638-29	32.682.977-5 ssp-sp-SP	Brasileira
3	Carlos Eduardo Ambrósio	Orientador responsável pela linha de pesquisa	255.397.158-37	280664242 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BELO HORIZONTE	MG	Parque das Mangabeiras	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
---	-----------	--------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 51425913

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21030-1	Data da Emissão: 17/09/2010 14:35
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: João Carlos Morini Junior	CPF: 214.708.368-23
Título do Projeto: Desenvolvimento Placentário em Quatis: evolução filogenética em carnívoros?	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

1	Captura de animais silvestres in situ	Nasua nasua
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Nasua nasua

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Fragmento de tecido/órgão
---	----------------------------------	---------------------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	Universidade de São Paulo

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 51425913

Página 2/3

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21030-1	Data da Emissão: 17/09/2010 14:35
Dados do titular	
Nome: João Carlos Morini Junior	CPF: 214.708.368-23
Título do Projeto: Desenvolvimento Placentário em Quatis: evolução filogenética em carnívoros?	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 51425913

Página 3/3

Nome: MORINI JUNIOR, João Carlos

Título: **Desenvolvimento Placentário em Quatis:** evolução filogenética em carnívoros?

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição _____

Prof.Dr. _____

Instituição_____

Prof.Dr. _____

Instituição_____

Prof.Dr. _____

Instituição_____

Prof.Dr. _____

Instituição_____

Epígrafe

*“A educação é o passaporte para o futuro, pois
o amanhã pertence a quem se prepara para isso
hoje”*
Malcolm X

Dedicatória

“Ao meu avô Roque Caroprezo in memória (O Homem) sempre brincalhão, pessoa carismática, que a todos que conhecia conquistava, um exemplo de vida a ser seguido e respeitado, seus conselhos e conversas fazem falta, mas sei que cuida de mim e da nossa família até hoje aí do céu SAUDADES ...”

*“...a meu pai João Carlos Morini, a cada dia me
orgulho mais de ter você como exemplo de homem
a seguir”*

*“...a minha mãe Zuleida Caroprezo Morini, o que
dizer de quem a cada dia nos faz sorrir quando
estamos tristes faz nos seu ombro descansar”*

*“... a minha irmã Adriana Caroprezo Morini, meu
avô da guarda sempre pronta a me proteger me
amar e me ensinar”*

*“...a minha avó Cinira Pavão Caroprezo, com todo
o carinho que existe e amor cuidou de mim, e
nunca esperar nada em troca te amo vovó”*

“... a Laura Amadi Morini(in memória), existem muitas formas de ser forte e de amar, aprendi com você e pelas historias de vida e de vivencia que a família passou que nunca devemos abaixar a cabeça e sim erguer e nos orgulharmos do que somos e de onde viemos.”

*“... a Professora Maria Angélica Miglino, não tenho
como agradecer a oportunidade que me deu ao
abrir as portas do departamento e da ciência para
mim.”*

*“... ao meu Orientador Professor Carlos Eduardo
Ambrosio, você sempre cuida dos seus orientados
como uma grande família lhe agradeço pelo apoio,
encorajamento, dedicação e acima de tudo
confiança ao me aceitar como orientado”*

Agradecimentos

A **FAPESP** por dar apoio e financiamento ao projeto de numero 2009/51606-0 assim proporcionado que uma proposta se torne-se realidade e conhecimento

Aos órgãos, FMVZ-USP e FZEA-USP que forneceram parâmetros e fundos para que este trabalho viesse a ser desenvolvido

A UFMG que nos acolheu para toda parte cirúrgica experimental

Ao Parque das Mangabeiras em Minas Gerais Belo Horizonte por permitir que usássemos os animais do local para este trabalho. E toda equipe do Projeto Quatis que nos proporcionou a captura dos animais.

Ao IBAMA e a Pró-carnívoros por autorizar a captura e uso dos Quatis neste trabalho.

Aos professores Carlos Eduardo Ambrósio, Daniele dos Santos Martins, e a nova integrante da família Helena, pelo carinho, pela amizade, incentivo e conhecimento compartilhado durante todas as etapas desta fase da minha vida. Aprendi muito com vocês tanto na parte profissional quanto na partepessoal.

Aos Professores Antônio Chaves de Assis Neto, Flavia Thomaz Verechia, Ana Flavia de Carvalho , Celina Almeida Furlanetto, Mançanares, e Moacir Franco de Oliveira que sempre estiveram ao meu lado durante a caminhada para adquirir o conhecimento sobre placenta.

Ao Professores Francisco Javier H. Blazquez, Dr.Thiago Pinheiro Arrais Aloia e Diogo Nader Palermo por me ensinarem como proceder no processo de imunohistoquímica

Aos Professores Romulo Cerqueira Leite e Valentim Arabicano Gheller que abriram as portas da UFMG e realizaram com toda competência e dedicação os procedimentos cirúrgicos necessários para realização deste trabalho

Aos colaboradores Ronaldo Agostinho, Roseli Eli Azarias, Ednaldo, João Pele, Raimundo e Bernardete, que sempre me ajudaram e me acompanharam durante todo o processo de aprendizado e desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Matheus Tajra Feitosa companheiro de todas as aventuras durante este projeto. Nunca me deixou sem apoio nem companhia, fosse durante as viagens quanto nos momentos de falta de ideias e pane cerebral, amigo e irmão.

Aos amigos André Luís Rezende Francioli, Phelipe Oliveira Favaron, Marina Phandolphi Brolio, Dilayla Kelly de Abreu, Juliana Casals e Thais Borges Lessa, por estarem sempre ao meu lado muitas vezes me socorrendo nos momentos tensão.

Aos amigos Cristiane Valverde Wenceslau, Carlos Alberto Palmeira Sarmiento, Camila Ercoline Luana Stunitz, Sonia Will, Paula Frantine e Fernanda Agreste, amigos que sempre estiveram ao meu lado, me auxiliando no trabalho, me encorajando a sempre crescer, me dando conselhos e me emprestando seus ouvidos. Obrigado por serem pessoas tão leais e companheiras.

A todos os colegas que compartilharam aulas, brincadeiras, minha pequena vida durante estes anos de pós graduação desculpem por não citar nome por nome pois são tantas pessoas que tenho que agradecer pois cada um que me emprestou seus ouvidos e me doou uma palavra de incentivo tenho muito a agradecer a vocês, Obrigado.

Aos colaboradores e funcionários do departamento da FMVZ-USP: Jaqueline, Maicon, Vera, Ana , Fátima, Elza, e Claudinha.

RESUMO

MORINI JUNIOR, J. C. **Desenvolvimento Placentário em Quatis:** evolução filogenética em carnívoros? [Placental development in Quati phylogenetic evolution in carnivores?] 2011. 137f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A importância de preservação de espécies silvestres brasileiras se baseia no conhecimento de sua distribuição, comportamento no ambiente natural e em cativeiro, além da descrição detalhada de sua biologia da reprodução com vistas à perpetuação das espécies. Um dos principais impactos científicos desta proposta é o detalhamento do ambiente uterino versus o processo de placentação e sua demarcada posição filogenética evolutiva nos mamíferos, via estudos placentários, com intuito de descrever a morfologia da placenta, evidenciando a barreira placentária em delimitação da evolução filogenética das características deste órgão, em relação aos carnívoros *Nasua nasua*. Foram utilizadas seis placentas provenientes de criadouros devidamente regularizados pelo IBAMA, vindas do CECRIMPAS/ São João da Boa Vista, SP e animais capturados no Parque das Mangabeiras Belo Horizonte MG, licença SISBIO 21030-1. A técnica de hemiovariossalpingohisterectomia foi utilizada como técnica para aquisição das placentas. Após a fixação de quatro sacos gestacionais em paraformaldeído 4%, ovários e placentas foram seccionados e fixados em glutaraldeído 2,5%. O material foi fotografado para descrição macroscópica. Todo o saco gestacional foi descrito, camada por camada, assim as membranas fetais [âmnio, saco vitelino, alantóide, (cório e órgão hemofago + placenta)]. As técnicas de coloração de PEARLS, Tricrômio de Masson, Ácido Periódico de Shiff (PAS) e Hematoxilina e Eosina (HE) foram utilizadas para descrição microscópica do material. Com auxílio das técnicas de imunohistoquímica de citoqueratina e vimentina evidenciamos estruturas avasculares e trofoblasto. Para maior detalhamento da barreira placentária e membranas utilizamos a microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Ao analisar as placentas foi viável descrever os componentes macro e microscópicos da formação e caracterização placentária nos quatis, a macroscopia nos mostrou que a placenta é formada pelas membranas fetais córion zonário, alantóide, âmnio e saco

vitelino em “T” invertido além de apresentar o órgão hemófago. Com a análise estrutural do material foi possível classificar a placenta dos quatis como Corioalantóide, Zonária, Lamelar e Endoteliocorial. A aquisição do material nos restringiu o número de técnicas que poderiam ser utilizadas para melhor esclarecimento e caracterização da placenta dos Quatis. Contudo, conseguiu-se com sucesso a descrição da placenta destes animais, fornecendo melhores dados sobre os aspectos reprodutivos da espécie para futuras pesquisas e dados comparativos na ordem dos carnívoros.

Palavras-chave: Placenta *Nasua nasua* Carnívoros.

ABSTRACT

MORINI JUNIOR, J. C. **Placental development in Quati phylogenetic evolution in carnivores?** [Desenvolvimento Placentário em Quatis: evolução filogenética em carnívoros?] 2011. 137f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The importance of preservation of Brazilian wild species is based on knowledge of their distribution, behavior in the wild and in captivity, and the detailed description of their reproductive biology in order to perpetuate the species. One of the main impacts of this study is the scientific details of the uterine environment versus the process of placentation and their evolutionary phylogenetic position in mammals. By this propose we described the carnivore *Nasua nasua* (coati) placental morphology, showing the placental barrier that delimits the characteristic phylogenetic evolution of this organ. We used four placentas from pregnant females, captured from Mangabeiras Park, Belo Horizonte, MG, (SISBIO license 21030-1) and CECRIMPAS, São João da Boa Vista, SP, bought appropriately regulated by IBAMA. The technique of hemi-ovario-salpingo-hysterectomy was used to catch the placentas. Four gestational sacs were fixed in 4% paraformaldehyde, uterous and ovaries were sectioned and fixed in 2.5% glutaraldehyde. The material was photographed for macroscopic description. All the gestational sac was described, layer by layer, [the fetal membranes (amnion, yolk sac, allantois) + (chorion and haemophagus organ) + endometrium] = placenta. The stain techniques of PEARLS, Masson's trichrome, periodic acid-Schiff (PAS) and hematoxylin-eosin (HE) were used for microscopic description of the material. Immunohistochemistry with cytokeratin and vimentin evidenced avascular structures and trophoblast. For further details of the placenta and membranes we used the scanning and transmission electron microscopy. By analyzing the placenta was viable to describe the macroscopic and microscopic components of placental formation and characterization in the coati. The macroscopy showed us that the placenta is formed by the fetal membranes zonary chorion, allantois, amnion and yolk sac with inverted "T" shape, in addition to present the

haemophagus organ. With the structural analysis of the material was possible to classify the coatis placenta as as chorioallantoic, zonary, lamellar and endotheliochorial. The acquisition of the material restricted the number of techniques that could be used for a better understanding and characterization of the coati placenta. However, we successfully described the placenta of those animals, providing better data on the reproductive aspects of the species for future comparative of carnivore order researches.

Key words: Placenta *Nasua nasu*, Carnivores.

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 JUSTIFICATIVA	29
4 REVISÃO DE LITERATURA	30
4.1 ASPECTOS REPRODUTIVOS DOS CARNÍVOROS SELVAGENS	30
4.2 MORFOLOGIA DA PLACENTAÇÃO EM CARNÍVOROS	31
5 MATERIAL E MÉTODO	51
5.1 ANIMAIS UTILIZADOS	51
5.2 COLETA DE MATERIAL	52
5.3 Microscopia de Luz	55
5.4 IMUNOHISTOQUÍMICA	56
5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	57
5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	58
6 RESULTADOS	60
6.1 AQUISIÇÃO DE MATERIAL	60
6.1.1 Aquisição do útero prenhe com placenta	69
6.2 RESULTADOS MACROSCÓPICOS	72
6.3 RESULTADOS MICROSCÓPICOS	78
6.3.1 Resultado microscópico: útero com inicio de implantação placentária	78
6.3.2 Microscopia das placentas	83
6.3.3 Zona Alantóide Coriônica	84
6.3.4 Zona Ampla do Labirinto	89
6.3.5 Zona de Junção	93
6.3.6 Saco vitelino	98
6.3.7 Órgão Hemófago	101
6.3.8 Hematoma placentário	105
6.4 Microscopia eletrônica de Transmissão	107
7 DISCUSSÃO	111
8 CONCLUSÕES	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
ANEXOS	124

1 INTRODUÇÃO

Os quatis são animais provenientes do continente americano (ALVES-COSTA e ETEROVICK, 2007), os quais são integrantes do filo *Chordata*, classe *Mammalia*, ordem *Carnívora* e família *Procyonidae* (ZELLER, 1999). São animais sociais que vivem em grupos com organização, e a hierarquia nas sociedades dos Procionídeos é de acordo com o sexo onde a fêmea é a dominante.

São conhecidas três espécies de Quatis, sendo elas, a *Nasua narica*, também conhecido como quati de nariz branco, encontrada ao sul do Arizona e sudoeste do novo México, uma segunda espécie conhecida como quati anão é o *Nasua nelsoni*, esta espécie é mais encontrada na ilha de Cozumel no México, e a terceira espécie de Quati é a *Nasua nasua*, encontrada no Brasil em abundância principalmente na região Sul, Sudeste e em alguns estados do Centro-Oeste brasileiro (ALVES-COSTA e ETEROVICK, 2007).

Os quatis são animais que vivem em bandos que podem ser formados por 5 a 70 indivíduos. Esta grande variável ocorre devida à sazonalidade e as barreiras ecológicas encontradas em cada ambiente. Seus bandos se dividem em dois diferentes grupos até a época reprodutiva, sendo um grupo formado exclusivamente de machos adultos, e um segundo grupo é formado pelas fêmeas adultas juntamente com os machos jovens, fêmeas jovens e filhotes (ALVES-COSTA e ETEROVICK, 2007).

O *Nasua nasua* é um animal nativo da América do sul, sendo observado principalmente nos países como Colômbia, Venezuela, Guianas, Suriname, Peru, Bolívia, Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil. Estes animais vivem principalmente nos biomas da Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pantanal e Mata Atlântica (EMMONS E FEER, 1997; CÂMARA E MURTA, 2003; SILVA ET AL. 2004; LIM, 2006).

Por se tratarem de animais que essencialmente ocupam florestas como habitat, vários fatores de sua perpetuação e distribuição estão diretamente relacionados às épocas de produção de frutos das árvores. Esta sazonalidade está diretamente relacionada à sua estrutura populacional e a reprodução destes animais (ALVES-COSTA, 2007).

Beisiegel (2001) retrata que os quatis podem atingir até 30,5cm de altura; seu comprimento pode variar entre 43 - 66 cm; e sua cauda pode atingir 22 - 69 cm.

O autor ainda demonstra que esses animais podem chegar até 11 kg de peso, além de sua reprodução gerar múltiplos filhotes e de seus hábitos serem diurnos.

Beisiegel (2001) cita que as fêmeas atingem a maturidade sexual aos dois anos e os machos por volta dos três anos de idade, e estes vivem cerca de 12 anos. A época de acasalamento, ocorre habitualmente no final da primavera. Esta é a única época em que o macho adulto reprodutor se reúne ao grupo dos demais quatis. A sociedade dos quatis é dividida em dois grupos, um de machos que ficam afastados dos demais indivíduos da espécie até a época de reprodução, e outro grupo formado pela fêmea alfa, animal dominante do grupo, jovens machos que não disputam a liderança do grupo e as demais fêmeas com seus jovens filhotes. No período fértil das fêmeas ocorre o acasalamento, ato realizado no topo das árvores onde as fêmeas já construíram seus ninhos. Logo após o coito os machos são expulsos e voltam a viver sozinhos. O período de prenhes compreende de dez a onze semanas, e uma fêmea gera de dois a seis filhotes. Por volta de seis semanas de idade, a mãe carrega os seus filhotes para o solo, os quais se juntam ao grupo.

Russel (1996) ressalta que os traços físicos característicos dos quatis são o focinho em forma de trombeta, que o ajuda a escavar por toda parte, em busca de alimentos, e a longa cauda anelada, intercalada de cores escuras e claras, usada para manter o equilíbrio.

Orr (1986) destaca outros aspectos sobre sua biologia, o autor afirma que estes animais possuem membros torácicos poderosos, longas garras e articulações dos tornozelos flexíveis, de forma a descer as árvores de cabeça para baixo. Outra característica marcante da família Procyonidae é a presença de cinco dígitos, também são denominados plantígrados, podendo realizar movimentos em diferentes direções.

Estudos comportamentais realizados por Gompper et al. (1998) sobre esta espécie, descrevem os quatis como um complexo sistema social. Ainda sobre seus estudos comportamentais, Russel (1996) e Gompper (2004) citam que as fêmeas são matriarcas e vivem com seus filhotes em grupos de até 30 indivíduos e os machos, quando se tornam adultos, vivem isolados e só se aproximam do grupo na época de acasalamento.

Estudos da análise do DNA por “finger print” demonstrou que as fêmeas tendem a se afastar e formar outros grupos, reduzindo assim, a possibilidade de consanguinidade entre pais e filhos (GOMPPER, 1996; GOMPPER ET AL, 1997).

Poucos são os relatos de literatura sobre a família Procyonidae, principalmente relacionado aos aspectos de placentação, Creed (1964) descreve a morfologia das membranas fetais do racoon o qual esta correlato ao grupo dos procionídeos, Benirschke (2004) estudou o *Nasua rufa*, porém nada foi encontrado sobre a espécie *Nasua nasua* especificamente.

2 OBJETIVOS

Diante da escassez literária supracitada sobre a biologia da espécie e principalmente relacionada à reprodução, objetivamos descrever a organização das membranas fetais e seu comportamento evolutivo perante a análise filogenética dos anexos placentários dessa espécie comparada a dos carnívoros domésticos já descritos na literatura.

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar macro e microscopicamente a barreira placentária, fluxo placentário e comportamento trofoblástico da placenta de quatis (*Nasua nasua*), como base importante para a compreensão do desenvolvimento embrionário/fetal destes animais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Descrever o tipo de barreira placentária através de microscopia eletrônica de transmissão;
- 2- Caracterizar macro e microscopicamente as estruturas da placenta e anexos fetais;
- 3- Analisar a placenta através de ensaios de imunohistoquímica.

3 JUSTIFICATIVA

A placenta é o órgão primordial do desenvolvimento embrionário/fetal, a qual realiza todas as funções orgânicas, endócrinas e nutricionais dos sistemas e aparelhos durante o desenvolvimento do concepto.

Buscando um melhor entendimento referente ao desenvolvimento placentário dos carnívoros, em especial da família Procyonidae, esta pesquisa busca caracterizar a placenta dos quatis assim como a barreira placentária, membranas fetais e classificação deste órgão, dentre as preconizadas por Leiser e Kaufmann (1994) em relação os animais domésticos e silvestre.

Devido à escassez sobre os aspectos da morfofisiologia placentária de carnívoros, os resultados obtidos nesta pesquisa poderão construir os alicerces necessários ao desenvolvimento da biotecnologia aplicada à reprodução visando a reprodução dos quatis em cativeiro e também no meio ambiente.

4 REVISÃO DE LITERATURA

Para um maior embasamento sobre a placenta dos Quatis foi realizado um levantamento de dados sobre os estudos anteriormente feitos sobre a filogenia e placentas de animais da ordem dos Carnívoros.

4.1 ASPECTOS REPRODUTIVOS DOS CARNÍVOROS SELVAGENS

Takuya et al (2009) ao estudar cerca de 335 racoos (*Procyon lotor*) em Kamakura, Japão avaliou o numero de gestações de acordo com a idade das fêmeas e descreveu que fêmeas de 18 a 23 meses de idade possuem maior capacidade de fecundação e gestação.

Hodje et al (2008) estudou o comportamento dos suricatos e descreveu que os mesmos vivem dentro de uma sociedade cooperativa com grande percentual reprodutivo, dentro desta sociedade ocorre à seleção das fêmeas que é de suma importância para o grupo, por ser os individuos dominantes dentre a maioria dos grupos da família Herpestidae, são animais altamente competitivos quanto aos cargos dentro desta sociedade, os quais são definidos de acordo com cronologia e peso das fêmeas, se ocorrer um pequeno numero de fêmeas no grupo, a que possui maior peso é dominante durante o mandato donatário.

4.2 MORFOLOGIA DA PLACENTAÇÃO EM CARNÍVOROS

As membranas extraembrionárias são o elo de comunicação entre o feto e a mãe, e posteriormente irão formar a placenta. Existem quatro tipos de membranas fetais, o saco coriônico, o alantóide, o âmnio e o saco vitelino (WOLF ET AL., 2003).

De acordo com Oliveira, et al (2006) o sucesso do processo de implantação do blastocisto na parede do útero dá origem ao órgão funcional da unidade biológica materno-fetal extremamente complexo que sofre modificações em termos de quantidade e qualidade macroscópica e microscópica, esse órgão é denominado placenta.

A placenta é um órgão presente na maior parte dos mamíferos do sexo feminino, através do qual ocorrem as trocas entre a mãe e o filho. Através da placenta o conceito "respira" (ocorrem às trocas de oxigênio e gás carbônico), se "alimenta" (recebendo diretamente os nutrientes por difusão do sangue materno) e excreta produtos de seu metabolismo (excretas nitrogenadas). A placenta é também um importante órgão endócrino durante a gestação, estando envolvida na produção de diversos hormônios tais como progesterona, gonadotrofina coriônica (hCG), hormônio lactogênio placentário, estrogênio (principalmente o estradiol), entre outros. (PRYSTOWSKY , 1961)

Classificada como órgão transitório, encontrada apenas em mamíferos, e responsável pelas trocas fisiológicas entre mãe e feto, a placenta pode receber a denominação de único órgão formado por células de dois indivíduos diferentes. A mesma é constituída por porções materna e fetal, cada porção possui células genética e imunologicamente diferentes. A porção fetal é representada pelo cório, esse possui uma placa corial de onde partem vilos coriônicos provenientes de uma parte central conjuntiva que por sua vez é derivada do mesênquima extraembrionário, possui também as camadas de citotrofoblasto e sinciotrofoblasto; a porção materna, chamada de decídua basal, fornece sangue arterial para as lacunas entre os vilos secundários e recebe sangue pobre em oxigênio proveniente do mesmo local (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Dyce, et al (1997) definem o órgão como o único que por meio de aposição, ou fusão de tecido materno e fetal é capaz de produzir hormônios e promover

mudanças fisiológicas, e afirma que, apesar de haver no início da gestação um órgão transitório estabelecido pelo saco vitelínico, a placenta é a estrutura definitiva em todos os mamíferos eutérios. De acordo com Hidebrand (1995) a principal contribuição da porção fetal à placenta em marsupiais e roedores é o saco vitelínico.

A chamada placenta definitiva dos mamíferos eutérios é constituída por cório e alantóide que é vascularizada pelos vasos sanguíneos umbilicais, sendo denominada de corioalantóidea; no entanto, no início do desenvolvimento muitos mamíferos apresentam uma placenta córiovitelínica, onde cório e saco vitelínico são seus formadores, alguns ainda mantêm esse último até o fim da gestação com parcial ou completa inversão das camadas germinativas, é o caso dos roedores (CARTER, et al, 2004)

Em seus estudos, Carter, et al (2004) afirmam que o trofoblasto invade a parede do útero em algumas espécies sendo essa invasão maior ou menor substituindo uma ou mais camadas de tecido materno, daí a classificação placentária em epiteliocorial, endoteliocorial, ou hemocorial de acordo com a forma de sobreposição e relacionamento do trofoblasto no epitélio uterino, no endotélio dos vasos maternos, ou diretamente com o sangue materno respectivamente, anteriormente estudado por Grosser (1909).

Segundo Ainudeen e Hafez (1995) o cordão origina-se dos envoltórios amnióticos ao redor do saco vitelínico e envolve os vasos alantóides.

Barone (1976) descreveu a placenta dos carnívoros como zonária, endoteliocorial e labiríntica. Na zona anular assenta-se o folheto externo do alantóide que se une ao cório no 18º dia de gestação em gatos e no 20º em cães. Neste momento os vilos trofoblasticos iniciam seu desenvolvimento ate formarem lamelas que se aprofundam no endométrio.

Uma das principais características da placenta dos carnívoros é a presença de hematomas na borda e na parte central da placenta. Em todos os membros desta Ordem, grandes ou pequenas hemorragias ocorrem desde o primeiro período de ligação das vesículas blastodérmicas, essas efusões variam de tamanho e posição. Quando estes hematomas ocorrem, a membrana corioalantóide desenvolve vilos, os quais, encontra-se diretamente em contato com os vasos maternos. (AMOROSO ,1952)

Na placenta de carnívoros, ocorre extravasamento de sangue através dos capilares endometriais, embora estudos feitos por Sinha e Mossman (1966) não demonstrar nenhum capilar aberto.

Mossman (1987) ao descrever a ordem dos carnívoros confirma que há um grande número de famílias e uma grande diversidade anatômica dentre elas. Morfogenicamente e anatomicamente as membranas fetais são sempre uniformes, somente as membranas fetais do cão e da foca são distintas em relação à localização do hematoma placentário. Uma característica peculiar aos carnívoros é o saco vitelino que possui formato de “T”, nas suas membranas definitivas.

A placenta dos carnívoros possui outras peculiaridades, sua membrana intersticial sobre a qual o endotélio materno da zona íntima descansa, é muito mais espesso e proeminente que a membrana endotelial basal, onde um grande saco alantóide quase que completamente funde-se ao âmnio. Outra peculiaridade é a presença das células gigantes também chamadas de decíduas. Estas são moderadamente grandes e encontradas entre o endotélio materno e o sinciciotrofoblasto na zona íntima. A posição do estroma na placenta de carnívoros é ocupada pela persistência e hipertrofia do endométrio glandular na base da placenta.

Na placenta endotelial o endométrio é invadido pelo trofoblasto fetal, destruindo o epitélio e o estroma. Desta maneira, a placenta dos grandes carnívoros, possui uma pequena espessura.

Hematomas placentários dos carnívoros também representados em algumas espécies como “Órgãos hematófagos” são áreas em que ocorre a fagocitose fetal a partir do sangue materno. Este fenômeno ocorre da justaposição do endométrio glandular com a face corioalantóica placentária tornando o citotrofoblasto de absorção, é a fagocitose colunar.

Os carnívoros possuem outras áreas de absorção, as aréolas, localizadas no corioalantóide liso dos cães (AMOROSO, 1952) e furões (GULAMHUSEIN; BECK, 1975) mas nunca foi identificada como sendo presente em gatos (LEISER; ENDERS, 1980).

Creed e Biggers (1962), observaram ao estudar as estruturas reprodutivas dos guaxinins (*Procyon lotor*) que a placenta destes animais é classificada como zonária incompleta, histologicamente apresenta formas de placenta labiríntica sendo endoteliocorial, com uma área lamelar labiríntica ramificada que consiste nas células

trofoblásticas fetais que circundavam os capilares maternos, estes são capilares sinusoidais em processo de desenvolvimento.

Creed e Biggers (1963) ao estudarem os aspectos da estrutura placentária dos guaxinins (*Procyon lotor*), mostraram que, como em muitas placentas de outros carnívoros, esta é classificada como do tipo zonária e forma um anel completo. Em especial, uma característica não usual é, entretanto, a presença de uma grande estrutura vascular de dimensões macroscópicas, as quais emergem do centro placentário e anti mesometrial. Essa estrutura tem sido chamada de órgão hemófago.

Este órgão aumenta de tamanho e complexidade até cerca de dois terços a três quartos do período da gestacional, após este período o mesmo regride. Morfologicamente, é bastante distinta do restante das placentas labirínticas, e histologicamente exibe uma série de ramificações e anastomoses nas lamelas que consistem o mesênquima fino do núcleo na parte fetal, contendo capilares fetais, revestidas em ambos os lados por células epiteliais colunares altas fetais.

Espaços interlamelares são preenchidos com sangue materno, que ganha acesso a partir do lado materno na base do órgão hemofágico e banha o epitélio colunar fetal. As células do epitélio parecem estar preocupadas essencialmente com a ingestão materna de glóbulos (BIGGERS e CREED, 1962; CREED e BIGGERS, 1963).

Creed e Biggers (1964) comparou a placenta e órgãos hemofágicos de procionídeos e mustelídeos nas quais foram observadas secções seriadas de um precoce alargamento do útero. Apesar de um número pequeno de amostras, a placenta do *Olingo* na fase inicial não possui um órgão hemofágico com células Hemófagocíticas dispostas no epitélio. Na ausência de observações sobre a anatomia macro do útero prenhe, as secções disponíveis não sequenciais, dificultando fazer informações positivas sobre este órgão hemofágico nesta espécie.

O órgão hemófago pode desempenhar um papel especial nas trocas materno-fetais apresentando um conceito de ser órgão que tem função extra fetal digestiva com um complexo mecanismo de substâncias avançadas (CREED e BIGGERS, 1963). É provável que o órgão hemófago seja equivalente ao chamado "hematoma" das placentas de outros carnívoros. Foi feita portanto a sugestão de que o termo "hematoma", devido a suas implicações patológicas seja substituído

pelo termo descritivo "hemofagus" aplicado para as regiões Hemófagocíticas da placenta (CREED e BIGGERS, 1963).

Histologicamente, o anel placentário dos guaxinins mostrou-se labiríntico e a relação materno fetal é de acordo com a classificação do tipo endoteliocorial. Contudo, do começo ao fim da gestação ocorre uma infiltração progressiva de capilares fetais e também, as paredes dos capilares maternos são evidentes. O órgão hemófago pode ser descrito como hemocorial, o qual consiste essencialmente de uma grande área de epitélio fetal fagocitário e as células, das quais aparecem principalmente, como responsáveis pela ingestão de corpúsculos de sangue materno, no qual está imerso (GROSSER, 1909).

Carter et al (2007) em estudo, demonstraram que a hiena é o único carnívoro que possui placenta do tipo hemomonocorial. Enders et al. (2006) relataram que em médio prazo a placenta da hiena, pode ter origem como endoteliocorial, por exibir entre 60 e 65 dias, um elaborado sistema de anastomose de vasos, do qual os processos estendem-se ao longo de espaços sanguíneos no labirinto materno. A disposição dentro do labirinto indica um fluxo sanguíneo de corrente cruzada e não contracorrente como sugerido em estudos realizados na espécie anteriormente. A lâmina alantocoriônica se estende dos vilos primários fetais até a zona juncional basal. Os processos das vilosidades primárias se estendem lateralmente em todos os níveis, mas na zona juncional as vilosidades primárias se modificam em estruturas diferentes. Apesar de o labirinto ter um sincício trofoblasto intersticial com lacunas de espaço de sangue materno, as regiões de trofoblasto colunar simples são constantemente encontradas na ponta dos vilos primários e na paraplacenta adjacente a placenta zonaria. Além disso, regiões com trofoblasto colunar são ocasionalmente encontradas na lamina alantocorionica ou dentro do labirinto. A região de paraplacenta em particular, mostra extensa atividade hemofaga, muitas vezes com maior atividade nas pontas das vilosidades. A abundância de atividade hemofaga sugere uma função nutritiva, bem como uma função de transferência de ferro para o feto.

Ao pesquisar a placenta de cinco hienas malhadas, Wynn e Amoroso (1964) averiguaram que no início do terço final da gestação, a placenta desta espécie é parecida com a da cadela e da gata em tamanho e limites, destacando um amplo alantóide e um saco vitelino médio. As hienas possuem uma particularidade, elas são a única espécie de carnívoros que possui placenta vilosa hemocorial.

Uma placenta a termo foi descrita por Morton (1957) em um útero multiprenhe de uma Hyena fêmea. O feto media cerca de 27 cm de comprimento e a placenta tinha 40 cm de circunferência variando em largura de 8,5 a 11 cm e obtendo de 1,4 cm de espessura. Ela possuía tonalidade azul e não possuía qualquer mudança de coloração em suas margens. Várias fases do desenvolvimento foram averiguadas por Wynn e Amoroso (1964). Entre os carnívoros, esta placenta é única, não sendo endoteliocorial, mas sim hemocorial (ENDERS ET AL., 2006). A placenta hemocorial possui vilosidades anulares com ocasionais interrupções da forma circular (Wynn e Amoroso, 1964).

Recentemente, dois lobos da placenta zonária foram observados em uma placenta de hiena descritas por Wynn e Amoroso (1964), estes lobos mediam 8,5 x 5,3 x 1,6 centímetros cada (comprimento, altura e espessura respectivamente). O peso placentário não foi aferido em nenhuma das referências encontradas. A anastomose dos vilos forma uma estrutura labiríntica, especialmente na porção medial da placenta.

Numerosos estudos têm sido feitos com placentação em gato, mas a placenta de grandes mamíferos carnívoros como a dos leões aparece raramente descrita. Existem muitas características da placenta dos leões que também são observados na placenta do tigre. Além disso, as características da placentação em gatos domésticos têm muitas semelhanças com a do leão. (KURT BENIRSCHKE 2008)

A lobulação placentária dos leões é muito distinta. Em um parto de gêmeos, a placenta zonária do primeiro conceito, incluindo as membranas dos animais gêmeos pesava 575 gramas e media 42 cm de circunferência de 11 cm de largura e 0,8 cm de espessura maior. Este é uma típica placenta zonária (com características de anel ou cinta) praticamente sem material da paraplacenta. A placenta do segundo gêmeo, que sobreviveu, pesava 425 gramas e media 34 x 11 cm. A segunda placenta pesava 267,5 gr (10x36x0.3 cm). Ela possuía basicamente a mesma aparência macro e microscópica da primeira.

A barreira materno-fetal da placenta em gatos é endoteliocorial e é apenas superficialmente invasiva para o endométrio, mas não se estendem para a região do miométrio. Uma importante descrição sobre a placentação endoteliocorial foi realizada por Dantzer (1999) e Enders et al. (1998) onde os mesmos definiram as novas distância interhemais em uma variedade de placentas. Para a subfamília

Felidae são atribuídas as seguintes características: “sinciciotrofoblasto é adjacente ao endotélio materno”. Mossman (1987) também descreveu a placenta dos felinos como sendo endoteliocorial, mas Zhemkova (1962) teve problemas em sua definição, como o descrito no caso dos leões, e declarou que o gato possui placenta hemocorial.

Em comparação com o gato doméstico, as placentas de tigre e o leão são muito mais densas e mais complexas em sua estrutura lamelar, além disto a estrutura labiríntica das placentas nos leões são incomumente retas (MOSSMAN, 1987).

Anderson (1969) descreveu a ultraestrutura do labirinto da placenta canina através de microscopia eletrônica de transmissão durante o quadragésimo e sexagésimo dia de gestação. O autor relata que o citotrofoblasto persiste em estado indiferenciado durante a gestação com numerosos poliribossomos e pequenos retículos endoplasmáticos rugosos. O sinciciotrofoblasto possui extensivo retículo endoplasmático rugoso com cisternas expandidas contendo precipitados. Os capilares fetais, progressivamente invadem o sincício sem entretanto penetrar a lâmina basal. O endotélio materno é consideravelmente hipertrófico com muitas organelas membranosas, mas existe um considerável estreitamento deste entre 50 e 60 dias de gestação. A membrana intersticial está entre o trofoblasto e o endotélio materno, participando em parte, na formação da fina barreira placentária com 60 dias. A condição definitiva de endoteliocorial é confirmada e a espessura da barreira placentária é aproximadamente de 1µm.

Barrau et al. (1975) descreveram o desenvolvimento da implantação da placenta em 25 fêmeas prenhes da raça Beagle durante 10, 12, 13, 14, 16, 18, 26 e 35 dias de gestação através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Após o décimo dia do fim do estro, sítios de implantação foram diferenciados macroscopicamente através de alterações por toda extensão dos cornos uterinos. Essas alterações são os resultados do edema das glândulas das zonas basais e intermediárias do endométrio. A largura das pequenas glândulas ou criptas endometriais nos sítios de implantação e inter-implantação são similares.

No 12º dia, a implantação é grande e dois importantes fatos relativos ao desenvolvimento foram notados: o crescimento das criptas e formação de lacunas. Figuras mitóticas eram abundantes no epitélio que delimita as criptas. A invasão surgiu por volta do 13º dia de gestação. Massas de sinciciotrofoblasto na superfície

do citotrofoblasto apareceram sobre o útero e gradualmente cresceram em direção ao perimétrio, penetrando entre as células epiteliais maternas, eventualmente ao redor da membrana basal. Gotas lipídicas abundantes, corpos densos e heterofagossomos com sinciotrofoblasto indicavam uma provável escala de fagocitose e digestão de tecido materno. O trofoblasto que cresceu ao redor da camada de capilares, estabeleceu estreita relação com os vasos maternos. Como o trofoblasto continuou a espalhar-se e o sincício permanecia mergulhado dentro das glândulas, penetrando nos espaços situados entre as glândulas, não havia indicação de formação sincicial em tecido epitelial materno.

Neste mesmo tempo, o vilo trofoblástico penetrava profundamente nas glândulas endometriais e figuras mitóticas tornavam-se abundantes no trofoblasto celular.

No 16º dia, sítios de implantação tinham se expandido consideravelmente, e a invasão primária estendia-se completamente por todo útero, menos ventralmente ao embrião. Numerosas características foram observadas nas regiões das criptas: (1) áreas focais de necrose tinham sido formadas apenas na frente do trofoblasto invasor; (2) as criptas dos sítios de implantação tinham tornado-se longas, tortuosas e fechadas; (3) figuras mitóticas eram abundantes no epitélio glandular; (4) a lacuna na base das criptas tinha tornado-se grande e apresentava apenas uma fina bainha de tecido conjuntivo que as separava dos epitélios das lacunas adjacentes. De outra parte, as glândulas basais tinham submetido-se a um pequeno crescimento em altura, entretanto elas estavam distendidas e inchadas, e o sítios inter-implantação não tinham se alterado.

No 18º dia, o trofoblasto era profundo dentro do endométrio e a zona de material necrótico tinha aumentado extremamente em tamanho. Discos grandes e planos de trofoblasto celular agora estavam delineados pela zona necrótica. O fato do sinciotrofoblasto não estar claro, mas aparecendo quebrado, contribuía com a deposição de debris celulares. No disco, dois tipos celulares trofoblásticos estavam morfológicamente distintos. As células predominantes contendo corpos densos e numerosas mitocôndrias apicais apresentavam a borda do lúmen com superfície irregular. As outras células possuíam vacúolos citoplasmáticos abundantes, microvilos densamente longos e empacotados nas suas superfícies apicais e citoplasma eletropaco, mas somente com poucos corpos densos com núcleos multimórficos.

No 26º dia, o trofoblasto alcançou a profundidade máxima de penetração tendo afastado ou corroído as criptas até as aberturas das lacunas. O sinciciotrofoblasto tinha expandido e cercado completamente os vasos maternos da zona placentária. No 35º dia, o sinciciotrofoblasto tinha diminuído e poucas células de citotrofoblastos eram remanescentes. Células decíduais estavam presentes junto aos vasos maternos, cercados por projeções de sinciciotrofoblasto. Dentro dos corpos multivesiculares sinciciais havia remendos de retículo endoplasmático rugoso, e numerosas mitocôndrias localizadas próximas aos vasos sanguíneos maternos. Os capilares fetais se estendiam dentro do sincício, a barreira entre a circulação materna e fetal era fina, mas havia uma densa lâmina basal. Ocasionalmente o trofoblasto invadia as grandes lacunas. Células de epitélio materno delinearam as lacunas possuindo numerosas e grandes gotas lipídicas apicalmente concentradas com mitocôndrias, esparsos retículos endoplasmáticos rugosos e microvilos abundantes e bem desenvolvidos em seu corpo luminal, podendo então ter caráter absortivo como função. Em contraste, células epiteliais das glândulas basais continham moderadamente grande amontoados de retículo endoplasmático rugoso, complexos de Golgi com corpos densos e bem desenvolvidos, mas com poucas gotas lipídicas e microvilos. Essas características indicavam que as glândulas basais provavelmente mantinham alguma função secretora. Hematomas formavam-se em ambas as bordas da placenta canina. A invasão do trofoblasto nas extremidades polares dos locais de implantação começou apenas do mesmo modo que em outra parte da placenta. Entretanto no 16º dia havia uma erosão extensiva do tecido materno incluindo o endotélio dos vasos sanguíneos. Longas necroses e hemorragias resultaram em lagos de sangue materno extravasado delineado por células de trofoblasto cobertas por citotrofoblasto em necrose. O citotrofoblasto possuía células sanguíneas vermelhas abundantes, pequenos corpos densos, microvilos irregulares e moderados amontoados de retículo endoplasmático rugoso.

Em suma, os sítios de implantação tornaram-se visíveis dez dias após o final do estro. As criptas cresceram rapidamente e continuaram após a invasão ter-se iniciado. A invasão começava por volta do 13º dia quando massas de sinciciotrofoblasto penetravam entre as células epiteliais maternas e espalharam-se rapidamente ao longo do lúmen e dentro das glândulas endometriais. O trofoblasto penetrou as criptas até o nível das grandes lacunas as quais tinham sido formadas

devido ao achatamento de algumas das glândulas na região basal das zonas das criptas. Neste estágio grande quantidade de tecido necrótico era evidente e o citotrofoblasto desenvolvia característica de células absorptivas. Após ocorrida a maturação do sincício fetal, por volta do vigésimo sexto dia gestação, a placenta apresentava máxima invasão em profundidade. Hematomas foram formados por necroses focais de tecido fetal e endometrial nos pólos finais dos sítios de implantação. Grandes lagos de sangue estagnado e células vermelhas fagocitadas encontravam-se cercadas por células trofoblásticas.

Dantzer et al, (1988) cita que ambas as artérias e veias cursam paralelas à placenta. Já as bifurcações arteriais e confluências venosas oriundas do funículo umbilical também seguem paralelas à placenta distinguindo-se em ramos placentários fetais centrais ou marginais tanto arteriais quanto venosos, além de ter os ramos placentários coriônicos (alantocoriônicos) arteriais e venosos, os quais seguem ao lado da cinta placentária inserindo-a em ângulo agudo.

Davies (1950) em estudo sobre os hematomas placentários na foca descreveu os mesmos como margens periféricas de coloração marrom e de forma irregular.

Amoroso (1952) caracterizou na placenta de carnívoros a presença de dois hematomas marginais, os quais nos caninos são grandes e volumoso, fáceis de serem observados a olho nu, dispostos regularmente ao longo das margens das zonas paraplacentárias.

Dantzer (1999) dá sinônimos para o hematoma como subunidade placentária, zona hemófaga ou órgão hemófago, e o descreve localizado na zona paraplacentária, resultante do extravasamento de sangue materno, o que parece ser mais distinto no final da gestação.

No gato o hematoma é visto como áreas marrons na margem de cada lado da placenta e como uma grande área de hematoma da face antimesometrial da placenta do vison americano (*Mustela vison*). O hematoma é considerado como fonte de obtenção de ferro para o feto (DANTZER, 1999).

Um citotrofoblasto proliferativo simples na zona juncional contribui para o desenvolvimento do sinciciotrofoblasto e do trofoblasto hemófago, o qual cresce em peso concomitantemente com o aumento do contato com sangue materno, seguido de fagocitose e digestão. O trofoblasto sincicial invade o endométrio intacto e penetra dentro de vasos com conseqüente extravasamento sangüíneo, o qual se

acumula nas bolsas dos hematomas. Estas estão alinhadas no epitélio uterino no trofoblasto hemófago e nas células trofoblásticas colunares altas. Numa diferenciação mais tardia, o desenvolvimento de citotrofoblasto proliferativo na área juncional é seguido pelo desenvolvimento das trocas dentro do hematoma trofoblástico com atividade fagocitária. Posteriormente é vista uma fase digestiva, na qual o trofoblasto hemófago é integrado à área juncional (DANTZER 1999).

Leiser e Enders (1980) estudaram com o auxílio da microscopia de luz e eletrônica, a paraplacenta a termo da gata doméstica, analisando a zona polar e as áreas juncionais paraplacentárias. Segundo os autores, a paraplacenta corioalantoíde da gata doméstica mostra evidências citológicas da transferência de substância materno-fetal. Existem, porém, diferenças qualitativas e quantitativas quando se considera o aumento progressivo que ocorre dos pólos até a margem da placenta destes animais.

Os autores ainda mencionam que na zona polar interfetal, o citotrofoblasto permanece proliferativo, o qual possui aparência colunar e demonstra pequena atividade pinocitótica. No anel adjacente da zona polar livre, o trofoblasto é cuboidal ou colunar e frouxamente conectado ao endométrio. Neste local, o material de origem uterina (histotrofo) parecia ter sido transferido do epitélio da superfície uterina colunar, para o trofoblasto.

Leiser e Enders (1980) descreveram hematomas na zona extravasada placentária do gato doméstico, que inclui áreas juncionais paraplacentárias e hematomas marginais; o epitélio uterino torna-se altamente proliferativo, especialmente nas pregas ou protusões. Esta superfície hiperplásica e o tecido conjuntivo tornavam-se simplásmicos e degenerados, eventualmente resultando em uma queda vascular materna. O lume uterino, portanto, continha sangue materno somando-se às células uterinas. O citotrofoblasto aparentemente fagocitava e ingeria este material. Vários estágios de fagolisossomos contendo eritrócitos de variáveis densidades eram vistos nestas células, como estruturas mielínicas, ferritina, glicogênio e gotas lipídicas. Depósitos de ferro cristalóide eram observados na lâmina basal e no tecido conjuntivo subjacente ao citotrofoblasto hemofágico.

Kiso et al. (1980) estudaram a arquitetura vascular sanguínea materna da placenta da cadela de 30 a 63 dias de prenhes valendo-se do método de corrosão e microscopia eletrônica de varredura. Os autores averiguaram que cada zona da cinta placentária era suprida pelas artérias radiais procedentes das artérias arqueadas. As

artérias radiais ramificavam 3 a 5 vezes originando arteríolas dispostas no centro do labirinto placentário as quais alcançavam o alantocório. As arteríolas emitiam capilares, os quais formavam uma rede na zona labiríntica. A rede capilar era orientada na direção feto-maternal. Vênulas originando-se da rede convergiam para a veia radial próximo à junção da zona labiríntica. Finalmente veias radiais uniam-se à veia arqueada. Aos 30 dias de prenhez, os autores descreveram a rede capilar da zona labiríntica mostrando uma arqueadura. Na placenta de 45 dias, a rede capilar da zona labiríntica completava seu desenvolvimento.

Perry (1981) em estudo descreveu a placenta endoteliocorial dos carnívoros, e mencionou que o trofoblasto ficava em contato com as paredes dos vasos sangüíneos. Esse tipo de placenta, com uma banda zonária equatorial ou central de vilos de ancoragem era característica dos carnívoros. Regiões hematômicas tornavam-se proeminentes nos carnívoros, como no cão e gato, ao longo de ambas as margens da banda zonária dos vilos de contato.

Leiser e Kohler (1983) realizaram um estudo da arquitetura microvascular do útero da gata entre 22 e 62 dias de prenhes mediante moldes de corrosão, por microscopia eletrônica de varredura, e cortes histológicos semifinos, da zona labiríntica endometrial.

Os autores descrevem que cada área do anel placentário zonário felino era suprida por um tronco arterial localizado centralmente. Cada artéria central dispunha de troncos vasculares, os quais parcialmente se anastomasam com outras áreas, originando a rede arterial superficial do útero. Eles cruzavam o miométrio e camadas labirínticas e ramificavam-se muitas vezes formando um sistema em forma de funil do lado fetal do labirinto placentário. Arteríolas ramificadas deste sistema entravam no septo de capilares da zona labiríntica, a qual era composta de lamelas únicas, que progressivamente, durante a prenhez, tornavam-se com formato complexo. Essa rede era orientada na direção feto-materna. Vênulas, originárias do final destas áreas convergiam oriundas das lamelas para o tronco venoso. Estas veias ligavam o labirinto e as camadas endometriais profundas com o plexo venoso do miométrio, o qual, finalmente juntava-se à rede superficial das veias uterinas. Como mencionado, a unidade precoce do labirinto materno ou rede septal de capilares com 22 dias de gestação tinha formato de lamelas em cesto na face fetal, e com proeminências apicais na face endometrial ou materna.

Leiser e Koob (1993) averiguaram no gato doméstico a placenta como cório-alantoíde, classificando-a de acordo com suas características como zonária. O formato da interface materno-fetal da placenta da gata era lamelar, ou seja, projeções fetais interdigitavam-se com os septos maternos numa complexa arquitetura. A relação entre circulação fetal e materna era do tipo corrente cruzada. Através das camadas de tecidos da membrana interhemática, a placenta do gato foi classificada como endoteliocorial, porém nas áreas de extravasamento sangüíneo, os hematomas marginais (órgão hemofágo), a placenta foi considerada hemocorial.

O suprimento vascular placentário materno se dava por uma artéria, ramo de uma artéria arqueada. Este vaso atravessava o miométrio e as camadas placentárias e ramificavam-se várias vezes antes de formar uma área com formato de funil no lado fetal da placenta. A partir deste sistema, arteríolas ramificavam-se e entravam na rede capilar do septo materno de formato lamelar, a qual na face fetal tinha formato de cesta, e na face materna, de lacunas. No início de gestação, as lamelas tornavam-se mais complexas e reduzidas em espessura (22 dias de gestação = 25 micrômetros; 58 dias de gestação = 17 micrômetros). Os capilares maternos, em detalhes, formavam um curso de rede, o qual em corte transversal era oval ou irregular e sua estrutura superficial rugosa. As lamelas capilares convergiam para formar vênulas, as quais se continuavam numa veia central. Estas veias deixavam este órgão, conectando-se com plexos venosos da camada endometrial profunda e com o plexo venoso do miométrio, para finalmente juntar-se à rede superficial das veias uterinas.

A vascularização placentária fetal é iniciada por duas artérias umbilicais e uma veia umbilical, as quais se ramificam seguindo o curso paralelo da placenta zonária. Os ramos artérias e arteríolas consecutivas juntavam-se à rede capilar, a qual na face fetal da placenta cobria as artérias maternas. Estas formavam camadas duplas, paralelamente orientadas por lamelas pedunculares ou tufo de pelos da face materna da placenta. Estas lamelas, alternadas com as camadas únicas de lamelas maternas formavam um complexo sistema placentário pregueado. As veias fetais convergiam em diferentes níveis dentro deste sistema e deixavam o órgão entre duas redes capilares na lamela fetal. O sentido da circulação sanguíneas na rede septal capilar da placenta da gata tinha direção alantocoriônica-uterina.

Leiser e Kaufmann (1994) fizeram um estudo comparativo entre placentas dos mamíferos, equinos, suínos, ruminantes domésticos, gatos, cobaias e humanos.

Neste estudo levou-se em conta o tipo de membranas placentárias, o formato da interdigitação materno fetal, as camadas da barreira inter-hemática, a invasão trofoblástica e as reações de células decíduais, a formação de sinciotrofoblasto, bem como a inter-relação dos tipos de microcirculação. Novos aspectos foram discutidos nesta pesquisa, ajudando a melhor compreensão de suas estruturas e funções de diferentes tipos de placentas. No caso, dos felinos, a placenta foi classificada como corioalantoíde, de cório frondoso anular ou circular, lamelar e endoteliocorial. O trofoblasto mostrava-se moderadamente invasivo, possuindo um citotrofoblasto e um sinciotroblasto. A circulação materno-fetal era de corrente cruzada simples.

Krebs et al. (1997) descrevem a placenta do vison americano (*Mustela vison*) como zonária considerando que à semelhança entre os demais membros da ordem dos carnívoros (AMOROSO, 1952). Ambos os autores, elucidam que a zona alantocoriônica comprime o tecido fetal na parte fetal a placenta e a zona labiríntica era proveniente da combinação dos vilos fetais e tecido septal materno. A zona juncional a qual incluía o topo dos vilos fetais invadia o tecido endometrial, e a zona glandular ou decídua materna incluía puro tecido endometrial. A zona alantocoriônica podia ser distinta histologicamente, pelas paredes dos vasos e seu conteúdo. As artérias eram circundadas por uma parede visível de células musculares e geralmente porções de eritrócitos. Artérias e veias ramificavam-se intensamente e percorriam a superfície fetal da placenta. Elas formavam troncos pares de artérias e veias coriônicas, e curvavam-se em ângulos retos para seguirem em direção materna, entrando na zona labiríntica.

Sobre a zona labiríntica, os mesmos autores acrescentam que a placenta é distintamente lobulada. Um tronco arterial materno define a orientação materno-fetal do eixo central dos lóbulos. Vasos coriônicos ou fetais dispunham-se aos pares e delimitam a periferia do lóbulo. Quando os vasos fetais eram obliterados por tecido conjuntivo, o lóbulo periférico tornava-se distintamente evidente.

Vistos pela parte fetal, e orientada na superfície dos moldes maternos, os lóbulos tinham formato de estrela. O centro era marcado por um tronco arterial materno. Os ramos arteriais desta artéria formavam um complexo capilar sub-coriônico, representado pelas raias das estrelas. Contribuindo para características labiríntica da parte materna, da zona placentária, os lóbulos com formato de estrelas

não permanecem isolados, já que pontes de capilares anastomosavam-se contatando os complexos lobulares.

A profundidade espacial entre as raiais dos lóbulos com formato de estrela representavam predominantemente vilosidades coriônicas corroídas, as quais recobriam as criptas maternas. Em detalhe, o vilo fetal e os sistemas capilares maternos do labirinto eram estritamente complementares entre si, exibindo um arranjo fechado dos vasos, os quais eram chamados capilares intra-epiteliais do sinciciotrofoblasto.

Os espaços de sangue materno e fetal eram separados somente por uma camada intersticial do fino endotélio materno. O raio do diâmetro do capilar materno-fetal é de 8-20 micrometros a 40-140 micrometros. Consequentemente, os capilares fetais consistiam geralmente de vasos arredondados, com poucas impressões endoteliais constritivas, enquanto que os capilares maternos eram do tipo sinusoídes, com constrições distintas. Também eram rugosos e superficiais no vison americano (*Mustela vison*). Os capilares fetais tinham paredes finas e formavam redes, as quais fechavam os capilares sinusoidais maternos, colabando o complexo e as anastomoses. Nas paredes notava-se formatos tridimensionais complexos devido à torções e ramificações sofridas pelos vasos dentro do labirinto durante o desenvolvimento da prenhes. Nos moldes vasculares, as artérias fetais podiam ser identificadas como ovais possuidoras de longas impressões endoteliais arranjadas longitudinalmente. Entretanto, as veias possuíam impressões celulares endoteliais arredondadas, rasas e orientadas ao acaso. Em relação a área juncional, a parte fetal estava caracterizada por vilos primários mais brilhantes, os quais contrapunham-se ao fundo escuro, entre massas degeneradas de tecido endometrial. Estes vilos primários consistiam de projeções oriundas da periferia dos lóbulos labirínticos no topo da face materna, incluindo arteríolas fetais extremas e vênulas orientadas para o alto da região materna. Nos moldes de corrosão, estes vasos estavam frequentemente arranjados em “Us” torcidos e eram estritamente demarcados no complexo labirinto capilar. Nos moldes maternos, o vilo fetal primário podia ser caracterizado como favo de mel do complexo capilar, delimitando o lado materno do labirinto. Troncos de artérias maternas podiam ser encontradas nestes orifícios quando entravam no labirinto. Em contraste, troncos de veias maternas deixam o labirinto na direção do miométrio originando-se nos complexos capilares em favo de mel.

A zona glandular era reduzida a pequenas camadas as quais se fechavam em poucas estruturas glandulares. Troncos de vasos cruzavam esta zona, entretanto outros vasos maternos não são conspícuos. Esses vasos não foram demonstrados nos moldes de corrosão por permanecerem bloqueados pela pressão durante a instilação do plástico líquido dentro do fechado labirinto capilar.

Stoffel et al (1998) descrevem a placenta canina peculiarmente zonária considerando três áreas distintas morfológicas e funcionalmente de trocas transplacentárias: o labirinto endoteliocorial da cinta placentária, a zona hemofaga hemocorial dos hematomas marginais e a zona livre placentária epiteliocorial. O saco vitelino persiste, segundo os autores, até o final da gestação. A microscopia eletrônica de varredura foi usada nestas estruturas dando ênfase especial às superfícies naturais, já que estas revelam processos de transferência materno fetal. Células desproporcionais em diâmetro eram típicas no trofoblasto. Especializações superficiais foram observadas nas células trofoblásticas alinhadas com o hematoma marginal. A zona livre placentária e as glândulas endometriais eram como as células epiteliais das glândulas endometriais e de glândulas profundas. Células endoteliais maternas e fetais do labirinto mostravam muitas diferenças: as células endoteliais fetais eram extremamente finas e poligonais no formato, e os vãos maternos estavam alinhados por células endoteliais espessas, exibindo uma complexa interdigitação de processos citoplásmicos. Assim, a superfície natural podia ser distinta por microscopia eletrônica de varredura devido à sua aparência típica. Na zona hemófaga, as pregas de alantocório estavam intimamente em contato com sangue materno. Nestas regiões, existiam células especializadas em fagocitar eritrócitos dotados de pseudópodes.

Ghether et al. (1998) estudando as glândulas endometriais de placentas caninas entre 30 e 44 dias de gestação mostraram que o epitélio glandular era colunar cúbico alto com protusões apicais em forma de pequenos microvilos. O epitélio formava pregas extensas as quais aparentavam estar cheias e localizadas acima do lúmen das glândulas endometriais. Seguindo labirinto, as glândulas eram cobertas por pontos de tufo coriônicos. O trofoblasto e o epitélio glandular estavam separados por uma densa camada de secreções, que era um tipo de muco.

Os vilos trofoblásticos projetavam-se dentro do lúmen das glândulas endometriais que estavam cobertas por epitélio pseudoestratificado, consistindo de uma lâmina basal lisa e uma superfície colunar.

Pfarrer et al. (1999) estudando a placenta endoteliocorial do vison americano (*Mustela vison*) mediante microscopia de luz e de varredura de moldes maternos corroídos. Notaram que o componente materno envolvia uma pré-implantação de vasos sanguíneos entre as glândulas endometriais, formando o primeiro contato materno fetal. A influência do sinciciotrofoblasto altamente invasivo provocava a transição dos capilares maternos em um processo extensivo, deixando-os como sinusoídes anastomosados a uma subsequente transformação de suas células endoteliais em grande células com protusões luminiais. Tridimensionalmente, os sinusoídes estão arranjados em criptas vasculares. As criptas são irrigadas por pequenas arteríolas ramificadas de uma artéria principal materna as quais eram originadas de ramos das artérias uterinas e movia-se em direção endometrial. As veias seguiam o mesmo sentido sobre os sinusoídes, transformando-se em vênulas até formarem uma grande veia principal, localizada na porção mais profunda do endométrio. Esta arquitetura persiste até o nascimento.

Ambrósio et al (2002) descreveram a placenta e alguns anexos fetais, tais como o cordão umbilical do cão e gato. Tal estrutura foi considerada nas suas porções: justafetal, justaplacentário e média. Na porção justafetal encontrou-se duas artérias umbilicais as quais originavam-se da aorta abdominal. Uma veia umbilical, um pedículo alantóideo e um pedículo vitelíneo foram também descritos como parte do cordão. No terço médio dois ramos compostos de uma artéria e uma veia encaminhavam-se para a face esquerda ou para a face direita da placenta. Na porção justaplacentária, os vasos inseriram-se ou emergiam do tecido placentário. Seus ramos percorriam e ramificavam-se sobre a área anular placentária. O cordão apresentava um comprimento médio de 49,84 mm, ou seja, aproximadamente 5 cm. A vascularização placentária de fetos caninos mostrava que os vasos funiculares ramificam-se no terço médio do cordão, emitindo dois ramos arteriais para cada face da placenta, um deles chamado de ramo placentário central, dirigido à cinta trofoblástica e outro ramo que se deslocava lateralmente aos hematomas marginais (ramo placentário coriônico). O saco vitelíneo estava presente no final de gestação, tornando o formato cilindro irregular, localizado ventralmente ao feto. Esta estrutura era intensamente vascularizada até o final da gestação. A placenta canina e felina classificada como zonária anular completa no cão, e zonária anular incompleta no gato, porque mostrava nos felinos uma fissura placentária, em 62,5% dos casos. Em relação aos hematomas marginais, os cães mostravam os mesmos, localizados nas

laterais da cinta placentária perfazendo todo o contorno anular do órgão. No gato os hematomas eram ausentes macroscopicamente e apareciam ao acaso dispersos microscopicamente no tecido placentário. Os hematomas marginais poderiam ser considerados lagos sanguíneos, em contato com o trofoblasto. O extravasamento de sangue materno acumulava-se nas bolsas laterais do anel trofoblástico. A origem deste extravasamento era materna e o mesmo permanecia em contato com mesênquima e lamelas trofoblásticas.

Krebs et al (1997) descreveu a placenta zonária do mink através da microscopia de luz e da microscopia de varredura para os sistemas vasculares, materno e fetal, respectivamente. Para estimar o período gestacional, seis minks prenhas de 2 a 3 anos foram usadas e depois sacrificadas. Os animais foram anestesiados e através da palpação do abdômen, tamanho e maturidade foram fatores importantes para confirmar o período gestacional. O mink possui placenta semelhante a maioria das outras espécies da ordem carnívora. Porém, sua implantação demora mais tempo que a de outros membros da família dos mustelídeos. A gestação dura de 42-49 dias, uma média de 6-8 semanas. Uma característica observada em alguns carnívoros, particularmente nos mustelídeos, sendo muito expressiva no mink, é a formação de uma distinta camada intersticial e a ampliação da camada de células endoteliais maternas. A área zonária da placenta do mink é muito importante para trocas placentárias e apresenta a característica de labirinto. Além disso, pode ser dividida em quatro partes, semelhante aos outros carnívoros, Zona Alantóide Coriônica, que compreende o tecido fetal no feto ao lado da placenta; Zona Ampla de Labirinto, que é a combinação dos vilos do feto com o tecido materno; Zona de Junção, que inclui os vilos fetais invadindo o tecido endometrial e Zona Glandular, que inclui um tecido endometrial simples.

Na **Zona Alantóide Coriônica**, podemos distinguir histologicamente, artérias e veias alantóides coriônicas, pela parede e conteúdo de seus vasos. As artérias são envoltas por uma parede de células musculares com eritrócitos dentro. Já as veias são fixadas por um tecido conjuntivo frouxo e se ramificam ao longo da superfície da placenta do feto, que continuam até a zona de labirinto. Na **Zona de Labirinto**, podemos perceber que o labirinto placentário do mink é distintamente lobulado. Arteríolas maternas definem a orientação materno-fetalmente do eixo central do lóbulo. Em contraste, as arteríolas e veias fetais delimitam a periferia do lóbulo paralelamente aos vasos maternos. Na parte fetal, a **Zona de Junção** é

caracterizada pela degeneração de massas de tecido endometrial. Além disso, os vasos são frequentemente arranjados em “voltas em U”, que demarcam o complexo de capilares do labirinto. Na parte materna, as vilosidades primárias fetais podem ser comparadas com buracos em forma de “favo-de-mel”. As arteríolas maternas podem ser encontradas em buracos na zona de labirinto. Em contraste, as veias maternas deixam o labirinto na direção do miométrio para as cadeias de “favo-de-mel” com complexos capilares. A **Zona Glandular** nos minks está reduzida a uma pequena camada que envolve algumas estruturas glandulares, onde os vasos maternos não são visíveis. Uma observação importante, é que o abastecimento desses vasos não pode ser demonstrado nos moldes, porque provavelmente esses vasos foram bloqueados durante a instalação de plástico líquido nos capilares localizados perto do labirinto.

Segundo Dantzer (1999), a placenta endotéliocorial se desenvolve a partir do córion vascularizado por alantóides, com contato na parte materna ou na membrana da mucosa uterina. A barreira interhemal (barreira entre o feto e a mãe) é constituída por três camadas de células e duas de tecido conjuntivo modificado. No lado do feto, as camadas são endotélio, mesotélio e trofoblasto. No lado materno, as camadas são a intersticial e o endotélio do sistema vascular materno. A área de contato é aumentada pelo desenvolvimento de lamelas que fornecem oxigênio, dióxido de carbono, nutrientes e produtos metabólitos através da barreira interhemal. As invaginações da placenta endotéliocorial, são resultados das transformações dos tecidos maternos que estão intimamente conectados com as membranas fetais que aparecem depois do parto. Essa placenta é designada decídua, pois há perda de tecido materno no parto. A placentação está relacionada com o contato primário, implantação e desenvolvimento, porém isso varia entre as espécies. O processo que ocorre entre tecidos é caracterizado pela transmissão de substâncias como hormônios, fatores de crescimento, entre outros. A correlação entre morfologia, fisiologia e bioquímica são fatores importantes para estudos relacionados com a imuno-histoquímica e hibridização, que contribuirão para o entendimento de mecanismos regulatórios que ocorrem durante o período de crescimento das células de diferenciação, o período de placentação, e ainda, o período de especialização da placenta durante a gestação. A placenta endotéliocorial é característica dos carnívoros, mas é encontrado entre outras variedades de espécies. O gato e o mink são exemplos desse tipo de placenta.

No gato, o saco vitelino forma uma placenta cório vitelínica, com trofoblastos invadindo e erodindo a membrana da mucosa uterina. Logo depois, é substituída por uma definitiva, bem vascularizada, a placenta corioalantóidea.

A implantação da placenta do mink é considerada mais demorada em relação a do gato. Podemos dividi-la em sobreposição, adesão e fases intrusivas, que são procedimentos para o desenvolvimento definitivo das zonas placentárias. A implantação apresenta a característica de desenvolvimento da camada de sinciotrofoblasto a partir do citotrofoblasto, no epitélio uterino. A placenta zonária é subdividida em lamelar/labiríntica (gato/mink) e em zonas de junção, que são conectadas pela camada de glândulas uterinas. A zona labiríntica é localizada no lado do feto e das zonas de junção. Na zona labiríntica, a placenta é composta por lamelas bem vascularizadas, que são quase regulares no gato, entretanto, elas se ramificam em vilos irregulares nos minks. A parte materna é composta por capilares e células gigantes decíduas, que são típicas no gato, mas não são identificadas no mink. Os capilares maternos com células endoteliais proeminentes, mas pronunciadas no mink, são definidos por uma camada de citotrofoblasto. A zona de junção da placenta é composta por lamelas fetais, vasos maternos, glândulas de secreção uterina e escombros de células. Nessa área, as células trofoblásticas são fagocitadas. No estágio da gestação, a invasão de glândulas uterinas, é somente em uma pequena área do epitélio glandular, que se multiplica a partir do epitélio uterino.

5 MATERIAL E MÉTODO

Para um bom entendimento dos procedimentos utilizados para captura, procedimentos cirúrgicos e processamento dos materiais e análise descrevemos a seguir a metodologia científica empregada no trabalho

5.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram coletados, um útero com início de implantação placentária de uma quati em São João da Boa Vista e quatro placentas de um quati fêmea, em meio de gestação proveniente do Parque das Mangabeiras situado em Belo Horizonte, Minas Gerais. Destas duas placentas foram utilizadas para análise e caracterização macroscópica e as demais para análise microscópica e imunohistoquímica.

O material foi retirado das fêmeas de uma das quatis adultas, que pelas análises estruturais placentárias estava entre o 2/3 da gestação para o 3/4 . As amostras foram provenientes do Parque das Mangabeiras situado em Belo Horizonte Minas Gerais. Foram capturados 34 animais sendo sete fêmeas em suspeitas de gestação negada após exame de ultrassom ou cirurgia, 26 fêmeas e machos jovens ainda em fase pré púbere, e um macho adulto. (tabela 1)

Tabela 1. Dados referentes ao número de animais capturados no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte Minas Gerais.

Período de coleta	Machos	Fêmeas	Jovens
25-29 Outubro	0	3	15
23-28 Novembro	1	2	11
5-6 Dezembro	0	2	0

Foram utilizados dois úteros prenhe de quati. Feita a ultrasonografia onde foi identificado alguns pontos de possível implantação placentária quando foi coletado o 1 útero gravídico, já o segundo foi capturado nos proporcionando estudar 4 placentas.

5.2 COLETA DE MATERIAL

Próximo ao término do período gestacional, os animais com suspeita de prenhes positiva foram submetidos a ultrasonografia em 2009, quando foi adquirido o primeiro útero e em 2010, após a confirmação da prenhes, as fêmeas foram levadas aos centros cirúrgicos na UNIFEOB (2009) e para a UFMG onde o material foi coletado da seguinte maneira.

Os cornos uterinos foram extraídos através da técnica cirúrgica de hemiovariossalpingohysterecomia seguindo a mesma técnica preconizada para cães e gatos (Oliveira et al, 2003).

Para a cirurgia foi adotada o seguinte protocolo anestésico, utilizando cloridrato de xilazina 0,05mg/kg intramuscular como medicação pré-anestésica; cloridrato de quetamina 2mg/kg intra-venoso para indução e isofluorano pra manutenção de anestesia inalatória.

Figura 1. Fotografia do processo cirúrgico de fêmea prenhe de Quati Cirurgia *Nasua nasua*, em A vemos a fêmea de quati após a captura com a mordança para não ter risco aos cirurgiões e no transporte o animal estava previamente sedado, em B vemos o animal recebendo o sedativo para dar início a OSH, em C visualizamos a tricotomia e limpeza com iodo para esterilização da área que foi feita a cirurgia, em D vemos a incisão mediana sendo iniciada para a OSH.

Como protocolo pós cirúrgico, no mesmo dia do experimento foi injetado 0,2 mg/kg de meloxicam intramuscular e posteriormente por três dias 0,1 mg/kg da mesma via.

Outro método para aquisição dos úteros gravídicos foi após a captura e devida contenção dos animais foi utilizado como protocolo anestésico, a anestesia dissociativa (Zoletil – tiletamina e zolazepam) na dosagem de 0,2 ml /Kg por via intramuscular.

As duas fêmeas foram submetidas a ovário-histerectomia para a retirada do útero. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala clínica do Parque das Mangabeiras, para investigação de uma possível gestação. Elas foram tosadas e devidamente realizada a assepsia no abdômen ventral desde a cartilagem xifóide até o púbis. Foi feita uma incisão de 2 a 4 cm através da pele e do tecido subcutâneo exatamente na região caudal do umbigo. Após a exposição da linha alba foi feita uma incisão em estocada com uma tesoura de Mayo e em seguida a parede abdominal esquerda foi levantada por meio de uma apreensão da linha alba com uma pinça polegar. O corno uterino foi exposto e através de tração caudal e medial no corpo uterino, o ligamento suspensor foi identificado por meio de palpação. Este foi estirado e rompido próximo ao rim para permitir a exteriorização do ovário através de tração caudolateral no ligamento superior, exercida pelo dedo indicador, juntamente com a tração caudomedial no corno uterino. Em seguida, um orifício no ligamento largo foi realizado uma ligadura com material de sutura absorvível em “figura de 7 C”. Os mesmos procedimentos descritos anteriormente foram realizados no outro corno uterino, assim que localizado e acompanhado até o ovário exposto. Por fim, o coto uterino foi recolocado no interior do abdômen e a parede abdominal foi fechada em três camadas (linha alba, tecido subcutâneo e pele). A sutura da pele foi realizada internamente com material absorvível para que os animais não pudessem removê-los.

A proteção da ferida cirúrgica foi feita com gaze estéril e iodo povidine.

Como protocolo pós-operatório foi administrado meloxicam na dosagem de 0,1 mg/Kg e pentabiótico na dosagem de 24.000U/Kg por via intramuscular.

Foi realizado acompanhamento clínico do retorno anestésico.

As fêmeas foram mantidas em observação após a microcirurgia e totalmente recuperadas apenas com ponto interno, estas foram soltas para prover seus filhotes de alimentação.

Do corno uterino e das placentas coletadas os materiais biológicos foram divididos para melhor organização e fixação dos tecidos. Dentre os materiais coletados uma das placentas foi selecionada aleatoriamente onde foi realizada uma incisão mediana, desta placenta foram separados, fragmentos de cório alantóide, do saco vitelino, do âmnio e da cinta placentária. Parte de cada um destes materiais foram reduzidos a dimensões de 1 cm; para melhor perfusão dos fixadores. Os fragmentos foram fixados em solução de paraformaldeído 4%, formaldeído 10% e glutaraldeído 2,5%.

5.3 Microscopia de Luz

Para o estudo histológico foram utilizados os fragmentos das placentas, cório e restante das membranas fetais (âmnio, saco vitelino, alantóide e do órgão hemofago) os quais já foram previamente fixadas em solução de paraformaldeído 4% e formaldeído 10% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Em seguida o material foi desidratado em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%), diafanizado em xilol, seguido de embebição de parafina (Histosec®) para formação dos blocos histológicos.

Os blocos foram submetidos à microtomia em micrótomo automático (Leica, RM2165) obtendo-se cortes de aproximadamente 5µm. Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas e deixados em estufa a 60°C.

Os cortes, após serem desparafinizados foram corados seguindo as técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômio de Masson, coloração de PEARLS para identificação de ferro nas áreas e reação histoquímica de P.A.S. (ácido periódico de Shiff), com fundo de hematoxilina (TOLOSA et al., 2003).

O material processado e corado foi analisado e as características morfológicas encontradas foram fotodocumentadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse E-800).

O útero com suspeita de início de gestação e as membranas fetais coletadas na segunda coleta receberam o tratamento descrito acima para microscopia de luz, assim como alguns cortes também foram destinados a técnicas de imunohistoquímica.

5.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a realização do protocolo imunohistoquímico foram utilizadas as mesmas placentas usadas para histologia convencional, as quais já se encontram fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4.

As placentas inicialmente receberam a técnica rotineira de processamento de tecidos e inclusão em parafina (TOLOSA 2003) melhor descrita acima. Em seguida os blocos foram cortados (5µm) e colocados em lâminas previamente silanizadas, (3-aminopropyltriethoxy-silane) Sigma® (A 3648-100) com dois cortes por lâmina sendo um, para controle negativo. Os cortes sequenciais foram cortados da região lateral para mediana.

Após a desparafinização das lâminas em estufa e em seguida a passagem por três baterias de xilol de 30 minutos cada, os cortes sofreram reidratação em alcoóis regressivos de 100 a 70%, seguidos de água corrente, destilada e PBS no qual as lâminas ficaram depositadas por 12 hs (overnight). No dia seguinte iniciou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio por 20 minutos e novamente alcoóis 95, 70% e água destilada por cinco min cada. Após o bloqueio os cortes foram colocados em tampão citrato fervidos por cinco min para a abertura dos sítios de ligação, em seguida deu-se o esfriamento da solução por cerca de 20 min e a lavagem das lâminas em água destilada e PBS ambos por cinco min cada. A próxima etapa consistiu no bloqueio das proteínas indesejáveis por meio do kit protein block (DAKO, x0909) por 45 min em câmara úmida; em seguida foram depositadas uma gota do anticorpo primário (Actina, DakoCytomation Carpinteria, CA, USA ; Citoqueratina Biogenex, San Ramon, Califórnia USA ou Vimentina, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, USA) diluído na proporção desejada (1:400; 1:300 e 1:400 respectivamente). A reação permaneceu nas lâminas em câmara úmida por 12 horas (overnight) em geladeira. Após isto realizou-se a

lavagem das lâminas em PBS por três vezes de cinco min para remoção do anticorpo primário. Em seguida se deu a aplicação do anticorpo secundário que permaneceu nos cortes por mais 45 min em câmara úmida. Em seguida nova lavagem com PBS três vezes de cinco min cada antecedeu a aplicação da estreptovidina nos cortes por 45 min em câmara úmida. Após nova lavagem com PBS por cinco minutos três vezes seguidas finalmente iniciou-se o processo de revelação com DAB por mais cinco min. Posteriormente os cortes foram corados com hematoxilina por um minuto. E, seguiram-se as baterias de álcool 95 e 100%, álcool xilol e xilol para somente então serem montadas as lâminas com cola permount e lamínula para proteção dos cortes. Sempre em cada uma das lâminas um dos cortes na etapa de recebimento do anticorpo primário recebia solução de IgG ficando assim sem a reação imunohistoquímica para servir de controle do protocolo.

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para o estudo de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizados fragmentos da placenta. Após a coleta, estes foram lavados em solução salina (solução fisiológica 0,9%) e perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4).

A técnica de fixação, foi por 24h, a 4°C, em solução de Karnovisk, contendo glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4). Em seguida o material foi lavado em três banhos sucessivos de tampão fosfato 0,1 M, por 15 minutos cada.

Pós-fixação, por 1h30 minutos em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M – pH 7,4. Lavagem do material em três banhos sucessivos de tampão fosfato 0,1M, de 15 minutos cada. Em seguida o material foi lavado em dois banhos sucessivos de água destilada por 10 minutos cada.

O material, então, foi imerso em solução de ácido tânico por 1h, em temperatura ambiente. Em seguida o material foi lavado com água destilada por três vezes seguidas de 5 minutos cada.

Após a fixação, as amostras foram desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol (50%,70%,90%) durante 10 minutos cada e quatro vezes no álcool 100% por 10 min.

As amostras foram secas no equipamento Balzers, modelo CPD 020, com ponto crítico de CO₂, montadas em bases metálicas e, finalmente, recobertas com camada de ouro em aparelho metalizador, Emitech K550. As peças foram examinadas sob microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP.

5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As placentas foram previamente fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfatado 0,1M, pH 7,2. Após a individualização das membranas, foram obtidos fragmentos da placenta. Ao término da fixação, o material foi lavado em tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,4 por três vezes durante dez minutos e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% por uma hora. Após novas lavagens em tampão fosfato os fragmentos das placentas foram desidratados em álcool etílico a 50%, 70%, 90% e 100% e lavados em óxido de propileno.

Por um tempo de 12 a 16 horas, os fragmentos das placentas permanecerão sob rotação em 1:1 de óxido de propileno e resina. Na sequência, esta mistura foi substituída por resina pura e a imersão feita por período de quatro a cinco horas. Após este tempo as amostras foram embebidas com resina pura em moldes. Uma vez incluídas, as placentas permanecerão em estufa a 69°C por 72 horas para consolidar a polimerização da resina.

Para localizar e caracterizar as áreas de interesse, os blocos foram cortados em ultra-micrótomo (Leica ULTRACUT UCT[®]) em cortes semi-finos com 1µm de espessura e corados a quente com solução de borato de sódio a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de Toluitina para observação sob microscópio de luz. Os cortes ultrafinos de cerca de 60nm de espessura foram coletados sobre telas de cobre e contrastados pelo acetato de uranila a 2% em água destilada, por cinco minutos, e pelo citrato de chumbo a 0,5% em água destilada, durante 10min. As

observações e eletromicrografias sub-celulares foram realizadas no microscópio eletrônico (ZEISS® EM-94S2 e JEOL CX-II-100).

6 RESULTADOS

Foram realizadas algumas tentativas de coleta de material para estudo neste trabalho. A primeira coleta realizada em São João da Boa Vista gerou um útero com suspeita de início de gestação mas sem grande mostras de tecidos placentários pois a gestação ainda estava nos seus primórdios sendo possível afirmar que a quati estava gestante somente após as reações de imunohistoquímica que mostraram os tecidos materno e fetais em desenvolvimento. Com o encerramento dos trabalhos no criadouro em São João da Boa Vista o qual foi fechado, entramos em contato com outros criadouros o que levou ao Parque das Mangabeiras, que nos recebeu com inteira disponibilidade e abriu suas portas a nossa pesquisa. Por ser uma gestação rápida e os animais serem de difícil captura para averiguar a gestação durante o ano de 2009 não foi possível capturar nenhum animal, prenhe apesar de seguidas tentativas até termos certeza da época em que os animais estariam em período gestacional. Em Agosto de 2010, com acompanhamento especializado conseguiu-se por fim adquirir quatro placentas proveniente de uma mesma gestação.

6.1 AQUISIÇÃO DE MATERIAL

Foram feitos vários contatos com Centros de Conservação (Parque Ecológico do Rio Tiete- São Paulo, Projeto Mata Ciliar- Jundiaí , Zoológico de São Paulo) e Criadouros de quatis (Exoticaves- São Paulo) nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, no entanto houve grande dificuldade em conseguir locais que estivessem dispostos a receber nosso projeto ou possuíssem excedente populacional para permitir a sua utilização em nossas pesquisas.

No contato feito em Campo Grande no estado do Mato Grosso do Sul, com o zoológico, foi informado não possuem excedente populacional, inclusive alegaram a necessidade de aumentar o número de animais. Por não ser adequada a reprodução entre animais consanguíneos e o zoológico não possuir outros machos de grupos diferentes há dificuldade do aumento da reprodução no local.

Outro contato feito com o Parque Ecológico do Tietê SP, teve como justificativa para a não colaboração com o projeto devido estar passando por mudanças na parte administrativa, foi informado pela responsável técnica que o parque não estava aberto a novos projetos no ano de 2009, mas que em 2010 o projeto poderia novamente ser exposto para nova tentativa de colaboração.

Por meio de revisões de literaturas, verificou-se que o Parque das Mangabeiras, localizado em Belo Horizonte - Minas Gerais, possuía um grande projeto junto a biólogos, veterinários, alunos da graduação e pós-graduação da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Conseguiu-se, através de contato com a bióloga responsável pelo projeto, acesso aos animais, permitindo capturá-los e coletar as placentas das fêmeas diagnosticadas como gestantes.

Desde então foram feitas três incursões ao Parque das Mangabeiras no intuito de conseguir o material biológico para realização desse trabalho.

O parque possui vários trabalhos juntos a estudantes da UFMG que desenvolvem o Projeto Quatis,. Estes trabalhos estudam morfometria corpórea, hábitos alimentares e comportamentais dos mesmos, também é realizado o padrão bioquímico sanguíneo e hemograma da espécie.

Além da receptibilidade e os aspectos de adaptação dos animais ao ambiente foi ótima, a área do parque que é vasta, com 337 hectares de mata preservada, sua flora é heterogênea, com amostras de vegetações de campo, mata e cerrado e sua fauna apresenta também grande diversidade, sendo encontrados tatus, gambás, caxinguelês, e 161 espécies de aves, tendo assim grande variedade alimentícia para as espécies e poucos predadores.

Após todos os documentos serem enviados e aceitos pelo parque iniciou-se as viagens com intuito de conseguir o material. As datas de coleta foram calculadas para que ocorressem durante a época reprodutiva dos animais. Pré estabeleceu-se trabalhos em conjunto com a equipe do parque para que as capturas fossem melhor aproveitadas para fins de estudo, cada incursão a mata dura cerca de uma semana, esse período não afeta o comportamento social dos animais respeitando assim o trabalho dos biólogos que monitoram dados para melhor conhecimento da biologia da espécie *Nasua nasua* e demais animais do parque.

A primeira apreensão dos animais ocorreu durante os dias 25 a 29 de outubro a de 2010, na ocasião acompanhou-se a captura dos quatis que é feita conforme descrição a seguir, no início da semana são espalhadas 20 armadilhas

modelo Tomahawk com iscas de banana e estrategicamente colocadas nas rotas que os grupos frequentam (Figura 2 A, B,C e D), as armadilhas são averiguadas duas vezes ao dia, uma as oito horas da manhã e outra as 16 horas. Em muitos casos é necessário rearmar as armadilhas ou repor as iscas dos locais.

Após acompanhar os procedimentos de rotina do grupo, verificou-se algumas dificuldades que ocorrem para a captura dos animais, dentre elas a concorrência de alimento por outras espécies, principalmente os micos estrela, animais de muita destreza que apanham o alimento sem desarmar a armadilha, além de tapetis e gambás porém esses são facilmente apanhados nas armadilhas; outro fato que pode-se levar em conta é o de que a grande maioria dos quatis apreendidos são quatis ainda jovens, possuidores de grande curiosidade e mais vulneráveis no grupo.

Figura 2 Fotografia das Armadilhas no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais demonstrando o posicionamento das armadilhas e uma das principais dificuldades de capturar os Quatis, concorrência por alimento. Observa-se em A a armadilha Tomahawk e em B uma fotografia aproximada para melhor visualização da mesma. Em C e em D observa-se o principal concorrente por alimento dos Quatis na região, o Mico Estrela.

O método de captura por armadilhas no parque tem como resultado conforme supracitado um número muito baixo de indivíduos coletados. Ao questionar se não haveria outro método de captura, foi informado que poderia-se utilizar o método de cevar os animais para atraí-los dentro de um grande viveiro de contenção, utilizado para observar os animais após anestésias e demais procedimentos de estudo realizados no parque. A equipe foi dividida para que pudesse maximizar e agilizar o processo de captura podendo assim realizar simultaneamente os dois métodos de captura.

Figura 3 Fotografia do Métodos de captura utilizados no Parque das Mangabeiras Belo Horizonte. Em A visualizarum animal adulto preso na armadilha de modelo tomahawk material utilizado rotineiramente para captura de pequenos e médios mamíferos em matas, em B visualiza-se o segundo método de captura por ceva em bretes de contenção

Com este segundo método junto ao utilizado anteriormente, conseguiu-se um maior número de capturas de quatis, infelizmente os animais capturados eram sempre grupos de machos jovens ou fêmeas que não possuíam ainda maturidade sexual para reprodução. Isto se deve a inexperiência e curiosidade dos jovens quatis, os adultos são animais com mais destreza e ariscos, além do fato dos grupos serem muito organizados, onde os batedores que saem a procura do alimento são os jovens e somente após averiguarem que o local é seguro as fêmeas prenhes ou com filhotes saem de seus ninhos para se alimentar.

Com todas estas dificuldades durante o período restrito no parque conseguiu-se somente três fêmeas adultas, as quais já possuíam filhotes. As mamas estavam com muito leite e possuíam aspecto de fêmeas prenhe.

O segundo período de coleta foi durante a semana de 23 a 28 de novembro, 2010 em uma semana chuvosa, o que reduziu o número de capturas, mas com a utilização da ceva conseguiu-se capturar uma fêmea adulta, que já havia tido filhotes. Além desta, novamente foram capturadas algumas fêmeas jovens.

Com o período reprodutivo dos quatis chegando ao fim no mês de Dezembro e Janeiro foi feita uma última tentativa de captura em 5 de dezembro. Na data os biólogos haviam capturado duas fêmeas com possível prenhes positiva. Sem disponibilidade do aparelho de ultrassom a única forma de averiguar a prenhes foi a palpação seguida de cirurgia com mínimo de dano ao animal.

Figura 4. Fotografia de ultrasonografia e método investigativo em Quatis Em A visualiza-se uma das fêmeas com possibilidade de prenhes passando pelo procedimento de diagnóstico por ultrassom em B vê-se o animal preparado para o procedimento cirúrgico de cesariana, em C temos a visualização do campo cirúrgico anterior a primeira incisão na linha Alba e em D verifica-se o procedimento de acesso abdominal para analisar os cornos uterinos.

Em colaboração com o Parque das Mangabeiras em Minas Gerais as capturas vêm ocorrendo, e até o presente momento uma tabela (Tabela 1) foi gerada com o número de animais capturados, os quais foram divididos por sexo (macho e fêmea, adultos) e também os indivíduos jovens.

Como os animais possuem um período de reprodução específico durante o ano as coletas forma interrompidas em janeiro e recomeçam em Julho de 2010.

Sem sucesso na aquisição de material no Parque das Mangabeiras em 2009 durante o período gestacional conseguiu-se em 2009 apenas um útero com início de implantação placentária, o qual foi coletado e doado pelo CECRIMPAS (Centro de Criação, Multiplicação e Pesquisa em Animais Silvestres do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos – UNIFEOB (processo IBAMA 02027.02297/2005-98, registro 579888), a quati foi submetida à cesariana onde o útero foi retirado e fotografado.

Mediante a dissecação do útero foi possível visualizar macroscopicamente que sua musculatura é rija e de coloração rosa clara. O útero dos quatis é simétrico quanto a sua composição, e este possui 2 cornos uterinos sendo classificado como bicornio. Conseguimos visualizar através de imagens macroscópicas, o corpo do útero, seu infundíbulo, ampola e ligamento largo, onde posteriormente se conectaria o ovário que foi retirado para estudos macro e microscópicos, como visualizado na figura 5.

Figura 5. Útero de Quati *Nasua nasua* doado pelo CECRIMPAS, Macroscopicamente observa-se o corpo do útero (C) a ampola (Am) que liga corpo ao ovário, o ligamento largo uterino (LI) e o infundíbulo (In).

6.1.1 Aquisição do útero prenhe com placenta

Em agosto de 2010 foi capturada uma fêmea prenhe, esta foi anestesiada de seguindo o método preconizado anteriormente, posteriormente a mesma foi levada ao centro cirúrgico do Hospital veterinário da UFMG Universidade Federal de Minas Gerais onde foi retirado o corno uterino prenhe da quati através de OSH.

A fêmea capturada possuía quatro placentas sendo duas localizadas no corno uterino direito e dois, no corno uterino esquerdo.

Uma característica morfológica da parte reprodutiva do animal que se destacou foi o ligamento ovariano muito similar ao dos gatos, apesar da filogenia do *Nasua nasua* estar baseada nas semelhanças com aos canídeos. (Figura 7 C e D)

Figura 6. Fluxograma mostrando a filogenia genética dos quatis

A filogenia evolutiva do Quati (*Nasua nasua*) tem origem na ordem dos carnívoros, que se divide em duas subordens principais os felídeos (felinos) e os canídeos (demais carnívoros) esta árvore desenvolve várias ramificações de onde tem origem animais como a lontra, ursos, pandas e raposas vermelhas. Da subordem canídea temos a família procyonidae, família esta composta por animais como o guaxinim e o mão pelada, além dos quatis.

Figura 7 Fotografia dos cornos uterinos gestantes com placentas de Quati. Corno uterino gestante e ligamento ovariano. Em A visualiza-se os quatro sacos gestacionais divididos simetricamente no corno direito e esquerdo, em B C e D são evidenciadas as características macroscópicas do ligamento ovariano semelhante aos felinos..

6.2 RESULTADOS MACROSCOPICOS

A placenta como nos demais membros pertencentes a ordem dos carnívoros e classificada como zonaria, possuindo uma cinta placentária completa. As membranas fetais encontradas nesta espécie, que constituem a placenta dos quatis são o cório, alantóide, âmnio, saco vitelino, e uma estrutura temporária denominada seguindo estudos anteriores realizados em guaxinins como Órgão hemófago. Esta estrutura é vista durante o segundo terço da gestação que em seu final regride e posteriormente desaparece, esta membrana temporária ajuda a identificar o período em que se encontrava a gestação (Figuras 8C, 8D, 9 e 10B),

Macroscopicamente é possível ver a parede externa uterina conhecida como perimétrio, a média e mais espessa o miométrio e a interna endométrio que faz contato direto com o cório alantóide membranas fetais mais externas (Figuras 8C e 8D) .

O córion alantóide se localiza ligada ao âmnio e a parede interna do útero grande parte da membrana corioalantóideana esta aderida ao âmnio no dorso de concepto. As membrana cório e alantóide são membranas que se sobrepõem quase que fundidas em uma só, macroscopicamente é visível a grande vascularização nesta área apesar de serem membranas bem finas e visível a diferença entre a parede uterina e as membranas fetais.

Em uma perspectiva de descrição em camadas, o âmnio esta localizado logo abaixo do alantóide recobrimdo por completo o feto, o âmnio se apresentou avascularizado, esta membrana possui grande quantidade de liquido de pigmentação amarelada que auxilia na proteção contra impactos mecânicos que podem ser sofridos durante a gestação.

Figura 8 Fotografia da macroscopia da placenta de Quati. Em A visualiza-se os 4 sacos gestacionais bem distribuídos nos cornos uterinos, enumerados aleatoriamente SG1 (saco gestacional), SG2, SG3 e SG4. Em B visualiza-se a parede externa do saco gestacional a face materna uterina (U), o Âmnio (Am) recobrindo o Feto (F), em C temos o feto recoberto pela membrana amniótica (Am) fora do saco gestacional onde internamente temos o Cório (Co) ligado ao alantóide (Al).

O saco vitelino o qual possui formato em T (vistos na Figura 9 A e D) está ligado ao cordão umbilical. Ele fica em uma área paralela a cinta placentária. A cinta placentária localizada centralmente na placenta circunda por completo uma faixa mediana do tronco do feto, tem uma pigmentação externa amarelada escura e internamente passam vasos calibrosos ramificados do cordão umbilical e vão se ramificando ate chegar ao órgão hemófago, estes vasos auxiliam na nutrição e metabolismo durante a gestação.

Figura 9 Fotografia da placenta de Quati Em A ver-setemos a placenta invertida junta ao feto e suas membranas fetais córion (Co), alantóide (Al), cinta placentária (Cp) bem definida e o órgão Hemófago (Oh). Em B é focado a área do Órgão Hemafago (Oh) que se localiza na área central da cinta placentária. Em C vê-se o cório (Co) alantóide (Al) bem vascularizado, o âmnio (Am) abaixo destas membranas de coloração amarelada bem clara envolvendo o feto e a cinta placentaria (Cp) completa centralizada. Em D visualiza-se o saco vitelino (Sv) pequeno e de coloração escura.

A cinta placentária dos Quatis (*Nasua nasua*) é completa (Figura 9 C) e se apresenta na parte central da placenta envolvendo por completo a parte mediana do tórax no feto. Em sua porção mediana interna esta localizada uma estrutura denominada Órgão hemófago equivalente ao hematoma placentário já na mesma posição mas na face externa da cinta placentária visualiza-se o hematoma propriamente dito. Seu posicionamento anatômico é centralizado assim como em felinos e diferente dos canídeos que se localiza marginalmente na cinta placentária tem função digestória extra-embionária. Aderido à cinta placentária, na sua parte central localiza-se o cordão umbilical junto aos demais vasos de conexão materno fetal bem calibrosos e de fácil visualização (Figura10).

Figura 10. Em A tem-se a placenta ex-situ com feto fixados em paraformaldeído onde pode-se visualizar claramente a presença do órgão hemófago sobre a cinta placentária, em B esquema para melhor visualização da figura anatômica (**Phelipe Oliveira Favaron**).

Figura 11 Fotografia da vista central da cinta placentária demonstrando macroscopicamente o Hematoma placentário em Quatis. Em A pode-se visualizar a sobreposição das membranas fetais desde a face uterina onde se localiza o Hematoma (circulo) e vai se aprofundando ate chegar na área lamelar labiríntica (*) ate se juntar ao Órgão Hemófago (Oh). Em B e C pode-se ver a face externa da cinta placentária (cp) e o hematoma placentário (circulo)

6.3 RESULTADOS MICROSCÓPICOS

Foram possíveis analisar apenas dois períodos gestacionais da espécie, um no início gestacional onde o blastocisto ainda não havia aderido a parede do útero, e possível neste momento visualizar as alterações uterinas para a chegada do blastocisto e futura adesão e, em um segundo momento a placenta já quase que em final da gestação onde ainda ocorre a presença do órgão hemófago e o feto ainda não se desenvolveu totalmente mas todos seus sistemas e características já são observadas, neste momento a placenta já é utilizada em juntamente com os órgãos fetais para sobrevivência intrauterina até o final da gestação.

6.3.1 Resultado microscópico: útero com início de implantação placentária

Na histologia foi possível identificar algumas microestruturas características do tecido uterino, como as camadas de tecido que o compõe como o endométrio e o miométrio, a área de implantação placentária se abrindo em um grande vazio onde as microestruturas como a borda do tecido sendo formada por um epitélio trofoblástico cúbico simples diferente da maioria dos carnívoros, que se apresentam na forma de epitélio colunar, achado que pode estar relacionado à implantação. As figuras 6 A e C; 7 E e G e 8 A e B demonstram as áreas citadas acima e possibilita visualização de algumas células epiteliais marcadas por citoqueratina (Figuras 6 e 7) através da técnica de imunohistoquímica, o que permite afirmar que no local está ocorrendo o início da implantação placentária. Além disso foi possível visualizar uma intensa vascularização nas camadas de tecido conjuntivo, onde os vasos sanguíneos maternos tiverem a camada endotelial marcada fortemente pelo anticorpo anti-vimentina (Figura 8), o que também sugere que está havendo um maior aporte sanguíneo para essa região, provavelmente para suprir uma possível gestação.

Figura 12. Fotomicrografias do útero e áreas de implantação placentária coradas com técnica de Hematoxina Eosina (HE) com aumento de 4x em A 20x em C e 40x em B e D. Em A tem-se uma visão panorâmica da lamina onde podemos visualizar o endométrio (ed), miométrio (mi) e a serosa (ce) camadas que compõe o útero. Na figura B visualiza-se o epitélio cúbico (ec) e uma glândula. Em C visualiza-se um grande vazio onde se inicia a área de implantação

Figura 13. Fotomicrografias do útero no início doado pelo CECRIMPAS onde foram feitas reações de imunohistoquímica com citoqueratina. Em A e C tem-se células epiteliais cúbicas marcadas pela reação histoquímica em B e D semelhantes áreas com a reação negativa.

Figura 14. Fotomicrografias do útero no qual foram feitas reações de imunohistoquímica com citoqueratina. Em E e G tem-se células epiteliais cúbicas marcadas pela reação histoquímica em F e H semelhantes áreas com a reação negativa da imunohistoquímica.

Figura 15. Fotomicrografias do útero doado no qual foram feitas reações de imunohistoquímica com vimentina. Em A e B tem-se as células endoteliais que envolvem os vasos sanguíneos marcadas pela reação histoquímica. Em C e D semelhantes áreas com a reação negativa da imunohistoquímica.

Nas fotomicrografias onde foram utilizadas reações de imunohistoquímica com vimentina foi confirmado o sítio de implantação, demonstrando reação positiva para diversas áreas tanto vasculares como epiteliais. A vimentina evidencia o endotélio de vasos sanguíneos de origem materna, enquanto que a citoqueratina marca o citoesqueleto intracelular das células embrionárias.

6.3.2 Microscopia das placentas

Para melhor entendimento e visualização das estruturas placentárias realizou-se fotomicrografias da placenta zonária do Quati, presentes na Figura 16.

Figura 16 Montagem Histológica da cinta placentária. Observar a musculatura uterina nas bordas laterais (Mu) logo abaixo a esta musculatura vê-se a zona de junção (Zj) na parte central a zona labiríntica (Lb) abaixo dela o Órgão hemófago (Oh) juntamente com o Saco vitelino (Sv)

É bem visível a diferença de coloração entre as camadas da cinta placentária, na figura abaixo é possível ver o cório, alantóide e o labirinto

placentário, camadas que junto ao âmnio e o saco vitelino formam as membranas que compõem a placenta dos carnívoros.

Figura 17 Eletromicrografia de Varredura. Observar em A e B as 3 camadas principais da cinta placentária onde pode-se ver o cório (Co), alantóide (Al) e o labirinto placentário (Lb)

6.3.3 Zona Alantóide Coriônica

A zona Alantóide Coriônica é constituída em sua porção materna pelo epitélio materno que se apresentou cúbico simples seguido do mesênquima (endométrio) repleto de glândulas endometriais e tecido frouxo foi visualizado também duas camadas musculares a primeira com fibras musculares circular seguida de uma camada de músculo com fibras longitudinais. A porção fetal em grande parte ainda não aderida ao epitélio materno com seu cório livre (também conhecido como cório frondoso (Figura 19), com epitélio prismático simples, é possível visualizar grande presença de vasos no alantóide mostrando a grande vascularização desta membrana fetal.

Figura 18 Fotomicrografia da porção uteroplacentária de quati. Observar a porção fetal composta pelo cório livre (Co) juntamente com a membrana alantóide (Al) e seus vasos constituintes (Vs). Pode-se observar também a porção uterina, onde observa-se o epitélio cúbico característico (Ep), juntamente com seu tecido conjuntivo composto de glândulas endometriais (Gl) e a musculatura lisa formada por duas camadas: longitudinal (MI) e circular (Mc). HE, 10x.

Em algumas áreas do epitélio materno foi possível visualizar diferentes tipos de epitélio (Figura 19) principalmente em áreas que possuíam vasos sanguíneos. O epitélio prismático é bem caracterizado nestas áreas.

Figura 19. Fotomicrografia da porção uteroplacentária de quati. Observar o tecido materno composto por uma camada de músculo com fibras longitudinais (MI) seguida de outra camada de fibras circulares (Mc) seguida de glândulas endometriais (GI) dois tipos um epitélio cúbico simples (seta preta) e um epitélio prismático simples nas áreas onde se encontram vasos próximos ao epitélio (seta vermelha). Tricromio 10x A e C; em B 20x e em D 40x.

É possível visualizar o cório livre onde não ocorrem as trocas materno fetais, somente ocorrendo estas trocas no cório frondoso local onde ocorrem as projeções coriônicas. Foi bem demarcado com imunohistoquímica de citoqueratina o epitélio prismático simples fetal bem diferente do epitélio materno o qual possui células binucleadas (Figura 20 A e B)

Figura 20 Fotomicrografia de imunohistoquímica do corialantóide livre em *Nasua nasua*. Em A observar a proximidade do córion livre fetal demarcado com citoqueratina (seta vermelha) sem contato com o epitélio materno (seta preta) 40x. Figura B tem-se a mesma região com maior proximidade, dando ênfase a marcação do anticorpo, no epitélio materno é possível ver algumas células binucleadas (*) 100x.

A membrana corialantóideana precede o labirinto placentário e parte do seu tecido vai adentrando o labirinto como se fossem lamelas preenchendo parte da área labiríntica. Esta área lamelar é constituída por vários vasos. O epitélio alantóideano é bem fino (Figura 22 A e B) e prende uma grande quantidade de tecido frouxo que em algumas áreas apresentou uma grande quantidade de vasos sanguíneos, este tecido mostrou presença de fibra colágena próxima ao epitélio nas regiões mais vascularizadas.

Figura 21. Fotomicrografia do alantóide adentrando o labirinto placentário. Em A e B observar o epitélio do alantóide (seta preta), vasos fetais alantoidianos (Va) e a área do labirinto placentário. Em C pode-se ver a área de ccitotroblastocitotrofoblasto (Si). A 10x he; B 10x tricromio e C he 40x.

6.3.4 Zona Ampla do Labirinto

Esta área que se localiza na porção mediana da placenta é a zona placentária que constitui a maior área da cinta placentária, está localizada e aderida abaixo do alantóide o qual tem um íntimo contato entre as membranas, em algumas localidades sendo invadida pela mesma.

É constituído por pequenos vacuólos circulares envoltos pelo citotrofoblasto que forma uma cinta envolvendo a luz do vaso materno (Figura 22 A), nesta região encontramos uma grande quantidade de colágeno invadindo os alvéolos. Em algumas regiões o tecido é invadido por lamelas vindas do alantóide (Figura 22 C e D) neste tecido encontrou-se vasos sanguíneos que em sua grande maioria são capilares que ajudam nas trocas fisiológicas durante a gestação.

Figura 22 Fotomicrografia da Zona Labiríntica placentária em *Nasua nasua*. Observar em A a zona vasta do labirinto (Lb) com a entrada das lamelas placentárias (l) vindas do alantóide com vários vasos (v). Em B observar o epitélio dos vasos bem demarcado com imunohistoquímica de vimentina e todo o envoltório das lamelas demarcada da mesma maneira. Em C fotomicrografia aproximada da zona labiríntica onde é possível visualizar a grande quantidade de vasos existente na lamela. Em D visualiza-se a marcação de fibras colágenas na zona labiríntica principalmente na área denominada cintatrofoblástica que envolve os vasos do labirinto.

Figura 23 Fotomicrografia evidenciando a Zona Labirintica Em A visualiza-se a zona ampla labiríntica (Lb) com suas lamelas e no centro da figura um grande vaso materno, em B visualizamos detalhes do vaso materno com suas paredes bem espessas e próximo ao vaso os vasos fetais em alguns possibilitando visualizar o sincício (Si) e o citotrofoblasto (Ci) além da cintatrofoblastica (Ct) em C visualiza-se a parte inicial da zona labiríntica onde temos um microhematoma (Me) entre a lamela e a Zona de junção (Zj) em D tem-se uma Figura aproximada de um vaso fetal (Vf) cercado pela cintatrofoblastica.

Figura 24 Fotomicrografia comparativa do Labirinto placentário. Em A e em C temos a visão da microscopia de luz do alantóide (*) a zona labiríntica constituída pelo labirinto (Lb) e as lamelas (l), já em B e em D temos a mesma área mas mostrada com seus detalhes em relevo pela MEV.

A Zona labiríntica possui as características semelhantes aos achados por Creeds e Biggers (1963, 1964) que estudaram guaxinins, onde a Zona labiríntica se relaciona de duas maneiras uma com a invasão do tecido pelas lamelas do alantóide e a relação onde vê-se o sinciciotrofoblasto e o citotrofoblasto bem próximos circundando os vasos fetais e os maternos livres destes tecidos. Estas características permitem visualizar a Microscopia Eletrônica de Transmissão, as características da barreira placentária que permite classificá-la com endoteliocorial, a qual, Leiser e Kaufmann (1994) descrevem como células fetais do trofoblasto, que se unem formando um sinsício (célula multinucleada) e fagocitam o epitélio uterino até chegarem ao endotélio do vaso materno.

6.3.5 Zona de Junção

Nesta região o epitélio trofoblástico fetal invade o estroma endometrial materno (Figura 26 A e B). Em alguns locais onde os tecidos se aproximavam, foi possível visualizar no tecido materno uma grande quantidade de vasos no endométrio e um epitélio cúbico bem definido que posteriormente a invasão do tecido materno pelo fetal desaparece por completo

É evidente através da marcação do anticorpo de citoqueratina a visualização da permanência do epitélio fetal (Figura 26 C e D), e a vimentina marca facilmente o estroma diferenciando os tecidos materno e fetal facilmente nesta área de junção.

Figura 25 Fotomicrografia da Zona de Junção face materna e fetal. As imagens A e B demonstram a área de junção placentária onde pode-se visualizar muitas particularidades. O epitélio fetal apenas permanecendo (seta vermelha) o hematoma placentário (He) o estroma materno (E) e a musculatura uterina (M) aproximando-se do início da Zona labiríntica (Lb)

Localizado na área mais interna da cinta placentária abaixo do epitélio fetal tem-se um grande extravasamento de sangue em algumas áreas onde é possível identificar o Hematoma placentário (Figura 27 A, B, C e D). Também pode-se observar uma área de pequenas vilosidades e parte da área lamelar onde tem-se a passagem de vasos em sua grande porção pequenos capilares.

Figura 26 Fotomicroscopia óptica da Zona de junção, Em A e B tem-se o epitélio do trofoblasto fetal (seta preta) invadindo o endométrio materno (T) alguma partes do hematoma placentário (He) formando a área da Zona de Junção (Zj). Em C e D tem-se a reação de Imunohistoquímica em citoqueratina vendo o epitélio fetal marcado (seta vermelha) e as glândulas endometriais (G).

Figura 27 Fotomicrografia de Imunohistoquímica com reação positiva a Vimentina na Zona de junção. Em diferentes aumentos das objetivas do microscópio pode-se visualizar alguns detalhes da invasão do trofoblasto fetal no estroma materno (T) pode-se visualizar o Hematoma placentário (He) aderido em algumas faces deste epitélio e a marcação do estroma se aderindo na parede e nas dobras do epitélio fetal (seta vermelha) e envolvendo, mas não se aderindo aos vasos do estroma.

6.3.6 Saco vitelino

Macroscopicamente o saco vitelino tem formato de “T” invertido e segue a direção do cordão umbilical.

Hitologicamente visualizou-se a membrana aderida a parede alantóide na face ventral da cinta placentaria e sua delimitação final se encontra próxima ao órgão hemófago.

Esta membrana placentaria tem característica comum dos demais o qual é sacos vitelinos já estudados dentre os carnívoros e demais espécies animais, composto por uma grande quantidade de células endodérmicas, com algumas áreas de concentração de hemácias onde se formam as ilhotas vasculares e fica evidente a área do eixo de mesenquima (mesotelio)

Figura 28: Fotomicrografia histologia do saco vitelino em Quatis. Visualizar em A e B uma visão panorâmica do saco vitelino onde se evidencia as dobras formadas pelo mesotélio (m), inúmeras células endodérmica (ce) e ao redor alguns vasos (V) entre o saco vitelino e seu epitélio, HE 20x. Em C temos uma aproximação da figura onde pode se observar detalhes como a ilhota vascular (i) repleta de hemácias e no mesotélio alguns cristais amarelados que com técnica de PEARLS em outros tecidos placentários caracterizou-se como depósitos de ferro, HE 40x.

Figura 29: Fotomicrografia da histologia do saco vitelino em Quatis. Visualizar em A uma visão panorâmica do saco vitelino visualizando-se mesotélio (m), inúmeras células endodérmica (ce) ao redor alguns vasos (V) entre o saco vitelino e seu epitélio e uma ilhota vascular (i) bem aderida ao mesotélio, Tricromio de Masson 20x. Em B temos uma aproximação da figura anterior A onde pode se observar detalhes da ilhota vascular (i) repleta de hemácias e no mesotélio (me), Tricromio de Masson 40x. Em C alguns cristais amarelados (c) que com técnica de PEARLS em outros tecidos placentários caracterizou-se como depósitos de ferro, HE 40x.

6.3.7 Órgão Hemófago

Em todas as placentas foi encontrado o Órgão Hemófago uma estrutura bem diferenciada das demais encontradas nas placentas dos carnívoros.

O Órgão Hemófago é uma região que é formada por inúmeras vilosidades, foi possível identificar inúmeras arvores vilosas com seus ramos em formato de cacho onde na face central deles é encontrado um extravasamento de líquido. Com a técnica histológica de PEARLS (Figura 30 C e D) que marca ferro no tecido foi possível verificar uma concentração significativa de ferro na região marginal dos cachos dos vilos e nas zonas de extravasamento de líquido sanguíneo. Uma grande quantidade de cristais de ferro são encontrados por toda extensão do tecido.

Figura 30 Microscopia do Órgão Hemófago em Quatis. Em A tem-se uma visão panorâmica do órgão hemófago (Oh) que se liga ao alantóide e bem próximo ao labirinto placentário, em B tem-se a adesão do Órgão hemófago no alantóide (Al) onde já conseguimos visualizar os cristais de ferro (seta vermelha) nos vilos do órgão hemófago. Em C e D tem-se a coloração histológica de PEARLS onde vê-se os cristais de ferro e uma concentração de líquido sanguíneo (seta preta) na face central do ramo viloso (V)

Na área central dos vilos é possível ver um extravasamento de líquido bem concentrado, estes vilos tem em cada uma de suas ramificações em formato de cachos que estão repletos de cristais de ferro na face interna como visto pela histologia (Figura 31 C e D).

Em uma das faces ele se adere a parede do alantóide sem ter invasão dos tecidos somente uma fina ligação entre os tecidos, a outra face não se adere aos tecidos, pois é um órgão anexo a placenta.

Figura 31. Fotomicrografia de Varredura do Órgão Hemófago. Em A e B pode-se visualizar as duas camadas e a fina divisão (seta preta) que separa o labirinto placentário (Lb) junto do alantóide do órgão Hemófago, em C temos um ramo viloso (V) do órgão Hemófago na Figura D pode-se ver o extravasamento de sangue (*). Nas imagens E e F pode-se observar o formato dos cachos (C) que formam os vilos placentário onde se acumulam os cristais de ferro.

6.3.8 Hematoma placentário

Bem aderido ao corioalantóide tem-se uma grande massa compacta de hemácias que é definida como Hematoma Placentário. Este hematoma foi encontrado na face medial da cinta placentária,

Em grande parte da sua margem ele é cercado por um epitélio cúbico bem definido. A maior área de hematoma encontrada se localiza entre a camada que está aderindo a Zona de Junção entre a face materna e fetal e entre a Zona Labiríntica.

Em algumas áreas é possível ver que junto ao epitélio o hematoma invade a área antes ocupada pelo epitélio uterino junto de seu estroma. Esta área ainda esta caracterizada na face materna pela presença das glândulas endometriais encontradas no estroma materno. Próximos ao hematoma podem ver o inicio das lamelas labirínticas onde ocorre a inserção na zona labiríntica que são bem irrigadas pelos capilares.

Figura 32. Histologia do Hematoma placentário. Nas imagens A, B e D tem-se áreas onde ainda o epitélio fetal (seta vermelha) ainda não apresentou íntimo contato com o tecido materno e seu epitélio ainda permanece preservado (seta preta) é possível visualizar o Hematoma placentário (He) e a zona labiríntica (Lb) bem próxima ao mesmo na face materna as glândulas endometriais (G) e o estroma (E). Nas imagens C, E e F tem-se o contato das faces materno e fetal onde o Hematoma placentário é separado do tecido materno apenas por um epitélio cúbico simples.

6.4 Microscopia eletrônica de Transmissão

Com intuito de esclarecer o tipo de barreira interhemática placentária em Quatis usou-se a técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

Em comparativo as demais espécies possuidoras de barreira interhemática, a barreira dos Quatis, assim como a grande maioria dos animais da Ordem Carnívora é endoteliocorial.

Na zona labiríntica da placenta observou-se o blastocisto invadindo mais profundamente o trofoblasto (Figura 33) ocorrendo um contato íntimo com o endotélio materno. Os vasos maternos são envoltos pelo sincício e citotrofoblasto. Em várias localidades são observadas células decíduais simples (Figura 33, 34 e 35).

Um tecido endotelial materno necrótico (Figura 33) é notado por toda a extensão mediana da zona labiríntica diferenciando os vasos maternos dos fetais. Os vasos fetais possuem contato com o trofoblasto (Figura 33)

Organelas como mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, são encontradas próximas aos vasos maternos (Figura 35D).

Nos vasos maternos visualizou-se uma grande quantidade de vilosidades vindas do trofoblasto (Figura 33A e D e 35C) direcionadas para absorção interna do vaso. Próxima a área do citotrofoblasto existe uma grande quantidade de vesículas, em algumas é possível visualizar resquícios das organelas celulares como retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Figura 33 e 35D).

A idade gestacional das amostras permitiu a visualização de vasos maternos com hemácias e endotélio do vaso sanguíneo materno mantendo contato com o trofoblasto (citotrofoblasto) através de ligações celulares denominadas do tipo desmossomos (Figura 35A).

O sinciciotrofoblasto apresentou-se delineando um espaço sanguíneo materno, apresentando vários núcleos, contidos em um único citoplasma. Novamente apresentando o tecido endometrial necrótico margeado por essas células trofoblásticas.

Figura 33: Eletromicrografia de transmissão da barreira placentária de quati, tipo endoteliocorial. Notar: vaso materno com hemácias no interior (vm). Os vasos sanguíneos maternos são rodeados por células de citotrofoblasto (Ct), as quais apresentam inúmeras vesículas na região apical do citoplasma (v). As células de Citotrofoblasto (Ct) apresentam citoplasma delimitado com núcleo individual e desenvolvido. Mitocôndrias são observadas nessa mesma região (seta). Grupos de células de Sinciotrofoblasto (círculo pontilhado) são observados no interior da camada de citotrofoblasto. Ao redor desses grupos de células fetais é notado um tecido endometrial necrótico (Te) com característica anucleado e fibrótico. Delimitando esses Vasos sanguíneos fetais (Vf) mantém contato com as camadas trofoblásticas. Barra : 10μm.

Figura 34: Eletromicrografia de transmissão da barreira placentária de quati, tipo endoteliocorial: **A-** vaso materno com hemácia (vm); trofoblasto com vilos projetados para absorção (*); vesículas (ve). Barra: 5 μ m. **B-** Citotrofoblasto (Ct)- citoplasma delimitado (setas), núcleo desenvolvido com presença de mitocôndrias (m). Barra: 2 μ m. **C-** Sinciotrofoblasto delineando um espaço sanguíneo materno (ES): apresentando vários núcleos (St), único citoplasma (seta). Notar tecido endometrial necrótico (Te) margeado por essas células trofoblásticas. **D-** Citotrofoblasto com a superfície apical da célula vilosa (*). Barra: 5 μ m.

Figura 35: Eletromicrografia de transmissão da barreira placentária de quati, tipo endoteliocorial: **A-** vaso materno com hemácia (vm) e endotélio do vaso sanguíneo materno (em) mantendo contato com o trofoblasto (citotrofoblasto) através de ligações celulares. Notar junções do tipo desmossomos (seta). **B-** Célula endotelial de um vaso materno (em) entre o citotrofoblasto (Ct). Barra; 2µm. **C-** Vilosidades do citotrofoblasto (*) presentes na membrana apical das células voltadas para vaso materno (vm). **D-** Citotrofoblasto em atividade, citoplasma com presença de mitocôndrias (m), vacúolos (v) e retículo endoplasmático rugoso (rer). Notar o núcleo desenvolvido do citotrofoblasto (Ct) e o nucléolo evidente (seta). Barra : 5µm.

7 DISCUSSÃO

Assim como os suricatos estudados por Sarah et al (2008), os quatis vivem em sociedade cooperativa na qual o cargo é definido por duas características, sendo uma delas a idade, igualmente aos suricatos, e outra relacionado ao sexo, pois nos quatis, as fêmeas dominam o bando afastando os machos adultos que vivem solitários, os quais se aproximam do bando apenas quando ocorre a época de acasalamento.

O ciclo estral dos *Nasua nasua* varia de acordo com o ambiente e temperatura do local onde eles habitam, no período de coleta no Rio Grande do Sul na Universidade Luterana Brasileira ULBRA estes animais reproduziam durante os meses de dezembro a janeiro, já no Parque das Magabeiras em Belo Horizonte onde foi realizada a aquisição do material os animais inciam sua gestação em junho e julho e tem seu período de prenhez em agosto e início de setembro.

A placenta em estágio de implantação foi descrita evidenciando o início das modificações no corno uterino para a recepção do blastocisto, que posteriormente daria origem a placenta assim como Oliveira descreve em 2006, no mocó e Kanashiro et al 2009 em capivaras em animais silvestres.

Em relação à placenta durante o terço médio de gestação, foi possível identificar as membranas extraembrionárias que constituem o elo de comunicação materno-fetal e, posteriormente formarão a placenta. Conseguiu-se identificar o saco coriônico, o alantoide, o âmnio e o saco vitelino assim como Wolf et al (2003), descreve a formação placentária em bovino.

Junqueira e Carneiro (2004) afirmam que por se tratar de um órgão responsável pelas trocas fisiológicas materno-fetais, a placenta é um órgão transitório que possui células de dois indivíduos diferentes. Na Zona de Junção e labiríntica na placenta dos quatis são evidentes estas características por meio de reações imunohistoquímica, no endométrio materno e suas glândulas endometriais marcadas pela vimentina e as células do epitélio coriônico fetal sendo marcadas por citoqueratina que marca citoesqueleto celular fetal.

Com relação as membranas fetais que formam a placenta completa é possível identificar as características que nos possibilitou classificar a placenta como corioalantoideana aonde vimos a sobreposição e junção do cório com o alantoide na maior parte da superfície placentária podendo defini-la desta maneira seguindo os estudos preconizados por Leiser e Kaufmann (1994), Carter et al (2004).

Pela sobreposição dos tecidos, observada pela microscopia eletrônica de transmissão foi possível visualizar o citotrofoblasto o sinciotrofoblasto e visualizando as células fetais do trofoblasto se unindo formando um sincício (célula multinucleada) e fagocitam o epitélio uterino até chegarem ao endotélio do vaso materno assim como descrito por Leise e Kaufmann (1994) e Carter et al (2004).

Apesar de não conseguir identificar a data precisa como foi o caso de Barone (1976) ao descrever a placenta dos carnívoros, foi possível identificar e classificar igualmente a ele todas as características de uma placenta de carnívoro que é uma placenta zonária, endoteliocorial e labiríntica.

Uma das principais características da placenta dos carnívoros é a presença de hematomas na borda e na parte central da placenta. Assim como todos os membros desta Ordem, foi possível observar o hematoma placentário, grandes ou pequenas hemorragias que variam de tamanho e posição. Nos quatis foi possível visualizar um grande Hematoma central e pequenos Hematomas marginais em algumas regiões da cinta placentária assim como Amoroso descreve em 1952.

A forma macroscópica do saco vitelino foi de fácil visualização tendo um formato de “T” invertido decorrendo numa direção perpendicular a cinta placentária esta característica de formato de foi descrita anteriormente por Mossman (1987).

Foi observada uma estrutura similar à descrita por Creed e Biggers (1963) que ao estudar os aspectos da estrutura placentária em guaxinins (*Procyon lotor*), mostraram que, além de todas as características peculiares a Ordem dos carnívoros, esta em especial possui uma característica não usual que é a presença de uma grande estrutura vascular de dimensões macroscópicas, as quais emergem do centro placentário e antimesometrial. Essa estrutura que foi definida pelos mesmos como de órgão hemófago. Esta mesma estrutura encontrada em outras famílias como nos onívoros como morcegos estudados por Carter et al (2004) nos mostrou acúmulo de ferro e sangue com as técnicas de coloração de PEARLS onde visualizamos facilmente cristais de ferro e glicoproteínas que foram demarcadas com

reação de PAS positivas indicando a presença de glicoproteínas na região do órgão hemófago.

Pelo fato da placenta ter sido coletada próxima ao final da gestação características estas possíveis de ser afirmadas pela quase formação completa do feto que já possuía pelagem e garras, e pela presença deste órgão Hemófago que se apresentou na placenta coletada pode-se afirmar que esta gestação estava no seu terço final. Creed e Biggers (1963) afirmam que este órgão se apresenta durante o segundo terço da gestação e é absorvido próximo ao terceiro quarto da gestação.

Através de algumas técnicas histológicas a coloração de PEARLS o PAS e o tricromio de masson foi possível observar varias características dos tecidos na região do órgão Hemófago foi PAS positiva, indicando uma grande quantidade de glicoproteínas e, com a coloração de PEARLS, foi evidenciada a presença de cristais de ferro, um dos constituintes da hemoglobina, evidenciando assim parâmetros que permitem dizer que este órgão hemófago pode desempenhar um papel especial nas trocas materno-fetais (pela presença dos cristais de ferro), apresentando um conceito de ser órgão extra-fetal digestivo (presença das glicoproteínas no PAS) com um complexo mecanismo de substâncias, assim como descrito por Creed e Biggers (1963).

O anel placentário em quatis se mostrou labiríntico assim como os achados de Grosser (1909). Foi observada uma grande quantidade de pequenos vasos (capilares nas lamelas labirínticas assim como Grosser cita a infiltração dos capilares maternos no final da gestação. Este também afirma que os guaxinins possuem barreira endoteliocorial a mesma barreira encontrada na espécie estudada neste trabalho. No Órgão Hemófago não foi possível visualizar a barreira placentária.

Ao analisar a barreira placentária através da microscopia eletrônica de transmissão observou-se a barreira materno-fetal como endoteliocorial, em algumas áreas foi visualizado o sinciotrofoblastoadjacente ao endotélio materno, assim como a descrição feita por Anderson (1969) e Dantzer (1999) e Enders et al. (1998).

Nos quatis observou-se um grande hematoma placentário central e pequenos hematomas marginais diferente dos descritos por Amoroso (1952) que caracterizou na placenta de carnívoros a presença de dois hematomas marginais, os quais nos caninos são grandes e volumoso, fáceis de serem observados a olho nu, dispostos regularmente ao longo das margens das zonas paraplacentárias.

A grande quantidade de cristais de ferro no hematoma placentário, característica esta presente na hemoglobina sanguínea sugere que o hematoma placentário resulta de um grande extravasamento de sangue placentário no terço final da gestação, assim como as zonas hemófagas estudadas por Dantzer (1999) que descreve esta área localizada na zona paraplacentária, resultante do extravasamento de sangue materno, o que parece ser mais distinto no final da gestação.

São visualizadas as células epiteliais cúbicas marcadas com citoqueratina, geralmente nos carnívoros as células epiteliais são colunares, diferentemente das demais descritas em outros trabalhos. A citoqueratina marca em geral o citoesqueleto celular nas células epiteliais (mucosas e glândulas),

Outra maneira de se classificar a placenta destes animais é quanto a barreira interhemal assim como na maioria dos animais da Ordem Carnívora a placenta dos *Nasua nasua* tem todas as características de placenta endotelicorial a invasão do blastocisto mais profundamente no trofoblasto ocorrendo um contato íntimo com o endotélio materno, os vasos maternos envolvidos pelo sincício e citotrofoblasto além de em algumas áreas serem observadas uma cinta trofoblástica, estas características são descritas também por Leiser e Kaufman (1994) ao estudarem a placenta de gatas.

A disposição do sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto, células que estão ao seu redor e organelas celulares nos tecidos que as envolvem ou estão circundados pela mesma como os vasos maternos e fetais possuem semelhantes características aos achados por Barrau et al. (1975) no 26º dia de gestação em Beagles.

O saco vitelino dos quatis assim como nos demais carnívoros estudados anteriormente se apresentou em formato de “T” invertido, tendo início junto ao cordão umbilical, assim como na descrição feita por Miglino et al (2006) onde os autores descreveram o saco vitelino de forma semelhante em cães e gatos, com o alantoide avascular bem próximo ao mesmo. O tamanho do saco vitelino não foi tão proeminente quanto os achados de Miglino et al (2006), isto pode ter ocorrido devido a idade gestacional ser diferente entre os trabalhos. Outra característica comum entre os trabalhos foi a vascularização encontrada no saco vitelino onde as pontas do “T” invertido eram bem prolongadas e irrigadas.

Na microscopia eletrônica de transmissão visualizou-se uma invasão mais profunda, o trofoblasto chega a um contato íntimo com o endotélio maternal. É

formada uma placenta endoteliocorial também descrita desta forma por Leiser e Kaufmann (1994).

Tanto na microscopia eletrônica de transmissão como na de varredura visualizamos inúmeros capilares irrigando a área lamelar labiríntica, nos relatos de Grosser (1909) este fato é observado e descrito como uma invasão progressiva dos capilares fetais e maternos no decorrer da gestação, como so possuímos uma única idade gestacional não podemos concluir que, nos Quatis esta invasão seja progressiva, mas pela grande quantidade de vasos encontradas nas lamelas do labirinto placentário podemos indicar que o mesmo fato pode estar ocorrendo nesta espécie.

8 CONCLUSÕES

Filogeneticamente assim como os demais procionídeos estudados anteriormente, os Quatis têm no seu ligamento ovariano, e hematoma placentário características similares aos felídeos, o que leva a refletir se sua classificação como ramo dos canídeos na árvore filogenética em uma classificação correta.

Após analisar macroscopicamente e microscopicamente a placenta dos Quatis (*Nasua nasua*) pode-se concluir que a placenta destes animais pode ser classificada como:

Uma placenta Corioalantóide em relação a área de junção materno fetal, pois a membrana corioalantóide esta ligada à circulação fetal pelos vasos alantóicos, E Zonária Anelar Completa pois a cinta placentária forma um anel ininterrupto ao redor do embrião com íntimo materno fetal. Lamelar e labiríntica quanto ao modelo de interdigitação materno fetal onde vemos pregas complexas com múltiplas ramificações característica esta visível aos carnívoros, mas entremeadas com seu corion sendo penetrado por lacunas e canais muito vista em animais insetívoros. E uma placenta Endoteliocorial onde viu-se um íntimo contato do trofoblasto como endotélio materno (sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto), além de possuir um Órgão Hemófago., características essas todas comuns aos carnívoros e aos animais que se alimentam de insetos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. *In*: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6 ed.. São Paulo: Manole. 1995.p. 217-240.

ALVES-COSTA, C. P., e ETEROVICK, P. C.. Seed dispersal services by coatis (*Nasua nasua*, Procyonidae) and their edundancy with other frugivores in southeastern Brazil. **Acta Oecologica**, v. 32, 2007. p.77-92,

AMBRÓSIO, C.E.; MIGLINO, M.A. Morfofisiológica da placenta canina, *Canis familiaris*, Linnaeus, 1958. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, 2001. p.164-167.

AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; BONATELLI, M.:SILVA, W. M.. Estudo anatômico das artérias e veias do funículo umbilical, sua ramificação e disposição na placenta de gatos (*Felis cattus domesticus*, l. 1758). *In*: Congresso de integração da morfologia luso-brasileira, 2000, Goiânia.

AMBRÓSIO, C.E.; MIGLINO, M.A.; CARVALHO, A. F.; MARTINS, J.F.P.; OLIVEIRA, M.F.; MARTINS, D.S.; FERREIRA, G.J.B.C.: Estrutura funicular, vascularização e morfologia placentária em cães e gatos (*Canis familiaris* e *Felis catus*), Linnaeus, 1958. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, 2002, p.99-101.

AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; LIMA, A, R.; MARTINS, D.S.; ASSIS-NETO, A. C.; BONATELLI, M.; VERECHIA, F.T.; CARVALHO, A.F. Fissura placentária em gatas SRD, *Felis catus*- Linnaeus, 1758. Aspectos macro e microscópicos. **Brazilian Journ of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n.2 , 2004, p 81-85.

AMOROSO, E. C. Alanto-chorionic differentiations in the carnivora. **Journal Anatomy**, 86, 1952, p. 481-482.

AMOROSO E, C.; Placentation. *In*: Parkes AS (ed) Marshall's physiology of reproduction, Longmans Green, London, vol 2, cap 15. 1952, p 127–311.

ANDERSON, J. W.: Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog. I- The placental labyrinth. **Anatomical Record**, v. 165, 1969, p.15-36.

BARONE, R. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome troislème. **Splanchnologia**, fascicule II, 1976. p. 453-496.

BARRAU, M. D.; ABEL JR., J. H.; TORBIT, C. A.; TIETZ JR., W. J.: Development of the implantation chamber in pregnant bitch. **The American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 143, 1975, p. 115-130.

BEISIEGEL, B. M.. Notes on the coati, *Nasua nasua* (Carnívora: Procyonidae) in Atlantic Forest area. **Brazilian Journal of Biology**, v 61, n.4: 2001, p689-692.

BENIRSCHKE, K. Coatimundi Disponível em <http://placentation.ucsd.edu/lionfs.htm>. Acesso 15 de abril 2009.

BJÖRKMAN, N. **An atlas of placental fine structure**. London: Baillière tindall, 1970.

BOJRAB, M. J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1996. p. 591-596.

CÂMARA, T.; MURTA, R.. **Mamíferos da Serra do Cipó**. PUC, Belo Horizonte, Minas Gerais 2003 p. 60.

CARTER, A.M.; CROY, B.A.; DANTZER, V.; ENDERS, A.C.; HAYAKAWA, S.; MESS, A.; SOMA, H. Comparative aspects of placental evolution: A workshop report. **Placenta**, v. 21, 2007. p129-132

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C.; KÜNZLE, H.; ODUOR-OKELO, D.; VOGEL, P. Placentation in species of phylogenetic importance: the Afrotheria. **Animal Reproduction Science**. 82-83., 2004. p. 35-48

CREED, R. F. S.; BIGGERS, J. D. Development of the racoon placenta **American Journal of Anatomy**, v. 113, , 1963. p.429

CREED, R. F. S.; BIGGERS, J. D. Placental haemophagous organs in the Procyonidae and Mustelidae. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 8, 1964 p. 133-137.

CREED, R. F. S.; BIGGERS, J. D. Some aspects of placental structures in the raccoon (*Procyon lotor*). **Journal of Anatomy**, v. 97, 1963.p. 475,

CREED, R. F. S.; BIGGERS, J. D. Two morphological types of Placentae in the raccoon. **Nature**, v. 194, 1962, p.103-105

DANTZER, V. Endotheliochorial placentation. In: Knobil, E.; NEILL, J. D. **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press, v.1, 1999, p. 1078-1084.

DANTZER, V.; LEISER, R.; KAUFMANN, P., LUCUHARDT, M. Comparative morphological aspects of placental vascularization.. Placental vascularization and blood flow . **Trophoblast Reseach**, , v. 3, 1988. p. 235-260.

DAVIES, D. V. The fetal membranes of the weddell seal (*leptonychotes weddell*). **Journal of Anatomy**, v. 84, 1950.p. 408,

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 2ª ed. Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1997 p 663.

EMMONS, L. H., e FEER, F.. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. Chicago: University of Chicago Press. 1997

ENDERS, A.C., BLANKENSHIP, T.N., CONLEY, A.J. AND JONES, C.J.P.: Structure of the midterm placenta of the spotted hyena, *Crocuta crocuta*, with emphasis on the diverse hemophagous regions. *Cells Tissues Organs* 183, 2006. 141-155

ENDERS, A.C., BLANKENSHIP, T.N., LANTZ, K.C. AND ENDERS, S.S.: Morphological variation in the interhemal areas of chorioallantoic placentae. A review. *Trophoblast Res.* 12: 1998.p1-19,

GHETHER, B. M.; FRIESS, A.E.; STOFFEL, M. H.; The glandular chamber of the placenta of bitch in the second third of pregnancy (day 30-44): an uktrastructural, ultrahistochemical and lectinhistochemical investigation. **Anatomia, Histologia, Embriologia**, v. 27, 1998. p. 95-103

GOMPPER, M. E.. Foraging costs and benefits of coati (*Nasua narica*) sociality and associativity. **Behavioral Ecology**,v7, 1996: p. 254-263.

GOMPPER, M. E. Correlations of coati (*Nasua narica*) socialstructure with parasitism by ticks and chiggers. In: Sánchez-Cordero, V. e Medellín, R.A. (ed.). **Contribuciones Mastozoológicas en Homenaje a Bernardo Villa**. Instituto de Biología e Instituto de Ecología, UNAM, Cidade do México, México, 2004.p.527-534.

GOMPPER, M. E.; GITTLEMAN, J. L.; WAYNE, R. K.. Genetic relatedness, coalitions and social behavior of white-nosed coatis, *Nasua narica*. **Animal Behavior**, v 53: 1997, p781-797.

GOMPPER, M. E.; GITTLEMAN, J. L.; WAYNE, R. K.. Dispersal, philopatry, and genetic relatedness in a social carnivore: comparing males and females. **Molecular Ecology**, v7 (2): 1998, p157-63.

GRETHER, B.M.; FRIESS, A. E.; STOFFEL, M.H.: The glandular chambers of the placenta of the bitch in the second third of pregnancy (day 30-44): An ultrastructural, ultrahistochemical and lectinhistochemical investigation. **Anatomia, Histologia, Embriologia**, v. 27, 1998, p. 95-103.

GROSSER, O. **Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der ciahaute und der Placenta**. Vienna: W. Brau-Muller, 1909.

GROSSER, O. Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Eihäute und der Placenta. Braumüller, Wien Leipzig, 1909, p 1–314

GULAMHUSEIN, A. P.; BECK, F. Development and structure of extra-embryonic membranes of ferret. A light microscopy and ultrastructural study. **Journal of Anatomy**, v. 120, 1975, p. 349-365.

HODGE, S. J; MANICA, A; FLOWER, T. P.; CLUTTON-BROCK, T. H. Determinants of reproductive success in dominant female meerkats. **Journal of Animal Ecology**. v 77, Issue 1, January 2008, p 92–102,

INTERNATIONAL COMMITTEE ON GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinaria**. 4.ed. Zurich, 1994. (Together with nomina histologica , 2.ed., 1992 and nomina embriologica veterinaria, 1992).

JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KANASHIRO, C; SANTOS, T.C; MIGLINO M. A; MESS A. M; CARTER A. M; **Growth and development of the placenta in the capybara (Hydrochaeris hydrochaeris)**. Reproductive Biology And Endocrinology Junho 2009

KEHRER, A. Zur Entwicklung und Ausbildung des Chorions der Placenta zonaria bei Katze, Hund und Fuchs. *Z Anat Entwicklungsgesch* v.143, 1973: p 25–42..

KISO, Y.; YAMASHITA, A.; SASAKI, F.; YAMAUCHI, S. Maternal blood vascular architecture of dog placenta during the second half of ancy. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v. 36, n. 2, 1990. p. 120-126.

KISO, Y.; YAMASHITA, A.; SASAKI, F.; YAMAUCHI, S. Maternal blood vascular architecture of the dog placenta during the second half of pregnancy. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v. 36, n. 2, 1990.p. 120-126.

KREBS, C., WINTHER, H., DANTZER, V, LEISER, R. Vascular interrelationships of near-term Vison placenta: Light microscopy combined with scanning electron microscopy of corrosion casts. **Microscopy Research and Techniques**, v. 38, 1997. p. 125-136,

LARGE, E. K.: A evolução dos cães. **National Geographic-BRASIL**, Ed. Abril, v.1, 2002. p. 34 –57.

LEISER, R.; ENDERS, A.C. Light and electron microscopy study of the near-term paraplacenta of the domestic cat II. Paraplacental hematoma. **Acta Anatomica (Basel)**, v.106, n.3, 1980, .p.312-26.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure in a comparative aspect. **Experimental Clinical Endocrinology**. v. 102, 1994. p.122-134.

LEISER, R.; KOHLER, T. The blood vessel of the cat girdle placenta. Observations on carrion casts, scanning electron microscopical and histological studies. **Anatomy and Embryology**, v. 170, 1984. p. 210-216.

LEISER, R.; KOOB, B.: Development and characteristics of placentation in a carnivore, the domestic cat. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 266, 1993, p.642-656.

LIM, B. K.; ENGSTROM, M.D.; OCHOA, J.G. **Preliminary checklist of the mammals of Guiana Shield (Venezuela: Amazonas, Bolívar, Delta Amacuro; Guyana; Surinam; French Guiana)**. Smithsonian Institute. Disponível em <<http://www.mnh.si.edu/biodiversity/bdg/shieldmammals/index.html>> Acesso em: 09 de maio de 2006.

MIGLINO MA, AMBROSIO CE, MARTINS DS, PFARRER C, LEISER R. The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, v.66, 2006, p.1699-1702

MORTON, W.R.: Placentation in the spotted hyena (*Crocuta crocuta* Erxleben). J. Anat. V. 91: 1957. p. 374-382,

MOSSMAN, H. J. W. **Vertebrate fetal membranes**. New Brunswick: Rutgers University Press, 1987. p. 251-255.

MOSSMAN, H.W.: Vertebrate Fetal Membranes. MacMillan, Houndmills, 1987.

ODUOR-OKELO, D. and NEAVES, W.B.: The chorioallantoic placenta of the spotted hyena (*Crocuta crocuta* Erxleben). Anat. Rec. v 204, 1982. p.215-222

OLIVEIRA, F.S.; TONIOLLO, G.H.; MACHADO, M. R. F.; PAURA, D:Hemi-ovariossalpingohisterectomia em pacas prenhes e posterior ocorrência de prenhez (Agouti, paca, Linnaeus, 1766). **Ciência Rural**, v.33, n3, 2003, p547-551.

OLIVEIRA, M. F.; CARTER, A. M.; BONATELLI, M.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. **Placentation in the rock cavy, *Kerodon rupestris* (Wied). Placenta (Eastbourne)**, Reino Unido, v. 27, n. 1, 2006, p. 87-97.

ORR, R. T. 1986. **Biologia dos Vertebrados**. 5. ed. Roca, São Paulo, Brasil, 508pp.

PERRY, J. S. The mammalian fetal membranes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, 1981, p. 321-335.

PFARRER, C.; WINTHER, H.; LEISER, R.; DANTZER, V.: The development of the endothelical Vison placenta: light microscopy and scanning electron microscopical morphometry of maternal vascular casts. **Anatomy and Embriology**, v. 199, 1999, p.63-74.

PRYSTOWSKY, H. M.D. Physiology of the Placenta **Annual Review of Medicine** v. 12: February 1961, p. 281-288.

RUSSEL, J. K.. Timing of reproduction by coatis (*Nasua narica*) in relation to fluctuations in food resources. In: LEIGH JR., E. G.; RAND, A. S. e WINDSOR, D. M. (ED.). **The ecology of a tropical forest**. 2.ed. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, 1996, p.413-431.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias**. Brasília: MMA, UFPE, p 382 2004

SINHA, A. A.; MOSSMAN, H. W. Placentation of the sea otter. **American Journal of Anatomy**, v. 119, 1966, p. 521,

STOFFEL, M.H., GILLE, U., FRIESS, A.E. Scanning electron microscopy of the canine placenta. In: MOTTA, P. M.: **Progress in clinical and biological research: new trends in microanatomy of reproduction**. New York: Alan Liss,. V. 103, n. 4,1998. p.291-300.

YAYOI I, KAZUMI T, MAKOTO A SHIN-ICHI HAYAMA Reproductive Characteristics of Feral Raccoons (*Procyon lotor*) Captured by the Pest Control in Kamakura, **Japan Journal of Veterinary Medical Science** Japanese Society of Veterinary Science 71(11), 2009, p.1473-1478,

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G.. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Manole, São Paulo, Brasil, 2. Ed, 2003,p331.

WOLF, E.; BAUERSACHS, G. J. A.; BEIER, H. M.; BLUM, H.; EINSPANIER, R.; FROHLICH, T.; HERRLER, A.; HIENDLEDER, S.; KOLLE, S.; PRELLE, K.; REICHENBACH, H. D.; STOJKOVIC, M.; WENIGERKIND, H.; SINOWATZ, F. Embryo-maternal communication in bovine – strategies for deciphering a complex cross talk. **Reproduction in Domestic Animal**, v.38, 2003. p. 276-289,

WYNN, R.M., AMOROSO, E.C.: Placentation in the spotted hyena (*Crocuta crocuta* Erxleben), with particular reference to the circulation. *Amer. J. Anat.*, v115: 1964, p327-362.

WYNN, R.M., HOSCHNER, J.A. and ODUOR-OKELO, D.: The interhemal membrane of the spotted hyena: an immunohistochemical reappraisal. *Placenta* v. 11, 1990, p215-221.

ZELLER, U.. Mammalian reproduction: origin and evolutionary transformations. **Zoologischer Anzeiger**, **238** (1-2): 1999, p 117-130.

ZEUNER, F.E.: A history of domesticated animals. Hutchinson e Company LTD, London, 1.ed. 1963, p. 79-111.

ZHEMKOVA, Z.P.: The use of sex chromatin in identifying embryonic and maternal tissues in the placenta: New observations on the haemochorial nature of the cat placenta. J. Embryol. Exp. Med. v10, 1962. p.127-139,

Endometrial behaviour of *Coati (Nasua nasua)*

MORINI JUNIOR, João Carlos¹; FAVARON, Felipe Oliveira¹; MORINI, Adriana Caroprezo¹; FRANCIOLLI, André Luis Rezende¹; MARTINS Daniele dos Santos¹; MIGLINO, Maria Angélica¹; AMBRÓSIO, Carlos Eduardo^{1,2}

¹ Faculty of Veterinary Medicine - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, ² College of Animal Science and Food Engineering - USP Pirassununga, SP, Brazil

jcmorini@gmail.com

Introduction

Two species of coatis, *Nasua narica* and *Nasua nasua* lives from Arizona to Argentina. Coati (*Nasua narica*) and racoon placentation have been observed, but less information is available about *Nasua nasua*. These aspects are important to be studied for comparative placentation especially with another carnivore species. This study focuses on the characteristics of the uterus that was supposedly pregnant obtained from UNIFEOB trial center, Sao Paulo, Brazil.

Methodology and results

The possible pregnancy was done because of a less increase of one of the horns and also the presence of corpus luteum at the ovary of the same side. Tissues were fixed in 10% formaldehyde and prepared for light microscopy and immunohistochemistry by standard procedures. The bicornual uterus was composed by perimetrium, myometrium, and endometrium.

At the myometrium were found a large number of vessels strongly stained by vimentin. Two distinct arrangement of muscle cells were observed at this layer, one circular and other longitudinal separated by vessels. The endometrium consists in a simple cuboidal epithelium with numerous glands with high activity of secretion. Those glands and the endometrium layer of the lumen present cytoqueratin positive stain at its cytoplasm. As we know, cytoqueratin was expressed at the cytoskeleton of trofoblast cells, but it was found at the lumen of endometrial gland cells, however, a disorganized area was found related to embryo site of implantation. The embryo cannot be found, and because of it we cannot confirm the gestation, but the high activity of the uterine glands its rearrangement more deep and the positive stain of cytokeratin gave us evidence that the maternal environment was prepared for the embryo attachment as know in domestic carnivores.

Figure A represent the uterus in Coati (*Nasua nasua*), this uterus consists of two horns, a body (C), infundibulum (In), funnel (Am) and broad ligament (Lj). Observed in B endometrium (ed), myometrium (mi) and area of implantation (*). Figure C shows the region of implantation in the uterus enlarged to better visualization. Figures C and D show histological slides stained with vimentin where the simple cubic trophoblastic (Ec) epithelium and marked on the cellular skeleton (Black arrow). In F show the negative control of the C and D the same area and not marked (red arrow). In G we have the vessels stained with cytokeratin and demonstrating marked the beginning of the blood supply, and finally H is a blade in the same area where vessels demonstrates the negative control.

Endometrial alterations, early placentation and maternal fetal interaction in carnivores

Alterações endometriais da placentação inicial e interação materno-fetal em carnívoros

C.E. Ambrósio^{1,5}, M.P. Brolio², D.S. Martins¹, J.C. Morini Jr², A.F. Carvalho³, M.A. Miglino²

¹Department of Basics Sciences, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of Sao Paulo (FZEA-USP), Pirassununga, SP, Brazil,

²Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo (FMVZ-USP), Sao Paulo, SP, Brazil

³Laboratory of Morphology, University Center of Foundation of Education Octavio Bastos (UNIFEOB), São João da Boa Vista, SP, Brazil.

⁴Corresponding author: ceambrosio@usp.br

Abstract

The canine and coati morphology of the endometrial glands during different phases of the estrous cycle and begin of pregnancy were compared; thus evaluating morphological alterations related mainly to endometrial chambers and microvessels distribution. We aimed to analyze a triad of uterine components and their morphophysiological features that were the disposal of the endometrial glands, microvascular net and relation with begin of gestational period and their morphological alterations for blastocyst/embryo reception. We can consider that canine endometrial glands follow demarcated alterations of the lumen to adjust it to the period of the estrous cycle. A bleeding process was followed among endometrial tissue. A capillary network reflects to the period of the estrous cycle, either with microvascular increases for estrous and diestrus or regression compared with proestrus highlighting the reduction of future hemorrhage that proceeds this estrous period. Endometrial glands delimit the trophoblast invasion when compared as no altered morphology related to the deeper endometrial glands. We stand out the extreme importance of the microvascular net (spirals artery) and the structural behavior of the endometrial glands since it begins to make possible the pregnancy confirmation in the type of endotheliochorial placenta and embryo implantation inside the lumen.

Keywords: canine, coati, endometrium, estrous cycle, morphology, pregnancy.

Resumo

A morfologia endometrial de caninos e quatis durante diferentes fases do ciclo estral e começo de gestação foi comparada e suas alterações e evoluções morfológicas foram descritas principalmente quanto às câmaras endometriais e à distribuição de microvasos. Foram estudadas uma tríade de componentes uterinos e suas características morfofisiológicas, as quais são a disposição das glândulas endometriais, sua rede microvascular e as relações com o início da prenhez e suas alterações quanto à recepção do blastocisto/embrião. Pode-se considerar que as glândulas endometriais seguem alterações evidentes do lúmen em ajuste a cada ciclo estral. O processo de sangramento foi acompanhado no tecido endometrial. A rede capilar reflete a cada período também, tanto com aumento microvascular no estro e diestro quanto para regressão destes no proestro, tornando evidente a redução do sangramento que se segue após a fase do estro. As glândulas endometriais superficiais delimitam a invasão do trofoblasto quando comparadas às profundas, que são inalteradas morfológicamente. Enfatizou-se a importância da rede microvascular (artérias espirais) e o comportamento estrutural destas glândulas, as quais podem tornar possível a confirmação de gestação em relação a este tipo de placenta, endoteliocorial, e a implantação do embrião no lúmen uterino.

Palavras-chave: caninos, ciclo estral, endométrio, gestação, morfologia, quati.

Introduction

The canine reproductive aspects possess some characteristics that cannot be seen in other mammals; for example: monogamy, pseudopregnancy and delayed ovulation. In the canine female, the manifestation of the endocrines events during the estrous cycle follows a particular standard. Specific aspects until now partially elucidated, as the expression or inhibition of hormones in the phases of the cycle and during moments of transition between these phases are poorly commented in literature. The main function of the uterus is gestational, to guarantee the complete development of new individuals (concepts) until the birth (gestation the term). In accordance with the phase of the estrous cycle, or gestation, some substances as the prostaglandins and secretions of the endometrial glands are produced by this organ, allowing its correct physiological activity. For Rodrigues and Rodrigues (2002), the mechanisms of regulation, secretion and hormonal interactions responsible

for changes which trigger or occur during the estrous cycle in dogs has been the target of a significant number of experiments. Many specific aspects of the estrous cycle of the bitch has not been revealed, and old concepts are being reviewed because the universe of canine reproduction should be better studied. A century ago, Turner (1876) noted that the openings of uterine glands were located in areas of the endometrium, with a similar pattern of blood vessels. Studies of Tsutsumi (1962) produced confirmatory evidences. Davies (1950) examined eight uteri containing embryos seal with a diameter less than 6mm and a length of 180mm and found that in the early stage there is marked increase in activity of the uterine glands, coinciding with the formation of crypts on the surface of the endometrium comparable to bitch. At this stage, no trace of the obliterated umbilical vein or calf-intestinal bag was verified. MacDonald (1976) studied the uterine vascularization of pregnant sows by electron microscopy. Through catheters, injected colored latex into the arteries and veins of sixteen pregnant uteri obtained from sows at various stages of pregnancy. The study of molds obtained indicated that in early pregnancy, the capillary network that serves the preliminary transversal fold of the membrane of the uterine mucosa was composed of parallel layers of low sulci and vascular gutters. Ambrósio and Miglino (2001) and Miglino et al., 2006 studied the exchange systems of maternal-fetal placenta at term of mongrel bitches about their vascular aspects through anatomy macro, microscopic and scanning electron microscopy. The vascularization of this organ is performed by funicular vessels, arteries and veins, which are distributed in the middle third of the umbilical cord emitting two branches to each placental side, a placental central branch and another branch as placental chorionic one.

Materials and Methods

Animals

For this research were used uteri of 34 bitches that were divided into the following phases of the estrous cycle: 7 uterus in proestrus phase, 7 uterus in diestrus phase, 12 uterus in anestrus phase, 4 uterus in estrus phase and 4 uteri of bitches in early gestation. All uteri were obtained by ovariohysterectomy. One pregnant uterus at begin of pregnancy from a coati was collected by the same surgical procedure at CECRIMPAS (Center of Raised and Preservation of Wild Animals) at São João da Boa Vista, UNIFEOP.

Cycle determination

Vaginal cytology was performed on each bitch, moments before ovariohysterectomy, to check their estrous cycle phase. The vaginal samples were collected according to the techniques indicated by others authors (Evans and Cole, 1977; Jöchle and Andersen, 1977; Feldman and Nelson, 1997).

Light microscopy

The uterus had their vessels perfused with an aqueous solution of 4% paraformaldehyde and subsequently sectioned. Preparations were fixed with the same solution with a pH of 7.3. The blocks were dehydrated with series of alcohols with increasing concentrations (70-100%) and diaphanized in xylol followed by inclusion in Paraplast (Paraplast Embedding Media-Paraplast Plus, Oxford Lab, USA) and sectioned in a Polyartmicrotomo (Leica). The stainings performed for evaluation of uterine histology were hematoxylin eosin and Sirius Red photomicrographs were taken (Nikon Eclipse E-400) for processing of the results.

Scanning electron microscopy

The vessels of fresh uteri were injected with Mercor (methyl methacrylate). The molds were immersed in water for about 24 hours to complete the hardening of Mercor. Subsequently they were submerged in a solution of 15% NaOH and distilled water at a temperature of 60° C to complete the technique of corrosion. These molds were washed for several days in distilled water and liquid soap (neutral Extram) and dried in an incubator. After this procedure, the molds were fragmented under stereoscopic lenses and mounted on aluminum base (stubs) with carbon cement. They were covered with gold (3 nm) and examined by scanning electron microscope Zeiss - LEO located at ICB - Institute of Biological Sciences at USP. To visualize the lumen of pregnant uterus between 0-20 days of gestation, the protocol was different, without injection of methyl methacrylate, therefore was followed by the fragmentation of the uterine horns and then submerged in 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer for fixation. After 48 hours fixation, the material was washed three times in 0.1 molar phosphate buffer (pH 7.4) for 10 minutes, totaling 30 minutes of immersion. The material was post fixed in osmium tetroxide for 2 hours and again washed three times in 0.1 molar phosphate buffer (pH 7.4) for 10 minutes. Dehydration occurred in batteries of 15 minutes with increasing concentrations of alcohol (50, 70, 80, 90 and 95%) passing subsequently in absolute alcohol for 15 minutes four times. The critical point was obtained by the equipment (CPD 020 - Balzers) UNION, where all the alcohol was removed from the material leaving it completely dry for the metallization with gold. As a final stage

of processing, the samples were fixed on stubs of aluminum with carbon glue, and left in incubator for 12 hours for drying and subjected to bathing gold in sputter (Emitech - K 550). The analyses of electron micrographs were performed in a scanning electron microscope (LEO - 435 PV).

Results

Light microscopy: uterine histology

In early anestrus, crypt regions still exist, but these were composed only of epithelial cells and its stroma was rare or absent. Columnar epithelium cells were still hypertrophic with picnotic nucleus in several cells, while the cytoplasm was, in many cells, replaced by foamy vacuoles. At the beginning this estrous phase was possible to find endometrial glands with different characteristics: most of these glands presented rectilinear shape, but there were several with curvilinear appearance suggesting the end of progesterone phase (Fig. 1A and B).

Figure 1. Photomicrograph of a canine uterus in anoestrus. The endometrium has actually regressed, it is fine, but many glands are still very curvy and have secretions (arrows). Increases: A - 4x B - 20x. H.E. Stain - Hematoxylin and Eosin.

The endometrium of animals in the middle of this stage was covered with a layer of simple cubic surface epithelium. In late anoestrus, epithelial surface was formed by simple cuboidal cells with large and round nuclei (Fig. 2A and 2B).

Figure 2. Photomicrograph of the uterus of a bitch during anoestrus, two months postpartum. We observed some glands without secretion (g) and the cuboid luminal epithelium is altered, showing cellular disorganization (arrow). Increases: A - 10x B - 20x. H.E. Stain - Hematoxylin and Eosin.

The proestrus is characterized by endometrial growth, so the endometrium at this stage of estrous was thicker and the luminal epithelial cells became columnar. The endometrial glands increased in size, became more linear (Fig. 3), indicating that they were under the influence of estrogen (arrows). Glandular secretions were absent or rare and in tiny quantities.

Figure 3. Photomicrograph of transversal cross section of canine uterus at proestrus. A very thick endometrium and uterine endometrial glands straight, featuring a stage of the influence of estrogen (arrows). Magnification: 4x. H.E. Stain - Hematoxylin and Eosin.

Mitotic figures were observed around the glands or within them, indicating a phase of glandular proliferation (Fig. 4).

Figure 4. Photomicrograph of the same animal from the previous figure, showing the rectilinear shape of the endometrial glands (g) and the presence of mitotic figures. Columnar cells (arrow), erythrocytes (E). Magnification: 40x. H.E. Stain - Hematoxylin and Eosin

Histological examination of the uterus of bitches in estrus showed a general increase in the size of the uterus, the endometrium with a very thick, and large glandular proliferation with highly developed glands (Fig. 5 and 6); The epithelium at this stage presents a cylindrical top. The uterine lumen it is sufficiently diminished in this phase. The connective tissue is characterized by congestion, edema and bleeding.

Figure 5. Photomicrograph of transversal cross of canine uterus in estrus. Note the glandular proliferation and general increase of the uterus with thick endometrium. Endometrial glands (g) vascular layer (v), circular myometrium (Mc), myometrium transversal cross (Mt). Magnification: 4x. H.E. Stain - Hematoxylin and Eosin.

Figure 6. Photomicrograph of canine uterus in estrus, indicating the high degree of development of endometrial glands (g). Magnification: 10x. Stain: H.E. - Hematoxylin and Eosin.

Figure 7. Photomicrograph of a cross section of canine uterus with less of 20 days of pregnancy. Possible area of implantation of the embryo (arrows). Magnification: A - 4x. B - 10x. Stain H.E. - Hematoxylin and Eosin.

Until 17 days of pregnancy, is possible to visualize the implantation site and embryonic body inside the endometrial glands rearrangement (Fig. 7). The endometrial glands become filled with narrow openings to the lumen. The citotrophoblast invasion started following via lumen to myometrium.

The endometrium of animals that were in early to mid-diestrus presented with hyperplastic and dilated, with edematous stroma and blood vessels redness. The endometrial glands were very convoluted with high amount of secretion (Fig. 8).

Figure 8. Photomicrograph of canine uterus in diestrus. There is clearly the degree of maximum development of endometrial glands (*), which are full of secretion, indicating the dominance of progesterone in this phase. The lumen it is very narrow (arrow). Increases: A - B and 4x - 20x. H.E. Stain - Hematoxylin and Eosin.

The endometrial crypts, present since the onset of estrus, were better delineated at the end of this stage, when some cells with picnotic nucleus were already observed. In this phase the endometrium and its glands were fully developed (Fig. 9).

Figure 9. Photomicrograph of the same animal to the previous figure. In "A" overview of the endometrium, totally taken by developed glands (arrows). In "B" glands (*) overdeveloped and filled with secretions. Increases: A - 2.5x and B - 40x. Stain Sirius Red with H.E. base.

Scanning electron microscopy

The microvascular structure of the canine uterus shows accentuated during anestrus, and the envelopment of the arteries of the perimeter is visible as nourishing base for this period of uterine rest. The uterine lumen is uniform and the endometrial glands are placed in sustentation of the endometrium. The microvascular network originates from the spiral arteries that leave the myometrium and penetrate the endometrium. When studying the ultra structure of vascular molds, we distinguish between the arterial and the venous vessels, through the endothelial negative impressions on the same ones. For the description, we consider for the arteries, is: longitudinal impressions and parallel bars, and for the veins, impressions to perhaps; circular and random. The spirals arteries are convoluted and going in direction to the uterine lumen, originating the capillary network. The capillary network during anestrus reveals a reduced bore and a circular and uniform, disposal, which originates from arterioles (Fig. 10A and B).

Figure 10. Scanning electron micrograph of perimytrium vessels and capillary network branching to lumen direction (*), 20X. B: Photomicrography of uterine components in contrast of microvascular ultrastructure with analogy with the microvessels (arrows).

The capillary network during anestrus reveals a reduced bore and obeys a circular and uniform, disposal, which originates from arterioles (Fig. 11).

Figure11. Scanning electron micrography of the spiral artery and it disposition to the uterine lumen. Magnification: 55X.

In the phase of proestrus, the conformation of the vascular network of the perimeter remains similar to anestrus; however we can see a reduction of bore of the arteries spirals (Fig. 12) and a bigger support of venous return.

Figure12. Scanning electron micrograph of pro estrous uterus showing the disposition of perimyrium vessels and spiral arteries origin.

However, when we look at the disposal of the endometrial capillaries during the period of estrous, it is evident the reduction of the bore of the capillaries, in an attempt to prevent any kind of disruption. In this period. The endometrial glands are immersed in a great lake of overflowed blood, watering down the hormone's alterations for the beginning of estrous and its consequent hemorrhage. During the phase of estrous we had some problems with the methylmethacrylate injection, probably due to occurred hemorrhagic region in this phase. We had vast extravasations of the solution that when making solid, presented an amorphous mass after the corrosion of soft fabrics. Different protocols had been made to fulfill the vascular net with the solution, however we had exaggerated by emptying points, we did not have definition of the capillaries. In the period of diestrus the enlargement of the endometrial glands with consequent envelopment of the net was clear. In this phase, the endometrial glands look like a tissue reorganization and renewal vascular or better, revitalization of the endometrium (Fig. 13).

Figure 13. A: Scanning electron micrograph of uterine horn at diestrus with microvascular net disorganized as effect of endometrial glands enlargement (B).

For pregnant, dogs with up to 25 days of gestation, the endometrial glands in analysis of the uterine lumen for scanning electron microscopy (SEM) surface, showing a parallelism between itself (Fig. 14A) and, moreover, they activate secretions; as we can see in the proven histology and in the SEM (Fig. 14B).

Figure 14. A: Scanning electron micrograph of pregnant uterus at begins showing the parallelism among endometrial glands opening (arrow). B: overview of the opened endometrial gland.

Already the microvascular study it shows differentiated of the glands, that present a disposal in “honeycomb” in the extremities of the microvascular arrangements in the region of the uterine lumen. (Fig. 15A). A prolongation of the vessels exists to give support mainly to the beginning of the gestation and to the placenta. (Fig. 15B).

Figure 15. Microvessels disposition at begin of pregnancy in dogs. A: Uterine lumen overview and in B, disposition of the vessels branching to perimetrium.

Wild carnivore's (Coati, *Nasua nasua*) uterine considerations

The possible pregnancy was considered because of a less increase of one of the horns and also the presence of corpus luteum at the ovary of the same side. Tissues were fixed in 10% formaldehyde and prepared for light microscopy and immunohistochemistry by standard procedures. The bicornuate uterus was composed by perimetrium, myometrium, and endometrium (Fig. 16A).

At the myometrium were found a large number of vessels strongly stained by vimentin. Two distinct arrangement of muscle cells were observed at this layer, one circular and other longitudinal separated by vessels. The endometrium consists in a simple cubic epithelium with numerous glands with high activity of secretion. Those glands and the endometrium layer of the lumen present cytokeratin positive stain at its cytoplasm. As we know, cytokeratin was expressed at the cytoskeleton of trophoblast cells, but it was found at the lumen of endometrial gland cells, however, a disorganized area was found related to embryo site of implantation. The embryo cannot be found, and because of it we cannot confirm the gestation, but the high activity of the uterine glands its rearrangement more deep and the positive stain of cytokeratin gave us evidence that the maternal environment was prepared for the embryo attachment as know in domestic carnivores (Fig. 16B-E).

Figure 16. Figure A represent the uterus in Coati (*Nasua nasua*), this uterus consists of two horns, a body (C), infundibulum (In), funnel (Am) and broad ligament (LI). Observed in B endometrium (ed), myometrium (mi) and area of implantation (*). Figure C shows the region of implantation in the uterus enlarged to better visualization. Figures D show histological slides stained with vimentin where the simple cubic trophoblastic (Ec) epithelium and marked on the cellular skeleton (Black arrow). In E show the negative control of the D the same area and not marked (red arrow).

Discussion

In this study, endometrial morphology and microvasculature of dogs at different stages of the estrous cycle and first third of pregnancy were evaluated by histological and scanning electron microscopy. Vaginal cytology were performed in all dogs, moments before the animals were submitted to ovariectomy. Vaginal cytology provides a simple and rapid diagnosis, which occasionally supplies the need for histological examination. The vaginal cytology aimed to assist in confirming the period of the estrous cycle for each female was moments before the surgery. Although many of the consulted authors (Onclin e Vertstegen, 1997; Cain,

2001; De Bosscher et al., 2002) also exalter the importance and exactness of the serum dosage of P4, using this examination as the main way to classify and to divide the animals used in the experiments in groups according the estrous cycle phase; in our study no sanguine sample of the animals was evaluated, therefore our objective was to evaluate and to classify the animals considering only the alterations and morphologic characteristics that were found in the evaluated samples. This objective was reached; therefore the results obtained in the microscopic evaluations of the canine endometrium had been very similar to those ones described by authors who had used hormones dosages in their methodology of research. The morphologic changes of the canine endometrium in estrous and end of diestrus, for example, imply functional mechanisms; the increase in the length and number of the microvillus in the end of estrous can be important for the blastocyst-uterine interaction in the beginning of gestation. In proliferative phase, endometrial cells human beings are differentiated and expressed molecules of adhesion for blastocysts. According to Van Cruchten et al. (2002); if these cells are also present in dogs, they should be important not only for deployment, but also have a role in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia complex. We also consider that morphologic alterations in the canine endometrium during the phases of the estrous cycle are very important in pathogenesis of pyometra. Our conclusions about the disposal of the endometrial glands and its structure had been similar to the discoveries of Elnaeim-Abd et al., 2001 for studies in uteri of asinine during estrous phase. Concerning that we may confirm the real function of these glands for reception of conceptus. They must secrete histotrofo, therefore it is will be the first phase of nutrition to the embryo, the call imbibitions nutrition. When we look at the beginning of the gestation, the conformation of the uterine glands appears as the apposition of citotrofoblast and the blastocist; and its reaction to trofoblastic invasion. Mainly in accordance with the form of the glands, therefore the same ones are the support of origin of the trofoblastic infiltrated one stop in direction to the myometrium. However, Davies, 1950 studying placentas in the beginning of gestation in seals show crypts uterine delimiting the area of placentation and its form, the same salient in our research. However we must take into account the type of placentation in each species and its organization of endometrial tissue for reception of concept, therefore MacDonald and Bosma (1985), by studying pregnant uterus of pigs shows formation of distinct transversal ridges in the uterine light, in reply to its epitheliocorial placentation, although it differs that ones that possess endoteliocorial placenta and with form to lamellar (Ambrósio and Miglino, 2001), however its endometrial glands determine the trofoblastic invasion. No literature in carnivores was found telling the disposal of the endometrial glands, its net to microvasculature and relation with the gestational period, and we can only infer that the study delimited clearly this triad and its morphologic alterations for reception of conceptus.

Conclusions

The canine endometrial glands follow demarcated alterations of via lumen to adjust it into the estrous cycle that if just find the in dogs. A capillary network reflects the period of the estrous cycle, either with microvascular increase for estrous and diestrus, or poor for proestrus, with sights of the reduction of future hemorrhage that proceeds this estrous period. The endometrial glands delimit the trofoblastic invasion. We highlighted the extreme importance of the microvascular network (spiral arterial) and the structural organization of the endometrial glands in the beginning at pregnancy to make possible the confirmation of pregnancy in the canine species of the gestation and uterine alterations. We also show for the first time uterine structure in a wild south America carnivore, Coati, with emphasis to endometrial glands organization and really begin of pregnancy in this specie, compared as similar with dogs, but philogenetically little different.

Acknowledgments

The authors thank FAPESP (Research Foundation of São Paulo State) for the financial support (Process nº 04/12323-0 and 09/51606-0).

References

- Ambrósio CE, Miglino MA.** Morfofisiologia da placenta canina (*Canis familiaris* Lineu, 1798). *Rev Bras Reprod Anim*, v.25, p.164-167, 2001.
- Cain JL.** A logical approach to infertility in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v.31, p.237-245, 2001.
- Davies MDV.** The fetal membranes of the weddel seal (*leptonychotes wedellii*). *J Anat*, v.84, p.408, 1950.
- De Bosscher H, Ducatelle R, Tshamala M, Coryn M.** Changes in sex hormone receptors during administration of progesterone to prevent estrus in the bitch. *Theriogenology*, v.58, p.1209-1217, 2002.
- Elnaeim-Abd MM, Zayed AE, Leiser R.** The blood vasculature as the forming element of the uterus of the estrous donkey (*Equus asinus*). *Ital J Anat Embryol*, v.106, suppl. 2, p.307-316, 2001.
- Evans HM, Cole HH.** An introduction to the study of the estrous cycle in the dog. In: Roszel JF. Normal canine vaginal cytology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v.7, p.667-681, 1977.

- Feldman EC, Nelson RW.** The ovarian cycle e vaginal cytology in the bitch. In: Di Bryden (Ed.). *Internal medicine*. Sydney: The Post-Graduate Foundation in Veterinary Science of the University of Sydney, 1997. p.273-288.
- Jöchle W, Andersen AC.** The estrous cycle in the dog: a review. *Theriogenology*, v.7, p.113-140, 1977.
- MacDonald AA.** Uterine vasculature of the pregnant pig: a scanning electron microscope study. *Anat Rec*, v.184, p.689-698, 1976.
- MacDonald AA, Bosma AA.** Notes on placentation in the Suina. *Placenta*. v.6, p.83-91, 1985.
- Miglino MA, Ambrosio CE, Martins DS, Pfarrer C, Leiser R.** The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. *Theriogenology*, v.66, p.1699-1702, 2006
- Onclin K, Verstegen, JP.** Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with non-pregnant diestrus beagle bitches. *J Reprod Fertil Suppl*, v.47, p.203-8, 1997.
- Rodrigues ÁB, Rodrigues JL.** Endocrinologia reprodutiva na cadela. *Clín Vet*, v.7, n.40, p.50-58, 2002.
- Tsutsumi Y.** The vascular pattern of the placenta in farms animals (horse, pig, cow, sheep and rabbit). *J Fac Agric Hokkaido*, v.52, p.372-482, 1962.
- Turner WM.** *Lectures on the comparative anatomy of the placenta*. Edinburgh, UK: Adam and Charles Black, 1876.
- Van Cruchten S, Van den Broeck W, Simoens P, Lauwers H.** Scanning electron microscopic changes of the canine uterine luminal surface during oestrus and late metoestrus. *Reprod Domest Anim*, v.37, p.121-126, 2002.
-