GUILHERME JOSÉ BOLZANI DE CAMPOS FERREIRA

**Desenvolvimento e adaptação de tecnologia para
obtenção de amostras de material intra uterino
durante a gestação em cães SRD
(*Canis familiares* – Linnaeus, 1758)**

Dissertação 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 a obtenção
do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2005

ID 3449

N.º CLASSIFICAÇÃO
T. 1485
FMVZ e.2
N.º TOMBO
023649

Assmo 1434336
Salvi 1333

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
2/03/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1485
FMVZ

Ferreira, Guilherme José Bolzani de Campos

Desenvolvimento e adaptação de tecnologia para obtenção de amostras de material intra uterino durante a gestação em cães SRD (*Canis familiares* – Linnaeus, 1758) / Guilherme José Bolzani de Campos Ferreira. – São Paulo : G. J. B. C. Ferreira, 2005.
78 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2005.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Biópsia. 2. Cães. 3. Placenta. 4. Bioquímica animal. 5. Líquido fetal animal. 6. Cordão umbilical animal. I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Lê-se
8	1	3	1758): estudo experimental.	1758).
8	1	5	75f. Dissertação (mestrado em	78 f. Dissertação (Mestrado em
9	1	3	1758): an experimental study.	1758).
9	1	5	75f. Dissertação (mestrado em	78 f. Dissertação (Mestrado em

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

PARECER

Interessado: Guilherme José Bolzani de Campos Ferreira

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 585/2004, intitulado: "Desenvolvimento e adaptação de tecnologia para coleta de material fetal em cães SRD (Canis familiares - Linnaeus, 1758", no qual foram utilizados 10 cães, sob responsabilidade da Profª Drª Maria Angélica Miglino, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

Folha de Avaliação

Nome do autor: FERREIRA, Guilherme José Bolzani de Campos

Título: Desenvolvimento e adaptação de tecnologia para obtenção de amostras de material intra uterino durante a gestação em cães SRD (Canis familiares – Linnaeus, 1758)

Dissertação 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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A DEUS

A meus PAIS

A meu IRMÃO

A meus AVÓS

A minha NAMORADA e sua FAMILIA

Aos professores e funcionários da FMVZ/USP

A todas as pessoas que se demonstraram verdadeiros amigos e

A todos os animais que cotribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimento

Agradeço:

A meus PAIS e IRMÃO, Toninho, Maria e Julio, por terem acreditado e confiado em mim nesta nova fase de minha vida

Aos PROFESSORES desta casa por me incentivarem e me mostrarem um novo mundo da pesquisa e da docencia

A Priscilla Peach, que me acompanhou e compreendeu durante esta fase

A minha orientadora, Maria Angélica Miglino, que sempre acreditou em mim

A Marcos Alexandre Ivo, um amigo que sempre esteve presente me ajudando em qualquer coisa que fosse necessária

A meus colegas que sempre me fizeram lembrar que todos nós somos diferentes e que para vivermos bem devemos respeitar cada um como é

Ao Dr. Thomaz e seu assistente Dr. Marcos que ensinaram-me a técnica e sempre estiveram a disposição

A Dr. Mayana Zatz, por ter me recebido em seu laboratorio para a realização dos PCRs

A Toninha e Constancia, do IB que me ajudaram prontamente sempre precisei

A toda a equipe do Laboratrio de ultrasonografia, sem eles nada deste trabalho seria possivel

Aos Funcionários e técnicos da FMVZ/USP, que se tornaram grandes amigos

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente a realizar este trabalho

A FAPESP por ter contribuído para o desenvolvimento deste trabalho (processo nº03/03440-0).

“Simplicidade é a complexidade resolvida.”

(C. Brancusi)

RESUMO

FERREIRA, G. J. B. C. **Desenvolvimento e adaptação de tecnologia para obtenção de amostras de material intra uterino durante a gestação em cães SRD (Canis familiares – Linnaeus, 1758): estudo experimental.** [Development and adaptation of technology for attainment of samples from intra uterine material during gestation in mongrel dogs (Canis familiares- Linnaeus, 1758)]. 2005. 75f. Dissertação (mestrado em Ciências) - Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Foram utilizadas 10 cadelas prenhez (SRD), oriundas de Centros de Controle de Zoonoses de São Paulo e Região, em diferentes estágios de gestação. Os animais foram submetidos a exame clínico geral e a uma avaliação ultrasonográfica para determinação do tempo de gestação. O desenvolvimento de tecnologias que possam auxiliar o diagnóstico prematuro de alterações genéticas em animais é algo ainda novo, contudo fundamental para o futuro. Uma destas técnicas é a Biopsia de corio fetal a qual nos permite coletar de modo pouco invasivo amostra de tecido fetal e submeter este a exames cromossômicos e de DNA. Através deste conseguimos identificar o sexo do feto com total exatidão. Também realizamos um estudo sobre a composição dos líquidos fetais, o qual obtivemos os seguintes resultados para líquido amniótico e alantoideano respectivamente: pH 8,19 e 7,13, proteína 144,44 e 121,11, densidade 1007,5 e 1011,44, Creatinina 2,21 e 22,71, Albumina 0,28 e 0,13, Fosfatase alcalina 432,94 e 22,73, proteína total 0,22 e 0,24, concluindo assim a grande semelhança dos líquidos fetais com a urina. A macroscopia do cordão umbilical nos forneceu alguns dados interessantes tais como a relação de tamanho entre o feto e o cordão umbilical a qual é de 2:1, outro dado interessante que é a relação de peso entre a placenta e o cordão umbilical que fica na proporção de 11,5:1. Microscopicamente o cordão umbilical do cão possui características próprias como a confluência das veias umbilicais ocorrendo próximo a cavidade abdominal, as paredes das veias (2) são delgadas e das artérias (2) são musculares e espessas, o ducto alantoideano localiza-se entre os quatro vasos. O saco vitelínico apresenta grande quantidade de capilares, parede delgada e vitelo

Palavras-chave: Biopsia. Cães. Placenta. Bioquímica animal. Líquido fetal animal. Cordão umbilical animal.

ABSTRACT

FERREIRA, G. J. B. C. **Development and adaptation of technology for attainment of samples from intra uterine material during gestation in mongrel dogs (*Canis familiares*- Linnaeus, 1758): an experimental study.** [Desenvolvimento e adaptação de tecnologia para obtenção de amostras de material intra uterino durante a gestação em cães SRD (*Canis familiares* – Linnaeus, 1758)]. 2005. 75f. Dissertação (mestrado em Ciências) - Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

We use pregnant female mongrel dogs, from Control centers of Zoonoses of São Paulo and region, in different periods of gestation. The animals had been submitted the general clinic examination and to a ultrasonographic evaluation for determination of the time of pregnancy period. The development of technologies can assist the premature diagnosis of genetic alterations, in animals is something new, however still basic for the future. One of these techniques and the biopsy of fetal chorion which in allows them to collect in little invasive fetal tissue and to submit this the chromosomic and DNA examinations. Through this we obtain to identify the embryo sex with total exactness. Also carry through a study on the composition of the fetal fluids, which we found the respectively the following results to amniotic and allantois liquid: pH 8,19 and 7,13, protein 144,44 and 121.11, density 1007,5 and 1011,44, Creatinina 2.21 and 22.71, Albumine 0,28 and 0,13, alkaline Fosfatase 432,94 and 22,73, total protein 0,22 and 0,24, thus concluding the great similarity of the fetal fluids with urine. The gross shape of the umbilical cord in supplied to some interesting data such to them as the relation of size between the embryo and the umbilical cord which is of 2:1, another interesting data that are the relation of weight between the placenta and the umbilical cord is the ratio of 11,5:1. Microscopically the umbilical cord of the dog possess proper aspects as the confluence of the umbilicals veins occurring next the abdominal cavity, the walls of the veins (2) are thin and arteries (2) are muscular and thick, allantois duct are between situated the four vases. The yolk sac presents great amount of capillaries, thin wall and yolk.

Key words: Biopsi. Dogs. Placenta. Animal biochemistry. Animal fetal fluids. Animal umbilical cord.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia do aparelho de ultra-sonografia utilizado para o procedimento de coleta de corio fetal; 1B Detalhe do monitor e painel de controle; 1C Detalhe dos transdutores	24
Figura 2	Agulha do tipo spinal da BD tamanho 22G, utilizada para a biopsia	26
Figura 3	Fotografia do madril (a) e da agulha (b)	27
Figura 4	Fotografia da seringa de 20ml contendo em seu interior 5ml de meio de transporte 199 do instituto Adolfo Lutz	27
Figura 5	Fotografia da seringa acoplada a agulha com o êmbolo tracionado para a formação da pressão negativa	28
Figura 6	Fotografia da seringa retirada juntamente com a agulha após a punção	28
Figura 7	Fotografia da centrifuga de eppendorf utilizada para a extração de DNA de corio fetal	29
Figura 8	Fotografia do aparelho PTC-100 (Programanable Thermal Controller - MJ Research, Inc.), utilizado para preparação das amostras para o PCR	29
Figura 9	Fotografia da cuba de eletroforese, onde o gel de agarose com as amostras é colocado e submetido a uma diferença de pontencial eletrico, permitindo a migração do DNA no gel	30
Figura 10	Fonte geradora de diferença de pontencial eletrico, que é ligada a cuba de eletroforese	31
Figura 11	Image Master: aparelho onde colocamos a o gel de agarose após a eletroforese para visualizarmos a marcação das bandas do DNA	31
Figura 12A	Imagem ultrasonográfica: bisel da agulha (b) na anel placentário (p)	34
Figura 12B	Imagem ultrasonográfica: bisel da agulha (b) na anel placentário (p)	34
Figura 12C	Imagem ultrasonográfica: bisel da agulha (b) na anel placentário (p)	35
Figura 13	Desenho esquemático da imagem obtida por ultrasom. Observar a agulha (a), dentro da anel placentária (p) e acima desta o tecido subcutâneo (c). Abaixo o saco gestacional (g)	35
Figura 14	Fotografia do útero grávidico, onde podemos visualizar as regiões dos aneis placentários (p)	36
Figura 15	Fotografia do feto de cão com aproximadamente 50 dias de gestação. Após rebatimento da membrana alantoideana, identificamos o feto (f), cordão umbilical (u), e placenta (p)	36
Figura 16	Esquema de um feto de 45 dias com as membranas fetais rebatidas. Observar o cordão umbilical (u), o saco vitelínico (s) e a placenta (p)	37

Figura 17	Imagem negativas do Gel de agarose após eletroforese. Pode-se observar a evidência das regiões desejadas nas amostras 1, 8 e 9. A numeração corresponde as amostras, B e a prova branca o M é o marcador de peso molecular	39
Figura 18	Esquema do cordão umbilical de um feto de cão com 52 dias de vida onde demonstramos o comportamento do cordão umbilical, e das suas divisões	50
Figura 19	Fotomicrografia mostrando um corte transversal do cordão umbilical em sua porção justa fetal onde observamos duas artérias (a), duas veias (v), a zona de confluência das veias (c), o ducto alantoidiano (d) e o âmnio (m) revestindo todo o cordão umbilical	55
Figura 20	Fotomicrografia mostrando as veias umbilicais após confluência (fv)	56
Figura 21	Fotomicrografia evidenciando uma artéria umbilical (a), com parede muscular espessa (P)	56
Figura 22	Fotomicrografia da parede da veia umbilical, com parede muscular mais delgada. Endotélio (e), túnica média (m), muscular externa (X) e adventícia (a)	57
Figura 23	Fotomicrografia mostrando o entrelaçamento das fibras musculares (C) das veias umbilicais, e o endotélio de cada um dos vasos (E)	57
Figura 24	Fotomicrografia do ducto alantoideano (DA), e dos inúmeros capilares (c) que o circundam	58
Figura 25	Fotomicrografia do epitélio de revestimento (T) do ducto alantoideano, o qual apresenta-se como epitélio de transição, circundado por grande quantidade de fibroblastos (F)	58
Figura 26	Fotomicrografia mostrando a proximidade dos capilares (c) em relação ao ducto alantoideano (DA)	59
Figura 27	Fotomicrografia mostrando a distribuição de músculo estriado esquelético(m), em corte transversal, lateralmente ao ducto alantoideano (DA)	60
Figura 28	Fotomicrografia evidenciando uma loja muscular (m) ao lado do ducto Alantoideano(DA)	60
Figura 29	Fotomicrografia mostrando o âmnio (a) revestindo o cordão umbilical	61
Figura 30	Observar o âmnio (a) delimitando o cordão umbilical, o qual possui células arredondadas (R) com núcleos centrais, e, mais internamente o tecido conjuntivo frouxo (f) que envolve as outras estruturas cordonais	61
Figura 31	Fotomicrografia A Fibras colágenas (c) do tecido conjuntivo frouxo do mesenquima umbilical e a membrana amniótica (m) delimitando esternamente o cordão umbilical. Em B observamos a membrana amniótica (a) e a ausência de grânulos glicoproteicos	62

Figura 32	Mesênquima umbilical (m), composto por tecido conjuntivo frouxo	62
Figura 33	Fotografia panorâmica do saco vitelínico do cão	63
Figura 34	Fotomicrografia mostrando em A a parede do saco vitelínico (p), capilares (c), vênulas (v) e vitelo (t). Em B vemos em detalhe um capilar (c) contendo hemácias (h) próximas a luz do saco vitelínico, contendo vitelo (t)	64
Figura 35	Observamos em A uma vênula (v) junto a parede do saco vitelínico (s). Em B observamos o endotélio (e), hemácia (h) e luz do saco vitelínico (s)	65
Figura 36	Fotomicrografia panorâmica do material resultante da coleta de corio fetal	67
Figura 37	Coloides (s), impregnação de hemociderina (h) e fragmentos de corio fetal (c)	68
Figura 38	Fragmento de corio fetal onde observamos: Capilares (c), coloides sangüíneos (s), tecido placentário (p) e impregnação de hemociderina (h)	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos dados da análise bioquímica do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação	42
Tabela 2	Descrição dos dados da análise bioquímica do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação	46
Tabela 3	Tabela contendo os dados descritivos do estudo morfológico do cordão umbilical	52

LISTA DE GRÁFICOS

Grafico 1	Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de pH do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação.	43
Grafico 2	Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de densidade do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação.	43
Grafico 3	Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de creatinina do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação.	44
Grafico 4	Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de Albumina do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação.	44
Grafico 5	Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de Fosfatase alcalina do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação.	45
Grafico 6	Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de Proteína Total do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação.	45
Grafico 7	Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de pH do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação.	47
Grafico 8	Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de densidade do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação.	47
Grafico 9	Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de creatinina do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação.	48
Grafico 10	Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de Albumina do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação.	48
Grafico 11	Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de Fosfatase Alcalina do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação.	49
Grafico 12	Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de Proteína total do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação.	49
Grafico 13	Gráfico de linhas onde demonstramos o peso placentário (°) e o peso do cordão umbilical (°).	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO EM CÃES	18
2.2	CORDÃO UMBILICAL	18
2.3	LÍQUIDOS FETAIS	21
2.4	CORIO FETAL	23
3	MATERIAL E MÉTODO	24
3.1	CORDÃO UMBILICAL	25
3.2	LÍQUIDOS FETAIS	25
3.3	COLETA DE CORIO FETAL	26
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4	RESULTADOS	33
4.1	BIÓPSIA DE CORIO FETAL	33
4.2	BIOQUÍMICA DOS LÍQUIDOS FETAIS	40
4.3	CORDÃO UMBILICAL (MACROSCOPIA)	50
4.4	MICROSCOPIA DO CORDÃO UMBILICAL	54
4.5	HISTOLOGIA DO MATERIAL DE BIÓPSIA DE CORIO FETAL	66
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXO A	78

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da gestação seja no homem ou nos animais, é marcado por grandes alterações do sistema reprodutor feminino e também pelo surgimento e maturação do conceito. A evolução da clínica pré-natal acompanhada pelo tratamento de doenças pré-natais exigem um acompanhamento detalhado de todas as fases da gestação, mediante um método seguro, indolor e não estressante para a mãe e para o feto. Apesar destes procedimentos estarem totalmente estabelecidos no homem, na medicina veterinária, estes ainda carecem de experimentos e adequações para sua utilização na prática.

Os cães são os representantes domésticos dos membros pertencentes à família *Canídea*, a qual possui inúmeros outros representantes como lobos, coiotes, chacais e raposas. Esta é constituída por 16 gêneros e 36 espécies.

Os aspectos reprodutivos destes animais mostram características incomuns à outros mamíferos, tais como a monogamia, a pseudociese e a ovulação tardia. Características tão distintas encontradas no processo de gestação destes mamíferos, torna necessário o desenvolvimento de tecnologia específica para obtenção de material fetal e ou placenta para estudos de desenvolvimento pré-natal. Assim, tentamos com esta proposta inicialmente descrever os componentes anatômicos macro e microscópicos das estruturas associadas à gestação, tais como cordão umbilical e outros anexos fetais, correlacionando o desenvolvimento dos mesmos, com a experimentação de uma técnica de obtenção de amostras, que pudessem evidenciar características de saúde

fetal e da biologia do desenvolvimento do conceito.

A ultra-sonografia encaixa-se bem neste perfil, pois não oferece riscos comprovados à mãe ou ao conceito, mesmo quando é utilizada diversas vezes em uma mesma gestação.

Não é um método invasivo, possibilitando uma boa observação dos eventos da prenhez.

De outra parte quando acompanhada de biópsia, orienta também o profissional a coletar líquidos fetais e ou amostras dos anexos fetais incluindo o cordão umbilical, tal como no homem que devido ao avanço das áreas de genética e da medicina molecular, pode ser submetido rotineiramente aos exames de amniocentese e biópsia de corio fetal.

Esta proposta visa o desenvolvimento e adaptação de tecnologia para coleta de material biológico (anexos fetais) de cães durante o período pré-natal, utilizando a ultra-sonografia (metodologia já estabelecida em carnívoros) associada a biópsia guiada à realização de amniocentese e coleta de corio fetal.

Relativamente ao cordão umbilical realizamos inicialmente no cão a descrição macroscópica, a descrição microscópica, as mensurações do mesmo nas diferentes fases gestacionais. Estabelecemos também correlações entre o peso do cordão, o tamanho (comprimento e diâmetro do cordão), o tempo de gestação e o peso placentário.

Quanto aos líquidos fetais, avaliamos a composição bioquímica destes.

No tocante ao corio fetal desenvolvemos tecnologia de coleta do mesmo para uma possível avaliação genética.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO EM CÃES

Evans, H.E., Sack, W.O. (1972) descrevem a curva de crescimento dos cães baseando-se em 145 embriões com tamanho variando de 3 a 59 mm (CR –Crown-Rump), e afirmam que o âmnio apresenta-se completo aos 22 dias de gestação.

Phesmister (1974) dividiu o desenvolvimento pré-natal dos cães em 3 períodos: Primeiro - período do ovo: que se inicia com a fertilização do oócito e vai até o momento em que o blastocisto atinge o útero (2º ao 17º dia); segundo - período de embrião: começa com a implantação do blastocisto e engloba todo o período embrionário (19º ao 35º dia); terceiro - período de feto: surgimento da aparência e características do cão e quando ocorre a maior parte do crescimento (35ºdia ao nascimento).

2.2 CORDÃO UMBILICAL

Bruni e Zimmerl (1947) afirmaram que o cordão umbilical é constituído pelo pedúnculo umbilical, pelo ducto alantóide e pelos vasos umbilicais (duas artérias e duas veias). O pedúnculo umbilical e o ducto alantóide são canalículos que permanecem até o nascimento, exceto nos carnívoros.

Daves (1950) observou que nas focas o funículo umbilical é uma pequena estrutura achatada contendo cerca de 180mm de diâmetro, duas artérias umbilicais, saco alantóide, uma veia umbilical e dois vasos vitelínicos.

Wislocki e Amoroso (1956) afirmaram que o cordão umbilical dos Wolverines

(Tipo de lobo conhecido no Brasil como Carcaju, *Gulo gulo*) possui duas artérias umbilicais e uma veia umbilical, um ducto alantóide, uma artéria, uma veia vitelínica e nenhum ducto vitelínico.

Young (1969) afirmou que distalmente o cordão umbilical de urso polar contém duas artérias, duas veias um ducto alantóide e dois vasos menores, provavelmente vasos vitelínicos. A veia umbilical une-se a um centímetro da parede abdominal, uma anastomose, entre ramos das artérias umbilicais.

Schwarze (1970) descreveu o cordão umbilical dos carnívoros contendo duas artérias e duas veias, estas últimas confluem um pouco antes de chegar ao feto. Fazendo parte também, do cordão, o pedículo alantoideano e o saco vitelínico.

Barone (1976) descreveu que o cordão umbilical dos carnívoros é espesso e curto, com cerca de 10cm na cadela e 3-4 cm na gata. Está dividido em uma parte amniótica curta (cerca de 2cm) e uma parte alantoideana que se estende do âmnio à placenta. É caracterizado pela obliteração precoce de seu conduto alantóide, seu conduto vitelínico e pela persistência de finos vasos vitelínicos.

Young (1978) ao estudar *Artctictis binturong* descreveu que o cordão achatou-se e alargou-se transversalmente com uma artéria e uma veia oriundas de cada margem, onde elas bifurcaram e seguiram as margens em direção a extensa região antifundal.

Martins (1986) em estudo no homem verificou que o comprimento médio do cordão umbilical é de 50-60cm, o diâmetro médio de 12mm e peso médio de 150g, variando de 3 a 18% do peso total placentário. A superfície do cordão é recoberta pelo epitélio amniótico e seu estroma é formado por tecido conjuntivo mucoso que envolve duas artérias e uma veia.

Latshaw (1987) descreveu a placenta dos carnívoros como zonária e endoteliocorial, descreveu também o funículo umbilical como sendo a conexão do embrião com a placenta. Nos carnívoros o funículo era formado por uma veia umbilical mais distal, duas artérias, tecido conjuntivo e alantóide.

Santos (1996) descreveu o cordão umbilical como um anexo que une o feto à placenta, apresentando no seu interior os vasos alantoideanos, agora chamados de umbilicais. Estes são responsáveis pelas trocas sangüíneas entre os organismos fetal e materno. De acordo com a autora, inicialmente, os vasos do cordão umbilical são representados por duas veias e depois em algumas espécies (homem, eqüino e suíno), ocorre a obliteração da veia umbilical direita. Além do epitélio amniótico, dos vasos e do conjuntivo, o cordão umbilical pode conter, ainda, os pedículos do saco vitelínico e alantóide. A autora ainda afirma que o cão possui um cordão umbilical equivalente a metade do comprimento corporal do feto. Nos carnívoros, o cordão umbilical é capaz de suportar o triplo do peso fetal, razão pela qual a mãe morde o cordão durante o parto.

Zanco (1998) afirmou que o funículo umbilical dos cães pode ser dividido em três porções: justafetal, média e justaplacentária. Afirma ainda o autor que estes possuem diferentes estruturas, sendo que na porção justa fetal observou-se duas artérias e uma veia, enquanto que as demais posições apresentam duas artérias e duas veias.

2.3 LÍQUIDOS FETAIS

Fuchs e Riis (1956) realizaram a determinação do sexo fetal através da determinação do corpúsculo de “Barr” em células do líquido amniótico.

Wales e Murdoch (1973) descrevem as características dos fluidos como volume, pH e pressão osmótica principalmente na fase inicial de gestação. Analisaram o volume do fluido amniótico entre os dias 22 e 44 observando-se que em todos os estágios o volume do fluido alantoideano foi maior que o fluido amniótico e que o pH apresentou sutil variação, com valores médios de 7,4.

Mellor e Slater (1974) afirmaram que a formação e composição do fluido amniótico sofrem influencia da urina fetal, fluido pulmonar, secreções bucais e nasofaríngeas bem como do equilíbrio entre o sangue fetal, o próprio fluido e a deglutição realizada pelo feto.

Bongson e Basrur (1978) descreveram ainda a avaliação citológica dos fluidos fetais independentemente do período gestacional, devendo-se tomar por base as características morfológicas das células, sendo que a um aumento no número de células no fluido em decorrências do processo natural de esfoliação da epiderme. Preconizaram a classificação dos tipos celulares de acordo com o tamanho, aspecto morfológico e propriedades tintoriais. Em bovinos pode-se determinar o sexo e o perfil citogenético com as células presentes no fluido amniótico.

Smith et al. (1979) considera o líquido alantoideano como um informante qualificado sobre bioquímica renal.

Derivaux e Ectors (1984) citaram que o fluido amniótico é o meio ambiente do feto durante a vida intra-uterina, tendo tanto função fisiológica como mecânica. Este se apresentou de coloração clara no início da gestação, tornando-se esbranquiçado pela

presença de substâncias sebáceas em suspensão ou de coloração parda devido eliminação de mecônio ou morte fetal.

Wintour e McFarlane (1993) dissertaram sobre a concentração dos fluidos fetais e afirmaram que o fluido amniótico era mais diluído ao contrário do alantoideano.

Kjeldsberg e Knight (1993) afirmaram que na espécie humana a composição do fluido amniótico simula o soro materno, nos estágios iniciais. Com o avanço da gestação há um decréscimo na concentração de alguns componentes como: proteína, sódio, glicose, cloreto e bilirrubina, enquanto outros componentes aumentam sua concentração progressivamente como: potássio, creatinina, uréia, amilase, fosfatase alcalina, ácido úrico e inúmeros fosfolipídios.

Hafez (1993) afirmou que os fluidos fetais possuem constituintes metabólicos, eletrólitos, hormônios, células entre outros, porém a presença destes varia de acordo com a espécie e o fluido analisado.

Zugaib (1997) descreve a amniocentese como um procedimento consagrado para diagnóstico de anomalias cromossômicas fetais, permitindo que seja realizada análises enzimáticas, citogenéticas e de DNA a partir de células oriundas do líquido amniótico.

Zogno (2002) afirmou que a composição dos líquidos fetais dos mocós foi semelhante as das ratazanas, bovinos e cadelas. Porém estes apresentaram algumas diferenças com relação às cadelas, sendo elas: glicose, creatinina, uréia e proteínas totais.

2.4 CORIO FETAL

Hahnemann et al. (1968) propôs a obtenção de mostras de tecido fetal no primeiro trimestre de gestação. Descreveram a primeira tentativa de realização de biópsia de vilos coriais (BVC) por histeroscopia. Devido ao baixo sucesso na obtenção de material esse procedimento foi abandonado.

Stone e Lockwood (1993) relatam que a primeira biópsia de vilos coriais (BVC) foi realizada por cânula de aspiração introduzida no útero através da cérvix, sem auxílio ultrasonográfico.

D'Alprà et al. (1993) comparou BVC tardias com as de primeiro trimestre. Não encontraram diferenças significativas no índice de mitoses, na qualidade de metáfase, e na porcentagem de contaminação com células maternas. Os autores não obtiveram nenhum resultado falso negativo e todos os casos de anomalia cromossômica sem mosaicismo foram confirmados posteriormente.

Zugaib (1997) descreve a BVC como meio diagnóstico pré-natal para as seguintes condições: anomalias cromossômicas, doenças genéticas, erros inatos do metabolismo, ansiedade dos pais e anomalia fetal identificada à ultrasonografia. Ainda cita que a BVC por via transcervical pode ser realizada a partir da sétima semana e a via transabdominal permite a realização do procedimento da nona semana até o terceiro trimestre da gestação. A fase ideal entretanto está entre a 11^a e a 14^a semanas, em função das células possuírem um bom índice mitótico neste período.

3 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas 10 cadelas prenhez (SRD), oriundas de Centros de Controle de Zoonoses de São Paulo e Região, em diferentes estágios de gestação. Os animais foram submetidos a exame clínico geral e a uma avaliação ultrasonográfica para determinação do tempo de gestação. Esta determinação foi baseada nas curvas de crescimento fetal de Evans e Sack (1973) e Noden e Lahunta (1990) (Anexo A). Quatro animais foram destinados ao estudo macro e microscópico do cordão umbilical e análise bioquímica dos líquidos fetais após retirada cirúrgica dos conceptos. As demais cadelas foram utilizadas para o desenvolvimento e adaptação de tecnologia de coleta de corio fetal.

Figura 1 - Fotografia do aparelho de ultrasonografia utilizado para o procedimento de coleta de corio fetal; 1B Detalhe do monitor e painel de controle; 1C Detalhe dos transdutores

3.1 CORDÃO UMBILICAL

Para o estudo das características macroscópicas do cordão umbilical utilizamos fetos e anexos fetais previamente fixados em solução aquosa de formaldeído a 10 %. Estes fetos tiveram seus cordões umbilicais dissecados e mensurados para análise de correlações verificada, entre desenvolvimento dos cordões e amadurecimento fetal.

Para o estudo microscópico do cordão umbilical, foi utilizado o processo histológico padrão, com inclusão em Paraplast, e secção dos blocos na espessura de 3-4 μm . Estes cortes foram corados em HE, Tricromo de Masson, Picrossirius e Orceína Romais. Os cortes foram submetidos à reação histoquímica de PAS, e fotografados.

3.2 LÍQUIDOS FETAIS

Para a coleta dos líquidos fetais, os animais foram anestesiados, tricotomizados e histerectomizados.

As amostras coletadas foram submetidas a avaliação físicoquímica, que compreende a análise de: cor, pH, densidade e parâmetros bioquímicos.

A análise de coloração, foi feita por observação direta do tubo contendo a amostra, a densidade foi medida através de um refratômetro de mesa e os parâmetros bioquímicos (Creatinina, Albumina, Fosfatase Alcalina e Proteína Total) foram determinados em um analisador bioquímico (Labquest). Os líquidos também foram analisados com fitas de Uritest, a qual nos forneceram pH, Leucócitos, Nitrito, Sangue, Proteína, Glicose, Uroglicogenio, Bilirrubina e Corpos cetônicos.

3.3 COLETA DE CORIO FETAL

A adaptação e desenvolvimento de tecnologia relativa à coleta de corio fetal foi adaptada ou desenvolvida a partir das técnicas já existente em humanos. Esta consiste em avaliar através de ultra-som o feto e a placenta determinando sua posição, e conseqüentemente a marcação do ponto de punção. Uma vez marcado o ponto, realiza-se introdução da agulha tipo espinal BD ou similar, sempre observando sua trajetória através do ultra-som. Após atingir o trofoblasto retiraremos o mandril e a agulha é acoplada a uma seringa de 20ml contendo de 2 a 5 ml de meio de transporte (meio de cultura 199 do Instituto Adolfo Lutz). Aplicamos então uma pressão negativa de aproximadamente 5 a 10 ml na seringa. Realizamos em seguida aproximadamente 10 movimentos de vai e vem na extensão do cório, retirando-a então da região do abdome (ZUGAIB, 1997). A adaptação da aparelhagem necessária ao procedimento no cão será desenvolvida como parte desta proposta.

Depois de coletado e separado o material foi submetido a extração de DNA e posterior análise por PCR (Polimerase Chain Reaction) para determinação do sexo dos fetos, apenas com a finalidade de confirmar a viabilidade do material coletado para análise genética.

Figura 2 - Agulha do tipo spinal da BD tamanho 22G, utilizada para a biopsia.

Figura 3 - Fotografia do madril (a) e da agulha (b)

Figura 4 - Fotografia da seringa de 20ml contendo em seu interior 5ml de meio de transporte 199 do instituto Adolfo Lutz

Figura 5 - Fotografia da seringa acoplada a agulha com o embolo tracionado para formação da pressão negativa

Figura 6 - Fotografia da seringa retirada juntamente com a agulha após a punção

Figura 7 - Fotografia da centrífuga de eppendorf utilizada para a extração de DNA de corio fetal

Figura 8 - Fotografia do aparelho PTC-100 (Programanable Thermal Controller - MJ Research, Inc.), utilizado para preparação das amostras para o PCR

Figura 9 - Fotografia da cuba de eletroforese, onde o gel de agarose com as amostras é colocado e submetido a uma diferença de potencial elétrico, permitindo a migração do DNA no gel

Figura 10 - Fonte geradora de diferença de pontencial elétrico, que é ligada a cuba de eletroforese

Figura 11 - Image Master: aparelho onde colocamos a o gel de agarose após a eletroforese para visualizarmos a marcação das bandas do DNA

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram submetidos a avaliação estatística pelo software SAEG - Sistema de Análise Estatística e Genética (RIBEIRO JR., 2001). Realizamos a análise de correlação, dentre outras que se fizeram necessárias para um melhor aproveitamento e esclarecimento dos dados coletados.

4 RESULTADOS

4.1 BIÓPSIA DE CORIO FETAL

A biópsia corial foi realizada em sete cadelas com idade de gestação variando entre 35 e 52 dias. Esta confirmação foi realizada após 10 dias da coleta, quando as cadelas foram hysterictomizadas e os fetos coletados, juntamente com seus líquidos fetais e cordão umbilical.

Para a realização da biópsia, utilizou-se o seguinte protocolo anestésico: Associação de Acepromazina (Acepran 0,2%, Univet S.A. Ind. Veterinária) com Meperidina (Dolosal 50mg/ml, Cristalia) nas seguintes doses: 0,05mg/kg e 2mg/kg respectivamente, como medicação pré anestésica, e para a manutenção anestésica durante a biópsia foi utilizado propofol (Propovan 10mg, Cristalia), na dose de 5mg por kg.

Com o auxílio do ultrassom localizamos a placenta, e assim determinamos um ponto para a inserção da agulha. Este foi localizado pelo transdutor e a partir deste inseriu-se a agulha de forma oblíqua em relação ao transdutor, tornando possível o acompanhamento de seu trajeto dentro da cavidade abdominal até a placenta.

Com o bisel da agulha dentro da placenta, acoplou-se uma seringa de 10ml contendo aproximadamente 5ml de meio de transporte 199¹, tracionou-se o êmbolo da seringa para a formação de vácuo e iniciou-se os movimentos de vai e vem dentro da placenta, a qual possui espessura de 0,3 a 0,7mm.

¹ Meio de transporte 199 do instituto Adolfo Lutz, meio destinado a manutenção da viabilidade de tecidos e células sem proporcionar condições para seu crescimento.

Após a seqüência de movimentos, realizou-se a retirada do conjunto. Aspirou-se um pouco mais de meio de transporte 199, para evitar que parte da amostra ficasse na agulha. Em seguida identificou-se a seringa. Esta pôde ser mantida em geladeira por até 72 horas, para posterior extração de DNA.

Figura 12A - Imagem ultrasonografica: bisel da agulha (b) na anel placentario (p)

Figura 12B - Imagem ultrasonografica: bisel da agulha (b) na anel placentario (p)

Figura 12C - Imagem ultrasonografica: bisel da agulha (b) na anel placentario (p)

Figura 13 - Desenho esquematico da imagem obtida por ultrasom. Observar a agulha (a), dentro da anel placentário (p) e acima desta o tecido subcutâneo (c). Abaixo o saco gestacional (g)

Figura 14 - Fotografia do útero gravídico, onde podemos visualizar as regiões dos anéis placentários (p)

Figura 15 - Fotografia do feto de cão com aproximadamente 50 dias de gestação. Após rebatimento da membrana alantoideana, identificamos o feto (f), cordão umbilical (u), e placenta (p)

16

Figura 16 - Esquema de um feto de 45 dias com as membranas fetais rebatidas. Observar o cordão umbilical (u), o saco vitelínico (s) e a placenta (p)

A extração do DNA iniciou-se com a separação da amostra do meio de transporte, a qual foi feita com a colocação do meio em um eppendorf seguido de centrifugação. Em seguida desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se esta operação até que todo o conteúdo da seringa fosse centrifugado. Após este procedimento iniciou-se a lavagem do material com uma solução de 150mM de NaCl e 25 mM de EDTA, homogenizando o material no vortex e centrifugando por 2 minutos à 12000 rpm, desprezando o sobrenadante e repetindo esta operação por mais 3 ou 4 vezes.

Em sequência a lavagem acrescentou-se 500µl da solução de lavagem, 10 µl de proteinase K e 10µl de SDS 10%, homogeneizou-se no vortex e colocou-se o material na estufa a 37°C por 16 horas.

Após esta etapa, acrescentou-se 250µl de clorofórmio-isoamil (24:1) e 250µl de fenol, homogeneizou-se no vortex e centrifugou-se por 2 minutos. Retirou-se o DNA do vilo e repetiu-se novamente a diluição e centrifugação anterior.

Transferiu-se o DNA do vilo a um novo eppendorf e acrescentou-se 500µl de cloroformio-isoamil (24:1). Homogeneizou-se no vortex e centrifugou-se por 2 minutos.

Transferiu-se novamente o DNA para outro eppendorf e acrescentou-se cerca de 40µl de NaCl a 0,4 molar. Homogeneizou-se levemente e completou-se com etanol

Armazenou-se este a -20°C por 15 minutos ,e em seguida centrifugou-se por 5 minutos, descartando o sobrenadante, acrescentando 50µl de água destilada, 25µl de acetato de amonia 7,5M e 3000µl de etanol absoluto, homogenizando e centrifugando por 5 minutos.

Desprezou-se novamente o sobrenadante e acrescentou-se álcool 70% até completar o eppendorf, centrifugando por mais 2 minutos, desprezando o sobrenadante

e deixando o eppendorf na estufa a 37°C por aproximadamente 10 minutos para eliminar o restante de álcool.

Dissolveu-se o pellet em 35µl TE-4 pH 7,5 à 8,0, deixando-o em banho maria à 65°C por 15 minutos.

Após este procedimento o DNA estava pronto para ser preparado para a PCR.

A amostra foi preparada em “mix” contendo os “primers” para determinação da região do cromossomo Y e submetida ao programa no aparelho PTC-100 (Programanable Thermal Controller - MJ Research, Inc.). Posteriormente foi colocado em um gel de agarose e submetido a eletroforese.

Figura17 - Imagens negativas do Gel de agarose após eletroforese. Pode-se observar a evidencia das regiões desejadas nas amostras 1, 8 e 9. A numeração corresponde as amostras, B e a prova branca o M é o marcador de peso molecular

4.2 BIOQUÍMICA DOS LÍQUIDOS FETAIS

O exame bioquímico dos líquidos fetais foi realizado com o auxílio do aparelho Labquest e os kits de creatinina, albumina, fosfatase alcalina e proteína total. Utilizando também a fita para urinálise Uritest, a qual nos forneceu leucócitos, pH, nitrito, sangue, proteína, glicose, cetona, uroglicogênio e bilirrubina.

Para determinação da densidade, fizemos uso de um refratômetro de mesa.

Todos os dados estão compilados nas Tabelas 1 (líquido amniótico) e 2 (líquido alantoideano). A partir das colunas de cada Tabela, preparamos gráficos de dispersão com reta de regressão, para assim observarmos o comportamento dos valores de nossas análises. Nestas Tabelas também apresentamos os valores médios de cada item observado.

Com relação ao líquido amniótico pudemos observar que o pH manteve levemente alcalino com média de 8,19, sem apresentar amostras muito discrepantes. A densidade tem seu valor médio de 1007,5, sendo que duas amostras estavam com valor muito inferior a variação estabelecida pela regressão. Os valores de creatinina estavam na média de 2,21mg/dl, sendo que duas amostras apresentaram valores inferiores, e outras duas valores superiores dentro da regressão linear estabelecida. Quanto a albumina apenas uma amostra apresentou valor superior a regressão, a média de albumina foi de 0,28g/dl. A fosfatase alcalina obteve a média de 432,94U/L, tendo neste caso a presença de quatro valores extremamente elevados. A proteína total do líquido amniótico encontrava-se com 0,22g/dl de média e possuía apenas duas amostras com valores discrepantes.

No líquido alantoideano as médias foram de: 7,13 pH, 1011,4 densidade, 22,71

mg/dl de creatinina e 0,13g/dl de albumina, 22,73 U/L de fosfatase alcalina e 0,24 g/dl de proteínas totais. Quanto às amostras que apresentaram-se fora da regressão linear obtivemos: uma amostra no pH, na creatinina, na albumina, na fosfatase alcalina e na proteína total e duas amostras na densidade.

Tabela 1 - Descrição dos dados da análise bioquímica do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação
São Paulo - 2005

Amostra	pH	Nitrito	Sangue	Proteína	Glicose	Uroglico	Biirrubina	Densidade	Creatinina	Albumina	Fosfatase Alcalina	Proteína Total
1	8,00	+	+++	500,00	normal	-	-	1010,00	1,70	0,39	638,00	0,20
2	8,00	+	+++	500,00	normal	-	-	1010,00	1,60	0,29	1302,00	0,30
3	8,00	+	+++	500,00	normal	-	-	1010,00	1,50	0,39	298,00	0,10
4	8,00	+	+++	500,00	normal	-	-	1009,00	1,30	0,29	696,00	0,10
5	8,00	+	+++	500,00	normal	-	-	1010,00	2,10	0,33	970,00	0,10
6	8,00	+	+++	500,00	normal	-	-	1009,00	1,40	0,22	306,00	0,00
7	8,00	+	++	-	normal	normal	-	1003,00	5,40	0,12	970,00	0,00
8	8,00	-	+++	100,00	normal	normal	-	1007,00	4,00	0,19	82,00	0,70
9	7,00	-	+++	100,00	normal	normal	-	1006,00	0,40	0,17	41,00	0,10
10	8,00	-	+++	100,00	normal	normal	-	1007,00	0,00	0,17	99,00	0,40
11	8,00	-	+++	100,00	normal	normal	-	1007,00	2,70	0,12	58,00	0,50
12	8,00	-	++	100,00	normal	normal	-	1007,00	3,90	0,12	58,00	0,10
13	9,00	-	++	100,00	normal	normal	-	1004,00	1,70	0,08	33,00	0,00
14	9,00	-	+++	500,00	normal	normal	+	1008,00	3,20	1,14	1294,00	0,40
15	9,00	-	++	100,00	normal	normal	-	1007,00	3,10	0,36	33,00	0,00
16	9,00	-	++	100,00	normal	normal	-	1006,00	1,30	0,12	49,00	0,00
Média	8,19	-	+++	144,44	normal	normal	-	1007,50	2,21	0,28	432,94	0,22

Gráfico 1 -Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de pH do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação

Gráfico 2 -Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de densidade do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação

Grafico 3 - Grafico de dispersão com reta de regressão dos valores de cretatinina do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação

Grafico 4 - Grafico de dispersão com reta de regressão dos valores de Albumina do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação

Gráfico 5 - Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de Fosfatase alcalina do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação

Gráfico 6 - Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de Proteína Total do líquido amniótico de cadelas SRD em diferentes fases de gestação

Tabela 2 - Descrição dos dados da análise bioquímica do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação
São Paulo - 2005

Amostra	pH	Nitrito	Sangue	Proteína	Glicose	Uroglico	Biirrubina	Densidade	Creatinina	Albumina	Fosfatase Alcalina	Proteína Total
1	9,00	+	+	-	250	normal	-	1007,00	4,10	0,07	8,00	0,00
2	9,00	+	+	-	-	normal	-	1004,00	1,90	0,06	8,00	0,00
3	9,00	+	-	30,00	50	-	-	1007,00	3,90	0,12	8,00	0,00
4	9,00	+	+	-	50	normal	-	1005,00	2,70	0,07	16,00	0,00
5	9,00	+	+	30,00	normal	normal	-	1007,00	3,10	0,08	24,00	0,00
6	9,00	+	+++	30,00	normal	normal	-	1003,00	1,60	0,07	8,00	0,00
7	6,00	-	+	100,00	normal	normal	+	1015,00	38,80	0,13	24,00	0,00
8	6,00	+	+	30,00	normal	normal	+	1013,00	45,60	0,17	8,00	1,00
9	5,00	+	+++	100,00	normal	normal	+	1018,00	41,10	0,16	16,00	0,50
10	5,00	-	+	30,00	normal	-	+	1013,00	31,90	0,16	16,00	0,40
11	6,00	-	+++	100,00	normal	normal	+	1016,00	32,10	0,18	16,00	0,30
12	5,00	-	+	30,00	normal	normal	+	1017,00	37,30	0,21	0,00	0,60
13	6,00	-	+++	100,00	normal	normal	+	1017,00	40,70	0,13	16,00	0,40
14	9,00	-	+++	500,00	normal	normal	-	1011,00	4,10	0,26	124,00	0,30
15	5,00	-	+++	100,00	normal	normal	+	1015,00	46,50	0,13	41,00	0,10
16	7,00	-	+++	100,00	normal	normal	+	1015,00	27,90	0,13	16,00	0,30
Média	7,13		++	121,11	normal	normal	+	1011,44	22,71	0,13	22,73	0,24

Gráfico 7 - Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de pH do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação

Gráfico 8 - Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de densidade do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação

Gráfico 9 - Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de creatinina do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação

Gráfico 10 - Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de Albumina do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação

Gráfico 11 - Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de Fosfatase Alcalina do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação

Gráfico 12 - Gráfico de dispersão com reta de regressão dos valores de Proteína total do líquido alantoideano de cadelas SRD em diferentes fases de gestação

4.3 CORDÃO UMBILICAL (MACROSCOPIA)

O cordão umbilical do cão apresenta-se na porção justa fetal como único. Entretanto uma bifurcação do mesmo, a qual emite um ramo cranial e outro caudal. Estes também se bifurcaram emitindo dois ramos, um direito e outro esquerdo, os quais dirigem-se a placenta, ou seja, aos respectivos hematomais marginais.

Em seis (6) dos dezesseis (16) fetos estudados foram observados hematomas centrais, sempre posicionados na porção dorsal da placenta. A presença de hematomas centrais pode prejudicar a qualidade do material coletado, pois a biópsia pode ser feita nesta região, e o material não ser viável para a extração de DNA, ou estar contaminado com DNA materno.

Figura 18 - Esquema do cordão umbilical de um feto de cão com 52 dias de vida onde o demonstramos o comportamento do cordão umbilical, e das suas divisões

A porção justa fetal do cordão umbilical de fetos com 48 dias de gestação apresentou-se em média com $1,04 \pm 0,25$ cm, sendo que o maior apresentava 1,40cm e o menor 0,7cm.

A porção intermediária possui o ramo cranial com média de $3,18 \pm 0,69$, sendo que a maior mensuração foi de 4,0cm e a menor de 2,1cm. O ramo caudal possuía em média $2,48 \pm 0,48$, com mensuração máxima de 3,6cm e mínima de 2,0cm.

A porção justa placentária apresenta o ramo direito do ramo cranial com média igual a $5,06 \pm 0,51$ cm e o ramo esquerdo $4,79 \pm 0,40$ cm. Já no ramo direito do ramo caudal a média foi de $4,17 \pm 0,62$ cm e o esquerdo $3,94 \pm 0,51$ cm. Os dados descritos acima se encontram detalhados na tabela a seguir.

dados descritivos do estudo morfológico do cordão umbilical -São Paulo - 2005

N-S	JF	r. cr	r. cd	r.crd	r. cre	r. cdd	r. cde
12,50	0,70	3,00	2,00	5,50	5,00	4,50	3,60
13,00	1,30	2,80	2,00	5,30	4,00	4,50	5,40
13,00	1,10	2,10	3,60	6,40	3,90	5,20	3,20
13,00	0,80	3,80	2,80	5,00	5,20	4,80	4,00
12,50	1,20	3,70	2,10	4,50	5,00	3,60	3,90
12,50	1,30	3,70	2,80	5,20	4,70	3,50	3,30
12,00	0,80	3,80	2,80	5,20	5,00	5,00	4,00
12,00	0,70	2,80	2,00	4,60	4,40	4,20	4,00
11,50	1,10	2,40	2,30	4,90	4,80	4,30	4,20
13,00	1,20	3,60	2,20	4,30	5,10	3,40	4,00
12,50	0,90	2,20	2,00	4,80	4,60	3,80	4,20
13,50	1,40	4,00	3,00	5,30	5,00	3,60	3,90
12,00	1,30	3,90	2,80	5,20	4,70	3,50	3,30
12,00	1,20	3,80	2,00	4,50	5,00	3,60	3,90
11,50	0,70	3,60	2,90	4,80	5,20	5,00	4,20
11,00	0,90	2,10	2,40	5,50	5,10	4,20	3,90
12,34	1,04	3,18	2,48	5,06	4,79	4,17	3,94
0,68	0,25	0,69	0,48	0,51	0,40	0,62	0,51

to - peso do feto; N-S - comprimento do feto; JF- porção justafetal; r. - ramo; cr - cranial; cd - caudal; crd - cradinal direito; cre - cranial

O gráfico abaixo demonstra a variação do peso da placenta e do peso do cordão umbilical. O peso da placenta é importante para a biópsia de corio fetal, devido esta ser a origem do material coletado, para a biópsia de corio fetal se faz necessário que a placenta já tenha um desenvolvimento de pelo menos 40 dias pois somente após este período torna-se possível sua visualização à ultrasonografia e que esta apresente espessura que permita a manipulação.

Gráfico 13 - Gráfico de linhas onde demonstramos o peso placentário (°) e o peso do cordão umbilical (°)

Mediante análise do gráfico 13 e da tabela 3, pudemos estabelecer uma proporção entre o peso da placenta e o peso do cordão umbilical que é de $11,5:1 \pm 1,61$. Este dado viabiliza maiores estudos sobre o desenvolvimento fetal e placentário. Assim, a proporção entre o comprimento do feto e o comprimento do cordão umbilical está na relação de 2:1.

4.4 MICROSCOPIA DO CORDÃO UMBILICAL

No estudo microscópico do cordão umbilical buscamos descrever brevemente suas particularidades histológicas, tais como o número de vasos umbilicais. Eles são constituídos por duas artérias e duas veias até próximo à sua inserção ao feto. Neste ponto observamos a confluência das veias (Figuras 19, 20 e 23), sendo que apenas uma a esquerda adentra a cavidade abdominal do feto. Todas estas estruturas encontram-se entremeadas por tecido conjuntivo frouxo.

Com relação a parede dos vasos umbilicais vemos que a artéria possui uma parede espessa e muscular (Figuras 19, 20 e 21) diferentemente das veias que apresentam uma parede muito mais delgada (Figura 22).

O ducto alantoideano apresenta um formato triangular com epitélio de revestimento do tipo epitélio de transição, assim como possui um grande número de capilares ao seu redor, da mesma forma que o saco vitelínico (Figuras 24,25 e 26).

Observamos também que a porção justa-fetal apresentou lojas musculares caminhando paralelamente ao ducto alantoideano (Figuras 27 e 28).

O saco vitelínico mostrou-se como uma estrutura ricamente vascularizada e de paredes delgadas (Figuras 33, 34 e 35).

O revestimento externo do cordão umbilical é feito pelo âmnio que apresentou-se distribuído de forma homogênea em todo o perímetro do cordão umbilical . (Figuras 19, 29, 30 e 31)

A região mesenquimal é basicamente composta por tecido conjuntivo frouxo, fibroblastos e capilares (Figura 32).

19

Figura 19 - Fotomicrografia mostrando um corte transversal do cordão umbilical em sua porção justa fetal onde observamos duas artérias (a), duas veias (v), a zona de confluência das veias (c), o ducto alantoideano (d) e o âmnio (m) revestindo todo o cordão umbilical. Coloração de HE

Figura 20 - Fotomicrografia mostrando as veias umbilicais após confluência (fv). Coloração HE

Figura 21 - Fotomicrografia evidenciando uma artéria umbilical (a), com parede muscular espessa (P). Coloração HE

Figura 22 - Fotomicrografia da parede da veia umbilical, com parede muscular mais delgada. Endotélio (e), túnica média (m), muscular externa (X) e adventícia (a). Coloração HE

Figura 23 - Fotomicrografia mostrando o entrelaçamento das fibras musculares lisas (C) das veias umbilicais, e o endotélio de cada uma destas (E). Coloração HE

Figura 24 - Fotomicrografia do ducto alantoideano (DA), e dos inúmeros capilares (c) que o circundam. Coloração HE

Figura 25 - Fotomicrografia do epitélio de revestimento (T) do ducto alantoideano, o qual apresenta-se como epitélio de transição, circundado por grande quantidade de fibroblastos (F). Coloração HE

Figura 26 - Fotomicrografia mostrando a proximidade dos capilares (c) em relação ao ducto alantoideano (DA). Coloração HE

Figura 27 - Fotomicrografia mostrando a distribuição de músculo estriado esquelético(m), em corte transversal, lateralmente ao ducto alantoideano (DA). Coloração Orceina Romais

Figura 28 - Fotomicrografia evidenciando uma loja muscular (m) ao lado do ducto alantoideano(DA). Coloração Orceina Romais

Figura 29 - Fotomicrografia mostrando o âmnio (a) revestindo o cordão umbilical. Coloração HE

Figura 30 - Observar o âmnio (a) delimitando o cordão umbilical, o qual possui células arredondadas (R) com núcleos centrais, e, mais internamente o tecido conjuntivo frouxo (f) que envolve as outras estruturas cordonais. Coloração HE

Figura 31 - Fotomicrografia A Fibras colágenas (c) do tecido conjuntivo frouxo do mesenquima umbilical e a membrana amniótica (m) delimitando esternamente o cordão umbilical. Em B observamos a membrana amniótica (a) e a ausência de grânulos glicoproteicos. Coloração em 31A picrossírius e 31B PAS

Figura 32 - Mesênquima umbilical (m), composto por tecido conjuntivo frouxo. Coloração HE

33

Figura 33 - Fotomicrografia panorâmica do saco vitelínico do cão. Coloração HE

Figura 34 - Fotomicrografia mostrando em A a parede do saco vitelínico (p), capilares (c), venulas (v) e vitelo (t). Em B vemos em detalhe um capilar (c) contendo hemácias (h) próximas a luz do saco vitelínico, contendo vitelo (t). Coloração HE

Figura 35 - Observamos em A uma venula (v) junto a parede do saco vitelinico (s). Em B observamos o endotélio (e), hemácia (h) e luz do saco vitelinico (s). Coloração HE

4.5 HISTOLOGIA DO MATERIAL DE BIÓPSIA DE CORIO FETAL

O material oriundo da biópsia de corio fetal tem por finalidade ser submetido a extração de DNA, porém para que nós possamos melhor descrever o que é este material, realizamos um estudo histológico, de algumas amostras obtidas pela técnica que nos dispusemos a adaptar.

O material encontrado consiste em fragmentos de corio fetal, colóide sangüíneo e eritrócitos. Em todo o material encontra-se impregnações de hemosiderina devido a hemólise e ao residuo de sangue dos hematomas marginais, que é rico em ferro.

A forma e a distribuição do corte não segue nenhum padrão devido este ser coletado por um método de biópsia aspirativa, alterando a distribuição dos tecidos. (Figura 36)

Observamos que todos os fragmentos de corio fetal apresentavam-se envoltos em colóide sangüíneo (Figuras 37 e 38), reafirmando a necessidade de várias repetições de lavagem para a extração do DNA.

A presença de capilares sangüíneos é outra característica do cório frondoso que compõe a placenta canina.

36

Figura 36 - Fotomicrografia panorâmica do material resultante da coleta de corio fetal. Coloração HE

Figura 37 - Colóides (s), impregnação por hemociderina (h) e fragmentos de corio fetal (c). Coloração HE

Figura 38 - Fragmento de corio fetal onde observamos: Capilares (c), coloides sangüíneos (s), tecido placentário (p) e impregnação de hemociderina (h). Coloração HE

5 DISCUSSÃO

O período de realização da biópsia de corio fetal em humanos restringe-se preferencialmente ao primeiro trimestre de gestação segundo Hahnemann et al. (1968). Em cães realizamos a biópsia com maior sucesso no terço final de gestação. Um dos fatores que nos levaram à identificação da placenta ao exame ultrasonográfico a partir do 30º dia de gestação. Nesta fase, a placenta encontra-se muito delgada, para a realização da biópsia, a qual é realizada com maior sucesso após o 40º dia de gestação. Este período segundo Phesmister (1974) é a fase que ocorre a maior parte do crescimento e a caracterização fetal.

Segundo Stone e Lockwood (1993), as primeiras biópsias foram realizadas por cânulas introduzidas no útero via cervix. Este método foi descartado de imediato em cães, devido ao fato destes animais serem multiparos e possuírem úteros bicórneos o que inviabiliza totalmente esta técnica. Seria portanto impossível a coleta de material dos fetos que não estivessem próximos à cervix. Outra dificuldade está associada ao formato da placenta, este método poderia ocasionar a ruptura das membranas fetais, uma vez que esta técnica era realizada sem auxílio de ultrassom.

O método utilizado em cadelas foi a coleta transabdominal descrita por Zugaib (1997). O autor afirma que a via transabdominal pode ser utilizada em humanos a partir da nona semana, sendo que o período ideal está contido entre a 11ª e a 14ª semanas. Zugaib (1997) afirma ainda que a coleta via cervix pode ser realizada mais precocemente a partir da sétima semana, porém como já descrevemos esta se torna inviável

para os cães

Segundo D'Alpra et al. (1993), as biópsias de vilo corial tardias em humanos não apresentam diferenças significativas, em relação às realizadas no início da gestação. O período de gestação utilizados em cadelas também não influenciou o diagnóstico realizado.

A biópsia de corio fetal é um pequeno passo para um avanço nas técnicas de diagnóstico pré natal, técnicas reprodutivas e para o estudo de mutações genéticas durante o desenvolvimento.

Esta técnica tende a se aprimorar quando associada ao desenvolvimento de aparelhos de ultra-sonografia com maior potência, podendo ser realizada ao redor do 25º à 30 dias de gestação. Para a reprodução animal podemos pensar em coleta de embriões em fases iniciais de gestação (5 a 6 dias) sem fazer uso de um sonda por via vaginal, a qual pode ocasionar contaminação intra-uterina.

Outra porta que se abra perante o desenvolvimento desta técnica são as terapias intra-uterinas, pois através delas podemos ter acesso ao feto e as membranas fetais, permitindo assim até mesmo a cordocentese, técnica utilizada no homem que ainda não foi adaptada a cães.

Com esta técnica torna-se possível prever antes do nascimento quaisquer anomalia cromossômica ou gênica, o que pode fazer com que o veterinário tome precauções para o momento do parto, reduzindo riscos.

Quanto aos fluídos fetais podemos concordar com Zogno (2002) quando se trata da composição dos líquidos fetais em relação a sua semelhança a ratazanas, bovinos e mocós.

Concordamos também com Wintour e Mc Farlane (1993) ao compararmos a densidade dos fluidos fetais. Observamos que o líquido amniótico apresenta-se menos denso que o líquido alantoideano, ou seja, o líquido amniótico apresenta-se diluído.

Wales e Murdoch (1973) descrevem que em todas as fases de gestação o volume de líquido alantoideano foi maior que o de líquido amniótico, igualmente ao que observamos. Ainda relatam os autores que o pH de ambos os líquidos apresentaram sutis variações, mantendo valores médio de 7,4, não podemos afirmar o mesmo já que observamos valores médio de 8,2 para o pH do líquido amniótico e de 7,1 para o líquido alantoideano. Estas diferenças devem ser observadas com certo cuidado pois o método de coleta, a forma de armazenagem e o método de aferição podem alterar completamente o processo de leitura das amostras.

A afirmação de Smith et al. (1979), a qual considera o líquido alantoideano como importante material para avaliação da bioquímica renal, foi confirmada pelas análises bioquímicas e pelo estudo histológico. As características do ducto pelo qual o líquido é eliminado, mostra-se semelhante a bexiga urinária.

O estudo dos líquidos fetais traz uma panorâmica do meio em que o feto se desenvolve, o que nos permite subsidiar outros estudos correlatos ao desenvolvimento de metodologias para a obtenção de células em diferenciação.

O desenvolvimento destes procedimentos para obtenção de células tronco também exige um conhecimento da hematologia e bioquímica sangüínea fetal, juntamente com os estudos de microambiente uterino. Assim, a técnica também permite obter uma visão das condições clínicas do feto.

Zanco (1998) descreveu o cordão umbilical do cão com três porções e afirmando que na porção justafetal o cordão umbilical apresentou apenas um vaso venoso e dois arteriais. Em nossos estudos encontramos as mesmas informações sobre as diferentes porções, entretanto na parte mais distal da porção justa fetal temos ainda duas veias e duas artérias. Mostramos também a confluência destas na porção justafetal.

Bruni e Zimmerl (1947) descrevem o cordão umbilical sendo constituído por duas artérias e duas veias, porém este não faz referência alguma ao fato das veias se confluírem ao se aproximarem do feto. A descrição da morfologia do cordão umbilical mais próxima dos nossos resultados que encontramos foi feita por Young (1969), no urso polar, e a descrição de Schwarze (1970).

Martins (1986) verificou que o cordão umbilical em humanos varia de 3 a 18% do peso total placentário. Nos cães esse percentual varia de 11 a 20% no terço final de gestação.

Latshaw (1987) faz uma descrição completamente equivocada, afirmando que o cordão umbilical dos carnívoros possui uma veia umbilical e duas artérias. Observamos este arranjo apenas próximo ao feto, onde ocorre a confluência das veias.

Encontramos ainda a mesma relação de tamanho entre o feto e o cordão umbilical descrita por Santos (1996) que é de 2:1 ou seja o cordão tem a metade do comprimento do feto.

A morfologia do cordão umbilical é um dado auxiliar para a obstetrícia e para a clínica de neonatos. Mediante seu estudo podemos saber sobre o desenvolvimento fetal e placentário durante a gestação. Este ainda futuramente poderá ser usado para a administração de terapias aos fetos ainda em desenvolvimento.

6 CONCLUSÕES

1. Pudemos concluir que a biópsia de corio fetal é um procedimento que pode ser realizado em ambulatório desde que o animal tenha passado por jejum e seja submetido ao protocolo anestésico descrito. Com relação as indicações do exame, estas ainda são restritas, porém devem ser ampliadas ao longo dos anos, graças ao avanço das investigações genéticas em cães. O material oriundo da biópsia apresenta-se viável para extração de DNA e permite que a PCR seja realizado com sucesso.

2. O cordão umbilical dos cães apresenta uma distribuição clássica para padrões vasculares, uma relação entre o peso do cordão umbilical com o peso da placenta de 11,5:1 e apresenta também uma proporção de 2:1 entre o comprimento do cordão e do feto.

3. Microscopicamente o cordão umbilical do cão possui características próprias como a confluência das veias umbilicais ocorrendo próximo a cavidade abdominal, as paredes das veias (2) são delgadas e das artérias (2) são musculares e espessas e o ducto alantoideano localiza-se entre os quatro vasos. O saco vitelínico apresenta grande quantidade de capilares, parede delgada e vitelo.

4. A bioquímica dos líquidos fetais mostra a semelhança de composição entre eles e sua proximidade de composição com a urina.

REFERÊNCIAS

BARONE, R. **Anatomie comparée des mammifères domestiques**. Tome Troisième: Splancnologia, 1976. Fascicule II, p.453-96.

BONGSO, A. Determination of fetal sex in cattle by cytologic examination of amniotic fluid. **Am. J. Vet. Res.**, Sep;39(9):1545-6. 1978.

BRUNI, A. C.; ZIMMERL, U. **Anat. Anim. Domest.**, Milano: Francesco Vallardi, 1947. V. II, p.114-119.

D'ALPRÀ, L.; NOCERA, G.; TIBILETTI, M. G.; MARTINOLI, E.; OLDRINI, A. "Late" chorionic villus sampling: cytogenetic aspects. **Prenat. Diagn** v.13, p.239, 1993.

DAVIES, D. V. The fetal membranes of the weddell seal (*Leptonychotes weddelli*). **J. Anat.**, v. 84, p. 408, 1950.

DERIVAUX, J.; ECTORS, F. **Fisiopatología de la gestación y obstetrícia veterinária**. Zaragoza (España): Acribia, 1984. p. 39-43.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: Growth curves, external features and selected references. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 2, p. 11-45, 1973.

FUCHS, F.; RIIS, P. Antenatal sex determination **Nature**, v. 117, p. 330-333, 1956.

HAFEZ, E. S. E., Gestation, prenatal physiology and parturition. In:_____ **Reproduction in farm animals**. 6. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p. 213-36.

HAHNEMANN, N.; MOHR, J. Genetic diagnosis in the embryo by means of biopsy from extra-embryonic membranes. **Bull. E.R Hum. Genet.**, v. 2, p. 23, 1968.

KJELDSBERG, C.; KNIGHT, J. Body Fluids: laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, serum and synovial fluids. In: **American Society of Clinical Pathology**. Chicago: Theid ed., 1993, 387 p.

LATSHAW, W. K. **Veterinary developmental anatomy**: extraembryonic membranes and placentation. Toronto: B. C. Decker, 1987. p. 49-73.

MARTINS, J. A. P. **Placentologia**: placenta-membrana-cordão umbilical. São Paulo: Roca, 1986. p. 40-41.

MELLOR, D. J.; SLATER, J. S. Some aspects of the physiology of sheep foetal fluids. **Br. Vet. J.**, v. 130, p. 238-248, 1974.

NODEN, D. M.; DE LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos**. Zaragoza (España): Acribia, 1990. 246 p.

PHEMISTER, R. D. Nonneurogenic reproductive failure in the bitch. **Vet. Clin. North Amer.**, v. 4, p. 573-586, 1974.

RIBEIRO JUNIOR, J. I. **Análises Estatísticas no SAEG**. Viçosa: UFV, 2001. 301 p.

SANTOS, H. S. L. **Embriologia comparada**: texto e atlas. Jaboticabal: FUNEP, 1996.

189 p.

SCHWARZE, E. **Compêndio de anatomia veterinária**: embriologia. Zaragoza: Acríbia,

SMITH, K. M.; LAI, P. C. W.; ROBERTSON, H. A.; CHURCH, R. B.; LORSCHIEDER, F. L. Distribution of @-fetoprotein in fetal plasma, allantoic fluid, amniotic fluid and maternal plasma of cows. **J. Reprod. Fert.**, v. 57, p. 235-238, 1979.

STONE, J. L.; LOCKWOOD, C. J. Amniocentesis and chorionic villus sampling. **Current Opinion in Obstet Gynecol**, v. 5, p. 211, 1993.

WALES, R. G.; MURDOCH, R. N. Changes in the composition of sheep foetal fluids during early pregnancy. **J. Reprod. Fertil.**, v. 33, p. 197-205, 1973.

WINTOUR, E. M.; McFARLANE, A. Abnormalities of foetal fluids in sheep: two case reports. **Aust. Vet. J.**, v. 70, n. 10, p. 276-378, 1993.

WISLOCKI, G. B.; AMOROSO, E. C. The placenta of the wolverine (*Gulo gulo luscus* -Linnaeus). **Bull. Mus. Comp. Zool.**, v. 114, p. 97, 1956.

YOUNG, A. The fetal membranes of *Arctictis binturong*. **J. Anat.**, v. 127, p. 644-645, 1978.

YOUNG, A. The foetal membranes of polar bear (*Thalarctos maritimus*). **J. Anat.**, v. 104, p. 200, 1969.

ZANCO, N. A. **Pesquisa anatômica das artérias e veias do funículo umbilical, sua ramificação e disposição na placenta de cães.** 1998. 187 f. Tese (Doutorado Anatomia dos Animais Domésticos) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ZOGNO, M. A. **Aspectos reprodutivos das fêmeas de mocó (*Kerodon rupestris*): Análise bioquímica dos líquidos fetais e caracterização colpocitológica do ciclo estral.** 2002. 64 f. Tese (Doutorado Anatomia dos Animais Domésticos) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ZUGAIB, M. Amniocentese Genética. In: _____ **Medicina fetal. 2.** ed. São Paulo: Atheneu, p. 453-460, 1997.

ZUGAIB, M. Biópsia de vilo corial. In: _____ **Medicina Fetal 2.** ed. São Paulo: Atheneu, p. 441- 452, 1997.

Fonte: Noden e De Lahunta (1990)

Fonte: Evans e Sack (1973)

ANEXO A