



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

GLEIDSON BENEVIDES DE OLIVEIRA

**PERFIL DOS GLICOSAMINOGLICANOS, MORFOLOGIA DO SISTEMA
REPRODUTOR FEMININO E DESENVOLVIMENTO PÓS-IMPLANTACIONAL
EM CUTIAS (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758)**

MOSSORÓ

2016

GLEIDSON BENEVIDES DE OLIVEIRA

**PERFIL DOS GLICOSAMINOGLICANOS, MORFOLOGIA DO SISTEMA
REPRODUTOR FEMININO E DESENVOLVIMENTO PÓS-IMPLANTACIONAL
EM CUTIAS (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758)**

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: MORFOFISIOLOGIA ANIMAL

Orientador: Nome Completo, Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira.

Co-orientador: Nome Completo, Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

MOSSORÓ

2016

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

Olivierap Oliveira, Gleidson Benevides de.
Perfil dos glicosaminoglicanos, morfologia do sistema reprodutor feminino e desenvolvimento pós-implantacional em cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758) / Gleidson Benevides de Oliveira.
- 2016.
133 f. : il.

Orientador: Moacir Franco de Oliveira.
Coorientador: Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2016.

1. Ciclo estral. 2. Gestação. 3. Feto. 4. Hormônios ovarianos. 5. Matriz extracelular. I. Oliveira, Moacir Franco de, orient. II. Rocha, Hugo Alexandre de Oliveira, co-orient. III. Título.

GLEIDSON BENEVIDES DE OLIVEIRA

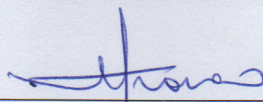
**PERFIL DOS GLICOSAMINOGLICANOS, MORFOLOGIA DO SISTEMA
REPRODUTOR FEMININO E DESENVOLVIMENTO PÓS-IMPLANTACIONAL
EM CUTIAS (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758)**

Tese apresentada ao Doutorado em CIÊNCIA
ANIMAL do Programa de Pós-Graduação em
CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal
Rural do Semi-Árido como requisito para
obtenção do título de Doutor em CIÊNCIA
ANIMAL.

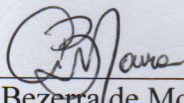
Linha de Pesquisa: MORFOFISIOLOGIA
ANIMAL

Defendida em: 22 / 09 / 2016.

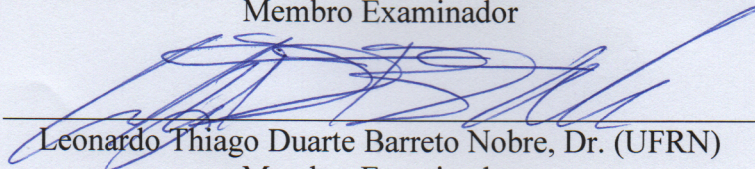
BANCA EXAMINADORA



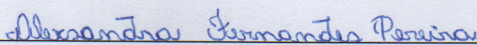
Moacir Franco de Oliveira, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente



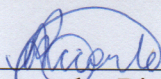
Carlos Eduardo Bezerra de Moura, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador



Leonardo Thiago Duarte Barreto Nobre, Dr. (UFRN)
Membro Examinador



Alexsandra Fernandes Pereira, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador



Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador

A Deus por sua infinita bondade, onisciência, misericórdia, proteção e direcionamento.

Ao Sr. Manoel Benevides de Oliveira Filho, meu pai, pelo incentivo e companheirismo.

A Sra. Gilda Cavalcante de Oliveira, minha mãe, amiga, a qual agradeço pelos ensinamentos que me fizeram ser a pessoa que sou.

A Sra. Gilcema Cavalcante de Oliveira Gonçalves, minha amada irmã, sempre preocupada comigo, sempre me ajudando em todas as circunstâncias, digna de ser intitulada de minha segunda mãe.

A Sra. Ketty Saluciele de Freitas Oliveira, minha esposa, fizemos muitos planos ao longo deste percurso e hoje estamos concluindo um deles, obrigado minha companheira, amiga e mulher.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o meu Senhor e rei e ter me conduzido, sido meu refúgio, fortaleza, auxílio em todos os momentos, permitindo a superação dos obstáculos que surgiram nesta trajetória e em toda a minha vida.

A Ketty Saluciele Silva de Freitas Oliveira, minha esposa, pelo companheirismo, estando comigo em todos os momentos, sendo compreensiva e me dado força, estímulo ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, Manoel Benevides de Oliveira Filho e Gilda Cavalcante de Oliveira, pelos ensinamentos, pela confiança, pela força e auxílio que contribuíram para mais uma vitória em minha vida.

Aos meus irmãos, Gilcema Cavalcante de Oliveira Gonçalves, Antônio Gilmário Cavalcante de Oliveira e Manoel Benevides de Oliveira Júnior, pela força, incentivo e auxílio em todos os momentos.

Ao meu orientador, Moacir Franco de Oliveira, por ter me aceitado como orientado, pelos ensinamentos, lições de vida, encorajamento, confiança a mim dada, pelas oportunidades de crescer profissionalmente e principalmente pela amizade adquirida ao longo deste longo período juntos. Muito obrigado meu amigo.

A Sra. Raimundinha Alves de Sousa, esposa de Moacir, pela receptividade em sua casa, pela amizade e laço criado por nossa família.

Aos meus sobrinhos Andson Benevides Silva, Pedro Henrique Oliveira Gonçalves, Vitor Gabriel Oliveira Araújo, Giselle Oliveira Gonçalves, Amanda Benevides Silva e Milena Grazielle Oliveira Araújo pelo carinho, amor, amizade e força.

Aos meus dois filhos peludos, Mel Oliveira e Molim Oliveira pela amizade verdadeira, carinho, alegria e receptividade em todos os momentos.

Ao meu coorientador Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, que aceitou o desafio de realizarmos esta parceria, pela receptividade, abrindo as portas de seu laboratório. Muito obrigado.

Ao professor Carlos Eduardo Bezerra de Moura, que sempre me encorajou, pela confiança a mim depositada, sendo um dos idealizadores deste projeto. Obrigado por toda a colaboração, incentivo e amizade.

A professora Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte pela amizade, participação na banca e colaboração para melhoria da Tese.

A professora Alexsandra Fernanades Pereira, por aceitar e participar da banca, colaborando a melhoria e enriquecimento da Tese.

Ao professor Leonardo Thiago Duarte Barreto Nobre pela amizade e colaboração no desenvolvimento do experimento e elaboração da Tese.

A Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro proporcionado.

Aos alunos de Pós-Doutorado, Doutorado, Mestrado e Graduação do Laboratório de Biopolímeros Naturais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em especial a Dr. Leonardo Thiago Duarte Barreto Nobre, pela ajuda, receptividade e contribuição neste trabalho.

Todos os amigos que fazem parte do Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada, muitos anos de convivência juntos, partilhamos grandes momentos, construímos um laboratório produtivo, fruto de muito trabalho, irão ficar marcados no meu coração. Obrigado a todos, André Menezes do Vale, Ferdinando Vinicius Fernandes Bezerra, Carlos Magno de Oliveira Júnior, Felipe Venceslau Câmara, Radan Elvis Matias de Oliveira, Herson da Silva Costa, Paulo Mateus, Hélio Noberto de Araújo Júnior e André Vinícius Nunes Silva, pois esta vitória compartilho com vocês. Muito obrigado.

A Hélio Noberto de Araújo Júnior, grande amigo que fez grande parte do trabalho braçal desta pesquisa, muito obrigado, seu esforço valeu a pena meu amigo. Sinta-se vitorioso. Muito obrigado.

A todos funcionários que fizeram e fazem parte do CEMAS, em especial a Antônio Almeida dos Santos, Francisco, Nazareno e Manoel Messias dos Santos (Cuscuz). Muito obrigado pela colaboração.

A empresa Abcam por disponibilizar os anticorpos para realização do experimento.

Todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho tenha atingido os objetivos propostos.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

**PERFIL DOS GLICOSAMINOGLICANOS, MORFOLOGIA DO SISTEMA
REPRODUTOR FEMININO E DESENVOLVIMENTO PÓS-IMPLANTACIONAL
EM CUTIAS (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758)**

OLIVEIRA, G.B. **Perfil dos glicosaminoglicanos, morfologia do sistema reprodutor feminino e desenvolvimento pós-implantacional em cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). 2016. 133f.** Tese (Doutorado em Morfofisiologia Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró – RN, Brasil, 2016.

RESUMO

O conhecimento morfológico e os dados sobre a composição dos glicosaminoglicanos (GAGs) no sistema reprodutor feminino e tecido placentário de cutia são essenciais para a compreensão dos eventos reprodutivos. Soma-se a estes, o conhecimento sobre o desenvolvimento embrionário/fetal na espécie, que serve como base para aplicação do exame ultrassonográfico e técnicas reprodutivas, contribuindo diretamente para conservação da espécie e exploração comercial. Portanto, objetivou-se descrever as características anatomohistológicas do sistema reprodutor de cutias fêmeas, bem como identificar o perfil dos GAGs presentes nos órgãos reprodutivos e placenta ao longo da gestação. Para tanto, foram utilizadas 25 cutias, adultas em diferentes fases do ciclo estral e gestação, obtidas no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEMAS/UFERSA). Após eutanasiadas, as cavidades abdominal e pélvica foram abertas, os órgãos do sistema reprodutor e fetos quando presentes foram fotografados *in situ* e *ex situ* e realizado a análise morfométrica. Fragmentos de cada órgão foram fixados em solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% e destinados à microscopia de luz e eletrônica de varredura. Fragmentos dos órgãos também foram colocados em acetona para realização do processo de delipidação e em seguida a amostra submetida à eletroforese em gel de agarose. Observou-se que o ovário da cutia é revestido por epitélio simples cúbico a pavimentoso que repousa sobre a túnica albugínea, evidenciando-se uma zona cortical e uma medular. A tuba uterina está organizada em três camadas, uma mucosa (epitélio colunar simples, ciliado e viloso), uma lâmina própria (conjuntivo frouxo) e uma camada serosa, estando o tamanho das vilosidades e a espessura da camada muscular variando entre as áreas de infundíbulo, ampola e istmo. Na gestação, este órgão teve perfil variável, com predomínio de DS e HS no início da gestação e DS e CS nos terços médio e final e redução acentuada a termo. O útero é classificado como duplo parcial, formado por dois cornos e uma cérvix com dois óstios distintos que se comunicam com o corpo e um único óstio que se abre na vagina. O corno uterino apresentou ao longo da gestação uma predominância de CS e DS, com pequena quantidade de HS. A vagina possui três camadas, adventícia externa (tecido conjuntivo), muscular e a mucosa composta por epitélio que varia de pavimentoso pouco estratificado sem queratinização (fase lútea) a estratificado pavimentoso queratinizado e cornificado (fase folicular) bastante pregueado e com presença de células leucocitárias. Na vagina, o principal GAG encontrado foi o DS, com pequena concentração de HS analisados ao longo da gestação. A vulva localiza-se entre o ânus (dorsal) e o óstio uretral, estando o vestíbulo

ausente na espécie. O clitóris encontra-se externo a vagina, no qual em seu ápice projetam-se lateralmente duas espículas córneas e uma uretra centralizada, não existindo uma parte comum entre os tratos urinário e genital. Os embriões aos 30 dias pós cópula possuíam forma de “C”, com brotos dos membros em forma de remo, Crown-Rump de $10,75 \pm 0,11$ mm e peso de $0,17 \pm 0,03$; aos 40 dias a pele foi lisa e transparente e saliência hepática e curvatura do corpo reduzidas, CR de $19,5 \pm 0,007$ mm e peso $1,34 \pm 0,01$ g; aos 65 dias, o tubérculo genital já estava diferenciado e CR observado foi de $83 \pm 0,08$ mm e peso de $29,22 \pm 0,46$ g; aos 85 dias, presença de pelos curtos distribuídos pelo corpo, olhos parcialmente abertos, CR de $127,7 \pm 0,6$ mm e peso de $96,56 \pm 7,37$ g; aos 100 dias, feto maduro com pêlos longos e em todo o corpo, unhas e dentes completamente formados e conduto auditivo aberto, CR foi de $164,3 \pm 10,4$ mm e peso de $166,5 \pm 7,79$ g; os neonatos apresentaram pêlos eriçados e olhos abertos ao nascer, com CR de $179,1 \pm 0,5$ e peso de $201,88 \pm 1,89$ g. Conclui-se que o perfil e a concentração dos GAGs varia quanto ao órgão e período de gestação e que a idade do embrião/feto pode ser avaliada durante gestação, permitindo estimar idades gestacionais, e os dados podendo ser usados como parâmetros para exames ultrassonográficos, ajudando na identificação de patologias ao longo do desenvolvimento.

Palavras-chave: Ciclo estral. Gestação. Feto. Hormônios ovarianos. Matriz extracelular. Roedor.

ABSTRACT

The morphological knowledge and data about the composition of glycosaminoglycans (GAGs) in the female reproductive system and placental of agouti are essential to the understanding of reproductive events. In addition to these, the knowledge of embryonic and fetal development in the specie, provides as the basis for application of ultrasound examination and reproductive biotech, contributing directly to conservation of the specie and commercial exploitation. Therefore, the objective describe the anatomohistological characteristics of the reproductive tract of agoutis females, as well as identify the profile of glycosaminoglycans in reproductive organs and placenta during the pregnancy. Were utilized agoutis 25 adult females at different stages of the estrous cycle and pregnancy, obtained in Centre of Multiplication of Wild Animals of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido. After eutanasiados, abdominal and pelvic cavities were opened, the reproductive organs and fetuses when gifts were photographed *in situ* and *ex situ* and analysed to morphometric. Each body fragments were fixed in 4% paraformaldehyde solution and 2.5% glutaraldehyde and submitted to histological technique of light and scanning electron microscopy. Fragments of organs were also placed in acetone to remove the lipids and then the sample subjected to agarose gel electrophoresis. Blades for light microscopy, were stained with hematoxylin-eosin, Gomori stain, Alcian-Mallory and Periodic Acid Schiff (PAS). It was observed that the ovary of the *Dasyprocta leporina* is coated by simple cubic to squamous epithelium that rests on the tunica albuginea, showing a cortical and medular zone. The uterine tube is organized in three layers, a mucous membrane (simple ciliated columnar epithelium), the lamina propria (loose connective) and serosa. The villus height and muscle layer thickness varying between the areas of infundibulum, isthmus and ampulla. In pregnancy this organ has profile variable, with predominance of dermatan sulfate (DS) and heparan sulfate (HS) in early gestation and DS and chondroitin sulfate (CS) in the middle and final thirds with sharp reduction at term. The uterus is classified as partial double, consisting of two horns and a cervix with two distinct ostia that communicate with the body and a single ostium that opens into the vagina. The uterine horn presented throughout pregnancy a predominance of CS and DS, with small amount of HS. The vagina has three layers, the outer adventitia (connective tissue), muscular and mucous membrane composed of epithelium that varies from little pavimentoso storied without keratinization (luteal phase) the storied pavimentoso keratinized and cornified (follicular phase) enough frilled and with leukocytes cells. In the vagina, the main GAG found was the DS, with small concentration of HS analyzed throughout of the pregnancy. The vulva is located between the anus (dorsal) and the ostium and the vestibule urethral absent in the species. The clitoris is external to vagina, in which in its peak protrude sideways two spicules corneas and the urethra centered, in the absence of a common part between the urinary and genital tracts. Embryos at 30 days after copulation had form of "C" with limb buds paddle-shaped, Crown-Rump (CR) of 10.75 ± 0.11 mm and weight of 0.17 ± 0.03 g; 40 days the skin was smooth and transparent and liver boss and curvature of reduced body, CR 19.5 ± 0.007 mm and weight 1.34 ± 0.01 g; after 65 days, the genital tubercle was already differentiated and CR was 83 ± 0.08 mm and weight of 29.22 ± 0.46 g; 85 days, presence of stubble throughout the body, eyes partly open, CR of 127.7 ± 0.6 mm and weight of 96.56 ± 7.37 g; 100 days, mature fetus with long hair and the whole body, fully formed tooth and nail and open auditory meatus, CR was 164.3 ± 10.4 mm and weight of 166.5 ± 7.79 g; the infants had the open eyes and bristling at birth, with CR 179.1 ± 0.5 and weight of 201.88 ± 1.89 g. Concluded that the profile and concentration of GAGs varies as to the organ and gestation period and that the age of the embryo/fetus can be evaluated during pregnancy, allowing to

estimate gestational age and the data can be used as parameters to ultrasound examinations, helping in the identification of diseases throughout development.

Keywords: Estrous cycle. Extracellular Matrix. Fetuses. Ovarian hormones. Pregnancy. Rodent.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO:

Figura 1- Exemplar de cutia. Fonte: Acervo do pesquisador..... 28

CAPÍTULO 1

Figura 1- Sistema reprodutor feminino de cutia. A: ovários (1) localizados caudalmente aos rins (R), tubas uterinas (2), cornos uterinos (3), corpo do útero (4), vulva (detalhe), bexiga (*) e cólon descendente (CD). B: ovários (1), tubas uterinas (2), cornos uterinos (3), corpo do útero (4), cérvix (5), vagina (6), vulva (7) e bexiga (*). C: detalhe da região vulvar (7), onde observa-se cranioventralmente à abertura vulvar (9), as espículas córneas (8) e caudodorsalmente, o ânus (10). Em maior aumento observa-se o clitóris (c), sem o prepúcio (*) e as espículas com o óstio uretral centralizado (cabeça de seta) (8). D: a membrana de oclusão vaginal (retângulo) em fêmea gestante. Barra = 1cm..... 38

Figura 2- Ovário de cutia em corte longitudinal. A: folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento (cabeça de seta), corpo lúteo maduro (círculo) e as fímbrias (seta). B: epitélio ovariano composto por uma única camada de células pavimentosas (cabeça de seta) que repousam sobre a túnica albugínea (*), folículos primordiais (seta amarela) na zona cortical e as fímbrias da tuba uterina com epitélio colunar simples e ciliado (seta preta). C: zona medular (*) repleta de vasos sanguíneos (cabeça de seta) e corpo lúteo maduro (círculo) e diversos folículos primordiais (retângulo) na zona cortical. D: dois grandes corpos lúteos hemorrágicos (*). E: varredura do ovário em corte longitudinal, mostrando a albugínea (a), as zonas cortical (b) e medular (c) e fossa de ovulação (of). F: MEV do ovário e infundíbulo (b), visualizando em detalhe a mucosa pregueada e vilosa das fímbrias. A- Alcian Mallory; B e D- HE; C- PAS..... 40

Figura 3- Tuba uterina de cutia. A: istmo, com túnica serosa (*) com presença de inúmeros vasos sanguíneos, túnica muscular (M) e mucosa (★). B: detalhe da mucosa do istmo formada por um epitélio colunar simples que repousa sob tecido conjuntivo frouxo. C: ampola com as camadas serosa (*), muscular (M) e a mucosa com epitélio colunar com dobras e o lúmen (L). D: lúmen onde verifica-se as dobras do epitélio colunar simples ciliado (seta) e com atividade secretória e a camada muscular (m). E: infundíbulo com o lúmen reduzido e epitélio com muitas dobras. F: detalhe das dobras do epitélio colunar simples ciliado (cabeça de seta). G: MEV do infundíbulo, evidenciando a camada serosa (S), uma muscular espessa (M) e uma mucosa pregueada e bastante vilosa (*). H: detalhe da mucosa vilosa do infundíbulo. A e B: HE; C, D e F: PAS; E: Tricrômio de Gomori..... 42

Figura 4- Útero de cutia. A: corno uterino em corte transversal, como lúmen uterino e as camadas do útero – endométrio (E), miométrio (M) e Perimétrio (P). B: detalhe do endométrio uterino, formada por epitélio cúbico simples (e) e o estroma endometrial rico em glândulas

endometriais de diferentes tamanhos. C: corpo do útero, com presença de um septo (S) que mantém individualizado cada corno uterino. Observa-se ainda as camadas endométrio (E), miométrio (M) e perimétrio (P) e dois lúmens individualizados (L). D: detalhe da mucosa do corpo do útero, mantendo a semelhança com aquela dos cornos uterinos, apesar da redução da quantidade de glândulas endometriais. E: MEV do corno uterino em corte transversal, evidenciando o perimétrio (P), o miométrio (M) espesso e o endométrio (E). F: detalhe da mucosa do endométrio identificando a abertura dos óstio das glândulas endometriais (cabeça de seta). A-D: HE.....

44

Figura 5- Cérvix de cutia ao longo do ciclo estral e terço final gestação. A: Porção cranial, onde verifica-se os dois óstios cervicais internos (seta) separados por um septo (S) espesso. Evidenciam-se as camadas média composta por tecido conjuntivo denso não modelado (*) e fibras musculares (M) e a serosa (★). B: óstio cervical externo, onde verifica-se uma única luz (L), epitélio bastante pregueado (*), a submucosa (sm) e média (M). C: epitélio estratificado pavimentoso (seta) que repousa sobre o tecido conjuntivo frouxo da submucosa (sm). D: mucosa da cérvix no diestro mostrando reação positiva para PAS. E: submucosa (sm) e mucosa bastante pregueada no terço final da gestação, onde evidencia-se a proliferação das glândulas mucosas cervicais coradas com Alcian-Mallory (seta), indicativo da produção de mucopolissacarídeos. F: epitélio cervical (*) com submucosa (sm) de fêmea gestante no terço final de gestação, identificando-se uma mucosa com reação PAS positiva e presença de muco no lúmen, marcado com a coloração. G: MEV da cérvix na porção inicial, evidenciando-se a serosa (*), uma muscular (M) e o septo (S) que divide o óstio cervical interno em dois lúmens (L). H: terço final da cérvix apresentando um único óstio cervical externo (L), uma camada média (M) espessa e uma serosa (*). I: detalhe da mucosa da cérvix. A-C: HE; D e F: PAS; E: Alcian-Mallory.....

45

Figura 6- Vagina de cutia no ciclo estral e gestação. A: vagina em fase lútea, evidenciando-se a formação de papilas (*), do tampão mucoso (★) e epitélio PAS positivo. B: epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (seta) com indícios de cornificação (cabeça de seta) e lúmen (L), na fase folicular. C: epitélio pouco estratificado com reação PAS positiva (seta) e lúmen (L), observados na fase lútea; D: epitélio estratificado pavimentoso(★) com cornificação, queratinização (seta) e lúmen (L), na fase folicular; E: epitélio bastante pregueado corado com Tricrômio de Gomori, observando-se a mucosa (★), submucosa (sm), musculatura (*) e lúmen (L) na fase lútea; F: detalhe da mucosa na fase secretória, mostrando células vacuoladas (seta) e camada muscular circular (★); G: detalhe da mucosa em fase folicular com epitélio PAS positivo (*), submucosa (sm) e lúmen (L); H: MEV em corte transversal, verificando-se as camadas média (M) e mucosa (*) e o óstio uretral (u). I: detalhe da mucosa (*) da vagina visto em corte longitudinal. A-D: HE; E-F: Alcian-Mallory; G: PAS.....

47

Figura 7- Espículas clitorianas de cutia. A: espículas córneas (E) circundadas pelo

prepúcio (p); B: espícula de cutia visualizada em maior aumento evidenciando a queratinização (*) e delimitada pelo prepúcio (p). C: detalhe do epitélio estratificado (★) e queratinizado (*) das espículas. D: MEV, mostrando as espículas (E) exteriorizadas ao prepúcio na fase folicular do ciclo estral. E: varredura da região vulvar em fase lútea com espículas internas (E) ao prepúcio, visualizadas após a remoção do mesmo e uretra centralizada entre as espículas (seta). F: detalhe da extremidade da espícula queratinizada. A-C: HE.....

48

CAPÍTULO 2:

- Figura 1- Etapas para Eletroforese em gel de agarose. A: aplicação das amostras nos poços. B: lâmina contendo as amostras e o padrão. C: lâmina submetida a eletroforese. D: lâmina colocada em solução de CTV 0,1%. E: lâminas envoltas em papel filtro e submetidas a corrente de ar quente contínua. F: lâmina corada em azul de toluidina. G: lâmina aplicada em solução descorante..... 64
- Figura 2- Perfil eletroforético da tuba uterina ao longo da gestação em cutias. TI- terço inil; TM- terço médio; TF- terço final; CS- conroitim sulfato; DS- dermatam sulfato; HS- heparam sulfato..... 66
- Figura 3- Eletroforese em gel de agarose e densitometria das lâminas do corno uterino gestante e não gestante. A: Perfil eletroforético do corno uterino gestante ao longo da gestação em cutias. B: densitometria do corno uterino ao longo da gestação. C: perfil eletroforético do corno uterino não gestante. D: perfil eletroforético do corno uterino não gestante após incubação com heparinase III. E: densitometria do corno uterino não gestante e após incubação com heparinase III. TI- terço inil; TM- terço médio; TF- terço final; CS- condroitim sulfato; DS- dermatam sulfato; HS- heparam sulfato..... 66
- Figura 4- Eletroforese em gel de agarose e densitometria das lâminas do corpo do útero. A: Perfil eletroforético do corpo uterino ao longo da gestação em cutias. B: perfil eletroforético do corpo uterino após incubação com heparinase III. C: A: análise das Unidades Arbitrárias de Densitometria (UADs) no corpo uterino. CS- condroitim sulfato; DS- dermatam sulfato; HS- heparam sulfato..... 68
- Figura 5- Eletroforese em gel de agarose e densitometria das lâminas da cérvix na gestação em cutias. A: Perfil eletroforético da cérvix ao longo da gestação. B: perfil eletroforético do cérvix após incubação com heparinase III. C: B: análise das UADs na cérvix uterina. CS- Condroitim sulfato; DS- Dermatam sulfato; HS- Heparim sulfato..... 69
- Figura 6- Eletroforese em gel de agarose e densitometria das lâminas da vagina em cutias gestantes. A: Perfil eletroforético da vagina ao longo da gestação em cutias. B: perfil da eletroforese do tecido vaginal após incubação com heparinase III. C: análise das UADs na vagina ao longo da gestação. CS- Condroitim sulfato; DS- Dermatam sulfato; HS- Heparim sulfato..... 70

Figura 7- Tuba uterina de cutia submetido a técnicas de citoquímica por PAS e imunohistoquímica. A: Infundíbulo de cutia aos 45 dias possuindo reação PAS positiva na camada muscular (M), na mucosa (cabeça de seta) e na submucosa das vilosidades (V). B: Ístmo aos 45 dias com as camadas muscular (M) e submucosa (Sm) marcados com anti-AH. C: ampola da tuba aos 75 dias, estando o epitélio ciliado marcado (cabeça de seta), submucosa (Sm) e camada muscular (M) marcadas com anti-AH. D: infundíbulo da tuba aos 100 dias com a submucosa (Sm) das vilosidades marcadas fracamente por anti-CS. Neg: Negativo..... 71

Figura 8- Útero de cutia submetido a técnicas de citoquímica por PAS e imunohistoquímica. A: Corno uterino de cutia aos 20 dias de gestação, mostrando reação PAS positiva na mucosa (seta) do endométrio (E) e miométrio (M). B: reação positiva no endotélio das glândulas endometriais (cabeça de seta) de cutia aos 75 dias. C: corno uterino aos 48 dias com a mucosa (cabeça de seta amarela) e lâmina basal (cabeça de seta preta) do epitélio endometrial e das glândulas endometriais (seta) marcadas com o anticorpo para AH. D: corno uterino aos 65 dias, estando a submucosa (Sm) e mucosa (cabeça de seta) e miométrio (M) marcado com anti-CS. E: corpo do útero aos 75 dias apresentando reação PAS positiva na mucosa (seta) e mucosa das glândulas endometrias (cabeça de seta). F: corpo aos 20 dias, estando o endométrio (E), miométrio (M) e serosa (S) marcadas com anti-CS. G: em detalhe o endométrio do corpo aos 20 dias mostrando as mucosas endometrial (seta) e das glândulas endometriais (cabeça de seta) marcadas por anti-CS. H: corpo aos 45 dias com marcação do anti-AH nas regiões de mucosa (seta), glândulas endometriais (cabeça de seta) e submucosa (Sm). I: cérvix de cutia aos 2 dias pós cópula com reação PAS positiva na mucosa (seta), submucosa (Sm) e miométrio (M). J: cérvix aos 45 dias evidenciando-se a reação PAS positiva forte no miométrio e fraca na submucosa. K: verifica-se tampão cervical mucoso aos 75 dias (estrela), e submucosa com reação fraca para PAS. L: cérvix aos 48 dias com a submucosa marcada fracamente para anti-AH. Neg: Negativo..... 72

Figura 9- Vagina de cutia submetida a técnicas de citoquímica por PAS e imunohistoquímica. A: vagina de cutia aos 35 dias mostrando a mucosa (seta) e a membrana de oclusão vaginal (*) com reação PAS positiva. B: vagina aos 100 dias com membrana de oclusão (estrela), mucosa (*) e camada muscular (M) PAS positivas. C: vagina aos 35 dias possuindo marcação fraca para anti-CS na submucosa (Sm) e muscular (M). D: vagina aos 75 dias com marcação forte na submucosa e tecido conjuntivo adjacente (Sm) para anti-AH. E: vagina aos 75 dias com marcação na submucosa e tecido conjuntivo para anti-CS. F: vagina aos 100 dias apresentando marcação na submucosa e tecido conjuntivo (Sm) e camada muscular (M), não estando a membrana de oclusão vaginal marcada para o anticorpo contra AH (estrela). Neg: Negativo..... 73

CAPÍTULO 3:

Figura 1- Ultrassom do útero de cutia fêmea 30 dias de gestação, evidenciando-se o embrião (seta) dentro da vesícula gestacional e a placenta (*). Fonte: Acervo do pesquisador..... 86

- Figura 2- Perfil eletroforético da placenta e subplacenta de cutia analisada ao longo da gestação. A: Análise da placenta entre 35 e 100 dias. B: placenta entre 35 e 100 dias após tratamento com heparinase III. C: análise da subplacenta entre 35 e 100 dias. D: Densitometria das lâminas de eletroforese da placenta e subplacenta ao longo da gestação. Condroitim Sulfato (CS), Dermatan Sulfato (DS), Heparan Sulfato (HS) e Unidades Arbitrárias de Densitometria (UAD)..... 90
- Figura 3- Placenta de cutia no terço inicial de gestação submetida a reação de citoquímica (PAS). A: placenta aos 25 dias, verifica-se reação intensa para PAS marcando o sinciotrofoblasto (Sin), circundando as lacunas maternas (*) numa placenta ainda imatura. B: detalhe da decídua basal com intensa reação PAS na placenta aos 25 dias. C: placenta aos 35 dias com o sincício (cabeça de seta) ainda marcado em PAS e a decídua (Dec) e células trofoblásticas gigantes (seta) mostrando reação intensa para PAS. D: citotrofoblasto marcado em PAS na borda lateral da placenta e sincício (Sin) com marcação fraca. Neg: Negativo..... 92
- Figura 4- Placenta de cutia no terço inicial e final de gestação submetida a reação de imunohistoquímica. A: placenta aos 30 dias, evidenciando-se a reação positiva do sinciotrofoblasto (seta) para condroitim sulfato. B: sinciotrofoblasto com reação positiva para ácido hialurônico. C: citotrofoblasto (Cit) marcado com reação fraca para anti-CS aos 35 dias. D: citotrofoblasto (Cit) marcado fortemente para Ácido Hialurônico aos 35 dias. E e F: placenta aos 65 dias com células trofoblásticas gigantes (seta) marcadas para anti-CS e anti-AH, respectivamente. G: citotrofoblasto (Cit) na placenta aos 65 dias com forte marcação para anti-CS e sincício marcado fracamente (Sin). H: placenta aos 65 dias com sincício (Sin) marcado para anti-AH (seta). I: placenta aos 85 dias com sincício próximo a borda marcado fortemente para anti-CS (cabeça de seta). J: placenta aos 85 dias com sincício (Sin) marcado com anti-AH. K: placenta aos 100 dias com reação anti-AH com sincício (Sin) marcado positivamente. L: células trofoblásticas gigantes marcadas fracamente para anti-CS (cabeça de seta) aos 100 dias e decídua (Dec) fortemente marcada. Neg: Negativo..... 93
- Figura 5- Subplacenta (S) de cutia entre 30 e 85 dias de gestação submetida as técnicas de citoquímica e imunohistoquímica. A: sinciotrofoblasto (sin) próximo a região da subplacenta e circundando as lacunas maternas (*) mostrando reação PAS positiva. B: detalhe dos septos subplacentários (S), sendo verificado internamente as células trofoblásticas marcadas em PAS (cabeça de seta) e externamente, o sinciotrofoblasto marcado fortemente em PAS (seta). C: trofoblasto dos septos subplacentários marcados para anti-CS circundando as lacunas da subplacenta aos 30 dias. D: subplacenta aos 35 dias com as células do septo com reação positiva para anti-CS. E: células do septo da subplacenta aos 65 dias, PAS positivas (seta). F: células trofoblásticas do septo aos 65 dias marcadas fracamente para anti-CS (seta) e tecido alantoidiano marcado fortemente (*). G: subplacenta aos 75 dias com células do septo PAS positivas (seta). H: detalhe das células do septo marcadas fracamente

para anti-AH e tecido alantoidiano fortemente marcado. I: subplacenta aos 85 dias com células do septo marcadas fortemente para anti-AH. Reação citoquímica para PAS: A-B, E, G. Imunohistoquímica para anti-CS: C-D, H. Anti-AH: F, I. Neg: Negativo.....

94

CAPITULO 4:

- Figura 1- Embriões de cutia. A: embrião aos 30 dias de idade com membros em formato de remo. B: embrião aos 32 dias, com o início da formação do focinho (*) e dos dígitos (cabeça de seta). C: embrião aos 35 dias com membros em formato de nadadeiras, formação do focinho e saliência hepática (a). D: embrião aos 40 dias com redução da saliência hepática e início da formação do sulco labial (seta), diferenciação da boca e narinas e presença dos raios digitais com membrana interdigital (cabeça de seta). Têm-se ainda o placóide óptico (1), vesícula prosencéfala (2), mesencéfalo (3) e rombencéfalo (4), saliência auricular (5), membro torácico (6), saliência cardíaca (7), membro pélvico (8), cauda (9), cordão umbilical (10), costelas (11). Barra= 1cm..... 109
- Figura 2- Fetos de cutia no terço médio de desenvolvimento. A: feto aos 45 dias, identificando o sulco labial (cabeça de seta) e dedos totalmente separados (seta). B: feto aos 55 dias, verificando-se o pavilhão auricular (*) e início da formação das unhas (cabeça de seta). C: feto aos 65 dias, observando-se a formação da pálpebra (cabeça de seta branca), rugas na pele (cabeças de seta preta) e pelo tátil (seta). D: feto aos 75 dias, observando-se o pavilhão auricular formado (seta) e pelos táteis na face (cabeça de seta). Barra= 1cm..... 112
- Figura 3- Detalhe das estruturas dos embriões/fetos de cutia ao longo do desenvolvimento. A: embrião aos 35 dias com broto do membro torácico em formato de nadadeira e presença de membrana interdigital. B: saliência auricular (cabeça de seta) de embrião aos 40 dias, formação da órbita ocular (seta). C: feto aos 55 dias detalhe dos vasos superficiais (seta) e olho com retina pigmentada e com membrana ocular (cabeça de seta); D: feto aos 55 dias com formação das suturas dos ossos cranianos (seta) e formação das vibrissas (cabeça de seta). E: tubérculo genital indiferenciado (seta) aos 45 dias. F: tubérculo genital em processo de diferenciação aos 55 dias. G: feto aos 65 dias com identificação da glândula (cabeça de seta preta) do pênis (seta), e escroto (cabeça de seta branca). H: feto aos 100 dias com vulva fechada (cabeça de seta)..... 113
- Figura 4- Fetos no terço final de desenvolvimento e neonato de cutia. A; feto aos 85 dias, observa-se pelos distribuídos pelo corpo e os olhos parcialmente abertos. B: feto maduro aos 100 dias pós cópula, verificando-se a presença dos toros palmares (cabeça de seta) e unhas formadas (seta). C: neonato de cutia aos 110 dias com os olhos completamente abertos. Barra= 1 cm..... 115
- Figura 5- Variação em peso (P) e crown rump (CR) ao longo do desenvolvimento fetal (i) de cutias..... 116

Figura 6- Análise das medidas corpóreas ao longo do desenvolvimento embrionário/fetal (i). A: comprimento total (CT) e céfalo-caudal (CC). B: comprimento cefálico (CEF), diâmetro biparietal (DBP) e circunferência cefálica (HC). C: perímetro torácico (PT) e abdominal (PA). D: comprimento dos membros pélvicos (CMT) e comprimento dos membros pélvicos (CMP). E: diâmetro maior do olho (OL), diâmetro menor do olho (DO) e comprimento de cauda (C). F: comprimento da orelha (OR) no decorrer da gestação (i)..... 117

Figura 7- Análise das medidas corpóreas ao longo do desenvolvimento embrionário/fetal (i). A: comprimento do rádio (R) e tíbia (T). B: comprimento das unhas dos membros torácicos (UMT) e unhas dos membros pélvicos (UMP). C: largura das unhas dos membros torácicos (LUT) e unhas dos membros pélvicos (LUP). D: comprimento dos dentes incisivos superiores (DIS) e comprimento dos dentes incisivos inferiores (DII) no decorrer da gestação (i)..... 118

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1:

Tabela 1-	Media e erro padrão da media (EPM) dos dados morfométricos dos ovários direito (OD) e esquerdo (OE) da cutia (<i>D. leporina</i>): peso, comprimento, diâmetro e espessura.....	39
Tabela 2-	Espessura (µm) da camada muscular do infundíbulo, ampola e istmo.....	40
Tabela 3-	Média e erro padrão da media (EPM) dos dados morfométricos do corpo do útero, cérvix e vagina da cutia (<i>D. leporina</i>): comprimento e diâmetro.....	46
Tabela 4-	Valores mensurados (µm) do epitélio vaginal ao longo do ciclo estral.....	47

CAPÍTULO 2:

Tabela 1-	Análise de estradiol e progesterona sérica em cutias gestantes.....	65
Tabela 2-	Correlação dos níveis séricos de progesterona e glicosaminoglicanos totais nos órgãos reprodutores de cutias fêmeas nos terços inicial, médio e final de gestação.....	67

CAPÍTULO 3:

Tabela 1-	Correlação dos níveis séricos de estradiol e glicosaminoglicanos totais na placenta e subplacenta ao longo da gestação.....	91
Tabela 2-	Correlação dos níveis séricos de progesterona e glicosaminoglicanos totais na placenta e subplacenta ao longo da gestação.....	91

ANEXO A:

Tabela 1-	Anticorpos Utilizados para marcação do condroitim sulfato e ácido hialurônico nos órgãos reprodutores e na placenta e subplacenta de cutias..	128
-----------	---	-----

ANEXO B:

Tabela 2-	Correlação dos níveis séricos de estradiol e glicosaminoglicanos totais nos órgãos reprodutores de cutias fêmeas nos terços inicial, médio e final de gestação.....	129
-----------	---	-----

ANEXO C:

Tabela 1-	Média e desvio padrão do peso e comprimento crown-rump de embriões e fetos de cutias (<i>Dasyprocta leporina</i> Linnaeus, 1758).....	130
-----------	--	-----

ANEXO D:

Tabela 2-	Média e desvio padrão das medidas corpóreas de embriões e fetos de cutias (<i>Dasyprocta leporina</i> Linnaeus, 1758), em diferentes idades pós-cobertura, medidas em milímetros.....	131
-----------	--	-----

ANEXO E:

Tabela 3-	Média e desvio padrão das medidas corpóreas de embriões, fetos e animais recém-nascidos aos 110 dias, de cutias (<i>Dasyprocta leporina</i> Linnaeus, 1758), medidas em milímetros.....	132
-----------	--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido Hialurônico
C	Cauda
CC	Céfalo-Caudal
CEF	Comprimento Cefálico
CMT	Comprimento do Membro Torácico
CMP	Comprimento do Membro Pélvico
CR	Crown-Rump
CS	Condroitim sulfato
CT	Comprimento Total
CTV	Cetavlon
CUT	Comprimento das Unhas dos Membros Torácicos
CUP	Comprimento das Unhas dos Membros Pélvicos
DBP	Diâmetro Biparietal
DII	Comprimento dos Dentes Incisivos Inferiores
DIS	Comprimento dos Dentes Incisivos Superiores
Dr	Doutor
DOL	Diâmetro do Olho;
DS	Deramtan sulfato
G	Gramas
GAGs	Glicosaminoglicanos
HC	Circunferência Cefálica
HE	Hematoxilina-Eosina
HS	Heparam sulfato
KCl	Cloreto de Potássio
LUP	Largura das unhas dos Membros Pélvicos
LUT	Largura das Unhas dos Membros Torácicos
MEC	Matriz Extracelular
Mm	Milímetros
OD	Ovário direito
OE	Ovário esquerdo

OR	Comprimento da Orelha
PA	Perímetro Abdominal
PAS	Ácido Periódico de Schiff
p.c.	Pós-cópula
PGs	Proteoglicanos
PT	Perímetro Torácico
QS	Queratan sulfato
RU	Rádio/Ulna
TB	Comprimento da Tíbia
UAD	Unidades Arbitrárias de Densitometria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
	REFERÊNCIAS	31
3	CAPITULO 1 - MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO DE CUTIA (<i>Dasyprocta leporina</i> LINNAEUS, 1758) EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL E GESTAÇÃO.....	34
3.1	RESUMO.....	34
3.2	INTRODUÇÃO.....	34
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.3.1	Animais e Protocolo Anestésico.....	35
3.3.2	Microscopia e Biometria.....	36
3.3.3	Microscopia de Luz.....	36
3.3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	37
3.3.5	Análise Estatística.....	37
3.4	RESULTADOS.....	38
3.4.1	Ovário.....	38
3.4.2	Tuba Uterina.....	41
3.4.3	Útero.....	43
3.4.4	Vagina e genitália externa.....	46
3.5	DISCUSSÃO.....	49
3.6	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
4	CAPÍTULO 2 – GLICOSAMINOGLICANOS NO SISTEMA REPRODUTOR DE CUTIAS (<i>Dasyprocta leporina</i> LINNAEUS, 1758) E ANÁLISE HORMONAL NA GESTAÇÃO.....	59
4.1	RESUMO.....	59
4.2	INTRODUÇÃO.....	59
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	61
4.3.1	Animais.....	61

4.3.2	Delineamento Experimental.....	61
4.3.3	Análise hormonal.....	61
4.3.4	Citoquímica e Imunohistoquímica.....	62
4.3.5	Delipidação.....	63
4.3.6	Extração e purificação dos GAGs.....	63
4.3.7	Eletroforese em gel de agarose.....	63
4.3.8	Digestão enzimática.....	64
4.3.9	Densitometria.....	64
4.3.10	Análise Estatística.....	65
4.4	RESULTADOS.....	65
4.4.1	Análise Hormonal.....	65
4.4.2	Perfil Eletroforético.....	65
4.4.3	Citoquímica e Imunohistoquímica.....	70
4.5	DISCUSSÃO.....	74
4.6	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
5	CAPÍTULO 3 – GLICOSAMINOGLICANOS NA PLACENTA E SUBPLACENTA DE CUTIAS (<i>Dasyprocta leporina</i> LINNAEUS, 1758)....	84
5.1	RESUMO.....	84
5.2	INTRODUÇÃO.....	84
5.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	86
5.3.1	Animais.....	86
5.3.2	Anestesia e Eutanásia.....	87
5.3.3	Análise Hormonal.....	87
5.3.4	Material para Citoquímica e Imunohistoquímica.....	87
5.3.5	Coleta do material, extração e purificação dos GAGs.....	88
5.3.6	Eletroforese em gel de agarose.....	88
5.3.7	Análise Estatística.....	89
5.4	RESULTADOS.....	89
5.5	DISCUSSÃO.....	95
5.6	CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS.....	99
6	CAPÍTULO 4 - DESENVOLVIMENTO PRENATAL DE CUTIA	

	(<i>Dasyrhcota leporina</i> LINNAEUS, 1758).....	104
6.1	RESUMO.....	104
6.2	INTRODUÇÃO.....	104
6.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	106
6.4	RESULTADOS.....	107
6.4.1	Embrião aos 30 dias.....	107
6.4.2	Embrião aos 32 dias.....	108
6.4.3	Embrião aos 35 dias.....	108
6.4.4	Embrião aos 40 dias.....	108
6.4.5	Embrião aos 45 dias.....	110
6.4.6	Embrião aos 55 dias.....	110
6.4.7	Embrião aos 65 dias.....	111
6.4.8	Embrião aos 75 dias.....	111
6.4.9	Embrião aos 85 dias.....	113
6.4.10	Embrião aos 100 dias.....	114
6.4.11	Neonato.....	115
6.4.12	Dados biométricos.....	116
6.5	DISCUSSÃO.....	118
6.6	CONCLUSÃO.....	123
	REFERÊNCIAS.....	123
	ANEXOS.....	127

1 INTRODUÇÃO

A cutia é um roedor silvestre, de pequeno porte pertencente à família Dasyproctidae e gênero *Dasyprocta*. As espécies deste gênero apresentam um tamanho considerável, membros longos e finos, o dorso posterior longo e fortemente curvado, a cauda pequena e desprovida de pelos e os membros torácicos contendo quatro dígitos e os pélvicos três (REIS et al., 2006). A pelagem do dorso caudal é formada por longos pêlos, ásperos, duros e de coloração variável entre as espécies em oliváceo-agrisalhada (*D. azarae*), amarelo-palha e castanho (*D. catrinae*), amarelo-alaranjada (*D. leporina* e *D. aurea*), laranja-avermelhada (*D. croconata*, *D. prymnolopha*) e castanho-escura ou mesmo preta (*D. nigriclunis*, *D. fuliginosa*) (IACK-XIMENES, 1999). Possuem hábito diurno e crepuscular, são terrestres e se alimentam de frutas, sementes, raízes e folhas (REIS et al., 2006).

A espécie *Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758, pertence a ordem Rodentia, subordem Hystricomorpha, Infraordem Hystricognathi, família Dasyproctidae, gênero *Dasyprocta* (REIS et al., 2006) (Figura 1), sendo encontrada na América do Sul ao norte do Amazonas e no leste do Rio Negro, Venezuela, Guiana Francesa, Guiana e Suriname, Trinidad e Tobago e região central do Brasil, tendo sido introduzida nas Pequenas Antilhas, especificamente Dominica, Granada, e as Ilhas Virgens dos Estados Unidos (EMMONS; REID, 2008). Esta espécie apresenta grande importância sócioeconômica, sendo sua carne utilizada como fonte de proteína animal pela população, muitas vezes por questões culturais ou como fonte de alimento da população social economicamente desfavorecida. Fatores como o hábito cultural e social da caça, desmatamento e queimadas, representam ações do homem que tem contribuindo para sua ameaça de extinção. Considerando a importância ecológica e o potencial zootécnico da cutia, por possuir elevado potencial reprodutivo, apresentar alimentação bastante diversificada e poucos problemas sanitários, a obtenção de informações sobre a biologia destes roedores oferecem subsídios para a produção racional e sustentável da espécie garantindo sua conservação.



Figura 1- Exemplar de cutia. Fonte: Acervo do pesquisador.

Na literatura consta vários estudos desenvolvidos com cutias, sendo encontrados trabalhos que tratam sobre sua morfologia (DINIZ et al., 1989; MENEZES, 2001; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016; SILVA et al., 2016), metabolismo basal (BRITO et al. 2010) e ciclo estral (GUIMARÃES et al., 1997; CAMPOS et al., 2015) e ainda alguns relacionados ao sistema reprodutor feminino (GUIMARÃES et al., 1994, MARTINS et al., 2011) e placentação (RODRIGUES et al., 2003; MIGLINO et al., 2004; CONCEIÇÃO et al., 2008; OLIVEIRA, 2012). Neste último caso, os autores relatam a presença de macromoléculas, apresentando-se como um material amorfo e que corava-se facilmente em PAS, localizadas na matriz extracelular (MEC), mas sem inferir sobre sua função.

No que diz respeito ao sistema reprodutor feminino da cutia, encontra-se na literatura os trabalhos em *D. fuliginosa* (MAYOR et al., 2011) e alguns trabalhos com *D. prymnolopha* (GUIMARÃES et al., 1994) e em *D. leporina* (SINGH et al., 2014). Ressalta-se que o sistema reprodutor feminino da *D. leporina*, possui diversas características particulares, como um útero duplo, presença de uma membrana de oclusão vaginal e espículas clitorianas, cuja formação e função são ainda indefinidos, o que torna o estudo morfológico de fundamental importância para o entendimento da fisiologia reprodutiva e a contribuição destes conhecimentos na aplicação de biotécnicas reprodutivas.

Quanto a MEC, esta é formada por um conjunto de agregados de macromoleculares constituídas por colágeno, glicoproteínas multiadesivas, elastina, GAGs e PGs (KRESSE; SCHÖNHER, 2001; HEINEGARD, 2009), fatores do crescimento, citocinas, enzimas de degradação e peptídeos crípticos que são expostos pela ação das peptidases (SCHENK; QUARANTA, 2003). Estas moléculas participam ativamente das funções celulares e são

capazes de interagir entre si e com as células, mantendo-as associadas de forma a garantir a organização tecidual e a sobrevivência celular, exercendo papel essencial na fisiologia normal e em muitos eventos patológicos (KRESSE; SCHÖNHER, 2001; HEINEGARD, 2009), o que torna os componentes da matriz, em especial os glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos (PGs), elementos fundamentais aos mais variados processos metabólicos. No que diz respeito as GAGs, estes são heteropolissacarídeos formados por unidades de hexosamina, açúcar não-nitrogenado e/ou ácido urônico, presentes em todas as células animais, tendo sido descritos em mamíferos o condroitim 4 e 6 sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato, heparina, queratam sulfato e ácido hialurônico (FRASER et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2015), sendo esta composição variável quanto a espécie e ao órgão estudados. Considerando que na cutia não existem dados sobre o padrão dos GAGs existentes em cada órgão do sistema reprodutor, bem como também na placenta e na subplacenta, realizou-se o estudo, a fim de elucidar a influência destas moléculas ao longo do ciclo estral e gestação.

Destaca-se ainda que em *D. leporina* nada se sabe sobre o desenvolvimento pré-natal e fetal, conhecimento que servirá como parâmetro para exames ultrassonográficos, aplicação de biotécnicas reprodutivas na espécie, bem como a identificação de anomalias congênitas que ocorrem na gestação, contribuindo diretamente para conservação da espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar, em cutias, a morfologia e o perfil de glicosaminoglicanos do sistema reprodutor de cutias fêmeas, na placenta e subplacenta, de modo a poder estimar sobre sua importância nos eventos fisiológicos que se processam nestas estruturas durante a gestação, bem como descrever o desenvolvimento embrionário/fetal na espécie.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Descrever a morfologia do sistema reprodutor de cutias fêmeas;
- b) Extrair, purificar, quantificar e identificar glicosaminoglicanos na tuba uterina, no útero e vagina de cutias durante a gestação;
- c) Extrair, purificar, quantificar e identificar os glicosaminoglicanos na placenta e subplacenta;
- d) Analisar a distribuição dos GAGs na tuba uterina, útero e vagina nas diferentes fases da gestação;
- e) Inferir sobre importância dos GAGs na gestação;
- f) Descrever o desenvolvimento pós-implantacional da espécie.

REFERÊNCIAS

- BRITO, H. F. V.; LANGE, R. R.; PACHALY, J. R.; DECONTO, I. Determinação da taxa metabólica basal em cutias, *Dasyprocta azarae*, por calorimetria indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 30, n. 6, p. 471-478, 2010.
- CONCEIÇÃO, R. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; CARVALHO, A. F.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Aspectos morfológicos do saco vitelino em roedores da subordem Hystricomorpha: paca (*Agouti paca*) e cutia (*Dasyprocta aguti*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 28, n. 5, p. 253-259, 2008.
- GUIMARÃES D.A.; MATOS, E.; VALE, W.G. Estudo morfológico do sistema genital feminino de cutia (*Dasyprocta prymnolopha*, Rodentia: Cavidae). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, v. 11, n. 2, p.167-171, 1994.
- GUIMARÃES D.A.; MOREIRA, D.; Vale W.G. Determinação do ciclo reprodutivo da cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) através do diagnóstico colpocitológico. **Acta Amazonica**, v. 27, n. 1, p.55-64, 1997.
- HEINEGARD, D. Proteoglycans and more – from molecules to biology. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, p. 575–586, 2009.
- IACK-XIMENES, G. E. **Sistemática da família Dasyproctidae Bonaparte, 1838 (Rodentia, Hystricognathi) no Brasil**. 1999. 429 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- KRESSE, H.; SCHÖNHER, E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. **Journal of Cell Physiology**, v. 189, n. 3, p. 266-274, 2001.
- MARTINS, L. L.; BIAGIONI, M. M.; OLIVEIRA, F. S.; TONIOLO, G. H.; PACHECO, M. R.; MACHADO, M. R. F. Morfologia do útero de cutias nulíparas e não nulíparas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.63, n.2, p.326-332, 2011.
- MAYOR, P.; BODMER, R. E.; LOPEZ-BEJAR, M. Functional anatomy of the female genital organs of the wild black agouti (*Dasyprocta fuliginosa*) female in the Peruvian Amazon. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.123, p. 249–257, 2011.
- MENEZES, D. J. A.; CARVALHO, M. A. M.; CAVALCANTE FILHO, M. F.; SOUZA, W. M. Configuração do sistema venoso portal na cutia (*Dasyprocta aguti*, RODENTIA). **Brazilian Journal of veterinary Research and animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 263-266, 2001.
- MIGLINO, M. A.; CARTER, A. M.; AMBROSIO, C. E.; OLIVEIRA, M. F.; FERRAZ, R. H. S.; RODRIGUES, R. F.; SANTOS, T.C. Vascular Organization of the Hystricomorph Placenta: a Comparative Study in the Agouti, Capybara, Guinea Pig, Paca and Rock Cavy. **Placenta**, Londres, v. 25, n. 5, p. 438-448, 2004.

OLIVEIRA, G. B.; VALE, A. M.; SANTOS, A. C.; MOURA, C.E. B.; ROCHA, H. A. O.; OLIVEIRA, M. F. Composition and Significance of Glycosaminoglycans in the Uterus and Placenta of Mammals. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.58 n.4: p. 512-520, 2015.

OLIVEIRA JÚNIOR, C.M.; BEZERRA, F.V.F.; CÂMARA, F.V.; VALE, A.M.; OLIVEIRA, G.B.; SILVA, A.R.; AMBROSIO, C.E.; OLIVEIRA, M.F. Morfologia das glândulas salivares maiores em cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1766). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 36, n. 3, p.227-236, 2016.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Nélío R. dos Reis, 2006. 437p.

RODRIGUES, R. F.; MIGLINO, M. A.; FERRAZ, R. H. S.; MORAIS-PINTO, L. Placentação em cutias (*Dasyprocta aguti*, Carleton, M.D.): aspectos morfológicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 133-137, 2003.

SCHENK, S.; QUARANTA, V. Tales from cryptic sites of the extracellular matrix. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 13, n. 7, p. 366-375, 2003.

SILVA, R.S.B.; OLIVEIRA, G.B.; OLIVEIRA JÚNIOR, C.M.; BEZERRA, F.V.F.; CÂMARA, F.V.; OLIVEIRA, R.E.M.; OLIVEIRA, M.F. Arterial vascularization of the brain of the agouti (*Dasyprocta aguti* Linnaeus, 1766). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 773-784, 2016.

SINGH, M. D.; ADOGWA, A. O.; MOLLINEAU, W. M.; GARCIA, G. W. Gross and microscopic anatomy of the reproductive tract of the female agouti (*Dasyprocta leporina*): A neotropical rodent with potential for food productions. **Tropical Agriculture (Trinidad)**, Kingston, v.91, n.1, p.38-46, 2014.

3 CAPÍTULO 1 – MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO DE CUTIA (*Dasyprocta leporina* LINNAEUS, 1758) EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL E GESTAÇÃO

Microscopy Research and Technique, 30 de agosto de 2016

3 CAPÍTULO 1 – MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO DE CUTIA (*Dasyprocta leporina* LINNAEUS, 1758) EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL E GESTAÇÃO

Morfologia do sistema reprodutor feminino de cutia (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758) em diferentes fases do ciclo estral e gestação

3.1 RESUMO

Foram utilizados 20 animais adultos em diferentes fases do ciclo estral e três no terço final de gestação, os quais foram eutanasiados, dissecados e os órgãos reprodutivos fotografados *in situ* e *ex situ*. Fragmentos de cada órgão foram fixados em solução de paraformaldeído 4% ou glutaraldeído 2,5% e submetidos à técnica histológica de luz e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. O ovário é revestido por epitélio simples cúbico a pavimentoso que repousa sobre a túnica albugínea, evidenciando-se uma zona cortical e uma medular. A mucosa da tuba uterina é formada por epitélio colunar simples ciliado e viloso, estando à altura das vilosidades e a espessura da camada muscular variando entre as áreas de infundíbulo, ampola e istmo. O útero é classificado como duplo parcial, formado por dois cornos, um corpo septado e uma cérvix com dois óstios distintos que se comunicam com o corpo e um único óstio externo. A mucosa endometrial é formada por epitélio cúbico simples à colunar pseudoestratificado, com núcleos basais. A mucosa vaginal é composta por epitélio que varia de pavimentoso pouco estratificado sem queratinização (fase lútea) a estratificado pavimentoso queratinizado e cornificado (fase folicular). A vulva localiza-se entre o ânus e o óstio uretral, estando o vestíbulo ausente na espécie. O clitóris encontra-se externo a vagina, no qual em seu ápice projetam-se lateralmente duas espículas córneas e uma uretra centralizada, não existindo uma parte comum entre os tratos urinário e genital. O sistema genital feminino da cutia é semelhante ao relatado em outros roedores como a paca.

Palavras-chave: Microscopia, biometria, órgãos reprodutivos, Dasyproctidae, roedor.

3.2 INTRODUÇÃO

A cutia é um roedor silvestre, de pequeno porte pertencente à família Dasyproctidae, que habita regiões de floresta pluvial e floresta semidecídua e ainda regiões de cerrado e caatinga. Particularmente a espécie *Dasyprocta leporina* distribui-se por quase todo território brasileiro, sendo encontrada na bacia amazônica ao sul do rio Amazonas, entre os rios Madeira e Tocantins, e Nordeste do Brasil, nos estados da Paraíba, Pernambuco e Bahia e ainda no Sudeste nos estados de Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (REIS et al., 2011b).

Estes animais possuem grande potencial ecológico, zootécnico e científico, são exímios disseminadores de sementes e sua carne é utilizada na região dos trópicos como fonte de proteína animal para populações rurais, estando o Brasil entre os países com criatórios autorizados para fins comerciais, auxiliando também a conservação da espécie (MOCKRIN et al., 2005). Destaca-se ainda, o uso destes roedores como possíveis modelos experimentais (MOCKRIN et al., 2005; OLIVEIRA, 2012). Estes roedores atingem a maturidade sexual aos seis meses e em ambientes naturais estabelecem pares monogâmicos, podendo em cativeiro, este comportamento reprodutivo ser modificado (KAISER et al., 2011). As cutias apresentam duração média de ciclo estral de 28 dias (CAMPOS et al., 2015) e ao contrário de outros roedores, possuem um longo período de gestação, em média 117 dias, parindo de um a dois filhotes (PINHEIRO et al., 1989).

Estudos prévios relatam a presença de uma placenta coriovitelina invertida (CONCEIÇÃO et al., 2008; OLIVEIRA, 2012), sendo o sistema reprodutor destes animais formado pelos ovários, tubas uterinas, um útero dúplex, cérvix e vagina (MARTINS et al., 2011; MAYOR et al., 2011; SINGH et al., 2014). Na cutia é relatado ainda a presença de uma membrana de oclusão vaginal (WEIR, 1971), formada em determinadas fases do ciclo estral, podendo ser identificada em espécies de roedores, como *Cavia porcellus* (STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1919), *Thryanomys swinderians* (ADDO et al., 2007), *Octodon degus* (MAHONEY et al., 2011) e *Galea spixii* (SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2016a).

A descrição dos dados morfológicos do sistema reprodutor é fundamental para compreender a fisiologia reprodutiva da cutia fêmea, porém estes dados ainda são insuficientes. Assim, este estudo possui o objetivo de preencher as lacunas em relação a descrição morfológica dos órgãos genitais em cutias, a fim de contribuir com aplicação de biotécnicas reprodutivas na espécie, bem como fornecer conhecimentos que possam ser úteis para manutenção desta em cativeiro, bem como a exploração racional em criatórios comerciais.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Animais, Bioética e Protocolo Anestésico

Foram utilizadas 20 cutias fêmeas, adultas, com idade variando de 18 a 36 meses e em diferentes fases do ciclo estral, sendo utilizado quatro fêmeas por cada fase e quatro cutias no terço final de gestação, ambas provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres

da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEMAS/UFERSA), Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil, criadouro científico registrado pelo IBAMA (n° 1478912) e o experimento aprovado pelo Comitê de Ética (Parecer 16/2014, Processo n° 23091.005467/2013-01).

Os animais foram anestesiados, utilizando cetamina (12 mg/kg) e xilazina (2 mg/kg) por via intramuscular, como pré-anestésicos, seguida da realização da anestesia, através da canulação da veia cefálica e administração de propofol (8 mg/kg). Após a identificação do 3° plano anestésico, procedeu-se a eutanásia do animal, injetando-se solução de cloreto de potássio (1 mL/kg) por este mesmo acesso venoso (OLIVEIRA, 2012).

3.3.2 Microscopia e Biometria

Após a eutanásia, foi realizada a abertura das cavidades abdominal e pélvica, para exposição dos órgãos que fazem parte do sistema reprodutor. Em seguida, cada órgão foi identificado e analisado quanto a sua topografia e seus meios de sustentação e fotografados *in situ*. Posteriormente, os órgãos foram removidos, fotografados e caracterizados macroscopicamente, procedendo-se a mensuração dos ovários (peso, comprimento, largura e espessura), tubas uterinas (diâmetro e comprimento), cornos uterinos (diâmetro e comprimento), corpo do útero (diâmetro e comprimento), cérvix (diâmetro e comprimento) e vagina (diâmetro e comprimento), utilizando paquímetro digital (“Mitutoyo”, modelo 500-147-10) e balança analítica (AL200C, Marte, Brasil).

Fragmentos dos órgãos reprodutivos foram coletados e fixados em solução de paraformaldeído 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 por 72 horas para microscopia de luz ou em solução de glutaraldeído 2,5% tamponado com fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 para microscopia eletrônica de varredura por 48 horas.

A nomenclatura adotada para descrição dos resultados foi da International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature (2012).

3.3.3 Microscopia de Luz

Os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e em seguida obtidos os cortes histológicos de 5 a 7µm em micrótomo (LEICA RM2235), os quais foram corados com hematoxilina-eosina, tricômio de Gomori, Alcian-Mallory e Ácido Periódico de Schiff (PAS) e depois analisados e fotografados em microscópio de luz (Leica DM 500 HD) com câmera acoplada (LEICA ICC50W).

Foram mensurados, utilizando o software ImageJ®, a espessura da camada muscular da tuba uterina (infundíbulo, ampola e istmo), bem como o epitélio da mucosa da vagina em diferentes fases do ciclo estral.

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O material fixado em glutaraldeído 2,5% foi lavado em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4 e em seguida pós-fixado em tetróxido de ósmio 0,5% por 2 horas, seguido de três lavagens em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4 e duas, com água destilada e posteriormente, foi tratado com ácido tânico 1% e submetido ao processo de desidratação com concentrações crescentes de álcoois (50%, 70%, 90% e 100%). Realizada a desidratação, foi feita a secagem em aparelho de ponto crítico utilizando gás carbônico e em seguida foi realizada a metalização das amostras após terem sido fixadas em suporte tipo “Stub”, pelo método de “sputtering”. Posteriormente foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO VP®435-Carls-Zeis, Oberkochen, Germany).

3.3.5 Análise Estatística

Os dados foram processados pelo programa estatístico SAS (SAS 9.3, 2009), os quais foram avaliados quanto a sua distribuição pelo teste de Kolgomorov-Sminorv. Os dados que obedeceram à distribuição paramétrica foram analisados pelo teste *T* para verificar a ocorrência de diferença entre os antímeros direito e esquerdo, enquanto os que não obedeceram foram avaliados pelo teste de Wilcoxon. Os dados do corpo do útero, cérvix e vagina foram dispostos na forma de média, erro padrão da média e intervalo mínimo e máximo. Foi considerado grau de significância de 5%.

3.4 RESULTADOS

O sistema reprodutor feminino de cutias é composto por um par de ovários, um par de tubas uterinas, dois cornos uterinos, o corpo do útero, a cérvix, a vagina, a vulva (Figura 1A e 1B) com a presença do clitóris, o qual apresenta espículas e um óstio vaginal externo (Figura 1C). Nas fêmeas gestantes foi possível observar a membrana de oclusão vaginal ocluindo o óstio vaginal externo (Figura 1D).

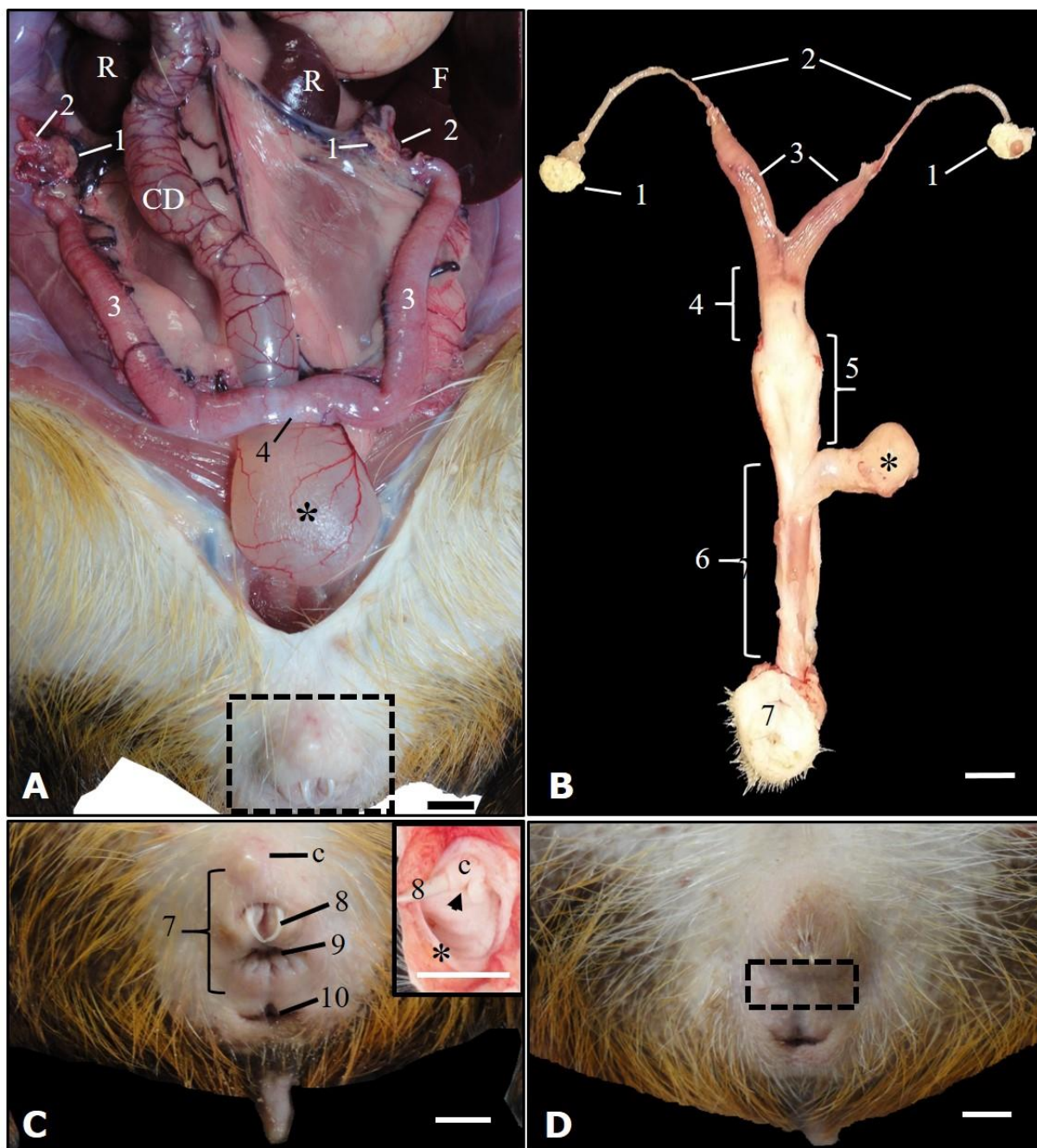


Figura 1- Sistema reprodutor feminino de cutia. A: ovários (1) localizados caudalmente aos rins (R), tubas uterinas (2), cornos uterinos (3), corpo do útero (4), vulva (detalhe), bexiga (*) e cólon descendente (CD). B: ovários (1), tubas uterinas (2), cornos uterinos (3), corpo do útero (4), cérvix (5), vagina (6), vulva (7) e bexiga (*). C: detalhe da região vulvar (7), onde observa-se cranioventralmente à abertura vulvar (9), as espículas córneas (8) e caudodorsalmente, o ânus (10). Em maior aumento observa-se o clitóris (c), sem o prepúcio (*) e as espículas com o óstio uretral centralizado (cabeça de seta) (8). D: a membrana de oclusão vaginal (retângulo) em fêmea gestante. Barra = 1cm.

3.4.1 Ovários

Os ovários apresentam forma elipsoide a irregular, estando achatados dorsoventralmente, com coloração amarelo claro e com superfície lisa a rugosa, variando

quanto ao formato e superfície conforme a fase do ciclo estral. Estes órgãos estão parcialmente envolvidos por uma camada de tecido adiposo e localizados na região sublombar, caudalmente aos rins e fixados a parede do abdome pelo mesovário (Fig. 1A. e 1B). Os dados morfométricos dos ovários estão agrupados na Tabela 1, sendo possível observar que não houve diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado os antímeros direito e esquerdo.

Tabela 1- Media e erro padrão da media (EPM) dos dados morfométricos dos ovários direito (OD) e esquerdo (OE) da cutia (*D. leporina*): peso, comprimento, diâmetro e espessura.

	Peso (g)		Comprimento (mm)		Diâmetro (mm)		Espessura (mm)	
	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE
Media	0,0869	0,0892	9,0410	9,1925	5,3340	4,9595	2,8515	3,0485
EPM	0,007	0,007	0,487	0,468	0,271	0,230	0,116	0,133

Histologicamente, o ovário é revestido por epitélio que varia de cúbico simples a pavimentoso, repousando sobre a túnica albugínea (Fig. 2A). Possui um hilo localizado próximo ao mesovário, sendo rico em tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos, os quais adentram o ovário (Fig. 2C). Possui uma zona cortical e uma zona medular (Fig. 2A), sendo encontrado na zona medular uma grande quantidade de tecido conjuntivo com inúmeros vasos sanguíneos, enquanto na cortical verifica-se folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e corpo albicans (Fig. 2A) e um ou dois corpos lúteos (2C e 2D, 2G e 2F).

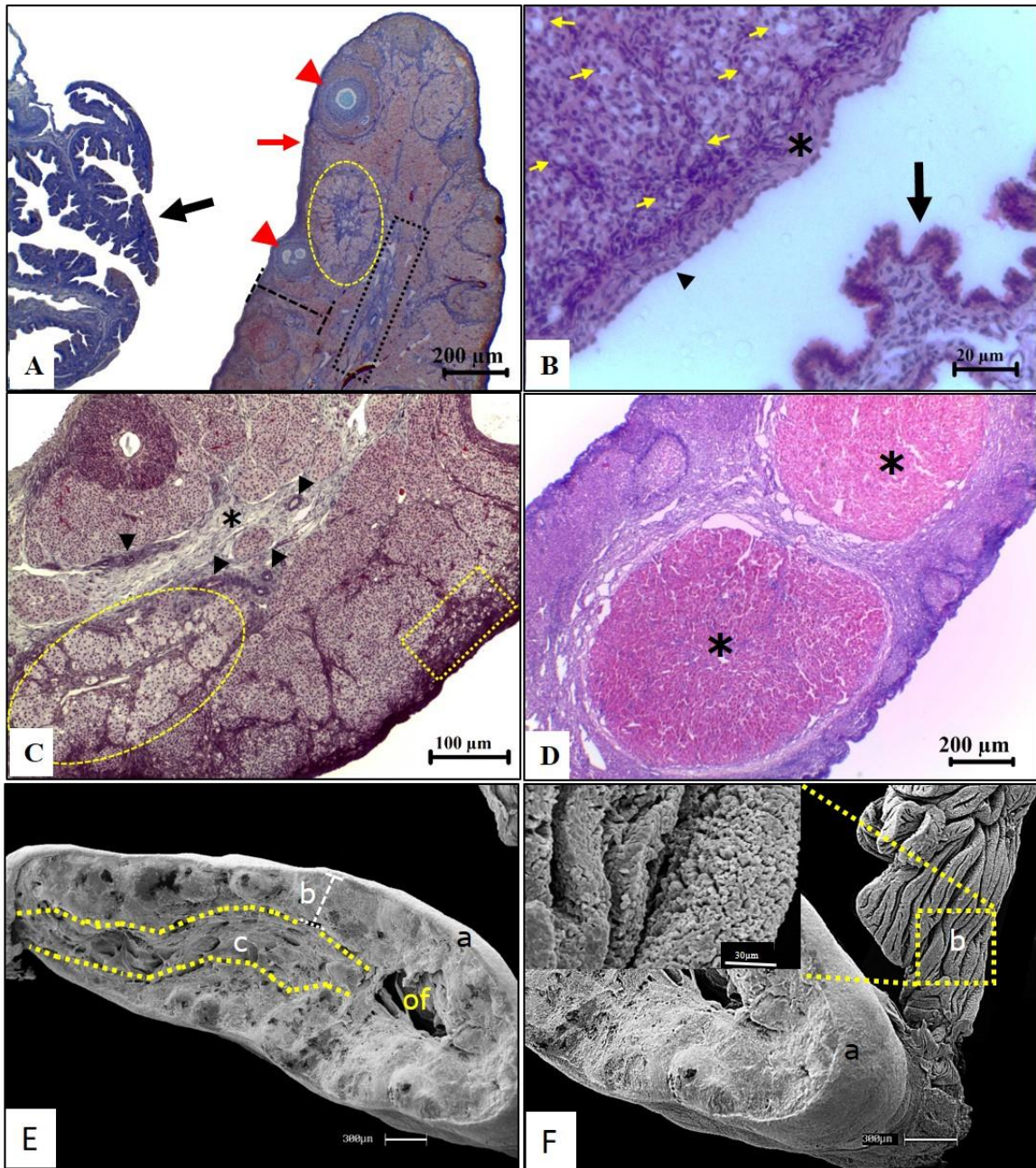


Figura 2- Ovário de cutia em corte longitudinal. A: folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento (cabeça de seta), corpo lúteo maduro (círculo) e as fímbrias (seta). B: epitélio ovariano composto por uma única camada de células pavimentosas (cabeça de seta) que repousam sobre a túnica albugínea (*), folículos primordiais (seta amarela) na zona cortical e as fímbrias da tuba uterina com epitélio colunar simples e ciliado (seta preta). C: zona medular (*) repleta de vasos sanguíneos (cabeça de seta) e corpo lúteo maduro (círculo) e diversos folículos primordiais (retângulo) na zona cortical. D: dois grandes corpos lúteos hemorrágicos (*). E: varredura do ovário em corte longitudinal, mostrando a albugínea (a), as zonas cortical (b) e medular (c) e fossa de ovulação (of). F: MEV do ovário e infundíbulo (b), visualizando em detalhe a mucosa pregueada e vilosa das fímbrias. A- Alcian Mallory; B e D- HE; C- PAS.

3.4.2 Tubas uterinas

As tubas uterinas apresentam-se como um ducto longo e bastante convoluto, suspenso pela mesosalpinge, comunicando os ovários aos cornos uterinos, estando divididas em três porções, infundíbulo, ampola e istmo. As tubas uterinas direita e esquerda possuem, respectivamente, comprimento médio de $50,23 \pm 2,51$ mm e $49,11 \pm 2,05$ mm e diâmetro de $1,59 \pm 0,07$ mm e $1,64 \pm 0,07$ mm, não ocorrendo diferença entre os antímeros para $p < 0,05$.

A tuba uterina microscopicamente está organizada em três camadas: uma mucosa composta por um epitélio colunar simples, ciliado, bastante viloso e com atividade secretória (Fig. 3A-I); uma lâmina própria formada por tecido conjuntivo frouxo e uma lâmina serosa. Quanto as divisões da tuba, evidencia-se o istmo com características que se aproximam do epitélio uterino, possuindo pequenas projeções, epitélio colunar simples e não ciliado e uma muscular bem desenvolvida ($183 \pm 4,678$ μ m) e um lúmen maior em comparação as outras porções da tuba (Fig. 3A e 3B). A ampola, possui sua camada muscular ($167,68 \pm 32,17$ μ m) desenvolvida, um lúmen reduzido e epitélio ciliado com aumento de dobras de epitélio (Fig. 3C e 3D). Já o infundíbulo apresenta-se com epitélio colunar simples ciliado e com inúmeras dobras, uma delgada camada muscular ($107,10 \pm 25,58$ μ m) (Tabela 2) e serosa (Fig. 3E e 3F).

Tabela 2- Espessura (μ m) da camada muscular do infundíbulo, ampola e istmo.

Infundíbulo	Ampola	Istmo	P
$107,10 \pm 25,58^A$	$167,68 \pm 32,17^B$	$183,42 \pm 29,63^C$	0,0001

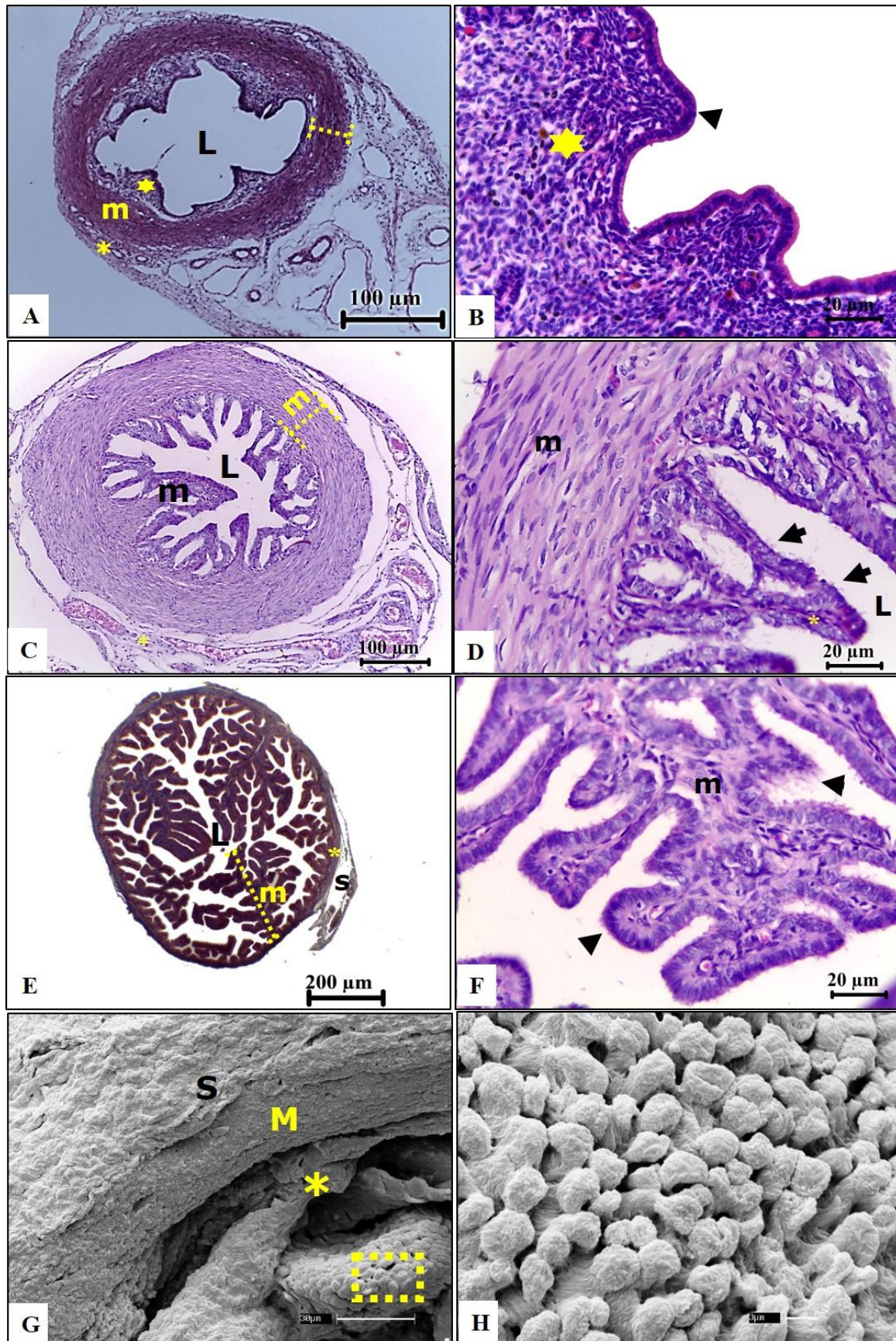


Figura 3- Tuba uterina de cutia. A: istmo, com túnica serosa (*) com presença de inúmeros vasos sanguíneos, túnica muscular (M) e mucosa (★). B: detalhe da mucosa do istmo formada por um epitélio colunar simples que repousa sob tecido conjuntivo frouxo. C: ampola

com as camadas serosa (*), muscular (M) e a mucosa com epitélio colunar com dobras e o lúmen (L). D: lúmen onde verifica-se as dobras do epitélio colunar simples ciliado (seta) e com atividade secretória e a camada muscular (m). E: infundíbulo com o lúmen reduzido e epitélio com muitas dobras. F: detalhe das dobras do epitélio colunar simples ciliado (cabeça de seta). G: MEV do infundíbulo, evidenciando a camada serosa (S), uma muscular espessa (M) e uma mucosa pregueada e bastante vilosa (*). H: detalhe da mucosa vilosa do infundíbulo. A e B: HE; C, D e F: PAS; E: Tricrômio de Gomori.

3.4.3 Útero

O útero da cutia está localizado na região sublombar, caudal aos rins e contínuo com as tubas uterinas, estendendo-se a partir destas até à entrada da pelve, local onde torna-se dorsal à bexiga. Nesta espécie, o útero é classificado como duplo parcial, formado por dois cornos, um corpo septado e uma cérvix com dois óstios distintos que se comunicam com o corpo e um único óstio que se abre na vagina.

Foi possível observar que os cornos uterinos direito e esquerdo estão fixados à parede abdominal pelo ligamento largo do útero e possuem, respectivamente, comprimento médio de $50,52 \pm 4,23$ mm e $51,76 \pm 4,19$ mm e diâmetro de $5,94 \pm 0,43$ mm e $5,92 \pm 0,34$ mm, não ocorrendo diferença significativa entre comprimento e diâmetro nos diferentes antímeros.

Histologicamente, o útero é dividido em três camadas: uma camada serosa externa ou perimétrio composta por tecido conjuntivo; uma camada média ou miométrio, formada por uma camada de fibras musculares circular e outra longitudinal; e uma camada interna ou endométrio (Fig. 4A). No endométrio encontra-se uma mucosa formada por um epitélio colunar simples à colunar pseudoestratificado, com núcleos basais, estando apoiado sobre a lâmina própria e o tecido conjuntivo adjacente (Fig. 4B). Nesta área identifica-se vasos sanguíneos e uma grande quantidade de glândulas endometriais tubulares que variam entre ovais, retas à tortuosas, revestidas por epitélio simples cilíndrico, (Fig. 4B), os quais seus ductos abrem-se no lúmen (Fig. 5E-F).

Os cornos uterinos, unem-se caudalmente mantendo-se separados por um septo, formando um pequeno corpo uterino, com comprimento de $12,22 \pm 0,96$ mm e diâmetro de $9,43 \pm 0,66$ mm (Tabela 4). Histologicamente, este apresenta características semelhantes aos cornos uterinos, epitélio colunar pseudoestratificado (Fig. 4C e D).

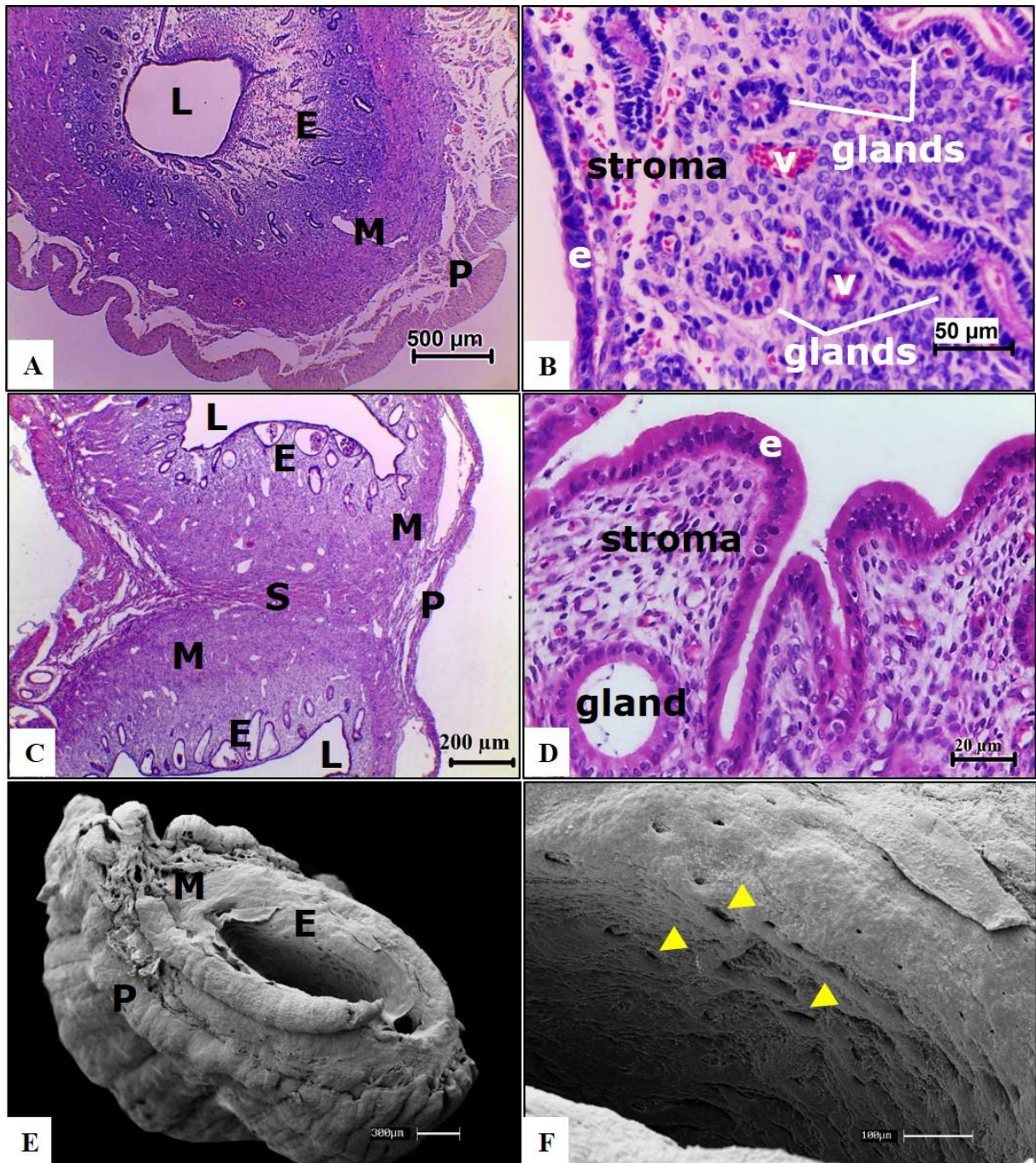


Figura 4- Útero de cutia. A: corno uterino em corte transversal, como lúmen uterino e as camadas do útero – endométrio (E), miométrio (M) e Perimétrio (P). B: detalhe do endométrio uterino, formada por epitélio cúbico simples (e) e o estroma endometrial rico em glândulas endometriais de diferentes tamanhos. C: corpo do útero, com presença de um septo (S) que mantém individualizado cada corno uterino. Observa-se ainda as camadas endométrio (E), miométrio (M) e perimétrio (P) e dois lúmens individualizados (L). D: detalhe da mucosa do corpo do útero, mantendo a semelhança com aquela dos cornos uterinos, apesar da redução da quantidade de glândulas endometriais. E: MEV do corno uterino em corte transversal, evidenciando o perimétrio (P), o miométrio (M) espesso e o endométrio (E). F: detalhe da mucosa do endométrio identificando a abertura dos óstio das glândulas endometriais (cabeça de seta). A-D: HE.

A cérvix da cutia abre-se caudalmente através do óstio cervical externo (Fig. 5H) terminando no fórnix e comunicando-se com a vagina. Este órgão tem em média $17,87 \pm 1,385$ mm de comprimento e $13,92 \pm 0,705$ mm de diâmetro (Tabela 4). Histologicamente, a cérvix, possui uma delgada camada média (Fig. 5A e 5B), sendo a camada média formada praticamente por tecido conjuntivo denso não modelado e uma mucosa composta por um epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (Fig. 5C) com presença de grandes células secretoras PAS positivas (Fig. 5D) e dobras que se projetam para o interior do lúmen (Fig. 5I). Vale destacar uma maior quantidade de células secretoras com conteúdo alcian e PAS-positivo (Fig. 5E e 5F) em fêmeas prenhes em comparação ao epitélio em fêmeas na fase folicular (Fig. 5D), fato que indica maior produção de mucopolissacarídeos em fêmeas gestantes, provavelmente para manutenção do tampão cervical nesta fase.

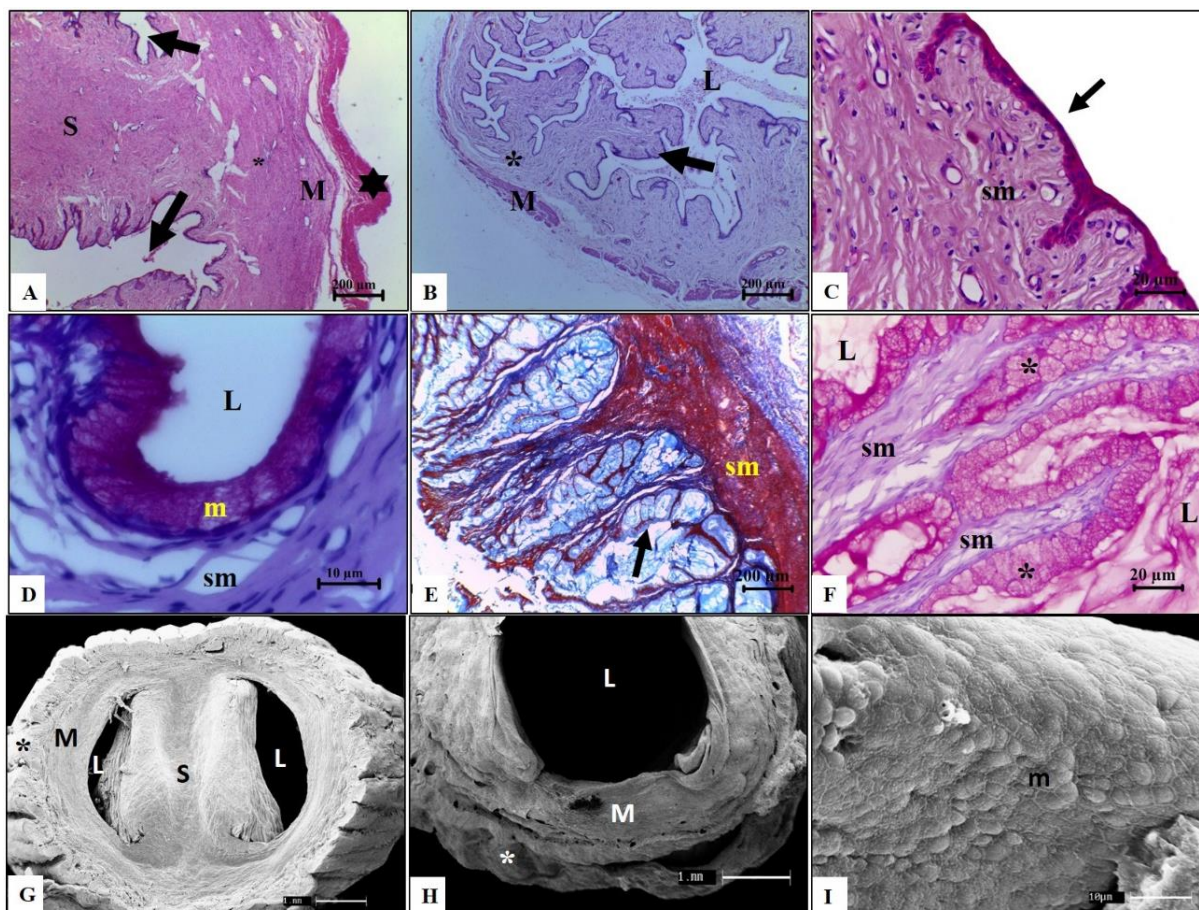


Figura 5- Cérvix de cutia ao longo do ciclo estral e terço final gestação. A: Porção cranial, onde verifica-se os dois óstios cervicais internos (seta) separados por um septo (S) espesso. Evidenciam-se as camadas média composta por tecido conjuntivo denso não modelado (*) e fibras musculares (M) e a serosa (★). B: óstio cervical externo, onde verifica-se uma única luz (L), epitélio bastante pregueado (*), a submucosa (sm) e média (M). C: epitélio estratificado pavimentoso (seta) que repousa sobre o tecido conjuntivo frouxo da submucosa (sm). D: mucosa da cérvix no diestro mostrando reação positiva para PAS. E: submucosa (sm)

e mucosa bastante pregueada no terço final da gestação, onde evidencia-se a proliferação das glândulas mucosas cervicais coradas com Alcian-Mallory (seta), indicativo da produção de mucopolissacarídeos. F: epitélio cervical (*) com submucosa (sm) de fêmea gestante no terço final de gestação, identificando-se uma mucosa com reação PAS positiva e presença de muco no lúmen, marcado com a coloração. G: MEV da cérvix na porção inicial, evidenciando-se a serosa (*), uma muscular (M) e o septo (S) que divide o óstio cervical interno em dois lúmens (L). H: terço final da cérvix apresentando um único óstio cervical externo (L), uma camada média (M) espessa e uma serosa (*). I: detalhe da mucosa da cérvix. A-C: HE; D e F: PAS; E: Alcian-Mallory.

3.4.4 Vagina e genitália externa

A vagina apresentou-se como um tubo longo com comprimento de $59,74 \pm 2,06$ mm e diâmetro de $10,96 \pm 0,56$ mm (Tabela 3), localizado ventralmente ao reto e caudal a cérvix (Figura 1A e 1B). Este órgão copulador abre-se diretamente na vulva, no óstio vaginal.

Tabela 3- Média e erro padrão da media (EPM) dos dados morfométricos do corpo do útero, cérvix e vagina da cutia (*D. leporina*): comprimento e diâmetro.

	Comprimento (mm)			Diâmetro (mm)		
	Média	EPM	Min-Max	Média	EPM	Min-Max
Corpo do útero	12,22	0,963	4,71-24,69	9,43	0,664	4,08-15,67
Cérvix	17,87	1,385	10,50-33,61	13,92	0,705	8,98-20,70
Vagina	59,74	2,066	43,92-77,38	10,96	0,565	6,80-15,59

Na região vulvar, observa-se o clitóris (Figura 1C), estrutura proeminente de forma cônica e revestida por pele ladeada de alguns pelos. No ápice clitoriano encontra-se duas estruturas queratinizadas projetadas lateralmente, as espículas (Figura 1C e 7A-F) e entre elas verifica-se a presença da uretra abrindo-se no óstio uretral (Fig. 7E). Microscopicamente, a vagina possui três camadas, uma túnica adventícia externa (tecido conjuntivo), uma muscular e uma túnica mucosa (Fig. 6H-I). A mucosa é composta por epitélio que varia de acordo com a fase do ciclo estral (Fig. 6A-D) ou gestação (Fig. 6E-G) em um epitélio pavimentoso pouco estratificado sem queratinização (fase lútea) a estratificado pavimentoso queratinizado e cornificado (fase folicular) bastante pregueado e com presença de células leucocitárias. Quando mensurado, o epitélio no proestro apresentou média de $50,743 \pm 4,186$ μ m, na fase de estro $99,288 \pm 5,089$ μ m, no metaestro $44,738 \pm 2,56$ μ m e no diestro $10,336 \pm 5,551$ μ m (Tabela 4), sendo evidente o aumento da estratificação do epitélio na fase folicular e posterior redução na fase lútea. Já as espículas apresentam-se compostas por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, repousando sobre tecido conjuntivo frouxo vascularizado (Fig. 7A-D), com características hormônio dependentes, que alteram seu tamanho ao longo do ciclo estral, a ponto de tornarem-se visíveis externamente (Fig. 7D-F).

Tabela 4- Valores mensurados (μm) do epitélio vaginal ao longo do ciclo estral.

Proestro	Estro	Metaestro	Diestro	p
50,74 $\pm$ 32,70 ^B	99,28 $\pm$ 39,75 ^A	44,73 $\pm$ 19,96 ^B	10,33 $\pm$ 4,33 ^C	0,0001

*Nível de significância ($p < 0,05$).

A genitália externa ou vulva, localiza-se entre o ânus (dorsal) e o óstio uretral, estando o vestíbulo ausente na espécie. Na fase lútea, verifica-se uma vulva pálida e não edemaciada, enquanto na fase folicular verifica-se uma vulva avermelhada e tumefeita.

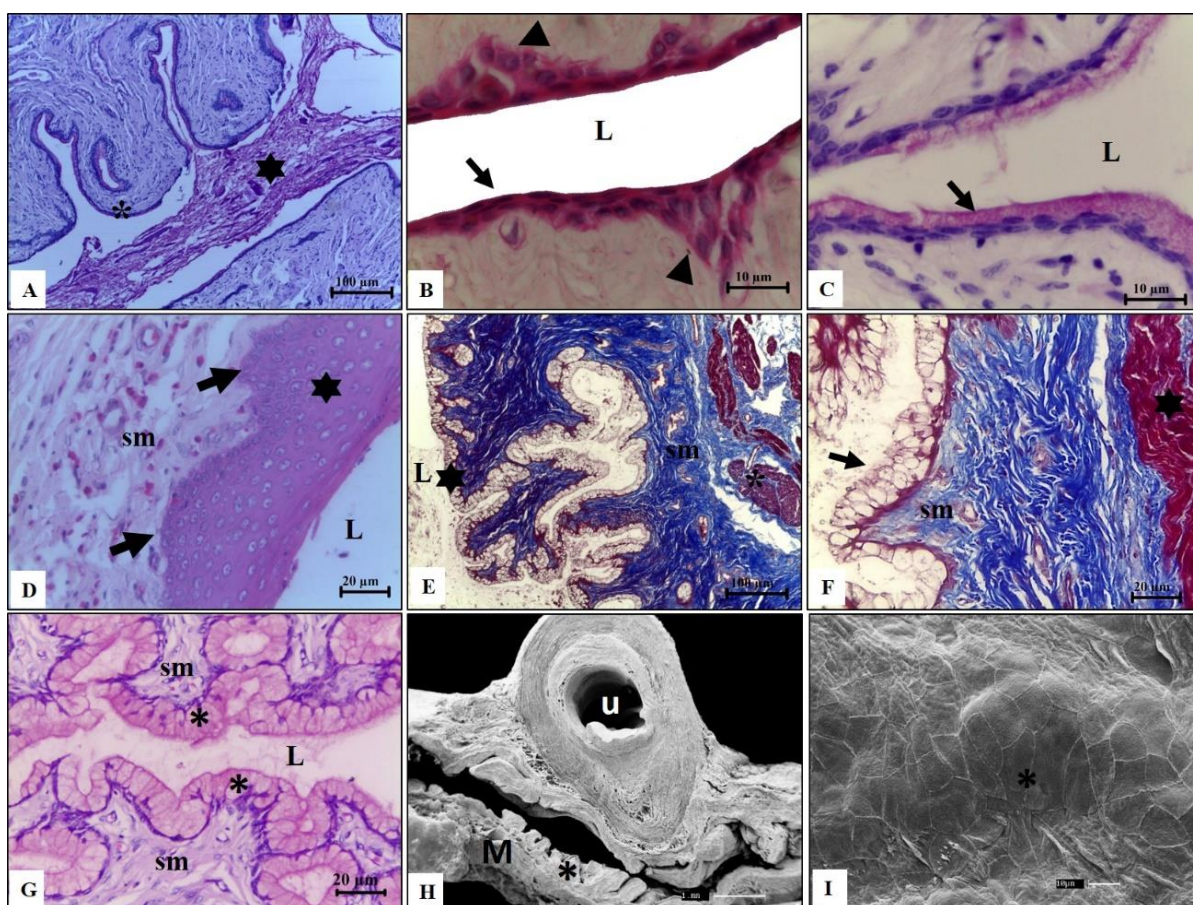


Figura 6- Vagina de cutia no ciclo estral e gestação. A: vagina em fase lútea, evidenciando-se a formação de papilas (*), do tampão mucoso (★) e epitélio PAS positivo. B: epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (seta) com indícios de cornificação (cabeça de seta) e lúmen (L), na fase folicular. C: epitélio pouco estratificado com reação PAS positiva (seta) e lúmen (L), observados na fase lútea; D: epitélio estratificado pavimentoso(★) com cornificação, queratinização (seta) e lúmen (L), na fase folicular; E: epitélio bastante pregueado corado com Tricrômio de Gomori, observando-se a mucosa (★), submucosa (sm), musculatura (*) e lúmen (L) na fase lútea; F: detalhe da mucosa na fase secretória, mostrando células vacuoladas (seta) e camada muscular circular (★); G: detalhe da mucosa em fase folicular com epitélio PAS positivo (*), submucosa (sm) e lúmen (L); H: MEV em corte transversal, verificando-se as camadas média (M) e mucosa (*) e o óstio uretral (u). I: detalhe da mucosa (*) da vagina visto em corte longitudinal. A-D: HE; E-F: Alcian-Mallory; G: PAS.

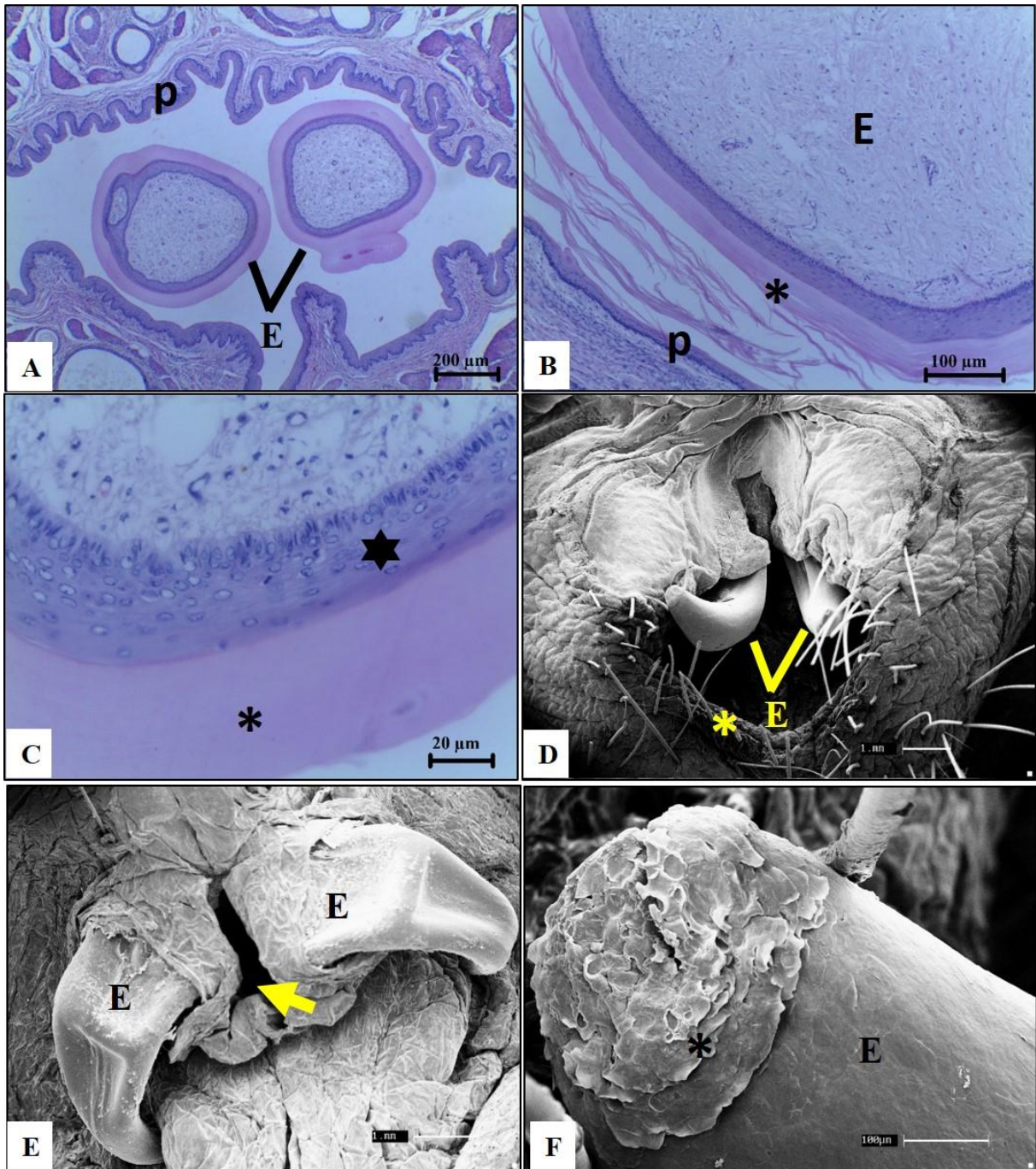


Figura 7- Espículas clitorianas de cutia. A: espículas córneas (E) circundadas pelo prepúcio (p); B: espícula de cutia visualizada em maior aumento evidenciando a queratinização (*) e delimitada pelo prepúcio (p). C: detalhe do epitélio estratificado (★) e queratinizado (*) das espículas. D: MEV, mostrando as espículas (E) exteriorizadas ao prepúcio na fase folicular do ciclo estral. E: varredura da região vulvar em fase lútea com espículas internas (E) ao prepúcio, visualizadas após a remoção do mesmo e uretra centralizada entre as espículas (seta). F: detalhe da extremidade da espícula queratinizada. A-C: HE.

3.5 DISCUSSÃO

Os órgãos genitais femininos de *D. leporina* têm características que se assemelham ao descrito em animais domésticos (DYCE; SACK; WENSING, 2010; KÖNIG; LIEBICH, 2011), e para outros roedores histricomorfos (WEIR, 1971; GUIMARÃES et al., 1994; FELIPE et al., 1999; Mayor et al., 2002; Mayor et al., 2003; Santos et al., 2014), apresentando ovários com forma elipsoide, tubas uterinas bastante convolutas, útero dividido em dois cornos, corpo e cérvix e uma longa vagina abrindo-se no óstio vulvar. Esta espécie ainda possui algumas particularidades, tais como um útero duplo parcial, vestíbulo da vagina ausente e a presença de espículas córneas na glândula do clitóris, estas últimas mencionadas por Reis et al. (2011a) na paca, o que demonstra o grau de parentesco entre as duas espécies.

Quanto a topografia e os tecidos adjacentes e de fixação dos ovários de *D. leporina*, pode-se observar que suas características se assemelham ao relatado em *Myocastor coypus* (FELIPE et al., 1999), *Dasyprocta aguti* (ALMEIDA et al., 2003) e *Cuniculus paca* (REIS et al., 2011a) e diferindo do mencionado em *Mus musculus* (COOK, 1965), em *Rattus norvegicus* (GREENE, 1963), em *D. prymnolopha* (GUIMARÃES et al. 1994) e *G. spixii* (SANTOS et al., 2014), cujos órgãos estão imersos em tecido adiposo. O revestimento epitelial, a divisão em córtex e medula e o desenvolvimento folicular dos ovários de *D. leporina* são similares ao relatado em *M. coypus* (FELIPE et al., 1999), *Cuniculus paca* (REIS et al., 2011a) e *G. spixii* (SANTOS et al., 2014), que descrevem que nesses animais podem ser encontrados folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento, a exemplo do observado nos ovários do presente estudo. Tal característica apresenta-se como um aspecto evolutivo das fêmeas, que amadurecem seus oócitos de forma progressiva a medida que passam por diversos ciclos reprodutivos.

As tubas uterinas em *D. leporina* apresentaram-se muito convolutas e divididas em regiões de infundíbulo, ampola e istmo, os quais diferenciam-se histologicamente quanto a composição ou espessura das camadas serosa, média e mucosa, semelhante ao descrito para *C. lanigera* (WEIR, 1966), *M. coypus* (FELIPE et al., 1998), *Hydrochoerus hidrocaeris* (COSTA et al., 2002), *Atherurus africanus* (MAYOR et al., 2003), *C. paca* (REIS et al., 2011a), *G. spixii* (SANTOS et al., 2014) e outros mamíferos (ZIEHMER et al., 2010; MONTEIRO et al., 2012; FAVORETTO et al., 2015), sendo esta última camada constituída por um epitélio colunar simples ciliado.

No que diz respeito ao útero da cutia, este é classificado como duplo parcial, corroborando com os achados de Singh et al. (2014) quando estudaram o útero de *D. leporina*, aos de Martins et al. (2011) em *D. azarae* e aos de Reis et al. (2011a) em estudos com *C.*

paca. Por sua vez, Weir (1971) ao estudar o sistema reprodutor do roedor *Lagostomus maximus*, Smallwood (1992) no *Oryctolagus cuniculus*, Mayor et al. (2011) em *D. fuliginosa*, citam um útero completamente duplo, com cérvix dupla que se comunica com uma vagina simples. Os resultados verificados em *D. leporina* diferem também do mencionado para *M. coypus* (FELIPE et al., 1998) e *Hystrix cristata* (OZDEMIR e ATALAR, 2009), no *G. spixii* (SANTOS et al., 2014) e *H. hidrocaeris* (COSTA et al., 2002), quando os autores citam que nestas espécies há formação de um útero duplo que se abre em uma cérvix simples e ainda diferem do roedor *Atherurus africanus* (MAYOR et al., 2003), uma vez que na espécie os cornos uterinos culminam em um único corpo e uma cérvix única. Microscopicamente, o útero da cutia é composto por três camadas, o perimétrio formado por tecido conjuntivo; o miométrio, formado por fibras musculares circulares e outra camada de fibras longitudinais; e o endométrio, camada mucosa, formada por epitélio cúbico simples a colunar pseudoestratificado o qual apoia-se sobre a lâmina própria, local onde encontra-se uma grande quantidade de glândulas endometriais que variam de ovais, retas à tortuosas ao longo do ciclo estral e gestação, corroborando com o descrito por Barrau et al. (1975) em cadelas. É relatado no *M. coypus* (FELIPE et al., 1998) a presença abundante de inúmeras glândulas endometriais que variavam conforme o formato em oval, tubular à vesicular, a exemplo do observado em *D. leporina*.

As características do epitélio uterino de *D. leporina* assemelham-se ao relatado no *H. cristata* (MAYOR et al., 2002), sendo do tipo colunar pseudoestratificado e difere do relatado no *G. spixii* (SANTOS et al., 2014), cujo epitélio é cúbico simples. Além disso, a mucosa endometrial em *D. leporina* assemelha-se também ao descrito em espécies domésticas como na cadela e na égua, cujo epitélio é colunar simples, e no suíno e ruminantes, nos quais o epitélio é colunar simples ou colunar pseudoestratificado (BANKS, 1991). Por sua vez, no *M. coypus* (FELIPE et al., 1998) e em *D. fuliginosa* (MAYOR et al., 2011) é relatado um epitélio colunar simples ciliado, diferindo do encontrado em *D. leporina*, no que diz respeito a presença de cílios, ausentes na espécie estudada. Destaca-se que em nenhum desses estudos os autores fizeram uma relação do estágio do ciclo estral em que os animais se encontravam ou se estava em fase gestacional.

O corpo do útero é dividido por um septo que individualiza os cornos uterinos. Este corpo abre-se em dois óstios uterinos internos na cérvix, semelhante ao relatado em histricomorfos (FELIPE et al., 1998; COSTA et al., 2002; MARTINS et al., 2011; MAYOR et al., 2011; REIS et al., 2011a; SANTOS et al., 2014; SINGH et al., 2014). O corpo do útero em *D. leporina* nas fases folicular e lútea apresentou características histológicas semelhantes

aos cornos uterinos com epitélio colunar pseudoestratificado, com escassas glândulas endometriais, a exemplo do mencionado por Ozdemir e Atalar (2009) no *H. cristata*.

A cérvix em *D. leporina* é parcialmente dupla, estando separada por um septo na sua porção cranial, formando dois óstios cervicais internos. Este septo, caudalmente desaparece culminando em um único óstio cervical externo, o qual comunica-se com a vagina, semelhante ao descrito em *D. azarae* (Martins et al. (2011) e em *C. paca* (REIS et al., 2011a; MAYOR et al., 2013). A mucosa da cérvix em *D. leporina* no diestro apresentou reação PAS positiva e no terço final da gestação, a mucosa foi bastante pregueada com um epitélio secretor de muco marcado intensamente com PAS e Alcian-Mallory, indicativo da produção de mucopolissacarídeos nestas fases do ciclo e na gestação, semelhante ao citado por Felipe et al. (1998) no *M. coypus* ao verificarem a presença de um epitélio secretor de muco, que o autor classificou como pseudoglândulas.

A vagina na cutia apresentou-se como um tubo longo, de mucosa pregueada com epitélio variando de pavimentoso pouco estratificado a estratificado pavimentoso queratinizado e cornificado com presença de células leucocitárias, padrão que varia conforme a fase do ciclo estral e/ou gestação, concordando com o que relata Selle (1922) para o *Cavia porcellus*, Weir (1971) no *Lagostomus maximus*, Mayor et al. (2011) em *D. fuliginosa* e Mayor et al. (2013) em *C. paca* ao inferirem sobre o aumento do grau de cornificação e queratinização da vagina na fase folicular. A exemplo do que ocorre em *A. africanus* (MAYOR et al., 2003), *C. paca* (REIS et al., 2011; MAYOR et al., 2013) e *G. spixii* (SANTOS et al., 2014), o vestíbulo da vagina está ausente, estando o clitóris e a uretra separados da região vaginal, localizados em uma região delimitada por pele, crânioventral ao óstio vaginal, portanto, não ocorrendo área comum entre o trato urinário e genital como ocorre nas espécies domésticas (KÖNIG e LIEBICH, 2001).

Da glande do clitóris partem duas espículas laterais ao óstio uretral externo já citados na *C. paca* (REIS et al., 2011) como estruturas espinhosas, apresentando em *D. leporina*, epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, com características hormônio dependentes. Na literatura, não constam dados sobre sua funcionalidade, mas por sofrerem alterações de tamanho ao longo do ciclo estral, a ponto de tornarem-se visíveis externamente, em especial na fase folicular e por regredirem na fase lútea e gestação, pode-se inferir sobre sua função, como por exemplo no reconhecimento ou estímulo do companheiro em um mecanismo de chave-fechadura durante a cópula, como defendem Arnold (1986) e Reis et al., (2011) ao analisarem as estruturas diferenciadas presentes nos órgãos copulatórios de répteis lacertídeos e roedor como o *C. paca* ou atuar estimulando a ovulação através da excitação de receptores

sensoriais durante o coito como ocorre na gata, coelha e camela (INTERVET, 2003; CUNNINGHAM, 2004). O que se sabe até o momento, é que o processo de canalização da uretra no clitóris está associado ao processo denominado de masculinização da genitália externa de fêmeas. Alguns autores têm relacionado este processo a ontogênese do órgão, devido a exposição dos embriões fêmeas a elevada concentração de hormônios andrógenos (YALCINKAYA et al., 1993; PLACE et al., 2002; GLICKMAN et al., 2006; CONLEY et al., 2006), como demonstrado em *Galea spixii* (SANTOS et al., 2016b).

Em *D. leporina*, vale destacar ainda a formação do tampão mucoso e a consequente formação da membrana de oclusão vaginal descrito em *Cavia porcellus*, (STOCKARD e PAPANICOLAOU, 1919; KELLY e PAPANICOLAOU, 1927) e em *G. spixii* (SANTOS et al., 2014) evidenciado em fêmeas gestantes, sendo ainda necessário outros estudos para elucidar os fatores envolvidos de como ocorre o processo de formação do tampão mucoso e membrana de oclusão vaginal. Até o momento, Santos et al. (2016) demonstraram que a membrana de oclusão vaginal possui controle celular de formação e ruptura em *Galea spixii* gestantes, sendo que sua formação está associada a proliferação das células do estrato germinativo do epitélio, com formação de junções desmossômicas entre estas células e sua ruptura está associada a apoptose celular e perda de adesões celulares. Destaca-se que a formação desse tampão mucoso e consequente formação dessa membrana de oclusão é uma característica típica de roedores e que poderia estar associada a impedir a ação dos machos após a cópula (ADRIAN; SACHSER, 2011).

A genitália externa ou vulvar está localizada entre o ânus (dorsal) e o óstio uretral, apresentando-se aberta, avermelhada e edemaciada na fase folicular e com presença de membrana vaginal, estando pálida e não tumefeita na fase lútea, semelhante ao descrito em *Atherurus africanus* (MAYOR et al., 2003). Vale ressaltar que os órgãos genitais femininos em *D. leporina*, a exemplo do que ocorre em outros roedores (MAYOR et al., 2003; REIS et al., 2011a; MAYOR et al., 2013; SANTOS et al., 2014) possuem diversas características interessantes, como a membrana de oclusão vaginal, ausência de vestíbulo da vagina e um clitóris externo à vagina, no qual insere-se duas espículas córneas que parecem ser estruturas hormônio dependentes, que carecem de estudos posteriores.

3.6 CONCLUSÃO

O sistema genital feminino da cutia se constitui de ovários, tubas uterinas, um útero duplo parcial, vagina com vestíbulo ausente e vulva, onde pode ser observada a formação da

membrana de oclusão vaginal em fêmeas na fase lútea e gestantes. O epitélio vaginal mostrou grau de estratificação, cornificação e queratinização variável no decorrer no ciclo estral, sendo intensificado na fase folicular.

O clitóris encontra-se externo a vagina, projetando-se lateralmente à glândula do clitóris duas espículas córneas e uma uretra centralizada, não existindo uma parte comum entre os tratos urinário e genital.

REFERÊNCIAS

- ADDO, P. G.; AWUMBILA, B.; AWOTWI, E.; ANKRAH, N-A. Reproductive characteristics of the female grass cutter (*Thryonomys swinderianus*) and formulation of colony breeding strategies. **Livestock Research for Rural Development**, Cali, v. 19, n. 4, p. 1-16, 2007.
- ADRIAN, O.; SACHSER N. Diversity of social and mating systems in cavies: a review. **Journal of Mammalogy**, v.92, n. 1, p. 39-53, 2011.
- ALMEIDA, M. M.; CARVALHO, M. A. C.; CAVALCANTE FILHO, M. F.; MIGLINO, M. A.; MENEZES, D. J. A. Estudo morfológico e morfométrico do ovário de cutias (*Dasyprocta aguti*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 1, p. 55-62, 2003.
- BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**, 2nd Ed, Manole, São Paulo, Brazil, 1991. p. 629
- BARRAU, M. D.; ABEL JÚNIOR, J. H.; VERHAGE, H. G.; TIETZ JÚNIOR, W. J. Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch. **American Journal of Anatomy**, Malden, v. 142, n. 1, p. 47-65, 1975.
- CAMPOS, L. B.; PEIXOTO, G. C. X.; LIMA G.L.; CASTELO T. S.; SOUZA A. L. P.; OLIVEIRA M. F.; SILVA A. R. Monitoramento do ciclo estral de cutias (*Dasyprocta leporina* Lichtenstein, 1823) através de citologia esfoliativa vaginal e ultrassonografia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 35, n.2, p.188-192, 2015.
- CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J. BROWNE, P.; MAPES, S. M.; PLACE, N. J.; HUGHES, A. L.; GLICKMAN, S. E. Placental Expression and Molecular Characterization of Aromatase Cytochrome P450 in the Spotted Hyena (*Crocuta crocuta*). **Placenta**, Londres, v. 28, n. 7, p. 668-675, 2006.
- COOK, M. J. **The anatomy of the laboratory mouse**. London: Academic Press, 1965. 143 p.
- CONCEIÇÃO, R. A.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; CARVALHO, A. F.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Aspectos morfológicos do saco vitelino em roedores da Sub-Ordem Hystricomorpha: paca (*Agouti paca*) e Cutia (*Dasyprocta agouti*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 28, p. 553-259, 2008.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D. Reprodução de capivaras. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 5, n. 1, p. 111-118, 2002.

CUNNINGHAM, J. G. Tratado de Fisiologia Veterinária. 3ª Ed.: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004. 579p.

FAVORETTO, S. M.; SILVA, E. G.; MENEZES, J.; GUERRA, R. R.; CAMPOS, D. B. Reproductive System of Brown-throated Sloth (*Bradypus variegatus*, Schinz 1825, Pilosa, Xenarthra): Anatomy and Histology. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlim, 2015. doi: 10.1111/ahe.12193

FELIPE, A.; CALLEJAS, A.; CABODEVILA, J. Anatomicohistological Characteristics of Female Genital Tubular Organs of the South American Nutria (*Myocastor coypus*). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlim, v. 27, p. 245-250, 1998.

FELIPE, A. E.; CABODEVILA, J.; CALLEJAS, S. Anatomicohistological Characteristics of the Ovary of the Coypu (*Myocastor coypus*). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlim, v. 17, n. 1, p. 89-95, 1999.

GLICKMAN, S. E.; CUNHA, G. R.; DREA, C. M.; CONLEY, A. J.; PLACE, N. J. Mammalian sexual differentiation: lessons from the spotted hyena. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, Cambridge, v. 17, n. 9, p. 349-356, 2006.

GREENE, E. C. **Anatomy of the rat**. v. 2. New York: American Philosophical Society, 1963. 370 p.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina Anatomica Veterinaria**. 5. ed. Knoxville: World Association on Veterinary Anatomist, 2012. 160 p.

INTERVET. Compêndio de Reprodução Animal. 383p.

KAISER, S. K.; MARGARIDO, T. C. C.; FISCHER, M. L. Avaliação do comportamento de cutias *Dasyprocta azarae* e *Dasyprocta leporina* (Rodentia: Dasyproctidae) em cativeiro e semi cativeiro em parques urbanos de Curitiba, Paraná, Brasil. **Revista de etologia**, São Paulo, v. 10, n. 2, p.68-82, 2011.

KELLY, G. L.; PAPANICOLAOU, G. N. The mechanism of the periodical opening and closing of the vaginal orifice in the guinea-pig. **American Journal of Anatomy**, Malden, v. 40, n. 2, p. 387-411, 1927.

MAHONEY, M. M.; BROOKE V. ROSSI, B. V.; MEGAN H. HAGENAUER, M. H.; LEE, T. M. Characterization of the estrous cycle in *Octodon degus*. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.84, n.4, p.664-671, 2011.

MARTINS, L. L.; BIAGIONI, M. M.; OLIVEIRA, F. S.; TONIOLO, G. H.; PACHECO, M. R.; MACHADO, M. R. F. Morfologia do útero de cutias nulíparas e não nulíparas.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.63, n.2, p.326-332, 2011.

MAYOR, P.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; JORI, F.; RUTLLANT, J.; LÓPEZ-PLANA, C.; LÓPEZ-GATIUS, F. Anatomicohistological characteristics of the genital tubular organs of the female brush-tailed porcupine (*Atherurus africanus*, Gray 1842) from Gabon. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlim, v.31, n.6, p.355-61, 2002.

MAYOR, P.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; JORI, F.; FENECH, M.; LÓPEZ-GATIUS, F. Reproductive functional anatomy and oestrous cycle pattern of the female brush-tailed porcupine (*Atherurus africanus*, Gray 1842) from Gabon. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.77, n.3-4, p.247-59, 2003.

MAYOR, P.; BODMER, R. E.; LOPEZ-BEJAR, M. Functional anatomy of the female genital organs of the wild black agouti (*Dasyprocta fuliginosa*) female in the Peruvian Amazon. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.123, p. 249–257, 2011.

MAYOR, P.; GUIMARÃES, D. A.; LÓPEZ, C. Functional morphology of the genital organs in the wild paca (*Cuniculus paca*) female. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.140, p. 206– 215, 2013.

MONTEIRO, N. C. S.; LIMA, A. R.; CARVALHO, A. F.; GARCIA, R. C.; THERRIER, J.; SOUZA, A. C. B.; PEREIRA, L. C.; BRANCO, E. Morphology and Morphometry of the Reproductive System of Female *Saguinus midas* (Linnaeus, 1758). **Microscopy Research and Technique**, Nova Iorque, v. 75, p.720–726, 2012.

OLIVEIRA, G. B. **Desenvolvimento placentário em cutias (*Dasyprocta aguti* Linnaeus, 1766)**. 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2012.

OZDEMIR, D.; ATALAR, O. Observations on the morphology of the uterus of the porcupine (*Hystrix cristata*). **Veterinarski Arhiv**, v. 79, n.4, p.379-384, 2009.

PINHEIRO, R. M.; ANDRADE, S. A.; CUNHA, J. N. Preservação e exploração de animais silvestres nativos: preá, cutia e mocó. **Caatinga**, Mossoró, v. 6, p.28-49, 1989.

PLACE, N. J.; HOLEKAMP, K. E.; SISK, C. L.; WELDELE, M. L.; COSCIA, E. M.; DREA, C. M.; GLICKMAN, S. E. Effects of prenatal treatment with antiandrogens on luteinizing hormone secretion and sex steroid concentrations in adult spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, n. 5, p. 1405-1413, 2002.

REIS, A. C. G.; GERBASI, S. H. B.; MARTINS, C.; MACHADO, R. R. F.; OLIVEIRA, C. A. Morfologia do sistema genital feminino da paca (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 183-191, 2011a.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 2 ed. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2011b. 439p.

SANTOS, E. F. **Ecologia da cutia *Dasyprocta leporina* (Linnaeus, 1758) em um fragmento florestal urbano em Campinas-SP (Rodentia: Dasyproctidae)**. 2005. 72f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

SANTOS, A. C.; BERTASSOLI, B. M.; VIANA, D.C.; VASCONCELOS, B. G.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A.; ASSIS NETO, A. C. The morphology of female genitalia in *Galea spixii* (Caviidae, Caviinae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 6, p. 1793-1802, 2014.

SANTOS, A. C.; OLIVEIRA, G. B.; VIANA, D. C.; OLIVEIRA, F. D.; SILVA, R. S.; RICÍ, R. E. G.; OLIVEIRA, M. F.; ASSIS-NETO, A. C. Development and morphological changes in the vaginal closure membrane through out gestation in *Galea spixii* (Rodentia: Caviidae). **Microscopy Research and Technique**, Nova Iorque, v. 79, n. 5, p. 359–364, 2016a.

SANTOS, A. C.; VIANA, D. C.; OLIVEIRA, F. D.; OLIVEIRA, M. F.; ASSIS-NETO, A. C. Steroidogenic control of intrauterine sexual differentiation in Spix's yellow-toothed cavy, *Galea spixii*. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 28, n. 2, p. 163-164, 2016b.

SELLE, R. M. Changes in the vaginal epithelium of the guinea-pig during the oestrous cycle. **American Journal of Anatomy**, Malden, v. 30, n. 4, p. 429-449, 1922.

STOCKARD, C. R.; PAPANICOLAU, G. N. The vaginal closure membrane copulation and the vaginal plug in the guinea pig, with further considerations of the oestrous rhythm. **Biological Bulletin**, Woods Hole, v. 37, 1, p. 222-244, 1919.

MYTHE, N. **The natural history of the Central American agouti (*Dasyprocta punctata*)**. Tese of Smithsonian Tropical Research Institue. Smithsonian Contributions to Zoology, 1978.

SINGH, M. D.; ADOGWA, A. O.; MOLLINEAU, W. M.; GARCIA, G. W. Gross and microscopic anatomy of the reproductive tract of the female agouti (*Dasyprocta leporina*): A neotropical rodent with potential for food productions. **Tropical Agriculture (Trinidad)**, Kingston, v.91, n.1, p.38-46, 2014.

SMALLWOOD, J. E. **A guided tour of veterinary anatomy**. Philadelphia, W. B Saunders. 1992. 390p.

STOCKARD, C. R.; PAPANICOLAU, G. N. The vaginal closure membrane copulation and the vaginal plug in the guinea pig, with further considerations of the oestrous rhythm. **Biological Bulletin**, Woods Hole, v. 37, 1, p. 222-244, 1919.

TOUMA, C.; PALME, R.; SACHSER, N. Different types of oestrous cycle in two closely related South American rodents (*Cavia aperea* and *Galea musteloides*) with Different Social and Mating Systems. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, n. 5, p. 791-801, 2001.

WEIR, B.J. Aspects of reproduction in chinchilla. **Journal of Reproduction Fertility**, Avicena, v. 12, p.410-411, 1966.

WEIR, B. J. Some observations on reproduction in the female agouti, *Dasyprocta aguti*. **Journal of Reproduction Fertility**, Avicena, v.24, p.203-211, 1971.

YALCINKAYA, T. M.; SIITERI, P. K.; VIGNE, J. L.; LICHT, P.; PAVGI, S.; FRANK, L. G.; GLICKMAN, S. E. A mechanism for virilization of female spotted hyenas in utero. **Science**, Nova Iorque, v. 260, p. 1929-1931, 1993.

ZIEHMER, B.; OGLE, S.; SIGNORELLA, A.; KNORR, C.; MACDONALD, A. A. Anatomy and histology of the reproductive tract of the female Babirusa (*Babyrousa celebensis*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, p.184–193, 2010.

4. CAPÍTULO 2 – GLICOSAMINOGLICANOS NO SISTEMA REPRODUTOR EM CUTIAS (*Dasyprocta leporina* LINNAEUS, 1758) GESTANTES

4. CAPÍTULO 2 – GLICOSAMINOGLICANOS NO SISTEMA REPRODUTOR EM CUTIAS (*Dasyprocta leporina* LINNAEUS, 1758) GESTANTES

Glicosaminoglicanos no sistema reprodutor em cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758) gestantes

4.1 RESUMO

RESUMO: Glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos de superfície e da matriz extracelular (MEC), envolvidos em inúmeros processos fisiológicos e patológicos. Diante da importância dos GAGs e sabendo que o conhecimento destas moléculas ajudará a compreender os eventos reprodutivos na cutia, contribuindo diretamente para conservação e exploração racional na espécie, realizou-se o estudo. O trabalho teve como objetivo identificar, caracterizar e quantificar os GAGs nos tecidos tubárico, uterino e vagina no decorrer da gestação, correlacionando-os com a análise de progesterona (P4) e estradiol. Foram utilizadas 10 fêmeas organizadas em grupos de cinco fêmeas para um macho, submetidas diariamente a citologia vaginal para detecção da cópula e por consequência contagem dos dias da gestação, sendo os animais eutanasiados nas idades 2, 15, 20, 35, 45, 55, 65, 75, 85 e 100 dias pós cópula. Após medicação pré-anestésica, a veia cefálica foi canulada, coletado 3 a 5 mL de sangue para análise dos níveis de P4 e estradiol, em seguida, foram anestesiados com propofol e eutanasiados com cloreto de potássio por este mesmo acesso venoso. Fragmentos da tuba uterina, útero e vagina foram coletados, fixados em paraformaldeído 4% tamponado em fosfato de sódio e os cortes histológicos destinados a imunoistoquímica. Fragmentos também foram coletados e submetidos a delipidação em acetona, depois pesados 20 a 40 mg de cada amostra, realizado a digestão proteica com prozima (4 mg/mL, 60°C, 48 horas), adicionado ácido tricloroacético (TCA) 90% em banho de gelo (20 minutos), centrifugados (20 minutos), e ao sobrenadante coletado adicionado metanol. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas, o pó ressuspenso em água destilada e submetidos a técnica de eletroforese em gel de agarose 0,5%, sendo os GAGs identificados e depois quantificados por densitometria. A concentração sérica média de P4 no início da gestação foi de $3,549 \pm 2,883$ ng/mL, no terço médio $5,143 \pm 0,202$ e terço final $4,337 \pm 3,719$ ng/mL. O estradiol no terço inicial apresentou concentração sérica média de $14,101 \pm 19,773$ pg/mL, no terço médio $38,241 \pm 15,662$ e no terço final $31,422 \pm 28,141$ pg/mL. A tuba uterina, o corno uterino e o corpo do útero apresentaram uma predominância ao longo da gestação de CS, DS, e AH, com pequena quantidade de HS. A cérvix possuiu como GAGs predominantes o DS e CS, com pequena concentração de HS e AH. Na vagina, o DS estava em maior quantidade, com pequena concentração de HS, CS e AH. Conclui-se que a concentração dos GAGs varia conforme o órgão e ao longo da gestação, fato que pode estar associado com a função desempenhada por cada órgão e em cada fase gestacional e podendo sofrer influência dos hormônios reprodutivos.

Palavras chave: reprodução, polissacarídeos, animais silvestres, roedor.

4.2 INTRODUÇÃO

O sistema reprodutor feminino da cutia é formado pelos ovários, tubas uterinas, um útero duplo, cérvix e vagina (MARTINS et al., 2011; MAYOR et al., 2011; SINGH et al.,

2014), a qual pode apresentar uma membrana de oclusão em determinadas fases do ciclo estral e gestação (WEIR, 1971; STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1919). Estes órgãos passam por diversas transformações no decorrer da gestação, mudanças que vão desde alterações macroscópicas com aumento do lúmen e no tamanho dos órgãos, alteração na composição das secreções e viscosidade, bem como alterações microscópicas e moleculares, inclusive nos componentes da matriz extracelular (CARSON et al., 1987; GLASSMAN et al., 1996; IWAHASHI et al., 1996; FAZLEABAS et al., 1997; HAFEZ e HAFEZ, 2002), decorrentes principalmente das mudanças hormonais.

Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos que têm como estrutura básica, unidades alternadas de hexosamina e açúcar não-nitrogenado unidas por ligações glicosídicas, estando presentes em todas as células animais com diferenças estruturais dependendo do tecido ou do organismo de origem (NADER et al., 1987; KJELLEN; LINDAHL, 1991; NADER et al., 1999; CECHOWSKA-PASKO; PALKA, 2000) e encontrados os tipos: condroitim 4 e 6 sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato, heparina, queratam sulfato e ácido hialurônico (DIETRICH & DIETRICH, 1976; DIETRICH, 1984; NADER et al., 1984; FRASER et al., 1997; BAÚ et al., 2000).

Os GAGs estão envolvidos em diversas funções biológicas como adesão, migração e proliferação celular, secreção de proteínas e expressão gênica, atuando na maturação de tecidos especializados como a placenta e como organizadores dos componentes da MEC (LOPES et al., 2006; DREYFUSS et al., 2009). Na gestação, os GAGs encontrados nos órgãos reprodutivos participam dos processos de decidualização, implantação, desenvolvimento uterino, no parto, na involução uterina pós-parto (DIETRICH, 1984; OLIVEIRA et al., 2015), no processo da formação do tampão mucoso e na abertura da cérvix uterina (GOLICHOWSKI; KING & MASCARO, 1980; EL MARADNY et al., 1997, AKGUL et al., 2012), sendo bastante sensíveis as variações hormonais (KOFOED et al., 1972; KOFOED et al., 1977; SIMÕES et al., 2012).

Os altos níveis de estrógeno e progesterona proporcionam o crescimento uterino no terço inicial da gestação, alterando sua consistência, volume, peso, forma, posição e coloração (BARROS, 2006; OLIVEIRA et al., 2015). A vagina que se apresenta na maior parte da gestação pálida e seca, torna-se edemaciada e flexível ao final da gestação, enquanto a cérvix permanece rígida com o canal cervical fechado pelo tampão mucoso em quase toda a gestação, passando a ser flexível ao final da gestação acompanhado pela abertura do canal cervical momentos antes do parto (HAFEZ; HAFEZ, 2002).

Considerando que os GAGs participam direta ou indiretamente de diversos processos fisiológicos e patológicos e diante da inexistência de estudos acerca da presença destas moléculas no sistema reprodutor de cutias, realizou-se o estudo, o qual teve como objetivo descrever o padrão dos GAGs em cada órgão do sistema reprodutor feminino, bem como analisar e correlacionar estas moléculas com o perfil hormonal ao longo da gestação, fornecendo conhecimentos que serão úteis para manutenção da espécie em cativeiro e exploração racional em criatórios comerciais.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Animais

Foram utilizadas 10 cutias fêmeas adultas, marcadas com tinta e agrupadas em boxes 5 x 4 m, contendo 5 fêmeas para 1 macho no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS), da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró, RN. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFERSA (processo nº 23091.005467/2013-01) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (SISBIO parecer nº 37987-3).

A seleção dos animais foi realizada mediante exame clínico criterioso, sendo escolhidos a partir do estado de higidez.

4.3.2 Delineamento experimental

As fêmeas foram submetidas ao exame colpocitológico diário entre 7 e 8 horas da manhã e as lâminas coradas em panótico rápido e analisadas em microscópio de luz. Quando da presença de espermatozoide na lâmina, a fêmea era separada do grupo e o dia contado como dia “zero” da gestação. As fêmeas gestantes foram colocadas em boxes individuais e após comprovada a gestação mediante palpação abdominal e/ou exame ultrassonográfico com transdutor de 8 MHz e Scanner portátil (Aquila Vet, Pie Medical®, Nutricell, Campinas, SP, Brazil).

4.3.3 Análise Hormonal

As concentrações séricas de progesterona e de estradiol foram analisadas a partir de amostras de sangue, coletadas previamente a eutanásia do animal. Os animais foram submetidos ao protocolo anestésico, descrito por Oliveira (2012), sendo inicialmente administrado a dose cloridrato de cetamina (12 mg/kg) e cloridrato de xilazina (2mg/kg) por

via intramuscular. Após sedado, a veia cefálica ou safena foi canulada e o sangue logo coletado em seringas descartáveis de 5 mL e armazenados em tubos de silicone com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Imediatamente a coleta, os tubos foram centrifugados a $3000 \times g$ durante 15 min para obtenção do plasma sanguíneo e depois armazenadas a -18°C . As análises de estradiol e progesterona foram determinadas por imunoensaio (EIA) (Diagnostic Bio Biochem Canada - DBC), conforme metodologia adotada por Peixoto (2016). Realizado a coleta do sangue, o animal foi anestesiado com propofol (8 mg/kg IV) e depois pelo mesmo acesso venoso realizado a administração de cloreto de potássio (1 mL/kg).

4.3.4. Citoquímica e Imunohistoquímica

Foram coletados fragmentos do ovário, tuba uterina, cornos uterinos, corpo, cérvix e vagina, que foram fixados em solução de paraformaldeído 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 por 72 horas. Os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e em seguida obtidos os cortes histológicos de 5 a 7 μm em micrótomo (LEICA RM2235). Para reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS), o material foi desparafinizado, hidratado e submetido a reação em PAS e os cortes contracolorados com hematoxilina e as lâminas montadas, analisadas e fotografados em microscópio de luz (Leica DM 500 HD) com câmera acoplada (LEICA ICC50W).

Para imunohistoquímica, os cortes de 5 μm foram aderidos em lâminas silanizadas, desparafinizados em xilol, reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100 a 50%) e imersos por 5 minutos em tampão fosfato (PBS; 137 mM NaCl/2.7 mM KCl/4.3 mM Na_2HPO_4 /1.4 mM KH_2PO_4 ; pH 7.3) para lavagem. A exposição antigênica dos tecidos foi realizada em tampão citrato (10 mM, pH 6,0), utilizando aparelho de micro-ondas (60°C , 5 min), seguida por duas lavagens em PBS. Para bloqueio da peroxidase endógena e reações inespecíficas foram utilizados uma solução de metanol com 3% de peróxido de hidrogênio e Reagente Imunológico (RUO) ABC Elite VECTASTAIN (Vector Laboratories) por 10 min. As secções foram incubadas com anticorpo primário a 4°C por 20 h em câmara úmida. A expressão tecidual dos GAGs foi determinada com o uso dos anticorpos contra condrotin sulfato (AC monoclonal, CAM-56, Abcam), contra ácido hialurônico (Ac. Policlonal de ovelha, Abcam) (Tabela 1, Anexo A). Em seguida, os cortes foram incubados por 45 min. com anticorpo secundário universal Anti-Mouse/Anti-Rabbit/Anti-Goat IgG (H+L) (Universal Pan-Specific, Vector Laboratories). Para amplificação do sinal da reação foi utilizado o complexo avidina-biotinilida (kit Vectastain Elite ABC[®], Vector Laboratories).

Para visualização da reação foi utilizado Vector NovaRed[®]. As lâminas foram montadas com uso de Permount[®] (Fisher Scientific), analisadas e fotografadas.

4.3.5 Delipidação

Para análise dos glicosaminoglicanos, fragmentos dos órgãos genitais, tecido placentário e subplacenta foram coletados, picotados e colocados em frascos de 15mL, contendo acetona, sendo realizado uma troca a cada 24 horas durante três dias consecutivos, para remoção dos lipídios (Delipidação).

4.3.6 Extração e purificação dos GAGs

Após finalizado o processo de delipidação, as amostras foram pesadas em balança de precisão (BEL M214 Ai) de modo a separar frações para cada órgão. Para a tuba uterina, pesou-se 10 mg e para os demais órgãos reprodutivos pesou-se 40mg, sendo estas frações colocadas separadamente em microtubos de 2 mL (Eppendorf) e identificados. Posteriormente, foi adicionado a cada frasco prozima (4 mg/mL) em tampão TRIS-HCl, 0,05 M pH 8,0 com NaCl 0,15 M, na proporção de 1 mg de pó para 20 µL de tampão, incubado em temperatura de 60°C durante 24 a 48 horas. Em seguida, foi adicionado ácido tricloroacético 90%, numa proporção de 10% do volume inicial da amostra em banho de gelo durante 20 minutos para precipitação dos ácidos nucléicos. Depois, as amostras foram centrifugadas a 4700 giros (SOLAB, SL-701) durante 20 minutos a 20° C e ao término descartado o precipitado, sendo o volume de cada amostra verificado e ao sobrenadante adicionado 2 volumes de metanol para 1 volume da amostra.

As amostras foram então congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas (TERRONI, LS 3000), obtendo-se ao final o pó contendo os GAGs, o qual foi ressuspenso em 10 a 35 µL de água destilada.

4.3.7 Eletroforese em gel de agarose

A identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos foram feitas por eletroforese em gel de agarose como proposto por Dietrich e Dietrich (1976), sendo aplicado no gel 5 µL do padrão (1 mg/mL) contendo condroitim (CS), dermatam (DS) e heparam sulfato (HS). Ao mesmo tempo, a amostra foi agrupada no gel, por tecido e por idade gestacional (Figura 1A e 1B) e submetida a eletroforese com duração média de 1 hora e 15 minutos, sob a tensão de 110 V, 5 A 10 W (Figura 1C).

Decorrido o período, o gel foi retirado da cuba de eletroforese e colocado em solução de cetavlon (CTV) 0,1%, permanecendo nesta solução por no mínimo 2 h (Figura 1D). Os géis foram removidos do CTV e envolvidos em papel filtro e colocados para secar em fluxo de ar contínuo, em média por 45 minutos (Figura 1E). Ao término da secagem, as lâminas foram coradas em azul de toluidina (0,1%) por 15 a 20 min (Figura 1F), colocados em solução descorante (etanol 50% e ácido acético 1%) (Figura 1G) por alguns minutos sob agitação e por fim, colocadas para secar e digitalizadas.

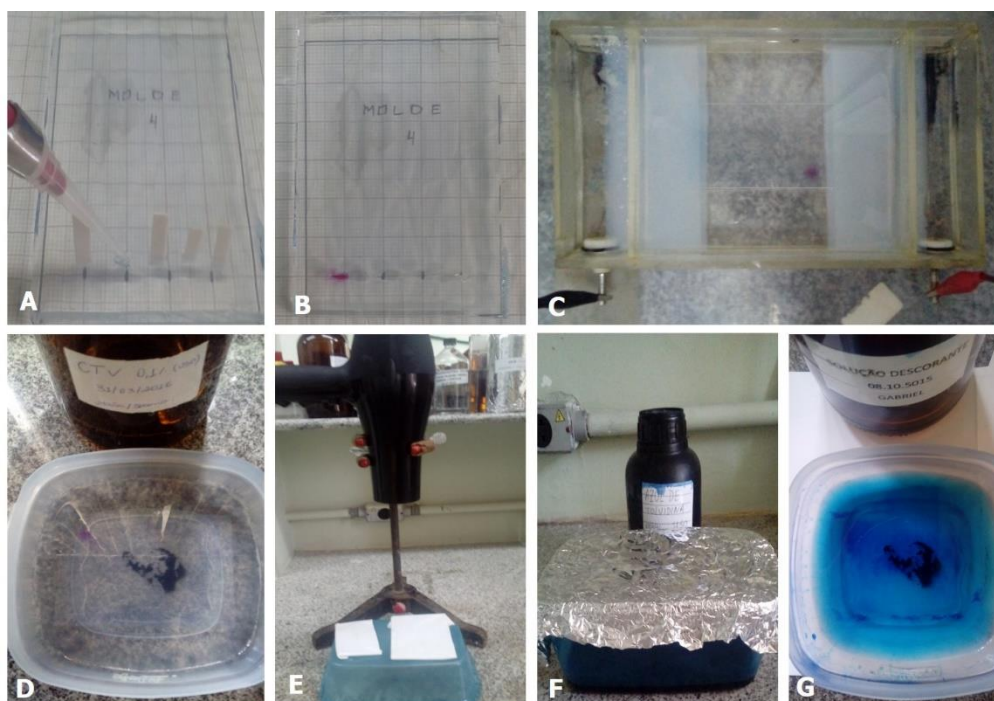


Figura 1- Etapas para Eletroforese em gel de agarose. A: aplicação das amostras nos poços. B: lâmina contendo as amostras e o padrão. C: lâmina submetida a eletroforese. D: lâmina colocada em solução de CTV 0,1%. E: lâminas envoltas em papel filtro e submetidas a corrente de ar quente contínua. F: lâmina corada em azul de toluidina. G: lâmina aplicada em solução descorante.

4.3.8 Digestão enzimática

As amostras foram submetidas ao processo de digestão enzimática, utilizando heparinase III obtidas de *Flavobacterium heparinum* (Sigma-Aldrich®) em solução tampão (20 mM Tris-HCl, pH 7,5 contendo 0,1 mg/ml BSA e 4 mM CaCl_2), seguindo recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich®).

4.3.9 Densitometria

A quantificação dos GAGs foi realizada através da densitometria das lâminas de eletroforese em gel de agarose, analisadas através do software ImajeJ® (FLORENTIN, 2015).

4.3.10 Análise Estatística

Foram obtidos valores de média e erro padrão para estradiol e progesterona nos terços inicial, médio e final de gestação. Posteriormente, de modo a identificar se ocorreu alguma relação dos GAGs totais nos terços inicial, médio e final de gestação e os hormônios ovarianos, foram realizados os testes de Correlação de Pearson utilizando o software SAS (SAS 9.3, 2009), considerando o nível de significância $p < 0,05$.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Análise Hormonal

A análise hormonal realizada nas cutias ao longo da gestação, mostra que no 15º dia, período que a placenta ainda é imatura, ocorreu um pico de progesterona (P4) de 6,855 ng/mL, produção esta que seria decorrente do corpo lúteo, estando acompanhada dos baixos níveis de estrógeno. Em geral, no terço inicial da gestação a concentração média de progesterona atinge cerca de $3,549 \pm 1,664$ ng/mL, enquanto o estradiol possui média de $24,356 \pm 14,625$ pg/mL. No terço médio de gestação, a placenta está totalmente desenvolvida e é a responsável pela produção de progesterona, tendo neste período a maior concentração média de P4 com $5,143 \pm 0,117$ ng/mL, ao mesmo tempo que apresentou também a maior concentração média de estradiol ($38,2421 \pm 9,043$ pg/mL). No terço final de gestação, a concentração média de P4 passou a ser de $4,337 \pm 2,147$ ng/mL, reduzindo drasticamente a termo (Tabela 1).

Tabela 1- Análise de estradiol e progesterona sérica em cutias gestantes.

Idade Gestacional	Estradiol (pg/mL)	Progesterona (ng/mL)
	Média $\pm$ Erro Padrão	Média $\pm$ Erro Padrão
Grupo Controle	$6,167 \pm 0,331$	$2,773 \pm 0,393$
Terço Inicial	$24,536 \pm 14,625$	$3,549 \pm 1,664$
Terço Médio	$38,241 \pm 9,043$	$5,143 \pm 0,117$
Terço Final	$31,422 \pm 16,247$	$4,337 \pm 2,147$

4.4.2 Perfil eletroforético

O perfil eletroforético de cada órgão do sistema reprodutor de cutias fêmeas foi estudado e analisados isoladamente.

A tuba uterina possuiu no decorrer da gestação um perfil variável na concentração de GAGs, com predomínio de DS e HS no início da gestação e DS e CS nos terços médio e final, com redução drástica a termo (Figura 2).

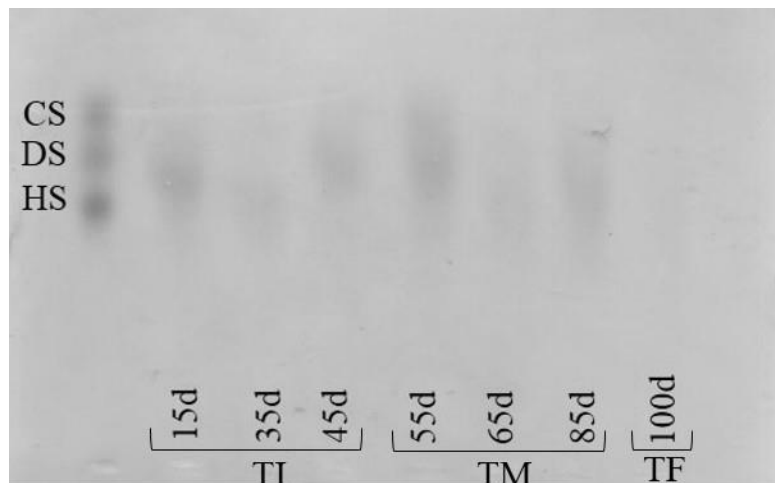


Figura 2 – Perfil eletroforético da tuba uterina ao longo da gestação em cutias. TI- terço inil; TM- terço médio; TF- terço final; CS- conroitim sulfato; DS- dermatam sulfato; HS- heparam sulfato.

O corno uterino apresentou ao longo da gestação uma predominância de CS e DS, com pequena quantidade de HS (Figura 3A), possuindo queda nas concentrações dos GAGs totais ao longo da gestação, notada a partir da análise por densitometria (Figura 3B).

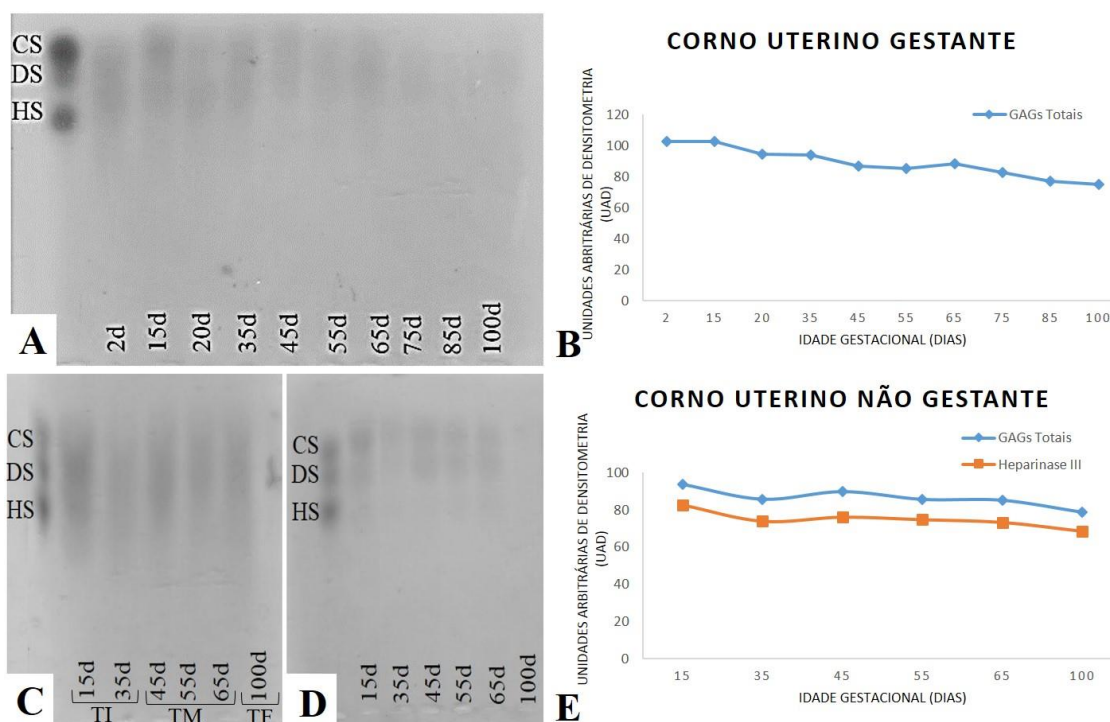


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose e densitometria das lâminas do corno uterino gestante e não gestante. A: Perfil eletroforético do corno uterino gestante ao longo da gestação

em cutias. B: densitometria do corno uterino ao longo da gestação. C: perfil eletroforético do corno uterino não gestante. D: perfil eletroforético do corno uterino não gestante após incubação com heparinase III. E: densitometria do corno uterino não gestante e após incubação com heparinase III. TI- terço inicial; TM- terço médio; TF- terço final; CS- conroitim sulfato; DS- dermatam sulfato; HS- heparam sulfato.

O corno uterino não gestante apresentou maior concentração de condroitim sulfato e dermatam sulfato e uma pequena concentração de heparam sulfato (Figura 3C), sendo as bandas melhor visualizadas após a aplicação da heparinase III (Figura 3D), quando ocorreu a degradação do HS. Neste órgão, o padrão eletroforético apresentou-se com características similares ao apresentado no corno uterino gestante, no entanto sem variação aparente no início e meio de gestação e com redução destes GAGs próximo do parto (Figura 3E), fato que pode estar relacionado com a expressão hormonal da progesterona sanguínea ou do estradiol circulante. Ao analisar a correlação entre os níveis de P4 e os GAGs totais no corno uterino gestante, verificou-se uma tendência de correlação positiva ($p=0,0763$; $r=0,99$), sendo que o aumento da concentração de P4 é acompanhado pelo aumento dos GAGs totais neste órgão no terço inicial de gestação (Tabela 2).

Tabela 2- Correlação dos níveis séricos de progesterona e glicosaminoglicanos totais nos órgãos reprodutores de cutias fêmeas nos terços inicial, médio e final de gestação.

Órgão	Fases da gestação					
	Terço Inicial		Terço Médio		Terço final	
	p	r	p	R	P	r
Corno Uterino gestante	0.0763	0.99283	0.2281	-0.93651	0.3371	-0.86309
Corno Uterino não gestante	-	-	0.7103	-0.43956	-	-
Corpo do Útero	-	-	0.6094	-0.57578	0.7199	0.42594
Cérvix	-	-	0.6959	-0.45969	0.3154	-0.87979
Vagina	-	-	0.4103	0.79937	0.1080	0.98564

* $p<0,05$

A partir da análise do tecido por eletroforese, observou-se que o corpo uterino, teve como principais GAGs, o CS e o DS, com baixas concentrações de HS (Figura 4A e 4B), sendo as maiores concentrações encontradas no início da gestação, com queda subsequente e contínua no terço médio até o final da gestação (Figura 4C).

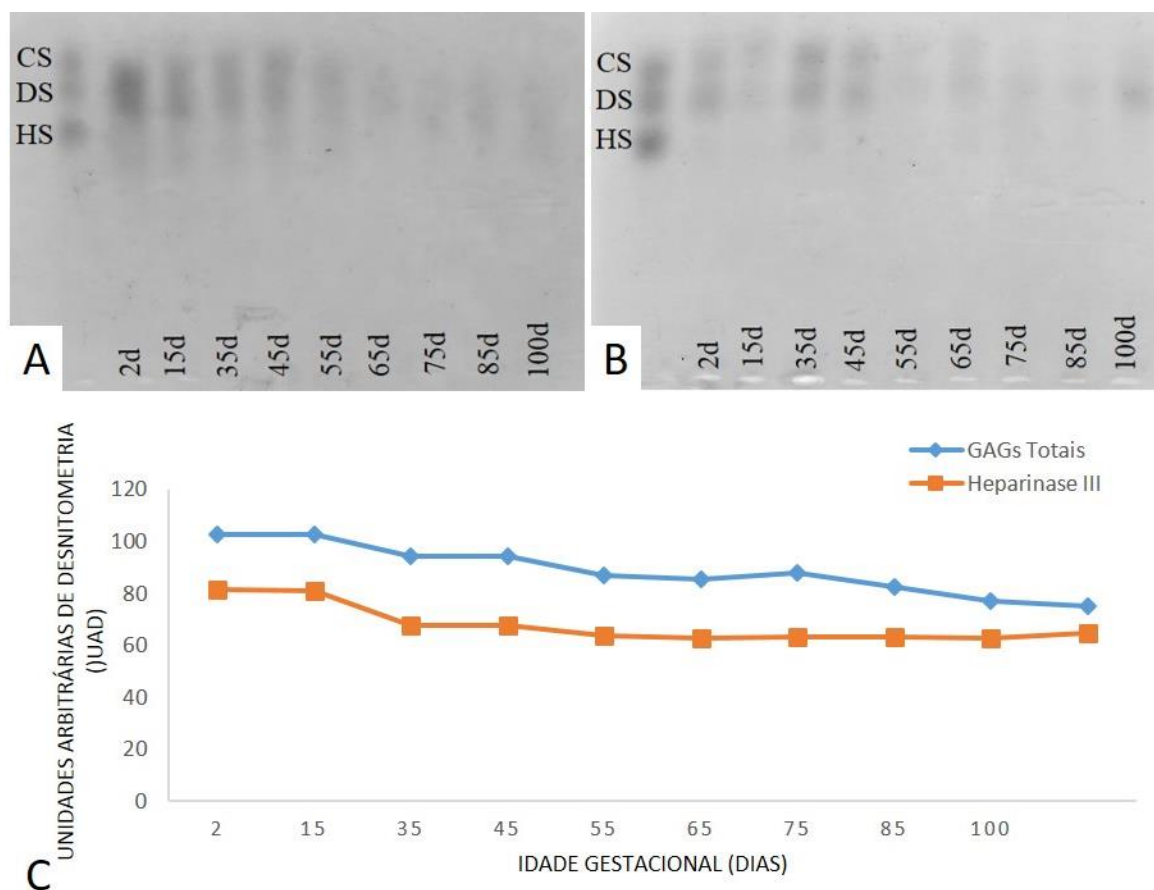


Figura 4- Eletroforese em gel de agarose e densitometria das lâminas do corpo do útero. A: Perfil eletroforético do corpo uterino ao longo da gestação em cutias. B: perfil eletroforético do corpo uterino após incubação com heparinase III. C: análise das Unidades Arbitrárias de Densitometria (UADs) no corpo uterino. CS- condroitim sulfato; DS- dermatam sulfato; HS- heparam sulfato.

Na cérvix verificou-se um predomínio de DS e HS (Figura 5A), com o aumento de CS no terço médio da gestação (Figura 5B). A partir da análise por densitometria verificou-se que ocorre um pico no 15º dia de gestação nos GAGs totais, seguido de uma queda até o terço final de gestação, sendo que no 100º dia há um pequeno aumento nesta concentração (Figura 5C).

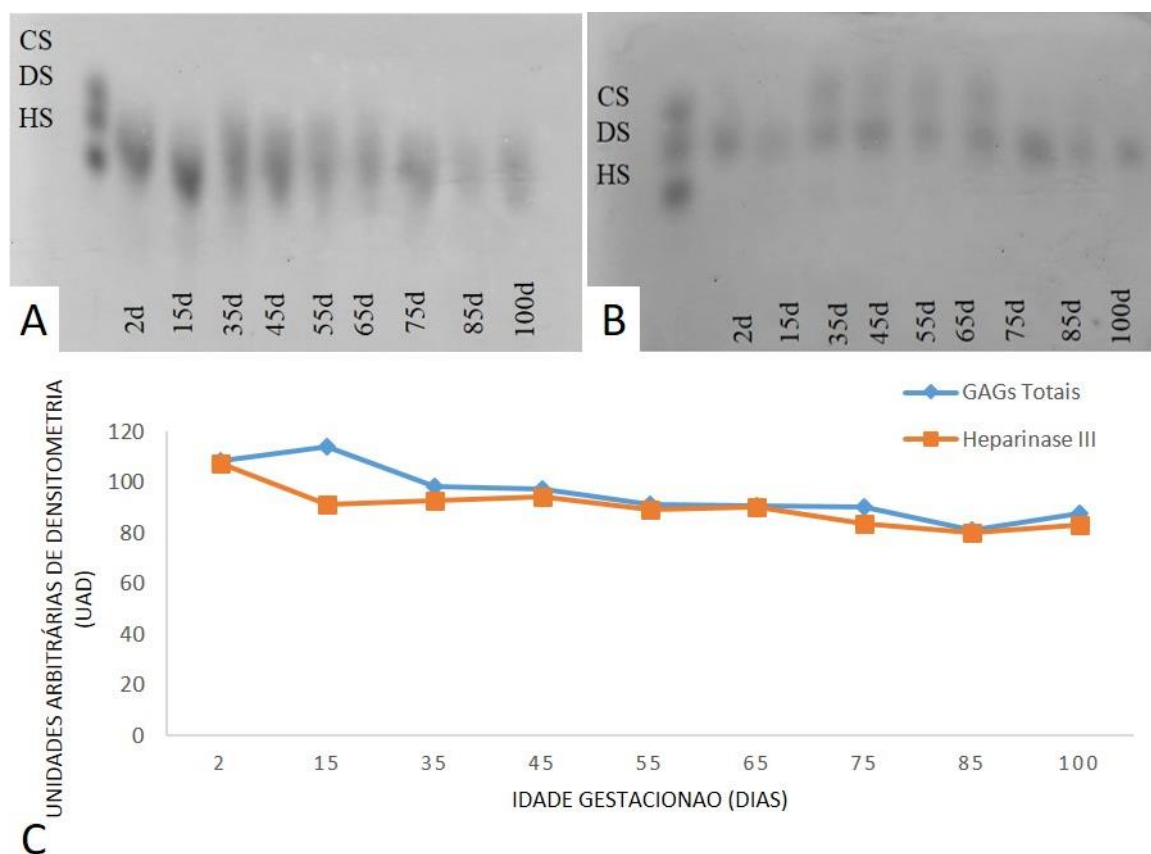


Figura 5- Eletroforese em gel de agarose e densitometria das lâminas da cérvix na gestação em cutias. A: Perfil eletroforético da cérvix ao longo da gestação. B: perfil eletroforético do cérvix após incubação com heparinase III. C: análise das UADs na cérvix uterina. CS- Condroitim sulfato; DS- Dermatan sulfato; HS- Heparan sulfato.

Na vagina, o principal GAG encontrado foi o DS, com pequena concentração de HS e CS analisados ao longo da gestação (Figura 6A e 6B), sendo verificado as maiores concentrações nos GAGs totais entre 15 e 45 dias, ocorrendo uma queda nestas concentrações a partir deste período até o 75º dia (Figura 6C).

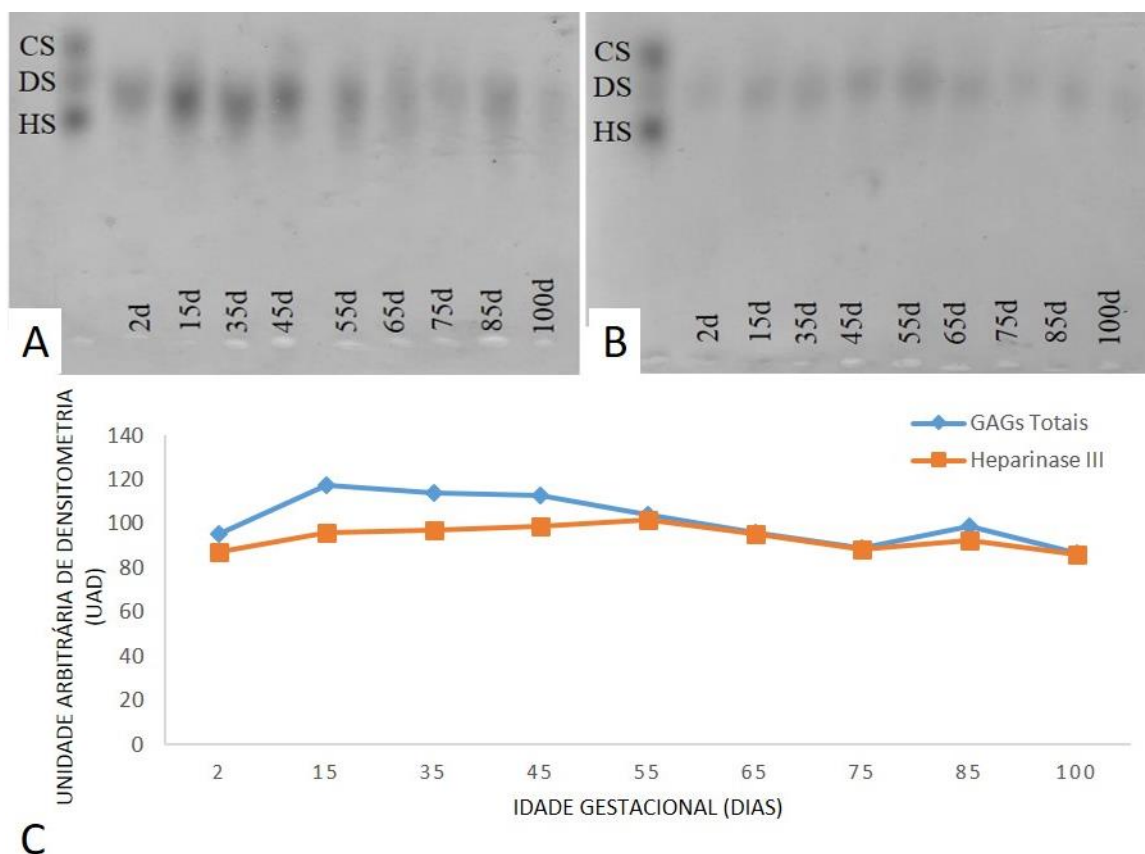


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose e densitometria das lâminas da vagina em cutias gestantes. A: Perfil eletroforético da vagina ao longo da gestação em cutias. B: perfil da eletroforese do tecido vaginal após incubação com heparinase III. C: análise das UADs na vagina ao longo da gestação. CS- Condroitim sulfato; DS- Dermatam sulfato; HS- Heparan sulfato.

4.4.3 Citoquímica e Imunohistoquímica

Analisando as lâminas coradas com PAS, verificou-se que na tuba uterina a mucosa, a submucosa e a camada muscular apresentavam reação PAS positiva (Figura 7A) e ao ser submetido à imunohistoquímica constatou-se a presença de CS e AH nestas regiões (Figura 7B e 7D), sendo a marcação fraca próximo do parto (Figura 7D).

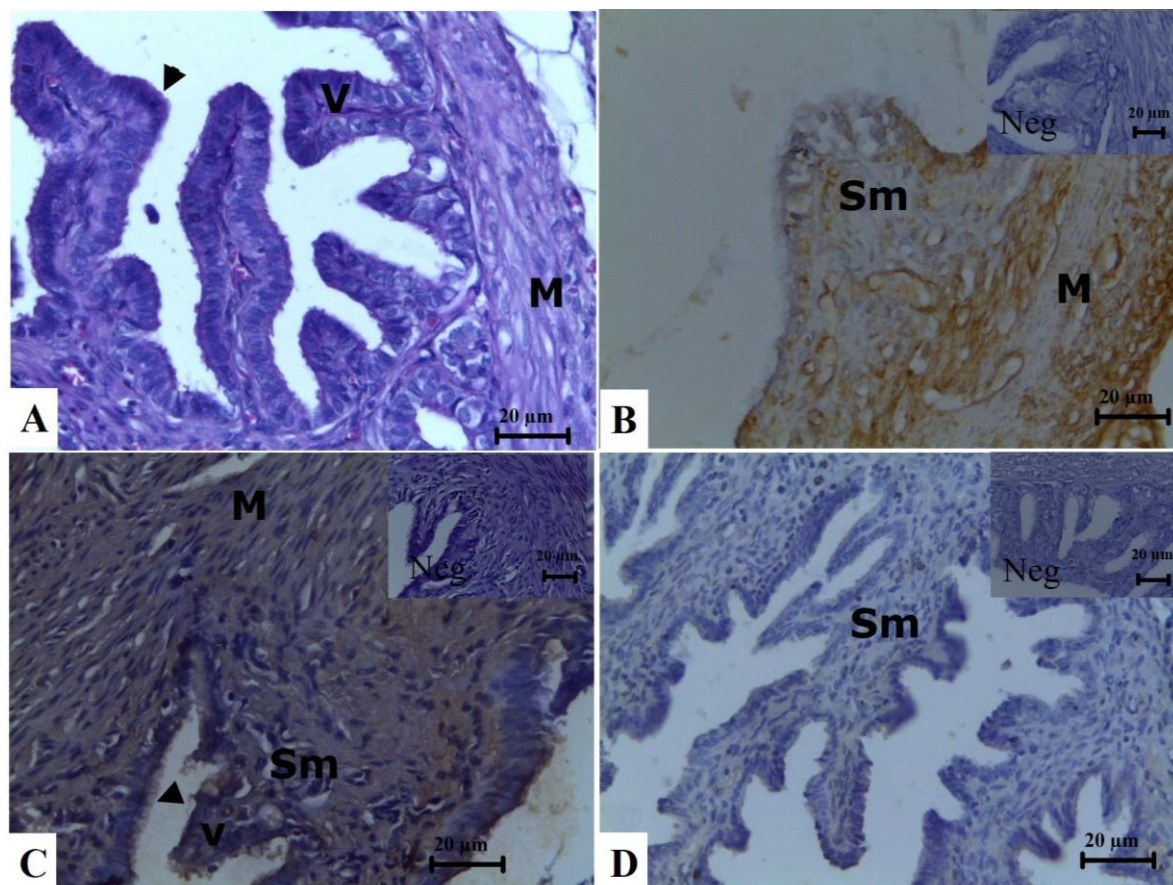


Figura 7- Tuba uterina de cutia submetido a técnicas de citoquímica por PAS e imunohistoquímica. A: Infundíbulo de cutia aos 45 dias possuindo reação PAS positiva na camada muscular (M), na mucosa (cabeça de seta) e na submucosa das vilosidades (V). B: Ístmo aos 45 dias com as camadas muscular (M) e submucosa (Sm) marcados com anti-AH. C: ampola da tuba aos 75 dias, estando o epitélio ciliado marcado (cabeça de seta), submucosa (Sm) e camada muscular (M) marcadas com anti-AH. D: infundíbulo da tuba aos 100 dias com a submucosa (Sm) das vilosidades marcadas fracamente por anti-CS. Neg: Negativo.

Quanto ao útero, em especial ao corno uterino e corpo do útero, observou-se na mucosa, submucosa e mucosa das glândulas endometriais reação PAS positiva (Figura 8A, 8B e 8E), sendo verificado a presença de CS e AH no corno uterino e corpo do útero, evidenciado pela marcação forte com anti-CS (Figura 8D, 8F e 8G) e anti-AH (Figura 8C e 8H). Na cérvix foi verificado também reação PAS positiva na mucosa, submucosa e na camada muscular, no entanto estas regiões foram marcadas fracamente para anti-CS e anti-AH.

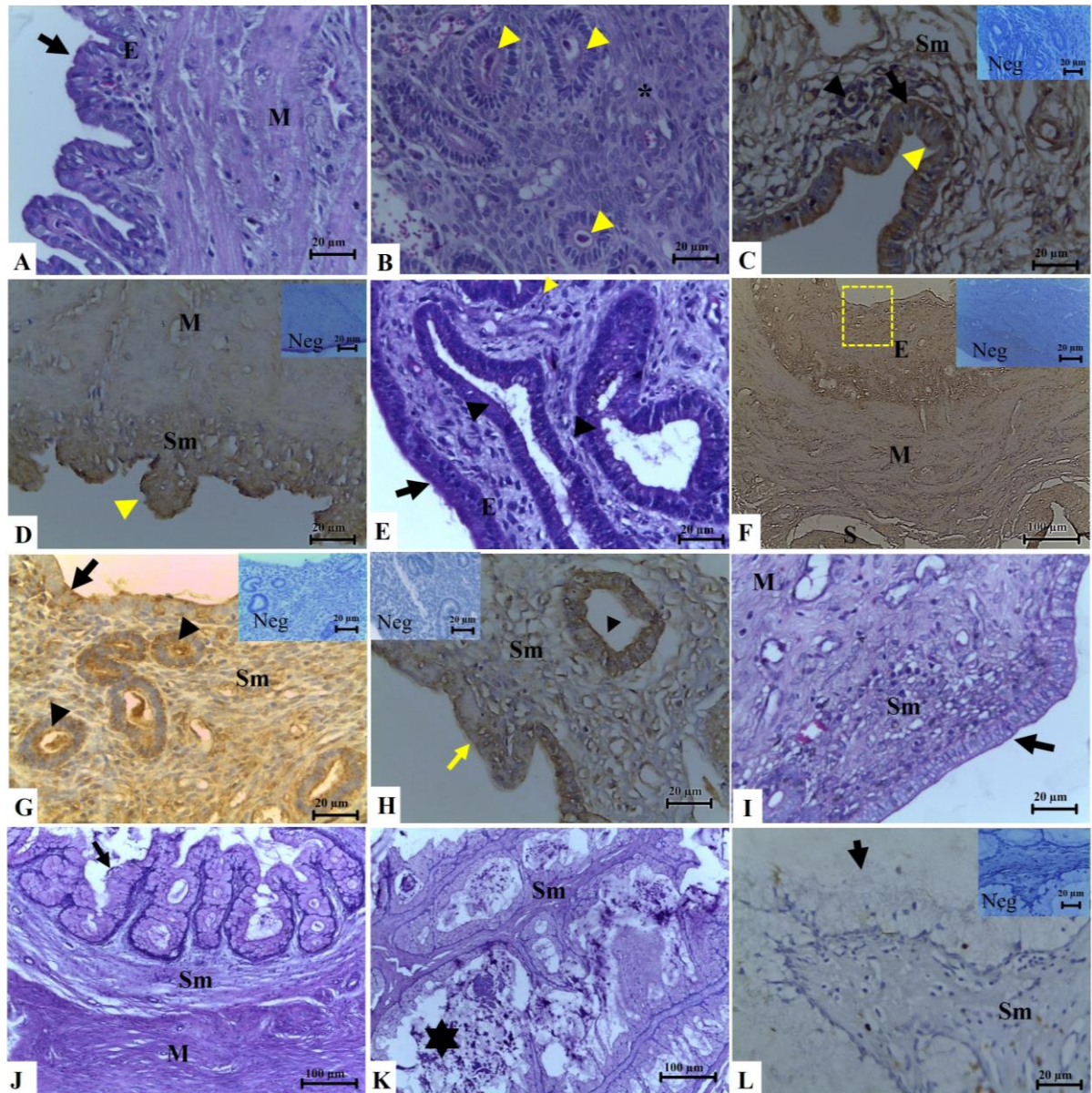


Figura 8- Útero de cutia submetido a técnicas de citoquímica por PAS e imunohistoquímica. A: Corno uterino de cutia aos 20 dias de gestação, mostrando reação PAS positiva na mucosa (seta) do endométrio (E) e miométrio (M). B: reação positiva no endotélio das glândulas endometriais (cabeça de seta) de cutia aos 75 dias. C: corno uterino aos 48 dias com a mucosa (cabeça de seta amarela) e lâmina basal (cabeça de seta preta) do epitélio endometrial e das glândulas endometriais (seta) marcadas com o anticorpo para AH. D: corno uterino aos 65 dias, estando a submucosa (Sm) e mucosa (cabeça de seta) e miométrio (M) marcado com anti-CS. E: corpo do útero aos 75 dias apresentando reação PAS positiva na mucosa (seta) e mucosa das glândulas endometriais (cabeça de seta). F: corpo aos 20 dias, estando o endométrio (E), miométrio (M) e serosa (S) marcadas com anti-CS. G: em detalhe o endométrio do corpo aos 20 dias mostrando as mucosas endometrial (seta) e das glândulas endometriais (cabeça de seta) marcadas por anti-CS. H: corpo aos 45 dias com marcação do anti-AH nas regiões de mucosa (seta), glândulas endometriais (cabeça de seta) e submucosa (Sm). I: cérvix de cutia aos 2 dias pós cópula com reação PAS positiva na mucosa (seta), submucosa (Sm) e miométrio (M). J: cérvix aos 45 dias evidenciando-se a reação PAS positiva forte no miométrio e fraca na submucosa. K: verifica-se tampão cervical mucoso aos 75 dias (estrela), e submucosa com reação fraca para PAS. L: cérvix aos 48 dias com a submucosa marcada fracamente para anti-AH. Neg: Negativo.

A vagina ao ser analisada por citoquímica por PAS, observou-se que a membrana de oclusão vaginal, a mucosa, a submucosa e a camada muscular foram PAS positivas (Figura 9A e 9B). A partir da marcação dos anticorpos para CS e AH, foi observado que o epitélio da mucosa e a membrana de oclusão vaginal não foram marcados por estes anticorpos, estando localizados na submucosa e na camada muscular (Figura 9C e 9F).

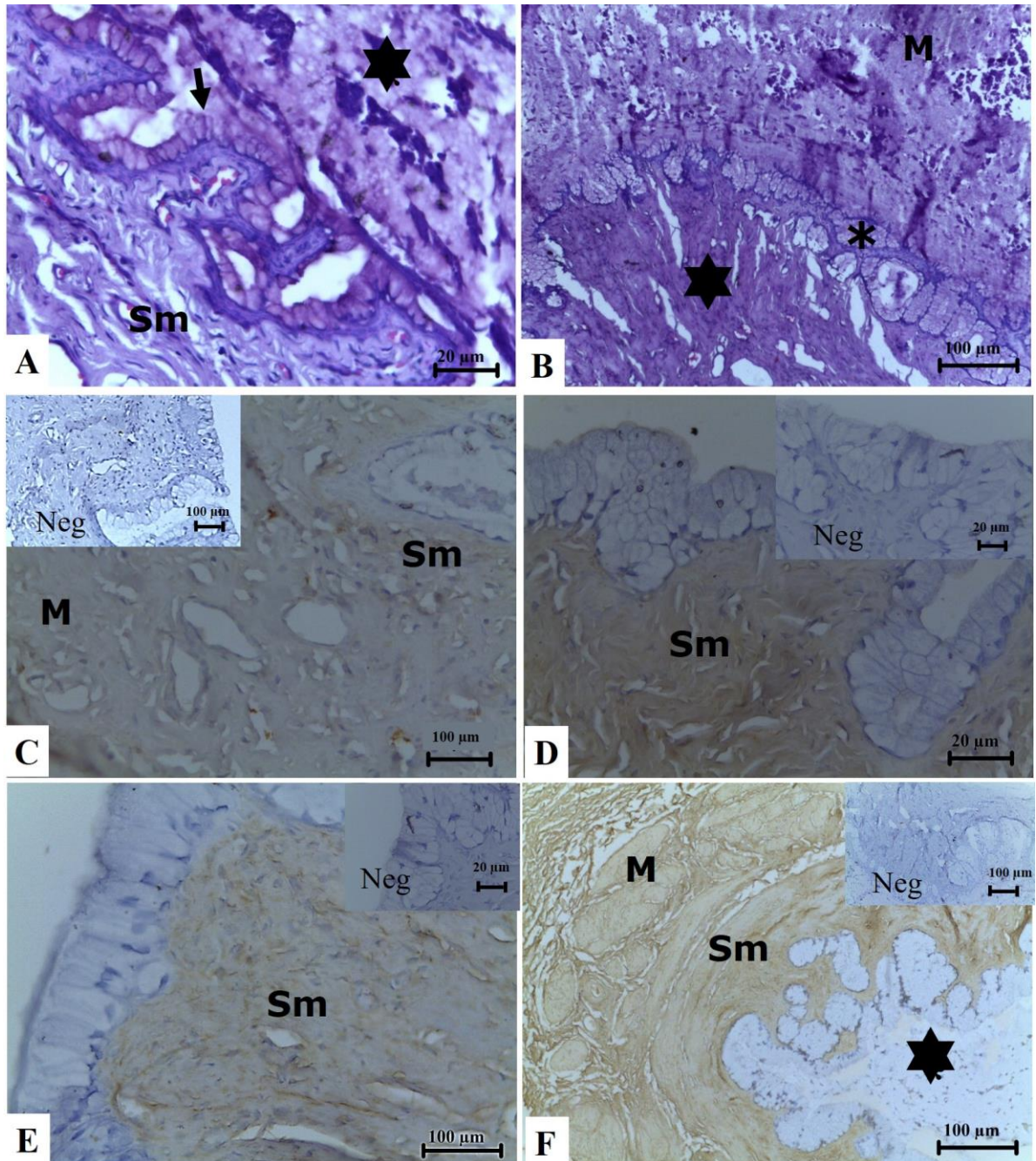


Figura 9- Vagina de cutia submetida a técnicas de citoquímica por PAS e imuhistoquímica. A: vagina de cutia aos 35 dias mostrando a mucosa (seta) e a membrana de oclusão vaginal (*) com reação PAS positiva. B: vagina aos 100 dias com membrana de oclusão (estrela), mucosa

(*) e camada muscular (M) PAS positivas. C: vagina aos 35 dias possuindo marcação fraca para anti-CS na submucosa (Sm) e muscular (M). D: vagina aos 75 dias com marcação forte na submucosa e tecido conjuntivo adjacente (Sm) para anti-AH. E: vagina aos 75 dias com marcação na submucosa e tecido conjuntivo para anti-CS. F: vagina aos 100 dias apresentando marcação na submucosa e tecido conjuntivo (Sm) e camada muscular (M), não estando a membrana de oclusão vaginal marcada para o anticorpo contra AH (estrela). Neg: Negativo.

4.5 DISCUSSÃO

A análise hormonal realizada nas cutias ao longo da gestação, mostra que no 15º dia, período que a placenta ainda é imatura, ocorre um pico de progesterona (P4) de 6,855 ng/mL, produção esta que seria decorrente do corpo lúteo, mantendo uma média de $3,549 \pm 2,883$ ng/mL, enquanto o estradiol possui concentração média de $14,101 \pm 19,773$ pg/mL. Em ratos, Pepe e Rothchild (1974), relatam que os níveis de P4 aumentaram de forma constante, apresentando um pico no dia 5 e mantem-se em um patamar de cerca de 70 ng/mL até 9 dias. Já McCormack e Greenwald (1974) mencionam em ratas um pico no dia 6 e uma queda significativa no dia 7, resultados que se assemelham ao encontrado na cutia.

No terço médio de gestação, a placenta está totalmente desenvolvida (OLIVEIRA, 2012) e é a responsável pela produção de progesterona, tendo neste período a maior concentração média de P4 com $5,143 \pm 0,202$ ng/mL, ao mesmo tempo que apresentou também a maior concentração média de estradiol ($38,2421 \pm 15,662$ pg/mL). McCormack e Greenwald (1974) citam em ratas que a concentração de progesterona periférica durante terço médio da gestação aumenta nos dias 12 e 13. Estes autores também relataram que os níveis de estradiol permaneceram baixos do dia 5

à 16, período que ocorre aumento significativo e contínuo na concentração de 17 β -estradiol até o dia do parto. Na cutia, os níveis de estradiol aumentaram no terço médio de gestação, tendo uma queda no 85º dia, seguido por um aumento do estradiol a termo, acompanhado pela queda de P4.

No terço final de gestação, a concentração média de P4 passou a ser de $4,337 \pm 3,719$ ng/mL, reduzindo drasticamente a termo. Em ratas (PEPE; ROTHCHILD, 1974), no terço final da gestação, ocorreu um pico de P4 no 15º dia de cerca de 130 ng / mL e a partir do 19º dia há uma queda rápida, semelhante ao observado na cutia, cujos níveis de P4 a termo caíram rapidamente. Resultado semelhante aos da cutia, foi também observado por McCormack e

Greenwald (1974) em ratas, em que nesta fase, ocorre um pico nos dias 14 a 17, seguido de queda contínua após o dia 17,3 dias até o parto.

Quanto a análise dos GAGs nos órgãos reprodutivos de cutia, verificou-se que a tuba uterina possuiu perfil variável ao longo da gestação, com predomínio de DS e HS no terço inicial e CS e DS nos terços médio e final e baixas concentrações de AH e HS. Coloianu et al. (1997) demonstraram através de técnicas de citoquímica e imunolocalização que o principal GAG encontrado neste órgão em fêmeas suínas foi o CS, seguido por baixas concentrações de DS e AH, estando o CS fortemente marcado no istmo e também na ampola, em especial na lâmina própria da mucosa. No suíno, Tienthai et al. (2000) mencionam que AH localizava-se na lâmina própria do infundíbulo e nas vilosidades do istmo e o HS (sindecán) no epitélio ciliado. Por sua vez, Bergqvist e Martínez (2006) em estudos com vacas, verificaram no epitélio da mucosa e no fluido do infundíbulo há sindecán-1 e sindecán-2, proteoglicano que contem HS, cujos autores acreditam estar envolvidos na capacitação do espermatozoide. Ressalta-se que na cutia o AH, além do epitélio ciliado este GAG estava presente também na submucosa e na camada muscular na ampola, no infundíbulo e istmo.

O corno e o corpo uterino apresentaram características semelhantes na composição dos GAGs da matriz extracelular, tendo sido encontrado o CS, DS, AH e o HS, com decréscimo nos níveis de GAGs totais ao longo da gestação. Da mesma forma, Munakata et al. (1984) em coelhas e Gomes et al. (2007) em camundongas citam como principais GAGs presentes no útero, o CS, DS e o HS. Já Simões et al. (2012) em ratas não gestantes mencionam como padrão de GAGs, o DS, HS e AH, ocorrendo redução do HS em fêmeas tratadas com P4. Estes resultados demonstraram que o HS é modulado pela concentração sérica de P4, fato que corrobora com o observado na cutia, em que foi verificado baixas concentrações de HS ao longo da gestação, provavelmente em função da produção de P4 pelo corpo lúteo e/ou placenta. Estudos realizados em ratas por San Martín et al. (2003) dias após a cópula mostram que o AH e o versican, proteoglicano formado por CS/DS, antes da implantação embrionária estavam localizados no estroma endometrial, concordando com o verificado na cutia, em que o AH e o CS foram marcados na mucosa e na submucosa do endométrio, bem como na mucosa das glândulas endometriais, fato que pode estar associado a participação destas moléculas no processo de decidualização. Em mulheres, Nasciutti et al. (2006) encontraram como GAG predominante no endométrio o CS, seguido pelo DS e HS, diferindo do observado na cutia, que teve como principais polissacarídeos CS, DS e AH e baixas concentrações de HS.

Na cérvix da cutia, os principais GAGs encontrados foram DS e HS, com baixas concentrações de CS. Similar ao encontrado na cutia, Cubas et al. (2010) citam em ratos que este órgão tem como principais GAGs o DS e HS, estando o AH, praticamente constante durante as fases do ciclo estral. Souza et al. (2014) no rato albino, citam como GAGs predominantes deste órgão o HS e uma mistura formada por CS e DS, semelhante aos GAGs encontrados na cérvix de cutia em diferentes fases da gestação. Por sua vez, Fosang (1984) relatou em ovelhas que mudanças na matriz extracelular da cérvix são vistas já no terço inicial de gestação, com o aumento da síntese de DS, queda nos níveis de proteoglicanos e ácido hialurônico no terço médio e aumento do AH a termo, acompanhado pela destruição das fibras de colágeno e invasão de células inflamatórias, fonte potencial de colagenase e proteinase. Já Osmers et al. (1995) em humanos relataram um aumento no total de GAGs durante a gestação, no entanto com queda nas concentrações de DS no momento do parto. Diferente do observado por Osmers et al. (1995), na cutia ocorre uma diminuição dos GAGs totais ao longo da gestação, em especial a termo.

Lee e Ax (1984) analisando os GAGs presentes no muco cervical mostram um aumento do CS presente no muco cervical no estro quando comparado ao muco cervical na fase de diestro, sugerindo que essas moléculas atuam no processo de capacitação espermática e são influenciadas pelos níveis hormonais. Na cutia gestante a análise por imunohistoquímica para CS e AH, o muco cervical apresentou uma reação muito fraca, indicativo que estas moléculas ou estariam em baixas concentrações ou ausentes neste muco na gestação.

Shimizu (1980) e Shimizu et al. (1980a) estudando a cérvix em mulheres encontraram que no pós-parto as concentrações de AH, CS, HS aumentam pós-parto, enquanto o DS diminui neste período, quando comparado ao tecido não gestante, alterações que podem estar relacionadas com a atuação destas moléculas no remodelamento tecidual. Já Maillot et al. (1979) verificaram que os principais GAGs encontrados na cérvix de mulheres gestantes foram o queratan sulfato (QS), o DS, CS e o AH, diferindo do encontrado em nossos estudos, devido o queratan sulfato não ter sido observado na cérvix de cutias. Os autores acrescentaram ainda que na gestação ocorreu um aumento significativo do queratan sulfato (QS) e redução de DS e CS, com aumento considerável no momento do parto e aumento significativo do AH no pós-parto. Ressalta-se que na cutia a concentração de CS reduziu após o terço médio de gestação e a do DS apresentou queda no terço médio até a termo.

Os resultados observados na cutia, diferiram também do descrito em cadelas por Linharattanaruksa et al. (2014), quando relataram que o AH foi o GAG predominante na cérvix, estando presentes também o CS, DS, QS e HS em menores concentrações. Na cutia os

GAGs predominantes foram o DS e CS, seguido do HS e menores concentrações de AH. Golichowski et al. (1980) e El Maradny et al. (1997) descrevem que na cérvix de mulheres gestantes ocorre uma baixa concentração de AH na maior parte da gestação, semelhante ao observado em cutias, cuja marcação foi fraca para anti-AH. Para El Maradny et al. (1997) a expressão do AH ocorreu mais significativamente próximo ao parto, estimulando a migração leucocitária e produção de metaloproteinases, e dessa forma atuando na abertura do canal do parto, no processo de remodelação de tecidos e involução uterina pós-parto. Estas diferenças no padrão dos GAGs cervicais podem estar associadas as diferenças na fisiologia reprodutiva das espécies.

Em cutias, os GAGs predominantes na vagina foram o DS, CS e o HS, com pequenas concentrações de AH. Em estudos realizados em mulheres no período fértil, Bezerra et al. (2004) verificaram como glicosaminoglicanos padrões para o órgão uma predominância de DS, seguido de concentrações menores de CS e HS, semelhante ao encontrado em cutias gestantes. No entanto, estes autores não citam a presença do AH, talvez por não terem realizado a técnica de imunohistoquímica. Vale ressaltar que o perfil dos GAGs vaginais possuindo maior quantidade de DS, apresentou padrão típico de órgãos musculares, corroborando com o descrito por Carrino (1998).

Já Ruano et al. (2011) analisando os GAGs na vagina de ratas, observaram que há diminuição dos GAGs totais e do DS em fêmeas gestantes e após o parto comparado ao tecido de fêmeas não gestantes, tendo como GAG predominante o DS. Na cutia, ocorre uma redução dos GAGs totais a partir do terço médio de gestação. Ruano et al. (2011) e Takano et al. (2010) verificaram também em ratas a concentração dos GAGs no tecido submetido a trauma natural ou induzido e verificaram que ocorre aumento significativo dos GAGs totais, em especial do DS, acreditando que o trauma possa provocar alteração no equilíbrio da MEC, o que serviria possivelmente como estímulo para o processo de cicatrização.

4.6 CONCLUSÃO

A concentração dos GAGs variou conforme o órgão ao longo da gestação, fato que pode estar associado a função desempenhada por estes em cada fase da gestação. Dessa forma, a tuba uterina, os cornos uterinos e corpo do útero apresentaram como principais GAGs na gestação o CS, DS, e AH, com baixa concentração de HS, enquanto a cérvix teve o DS e CS, com pequena concentração de HS e AH e a vagina, o DS estava em maior quantidade, seguido de pequena concentração de HS, CS e AH, sendo as concentrações de polissacarídeos de cada órgão influenciadas pela concentração sérica de P4 e estradiol.

Ressalta-se que as concentrações de HS foram baixas ao longo da gestação, fato que pode estar associado ao aumento da produção de P4 pelo corpo lúteo e/ou placenta, no entanto, outros estudos são necessários para elucidar a atuação dos hormônios reprodutivos na alteração do padrão dos GAGs na matriz extracelular.

REFERÊNCIAS

- BARROS, S. M. O. **Enfermagem no ciclo gravídico puerperal**. 1ªed. São Paulo: Manole, 2006. 260 p.
- BAÚ, E. C.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1475, n. 3, p. 285-294, 2000.
- BERGQVIS, A. S.; MARTÍNEZ, H. R. Sulphated glycosaminoglycans (S-GAGs) and syndecans in the bovine oviduct. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 93, n 1-2, p. 46-60. 2006.
- BEZERRA, L. R.; FELDNER P. C. J.; KATI, L. M.; GIRÃO, M. J.; SARTORI, M. G.; BARACAT, E. C.; DE LIMA, G. R.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Sulfated glycosaminoglycans of the vagina and perineal skin in pre- and postmenopausal women, according to genital prolapse stage. **International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction**, Washington, v.15, n. 4, p. 266-271, 2004.
- CARRINO, D. A. Dynamic Expression of Proteoglycans during Skeletal Muscle Development. **Basic and Applied Myology**, Bethesda, v. 8, n. 2, p. 95-106, 1998.
- CARSON, D. D.; DUTT, A.; TANG, J. P. Glycoconjugate Synthesis during Early Pregnancy: Hyaluronate Synthesis and Function. **Developmental Biology**, San Diego, v, 120, p. 228-235, 1987.
- COLOIANU, M.; OANCEA, A.; ZARNESCU, O. Histochemistry and immunocytochemistry of glycosaminoglycans in sow oviduct. **Review Roumain de Biologie Animals**, Bucarest, v. 42, n. 1, p. 63-71, 1997.
- CUBAS, J. J.; SIMÕES, R. S.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; SIMÕES, M. J.; BARACAT, E. C.; SOARES, J. M. J. Glycosaminoglycan distribution in the rat uterine cervix during the estrous cycle. **Clinics**, São Paulo, v. 65, n. 7, p. 703-708, 2010.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, Nova Iorque, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.
- DIETRICH, C. P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 1, p. 5-15. 1984.

DREYFUSS, J. L.; REGATIERI, C. V.; JARROUGE, T. R.; CAVALHEIRO, R. P.; SAMPAIO, L. O.; NADER, H. B. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 3, p. 409-429, 2009.

EL MARADNY, E.; KANAYAMA, N.; KOBAYASHI, H.; HOSSAIN, B.; KHATUN, S.; LIPING, S.; KOBAYASHI, T.; TERAQ, T. The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. **Human Reproduction**, Oxford, v.12, p.1080-1088, 1997.

FAZLEABAS, A. T.; BELL, S. C.; FLEMING, S.; SUN, J.; LESSEY, B. A. Distribution of Integrins and the Extracellular Matrix Proteins in the Baboon Endometrium during the Menstrual Cycle and Early Pregnancy. **Biology of Reproduction**, Champaign v. 56, p. 348-356, 1997.

FLORENTIN, H. Q. **Caracterização estrutural e atividades farmacológicasdo alginato obtido da alga *Dictyopteris delicatula* (J. V. Lamouroux, 1809) e seu derivado sulfatado**. 2015. 92f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2015.

FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 242, n. 1, p. 27-33, 1997.

GLASSMAN, W.; SMITH, M. B.; GARFIELD, R. E. Changes in rat cervical collagen during gestation and after antiprogesterone treatment as measured in vivo with light-induced autofluorescence. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v. 173, n. 5, p. 1550-1556, 1995.

GOLICHOWSKI, A. M.; KING, S. R.; MASCARO, K. Pregnancy-related changes in rat cervical glycosaminoglycans. **Biochemical Journal**, Londres, v.192, p.1-8, 1980.

GOMES, R. C. T.; MAIORAL, G. C. C. C.; VERNA, C.; PATRIARCA, M. T.; NADER, H. B.; SIMÕES, R. S. et al. Hyperprolactinemia changes the sulfated glycosaminoglycan amount on the murine uterus during the estrous cycle. **Fertility and Sterility**, Birmingham v. 100, n. 5, p. 1419-1427, 2013.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004. 530 p.

IWAHASHI, M.; MURAGAKI, Y.; OOSHIMA, A.; YAMOTO, M.; NAKANO, R. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 108, p. 147-155, 1996.

LEE C. N.; AX, R. L. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 9, 2006-2009, 1984.

LINHARATTANARUKSA, P.; SRISUWATANASAGUL, S.; PONGLOWHAPAN, S.; KHALID, M.; CHATDARONG, K. Collagen and glycosaminoglycan profiles in the canine cervix during different stages of the estrous cycle and in open- and closed-

cervix pyometra. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio, v.76, n. 2p. 197-203, 2014.

LOPES, C. C.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 2, p. 157-67, 2006.

OLIVEIRA, G. B.; VALE, A. M.; SANTOS, A. C.; MOURA, C.E. B.; ROCHA, H. A. O.; OLIVEIRA, M. F. Composition and Significance of Glycosaminoglycans in the Uterus and Placenta of Mammals. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.58 n.4: p. 512-520, 2015.

MAILLOT, K. V.; STUHLSTADT, H. W.; MOHANARADHAKRISHNAN, V.; GREILLING, H. Changes in the glycosaminoglycans distribution pattern in the human uterine cervix during pregnancy and labor. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Sain Louis, v. 135, n. 4, p.503-506, 1979.

MARTINS, L. L.; BIAGIONI, M. M.; OLIVEIRA, F. S.; TONIOLO, G. H.; PACHECO, M. R.; MACHADO, M. R. F. Morfologia do útero de cutias nulíparas e não nulíparas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.63, n.2, p.326-332, 2011.

MCCORMACK, J. T.; GREENWALD, G. S. Progesterone and oestradiol-17beta concentrations in the peripheral plasma during pregnancy in the mouse. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 62, n. 1, p. 101-107, 1974.

NADER, H. B.; FERREIRA, T. M.; PAIVA, J. F.; MEDEIROS, M. G.; JERONIMO, S. M.; PAIVA, V. M.; DIETRICH, C. P. Isolation and structural studies of heparan sulfates and chondroitin sulfates from three species of molluscs. **The Journal of Biological and Chemistry**, Bethesda, v. 259, p. 1431-1435, 1984.

NADER HB, DIETRICH CP, BUONASSISI V AND COLBURN P. Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. **Proceedings of the National Academy of Science (PNAS)**, v. 84, p. 3565–3569, 1987.

NADER, H. B.; CHAVANTE, S. F.; SANTOS, E. A.; OLIVEIRA, F. W.; Paiva, J. F.; JERÔNIMO, S. M. B.; MEDEIROS, G. F.; ABREU, L. R. D.; LEITE, E. L.; SOUSA-FILHO, J. F.; CASTRO, R. A. B.; TOMA, L.; TERSARIOL, I. L. S.; PORCIONATTO, M. A.; Dietrich, C. P. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 529-538, 1999.

NASCIUTTI, L. E.; FERRARI, R.; BERARDO, P. T.; SOUZA, M. L.; TAKIYA, C. M.; BOROJEVIC, R. Distribution of condroitin sulfate in human endometrium. **Micron**, Nova Iorque, v. 37, n. 6, p. 544-550, 2006.

OLIVEIRA, G. B. **Desenvolvimento placentário em cutias (*Dasyprocta aguti* Linnaeus, 1766)**. 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2012.

OSMERS, R. G.; ADELMANN-GRILL, B. C.; RATH, W.; STUHLSTZ, H. W.; TSCHESCHE, H.; KUHN, W. Biochemical events in cervical ripening dilatation during pregnancy and parturition. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Londres, v. 21, p. 185-194, 1995.

PEIXOTO, G. C. X. **Aplicação de técnicas para monitoramento e controle do ciclo estral de espécies silvestres do bioma caatinga**. 2016, 141f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

PEPE, G. J.; ROTHCHILD, I. A Comparative Study of Serum Progesterone Levels in Pregnancy and in Various Types of Pseudopregnancy in the Rat. **Endocrinology**, Baltimore, v. 95, n. 275, 1974.

RUANO, J. M.; FELDNER, P. C. J.; TAKANO, C. C.; CASTRO, R. A.; NADER, H. B.; SARTORI, M. G.; GIRÃO, M. J. Impact of birth in the presence and absence of simulated birth injury on vaginal glycosaminoglycan content. **International Urogynecology Journal**, Londres, v. 22, n. 12, p. 1513-1519, 2011.

SAN MARTIN, S.; SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. M. T. Distribution of versican and hyaluronan in the mouse uterus during decidualization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 8, p. 1067-1071, 2003.

SHIMIZU, T. Correlation of human cervical ripening and glycoconjugates (glycosaminoglycans and glycoproteins). **Acta of Obstetrics and Gynaecology Japanese**, Tóquio, v. 32, n. 12, p.1967-1976, 1980.

SHIMIZU, T.; ENDO, M.; YOSIZAWA, Z. Glycoconjugates (glycosaminoglycans and glycoproteins) and glycogen in the human cervix uteri, **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, Sendai, v.131, p.289-299, 1980.

SIMÕES, R. S.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; NADER, H.B.; BARACAT, E. C. Glycosaminoglycan profiles in the uterus of adult ovariectomized rats treated with estrogen and progestagen. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v.165, n.2, p. 265-70, 2012.

SINGH, M. D.; ADOGWA, A. O.; MOLLINEAU, W. M.; GARCIA, G. W. Gross and microscopic anatomy of the reproductive tract of the female agouti (*Dasyprocta leporina*): A neotropical rodent with potential for food productions. **Tropical Agriculture (Trinidad)**, Kingston v.91, n.1, p.38-46, 2014.

SOUZA, G. N.; CAMANO, L.; ARAUJO JÚNIOR, E.; NADER, H. B.; MEDEIROS, V.; MARTINS, J. R.; SOUZA, E. The expression of glycosaminoglycans and proteoglycans in the uterine cervix of albino rats after local hyaluronidase infusion. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, Kansas, v. 27, n. 9, p. 879-886, 2014.

STOCKARD, C. R.; PAPANICOLAOU, G. N. The vaginal closure membrane copulation and the vaginal plug in the guinea pig, with further considerations of the oestrous rhythm. **Biological Bulletin**, Woods Hole, v. 37, 1, p. 222-244, 1919.

WEIR, B. J. Some observations on reproduction in the female agouti, *Dasyprocta aguti*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.24, p.203-211, 1971.

TAKANO, C. C.; BEZERRA, L. R.; ZUCCHI, E. V.; NADER, H. B.; SARTORI, M. G.; GIRÃO, M. J. Long-term and short-term effects of simulated birth trauma, cesarean and vaginal delivery on sulfated glycosaminoglycans in the urethra of female rats. **International Urogynecology Journal**, Londres, v.21, n.6, p. 705-710, 2010.

TIENTHAI, P.; KJELLÉN, L.; PERTOFT, H.; SUZUKI, K.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 12, n. 3-4, p. 173-182, 2000.

ULRICH, D.; EDWARDS, S. L.; LETOUZEY, V.; SU, K.; WHITE, J. F.; ROSAMILIA, A.; GARGETT, C. E.; WERKMEISTER, J. A. Regional Variation in Tissue Composition and Biomechanical Properties of Postmenopausal Ovine and Human Vagina. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n.8, 2014.

**5. CAPÍTULO 3 – GLICOSAMINOGLICANOS NA PLACENTA E SUBPLACENTA
DE CUTIAS (*Dasyprocta leporina* LINNAEUS, 1758)**

5. CAPÍTULO 3 – GLICOSAMINOGLICANOS NA PLACENTA E SUBPLACENTA DE CUTIAS (*Dasyprocta leporina* LINNAEUS, 1758)

Glicosaminoglicanos na placenta e subplacenta de cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758)

5.1 RESUMO

Considerando a importância dos glicosaminoglicanos em inúmeros processos fisiológicos, realizou-se o estudo tendo como objetivo identificar os principais GAGs existentes no tecido placentário e subplacentário ao longo da gestação em cutias. Foram utilizadas nove cutias fêmeas adultas e gestantes com as idades gestacionais de 25, 30, 35, 45, 55, 65, 75, 85 e 100 dias, estabelecidas a partir do exame colpocitológico diário. Os animais foram eutanasiados, dissecados e os fragmentos da placenta e subplacenta coletados e submetidos à técnica de imunohistocitoquímica marcados para PAS e para CS e AH. Fragmentos dos órgãos provenientes a partir de 35 dias também foram coletados e submetidos a delipidação em acetona, depois pesados 20 a 40 mg de cada amostra, realizado a digestão protéica com prozima (4 mg/mL, 60°C, 48 horas), adicionado ácido tricloroacético (TCA) 90% em banho de gelo (20 minutos), centrifugados (20 minutos), e ao sobrenadante coletado adicionado metanol. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas, o pó ressuspenso em água destilada e submetidos a técnica de eletroforese em gel de agarose 0,5%, sendo os GAGs identificados e depois quantificados por densitometria. A placenta de cutia nos estágios inicial, médio e final de gestação apresentaram os GAGs: CS, DS, HS e AH em diferentes proporções, sendo as maiores concentrações verificadas na placenta madura e a termo, constituída principalmente de DS e CS. A subplacenta apresentou uma maior quantidade de GAGs no terço médio e final de gestação, tendo como principal GAG o dermatam sulfato, sendo encontrado ainda baixas concentrações de condroitim sulfato e heparam sulfato. Alterações na composição dos GAGs ocorrem ao longo da gestação, estando diretamente relacionadas com as funções destas moléculas na regulação do transporte placentário e na formação da barreira placentária.

Palavras-chave: Tecido placentário, polissacarídeos, matriz extracelular, *Dasyprocta leporina*, roedor.

5.2 INTRODUÇÃO

Pesquisas têm demonstrado que os proteoglicanos (PGs) e os glicosaminoglicanos (GAGs), bem como as proteínas de adesão apresentam um notável efeito sobre o comportamento celular, influenciando na sua proliferação e diferenciação tecidual. É relatado na literatura a presença de um material amorfo, elétron denso que se cora facilmente ao Ácido Periódico de Schiff (PAS) na interface materno-fetal da placenta, o qual varia no decorrer da gestação entre as espécies mamíferas (LOVELL; TIGHE e CURRAN, 1967; CALATRONI e

DI FERRANTE, 1969; LEE; JAMIESON e SCHAFER, 1973; WASSERMAN et al., 1983; OTT; WILEY e BARTOL, 1997).

Os GAGs são heteropolissacarídeos que possuem como estrutura básica, unidades alternadas de hexosamina e açúcar não-nitrogenado unidas por ligações glicosídicas, estando presentes em todas as células animais com diferenças estruturais dependendo do tecido ou do organismo de origem (DIETRICH & DIETRICH, 1976; DIETRICH, 1984; NADER et al., 1984; KJELLEN e LINDAHL, 1991; CECHOWSKA-PASKO e PALKA, 2000). Na placenta são encontrados o heparam sulfato (HS), condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e o ácido hialurônico (AH), podendo o queratan sulfato (QS) estar presente em baixas concentrações (LOVELL et al., 1967; LEE; JAMIESON e SCHAFER, 1973; OLIVEIRA et al., 2015). Com exceção do ácido hialurônico, os GAGs agrupam-se formando cadeias laterais, as quais estão conectados a um cordão proteico formando os PGs, sendo identificados na placenta sindecan e perlecan, PGs contendo HS (JOKIMAA et al., 1998; YANG et al., 2005) e o decorin e biglican, PGs com CS e DS (CHEN et al., 2007).

Os GAGs estão envolvidos em inúmeros processos fisiológicos, desempenhando importantes funções como adesão, migração e proliferação celular, secreção de proteínas e expressão gênica, atuando na maturação de tecidos especializados e como organizadores dos componentes da matriz extracelular (MEC) (NADER et al., 1987; LOPES et al., 2006; DREYFUSS et al., 2009). Estas moléculas estão presentes em diferentes tecidos em padrões típicos, que podem ser alterados ao longo da gestação (CALATRONI; DI FERRANTE, 1969), do ciclo estral com as variações hormonais (KOFOED et al., 1972; KOFOED et al., 1977; SIMÕES et al., 2012; GOMES et al. 2007) e em decorrência do amadurecimento e envelhecimento do tecido (MEYER, 1969). Neste aspecto tem se especulado que as mudanças que ocorrem no processo de maturação, no tecido placentário, em especial a composição e estrutura molecular dos GAGs presentes neste tecido possam resultar numa matriz extracelular com propriedades físicas diferentes, e assim alterar o transporte de moléculas através do tecido conectivo placentário, o que afetaria diretamente a taxa de crescimento fetal, variável nas diferentes fases da gestação (LEE; JAMIESON e SCHAFER, 1973; OLIVEIRA et al., 2015).

Além disso, na gestação, os GAGs participam dos processos de decidualização e implantação embrionária (DIETRICH, 1984), sendo que na placenta, o DS e o HS, contribuem para formação de uma barreira placentária eficiente resistente a hialuronidase (CALATRONI e DI FERRANTE, 1969) e ainda possuem importante ação anticoagulante, de modo a evitar possíveis eventos trombóticos (GIRI e TOLLEFSEN, 2006), enquanto o CS e

AH atuam na manutenção estrutural do órgão (LEE et al. 1973; GREISS e WAGNER 1983), tendo sido associado à alteração do padrão dos GAGs dispostos no tecido placentário, o desenvolvimento de complicações na gestação, a exemplo da pré-eclampsia (WARDA et al., 2008).

Dada a importância e o envolvimento dos GAGs em inúmeros processos fisiológicos e, atrelando-se a inexistência de dados sobre o perfil destes ao nível da placenta e subplacenta de cutias, este trabalho se coloca como um precursor desses estudos em animais silvestres. Além do mais, a subplacenta é um órgão típico dos roedores histicognatas, sendo este estudo o primeiro a analisar o perfil dos glicosaminoglicanos e inferir sobre a função destas moléculas no órgão ao longo da gestação, fornecendo assim conhecimentos para a biologia da espécie.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Animais

Foram utilizadas nove cutias fêmeas com idades gestacionais de 25, 30, 35, 45, 55, 65, 75, 85 e 100 dias, estabelecidas a partir do exame colpocitológico diário. Os animais foram provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró, RN, sendo o experimento aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFERSA (processo nº 23091.005467/2013-01) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio (SISBIO Nº 37987-3).

A gestação foi comprovada mediante palpação e/ou ultrassonografia utilizando transdutor de 8 MHz e Scanner portátil (Aquila Vet, Pie Medical®, Nutricell, Campinas, SP, Brazil).

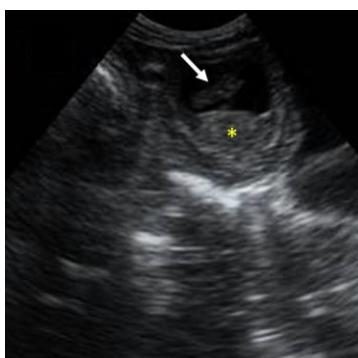


Figura 1- Ultrassom do útero de cutia fêmea 30 dias de gestação, evidenciando-se o embrião (seta) dentro da vesícula gestacional e a placenta (*). Fonte: Acervo do pesquisador.

5.3.2 Anestesia e Eutanásia

Os animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta do material, recebendo estes medicação pré-anestésica cloridrato de cetamina (12 mg/kg) e cloridrato de xilazina (2 mg/kg) por via intramuscular, a veia cefálica foi canulada e coletado 5 mL de sangue para análise hormonal e depois realizado medicação anestésica com administração de propofol (8mg/kg) pelo mesmo acesso venoso (veia cefálica), sendo em seguida submetidos à eutanásia, injetando-se solução de KCl (1 mL/kg IV).

5.3.3 Análise Hormonal

As amostras de sangue coletadas previamente a eutanásia do animal foram colocadas em frascos contendo EDTA, sendo centrifugados em $3000 \times g$ durante 15 min para obtenção do plasma sanguíneo e depois armazenadas a -18°C e submetidos ao teste de radioimunoensaio (Diagnostic Bio Biochem Canada - DBC) para obtenção dos níveis séricos de estradiol e progesterona.

5.3.4. Material para Citoquímica e Imunohistoquímica

Foram coletados fragmentos da placenta e subplacenta entre 25 e 100 dias, e os mesmos foram fixados em solução de paraformaldeído 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 por 72 horas. Os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e em seguida obtidos os cortes histológicos de 5 μm em micrótomo (LEICA RM2235). Para reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS), o material foi desparafinizado, hidratado e submetido a reação em PAS e os cortes contracolorados com hematoxilina e as lâminas montadas, analisadas e fotografados em microscópio de luz (Leica DM 500 HD) com câmera acoplada (LEICA ICC50W).

Para imunohistoquímica, os cortes foram aderidos em lâminas silanizadas, desparafinizados em xilol, reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100 a 50%) e imersos por 5 minutos em tampão fosfato (PBS; 137 mM NaCl/2.7 mM KCl/4.3 mM Na_2HPO_4 /1.4 mM KH_2PO_4 ; pH 7.3) para lavagem. A exposição antigênica dos tecidos foi realizada em tampão citrato (10 mM pH 6,0) a 60°C por 5 min., seguida por duas lavagens em PBS. Para bloqueio da peroxidase endógena e reações inespecíficas foram utilizados uma solução de metanol com 3% de peróxido de hidrogênio por 10 min e reagente Imunológico (RUO) ABC Elite VECTASTAIN (Vector Laboratories), respectivamente. As secções foram incubadas com anticorpo primário a 4°C por 20 h em câmara úmida. A expressão tecidual dos GAGs foi determinada com o uso dos anticorpos contra condroitin sulfato (AC monoclonal,

CAM-56, Abcam, 1:300), contra ácido hialurônico (Ac. Policlonal de ovelha, Abcam, 1:300). Em seguida, os cortes foram incubados por 45 min. com anticorpo secundário universal Anti-Mouse/Anti-Rabbit/Anti-Goat IgG (H+L), Universal Pan-Specific, Vector Laboratories). Para amplificação do sinal da reação foi utilizado o complexo avidina-biotinilida (kit Vectastain Elite ABC®, Vector Laboratories). Para visualização da reação foi utilizado Vector NovaRed®. Finalmente, as lâminas foram montadas com uso de Permount® (Fisher Scientific), analisadas e fotografados.

5.3.5. Coleta do material e extração e purificação dos GAGs

Fragmentos da placenta e subplacenta a partir dos 35 dias foram coletados e colocados em acetona, com trocas a cada 24 horas durante 3 dias consecutivos, deixando após a última troca ocorrer a evaporação do líquido.

Posteriormente, as amostras foram pesadas em balança de precisão (BEL M214 Ai 0,0001g) de modo a separar frações para cada órgão, separando-se 40 mg da amostra e a fração colocada em microtubos de 2 mL (Eppendorf), e adicionado a esta prozima (4 mg/mL) em tampão TRIS-HCl, 0,05 M pH 8,0 com NaCl 0,15 M, na proporção de 1mg de pó para 20 µL de tampão, incubado em temperatura de 60°C durante 24 a 48 horas e depois adicionado ácido tricloroacético 90%, numa proporção de no máximo 10% do volume inicial da amostra em banho de gelo durante 20 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 4700 g a 20°C durante 20 minutos (SOLAB, SL-701), sendo ao término o sobrenadante pipetado e o volume analisado, sobre o qual foi adicionado metanol na proporção de 2 volumes de metanol para 1 da amostra. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas (TERRONI, LS 3000), obtendo-se ao final o pó contendo os glicosaminoglicanos, que foi ressuspenso em 35µl de água destilada.

5.3.6. Eletroforese em gel de agarose

A identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos foram feitas por eletroforese em gel de agarose como proposto por Dietrich e Dietrich (1976), sendo aplicado no gel 5 µL do padrão (1 mg/mL) contendo condroitim (CS), dermatam (DS) e heparam sulfato (HS). Ao mesmo tempo, as amostras foram agrupadas no gel por tecido e por idade gestacional (Figura 2A, 2B e 2C). A corrida foi realizada sob tensão de 110 V, 5 A e 10 W, com duração média de 1 hora. Posteriormente, a lâmina foi colocada em solução de CTV 0,1% (Figura 2D), permanecendo nesta solução por no mínimo 2 horas, depois, envolvidos em papel filtro e colocados para secar em fluxo de ar contínuo por 1 hora (Figura 2E). Ao término da secagem,

as lâminas foram coradas em azul de toluidina (15 a 20 minutos), removido o excesso de corante e após secas foram digitalizadas.

Para certificar-se do tipo de glicosaminoglicano presente no tecido, as amostras foram submetidas ao processo de digestão enzimática, que consistia na adição de heparinase III obtidas de *Flavobacterium heparinum* (Sigma-Aldrich®) em solução tampão (20 mM Tris-HCl, pH 7,5 contendo 0,1 mg/ml BSA e 4 mM CaCl₂), seguindo recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich®), sendo posteriormente submetidas a eletroforese em gel de agarose.

A quantificação dos GAGs foi realizada através da densitometria das lâminas de eletroforese em gel de agarose, analisadas através do software ImageJ®.

5.3.7. Análise Estatística

Realizou-se o teste de Correlação de Pearson a partir do software estatístico SAS (SAS 9.3, 2009) de modo a identificar a correlação entre as concentrações séricas de progesterona e estradiol e os GAGs totais na placenta e subplacenta ao longo da gestação.

5.4. RESULTADOS

As análises de tecido placentário de cutias apresentaram como principais glicosaminoglicanos o dermatam sulfato e o condroitim sulfato, além do heparam sulfato em menores concentrações (Figura 2A, 2B). A análise dos GAGs totais por densitometria, demonstrou que as menores concentrações dos GAGs foram no terço inicial da gestação, apresentando-se praticamente constantes entre 35 e 45 dias, possuindo 82,48 e 76,85 UADs, respectivamente. Após o 55º dia ocorre um pico, atingido a maior concentração aos 75 dias com 96,46 UADs, seguido de uma leve redução aos 85 dias e permanecendo quase que constante até os 100 dias de gestação com 87,8 UAD (Figura 2D).

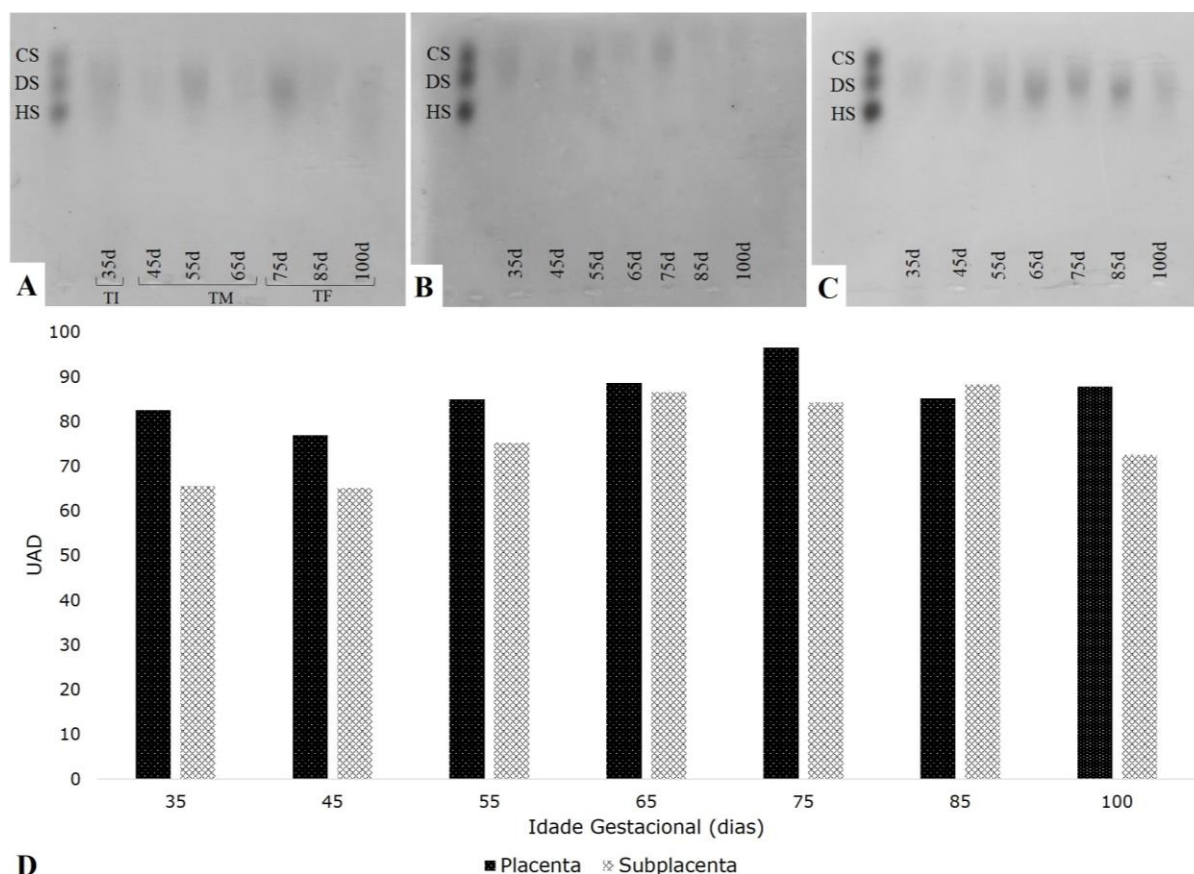


Figura 2- Perfil eletroforético da placenta e subplacenta de cutia analisada ao longo da gestação. A: Análise da placenta entre 35 e 100 dias. B: placenta entre 35 e 100 dias após tratamento com heparinase III. C: análise da subplacenta entre 35 e 100 dias. D: Densitometria das lâminas de eletroforese da placenta e subplacenta ao longo da gestação. Condroitim Sulfato (CS), Dermatan Sulfato (DS), Heparan Sulfato (HS) e Unidades Arbitrárias de Densitometria (UAD).

Quando analisado a correlação entre os níveis séricos dos hormônios ovarianos e os valores de GAGs totais verificou-se no terço final da gestação uma tendência com correlação positiva, em que na ocorrência do aumento do estradiol ocorre o aumento dos GAGs na placenta (Tabela 1). Quanto aos níveis de progesterona, não ocorreu correlação significativa quando analisados os GAGs placentários e subplacentários (Tabela 2).

Tabela 1- Correlação dos níveis séricos de estradiol e glicosaminoglicanos totais na placenta e subplacenta ao longo da gestação.

Idade Gestacional	Estradiol (pg/mL)	Placenta	p	r	Subplacenta	p	r
Terço Inicial	53,399	82,489	-	-	65,505	-	-
Terço Médio	38,241	83,421	0.4103	-0.79938	75,624	0.2583	-0.9188
Terço Final	31,422	89,802	0.0554	0.99622	81,659	0.9718	-0.0443

*p<0,05

Tabela 2- Correlação dos níveis séricos de progesterona e glicosaminoglicanos totais na placenta e subplacenta ao longo da gestação.

Idade Gestacional	Progesterona (ng/mL)	[] GAGs Placenta (UAD)	p	r	[] GAGs Subplacenta (UAD)	p	R
Terço Inicial	1,559	82,489	-	-	65,505	-	-
Terço Médio	5,1433	83,421	0.8526	0.22946	75,624	0.9954	-0.00729
Terço Final	3,605	89,302	0.6667	-0.50001	79,376	0.3605	0.84393

*p<0,05

A partir da análise histológica, verificou-se uma intensa marcação por PAS no sinciotrofoblasto banhado pelo sangue materno (Figura 3A) e na região próximo a decídua, células trofoblásticas gigantes PAS positivas (Figura 3C) e intensa marcação da decídua basal (Figura 3B). Na margem lateral da placenta, o citotrofoblasto encontrava-se marcado em PAS (Figura 3D) e marcado fortemente na reação de imunohistoquímica para anti-CS e anti-AH, indicativo da presença de polissacarídeos, em especial, condroitim sulfato e ácido hialurônico. Com análise das lâminas, verificou-se que o CS e o AH estariam localizados preferencialmente no estroma placentário (Figura 4A-P), de forma a manter a organização estrutural da placenta, localizados principalmente no trofoblasto celular (Figura 4C-D, G) e no sincicial (Figura 4H-K), nas células trofoblásticas gigantes na zona juncional (Figura 4E-F, 4L), algumas vezes variando ao longo da gestação. O citotrofoblasto na margem lateral da placenta apresentou reação positiva para PAS, confirmado após aplicado os anticorpos anti-CS e anti-AH (Figura 4D-C). Estas células aos 35 dias marcaram-se fracamente para o anticorpo específico CS e fortemente para AH. As células trofoblásticas gigantes encontravam-se marcada fortemente aos 65 dias com o anticorpo para CS e fracamente aos

100 dias para o anticorpo CS, mostrando uma redução deste GAG na fase final de gestação (Figura 4E, 4L).

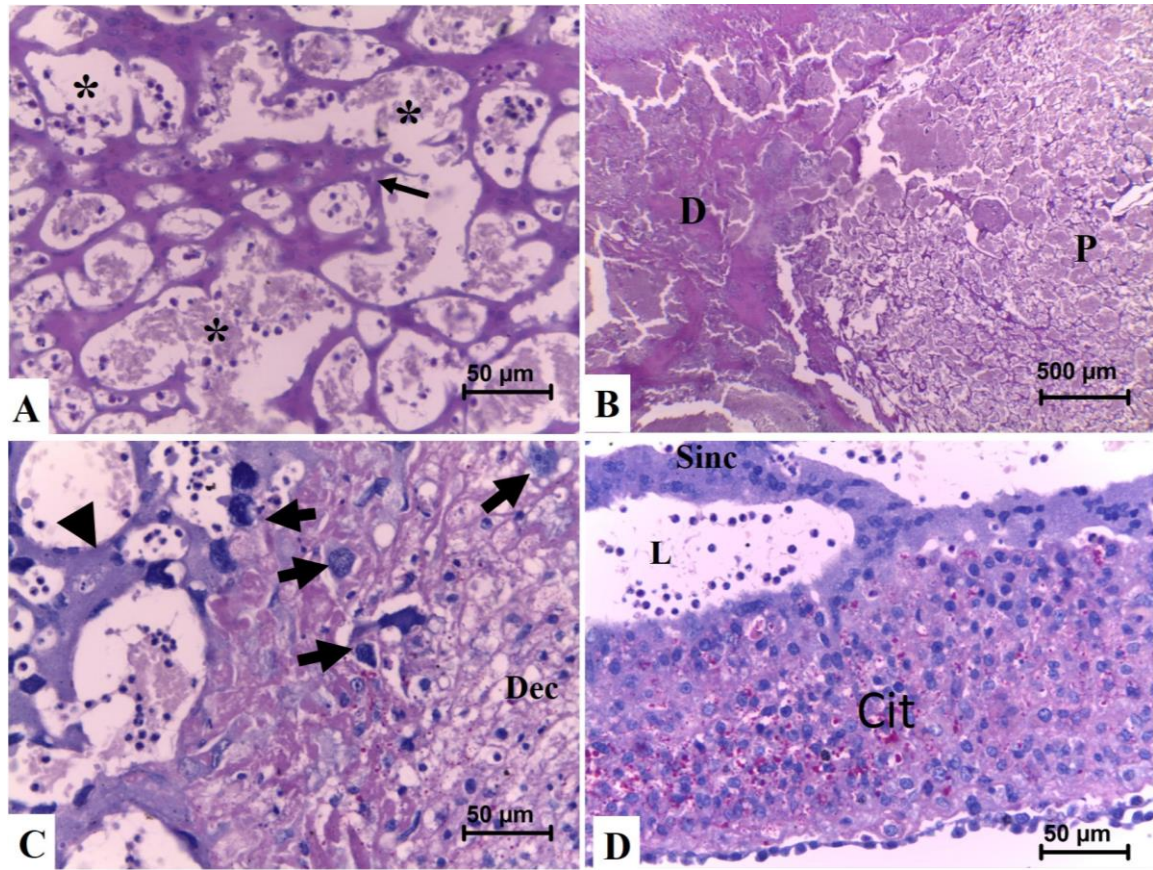


Figura 3- Placenta de cutia no terço inicial de gestação submetida a reação de citoquímica (PAS). A: placenta aos 25 dias, verifica-se reação intensa para PAS marcando o sinciotrofoblasto (Sin), circundando as lacunas maternas (*) numa placenta ainda imatura. B: detalhe da decídua basal com intensa reação PAS na placenta aos 25 dias. C: placenta aos 35 dias com o sincício (cabeça de seta) ainda marcado em PAS e a decídua (Dec) e células trofoblásticas gigantes (seta) mostrando reação intensa para PAS. D: citotrofoblasto marcado em PAS na borda lateral da placenta e sincício (Sin) com marcação fraca. Neg: Negativo.

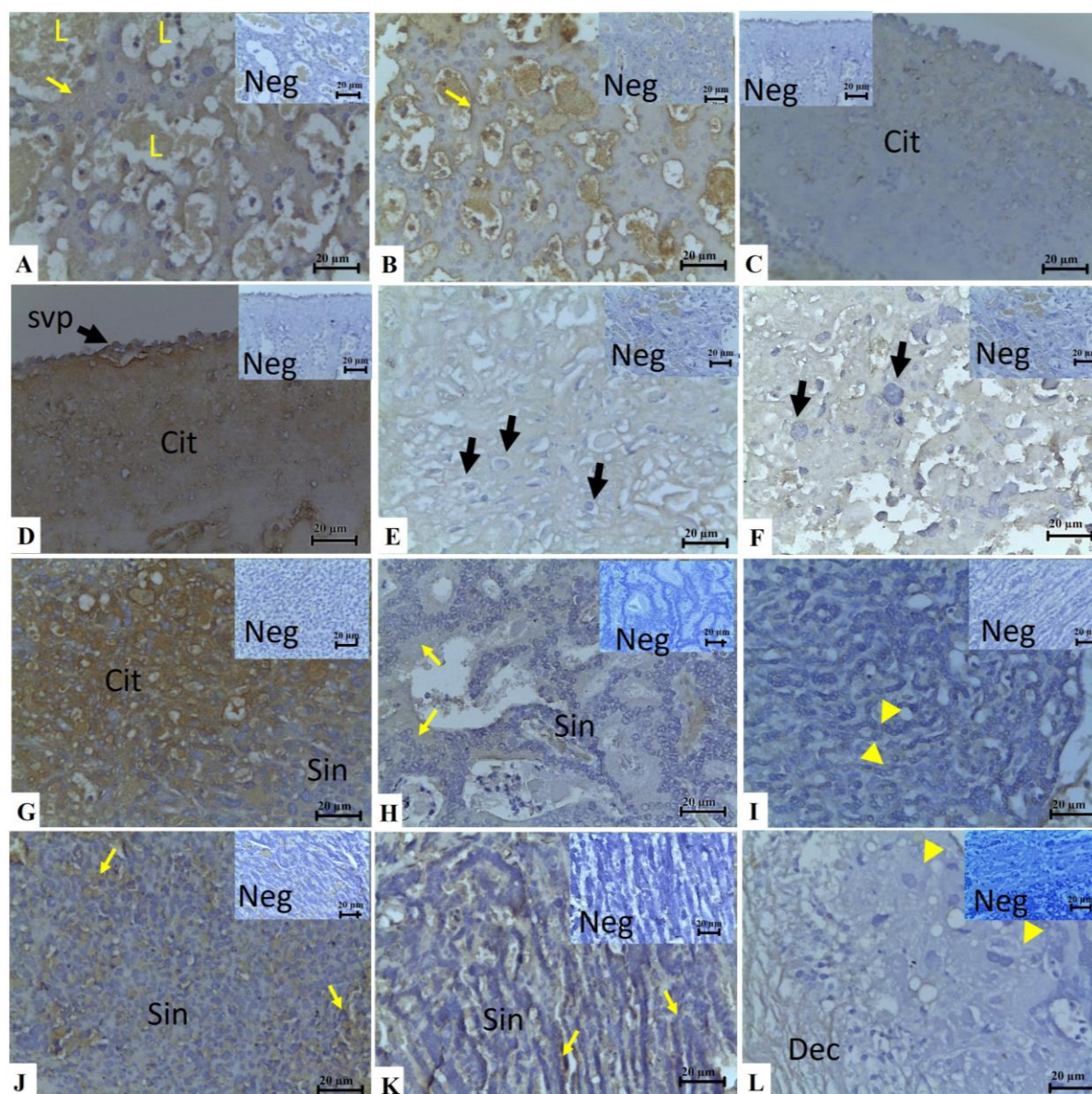


Figura 4- Placenta de cutia no terço inicial e final de gestação submetida a reação de imunohistoquímica. A: placenta aos 30 dias, evidenciando-se a reação positiva do sinciotrofoblasto (seta) para condroitim sulfato. B: sinciotrofoblasto com reação positiva para ácido hialurônico. C: citotrofoblasto (Cit) marcado com reação fraca para anti-CS aos 35 dias. D: citotrofoblasto (Cit) marcado fortemente para Ácido Hialurônico aos 35 dias. E e F: placenta aos 65 dias com células trofoblásticas gigantes (seta) marcadas para anti-CS e anti-AH, respectivamente. G: citotrofoblasto (Cit) na placenta aos 65 dias com forte marcação para anti-CS e sincício marcado fracamente (Sin). H: placenta aos 65 dias com sincício (Sin) marcado para anti-AH (seta). I: placenta aos 85 dias com sincício próximo a borda marcado fortemente para anti-CS (cabeça de seta). J: placenta aos 85 dias com sincício (Sin) marcado com anti-AH. K: placenta aos 100 dias com reação anti-AH com sincício (Sin) marcado positivamente. L: células trofoblásticas gigantes marcadas fracamente para anti-CS (cabeça de seta) aos 100 dias e decídua (Dec) fortemente marcada. Neg: Negativo.

Quanto a subplacenta, verificou-se que esta apresenta uma maior quantidade de GAGs no terço médio e final de gestação, sendo o principal GAG o dermatam sulfato, além do

condroitim sulfato e heparim sulfato encontrados em baixas concentrações (Figura 1C). Observou-se que condroitim sulfato estava presente principalmente no terço médio de gestação. Verifica-se ainda os GAGs subplacentários apresentaram semelhanças com o tecido placentário, possuindo uma maior concentração de açúcares no terço médio de gestação, fato que pode estar associado a sua maior atividade nesta fase, já que apesar de permanecer até o final da gestação, tem sua involução próximo ao parto.

Quanto à análise das lâminas histológicas, verificou-se uma reação PAS positiva no sinciotrofoblasto próximo a subplacenta (Figura 5A) e nas células trofoblásticas internas ao septo subplacentário e uma intensa reação decidual PAS positiva (Figura 5A-B) e as células da subplacenta marcadas para Anti-CS aos 30 dias de gestação e 35 dias (Figura 5C-D) reduzindo com o avançar da gestação (Figura 5F). Quanto ao ácido hialurônico este foi marcado fortemente nos septos de tecido alantoidiano que chegavam entrelaçavam os lóbulos subplacentários (Figura 5H).

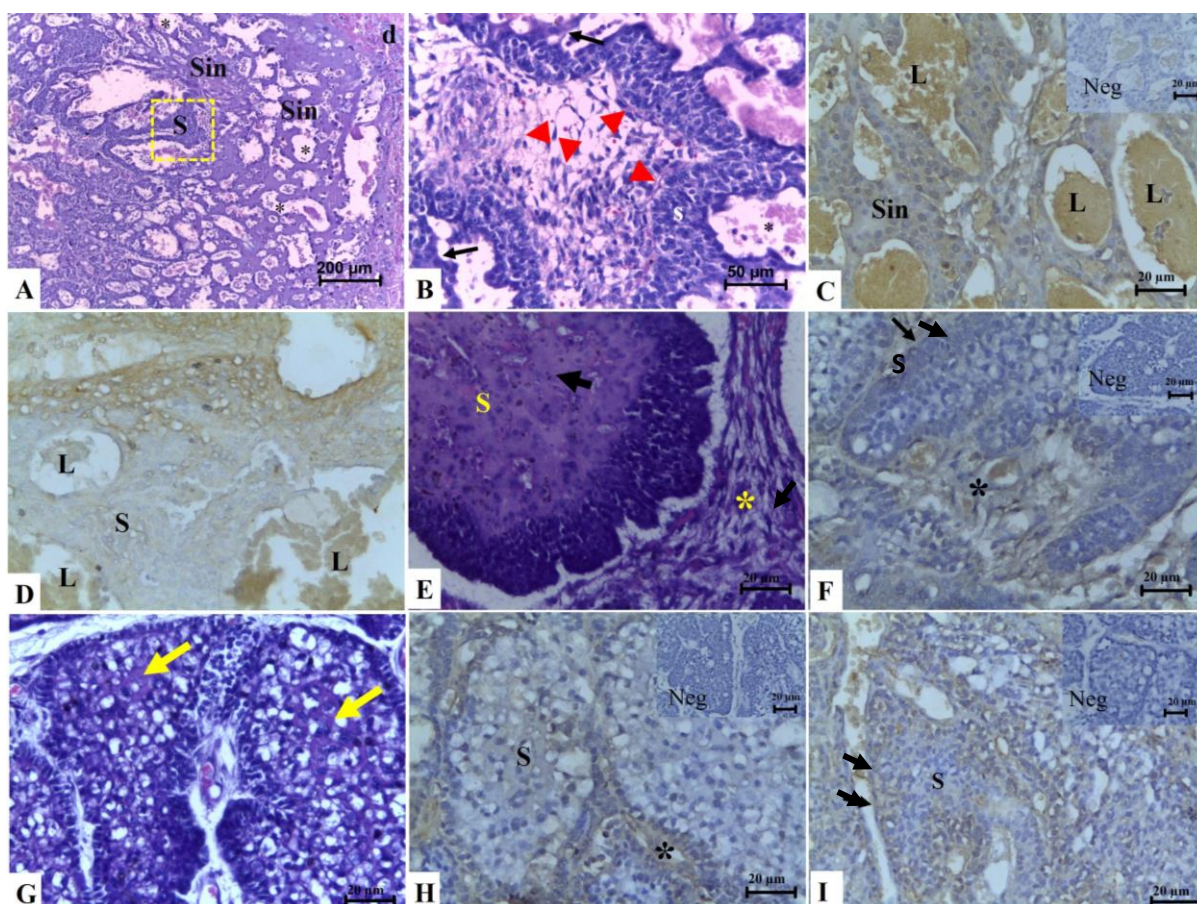


Figura 5- Subplacenta (S) de cutia entre 30 e 85 dias de gestação submetida às técnicas de citoquímica e imunohistoquímica. A: sinciotrofoblasto (sin) próximo a região da subplacenta e circundando as lacunas maternas (*) mostrando reação PAS positiva. B: detalhe dos septos subplacentários (S), sendo verificado internamente as células trofoblásticas marcadas em PAS (cabeça de seta) e externamente, o sinciotrofoblasto marcado fortemente em PAS (seta). C: trofoblasto dos septos subplacentários marcados para anti-CS circundando

as lacunas da subplacenta aos 30 dias. D: subplacenta aos 35 dias com as células do septo com reação positiva para anti-CS. E: células do septo da subplacenta aos 65 dias, PAS positivas (seta). F: células trofoblásticas do septo aos 65 dias marcadas fracamente para anti-CS (seta) e tecido alantoidiano marcado fortemente (*). G: subplacenta aos 75 dias com células do septo PAS positivas (seta). H: detalhe das células do septo marcadas fracamente para anti-AH e tecido alantoidiano fortemente marcado. I: subplacenta aos 85 dias com células do septo marcadas fortemente para anti-AH. Reação citoquímica para PAS: A-B, E, G. Imunohistoquímica para anti-CS: C-D, H. Anti-AH: F, I. Neg: Negativo.

5.5 DISCUSSÃO

A placenta de cutia nos estágios inicial, médio e final de gestação, possuíram CS, DS, HS e AH, em diferentes proporções. As maiores concentrações de GAGs foram verificadas na placenta madura e a termo, constituída principalmente de DS e CS. Por sua vez, Lee et al. (1973) relataram em humanos que a maior concentração de GAGs ocorria na placenta jovem em comparação com a placenta a termo estando a MEC constituída principalmente de CS e HS e em menor concentração o DS. Os autores citam ainda que a termo o DS era predominante, seguido de HS e baixas concentrações de CS. Diferente do relatado em humanos, na cutia CS esteve em maiores concentrações no terço médio de gestação, período que a placenta estava totalmente formada e madura, fato que pode estar associado a atuação destas moléculas na manutenção do estroma placentário.

O HS na cutia esteve presente em toda a gestação em baixas concentrações, mas com maior predominância no terço médio, fato que pode estar associado a atuação destas moléculas na manutenção da homeostase sanguínea. Sabe-se que o HS e DS apresentam importantes funções anticoagulantes, prevenindo a formação de trombos na placenta, sendo que o HS atua associando-se a antitrombina através de uma sequência de pentassacarídeos, enquanto as cadeias de DS ligam-se ao Cofator II de heparina inibindo a trombina (DELORME et al., 1998; CHEN e LIU, 2005; GIRI e TOLLEFSEN, 2006). Alterações no padrão da regulação da trombina têm sido observados em placentas de gestações complicadas pela pré-eclâmpsia (WARDA et al., 2008), inclusive em humanos, (FAMÁ et al., 2014; GUNATILLAKE, 2015), quando os autores citam a participação de HS em concentrações elevadas na MEC nos casos em que desencadeiam patologias. Chauhan et al. (2014) também estudando em humanos acrescentaram que a placenta proveniente de parto prematuro possui concentrações de GAGs mais baixos em comparação com os tecidos oriundos de placenta a termo, sendo na pré-eclâmpsia estas concentrações ainda menores em comparação ao órgão prematuro, podendo-se inferir que alterações nos padrões de GAGs ao

longo da gestação possa ser um fator determinante no desenvolvimento de patologias gestacionais.

Svejcar (1968) analisando os glicosaminoglicanos na placenta de ratos entre o 12º e 19º dia de gestação verificou que ocorre um pico na concentração de GAGs no terço final de gestação entre os dias 14 e 15, seguido de um declínio acentuado até o 19º dia, corroborando com o observado na cutia, cujo pico ocorre entre 65 e 85 dias, seguido de um declínio. Para Svejcar (1968) este pico, estaria relacionado a GAGs de baixo peso molecular, glicoproteínas e ao ácido hialurônico, estando a função destas moléculas associadas a mecanismos imunológicos.

Na placenta a termo da cutia, observou-se o DS e CS, estando o HS em baixas concentrações diferindo do descrito por Calatroni e Di Ferrante (1969), quando descrevem para a placenta humana a termo como principais GAGs o queratan sulfato (QS) e DS, com uma proporção menor de CS. Para os autores o DS e QS, por serem resistentes a hialuronidase constituiriam uma barreira para a passagem de células imunocompetentes da mãe para o feto. No entanto, na cutia o QS não foi observado na placenta deste roedor, sendo esta barreira composta pelo DS e HS, fato que pode estar atrelado ao tipo de barreira placentária dos roedores.

Por sua vez, Lee et al. (1973) estudando a placenta humana jovem e a termo, encontraram AH, CS, condroitim não sulfatado, DS, HS em diferentes proporções e baixos níveis de QS, sendo relatado uma maior quantidade de GAGs sulfatados na placenta a termo, quando comparado à placenta em estágio inicial. Lovell et al. (1967) acrescentam ainda que o AH, o CS e o DS localizavam-se na região das vilosidades coriônicas. Já Wasserman et al. (1980b) estudando as mudanças na composição dos GAGs na placenta humana, verificaram uma redução dos açúcares com o amadurecimento da placenta, estando presentes em todas as placentas iniciais e maduras o DS, CS, HS e AH. De acordo com os autores com o envelhecimento da placenta, a proporção de CS diminuiu e as de DS e HS aumentaram com a idade. Diferente do que ocorre em humanos, na placenta da cutia, ocorre um aumento dos GAGs com o amadurecimento placentário, decorrente principalmente do aumento do CS e DS.

Estudando a placenta de ratos no terço médio e final de gestação, Batbayal et al. (2006) utilizando técnica de imunohistoquímica com marcação do decorin, proteoglicano formado por cadeias laterais de CS ou DS, verificaram que a reação se intensificava com o avançar da gestação, estando no rato formado principalmente de CS, sendo que a proporção CS e DS aumentava com a idade. Na placenta da cutia verificou-se que o CS e DS

aumentavam com o avançar da idade gestacional e reduziam sua composição a termo, não tendo sido possível neste estudo fazer a proporção de CS e DS ao longo da gestação. Corroborando com Batbayal et al. (2006), quando citam que as mudanças na composição dos GAGs ao longo da gestação estariam diretamente relacionadas com o papel de cada GAG na organização do tecido placentário.

Greiss e Wagner (1983) estudando os placentomas de ovinos, verificaram que o CS e AH eram os principais GAGs encontrados neste tecido, estando o AH predominante no terço inicial de gestação e praticamente restrito ao mesênquima viloso fetal. Na cutia, o AH esteve presente ao longo de toda a gestação marcando todo o sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto fortemente. Os autores citam ainda que as concentrações destes GAGs aumentam no decorrer da gestação, sendo que o AH tem seus níveis reduzidos drasticamente no terço final, a ponto de atingir os menores níveis a termo. Acredita-se que o mecanismo envolvido no processo de regulação dos níveis de AH placentários no decorrer da gestação, atue como fator determinante para o processo de maturação placentária, bem como para a regulação da taxa de crescimento fetal (OTT et al., 1997).

Wasserman et al. (1979) analisando a composição de GAGs em vasos sanguíneos da placenta a termo verificaram como principais açúcares o AH, CS, DS e em menor concentração de HS e ainda acrescentaram que o teste através da coluna de cloreto de cetilpiridínio de celulose exibe, uma atividade anticoagulante, o qual pode ter importância fisiológica para a manutenção da fluidez do sangue da placenta. Há de ressaltar que na cutia, o dermatam sulfato e o heparam presentes na placenta deste roedor estariam participando diretamente da inibição da trombina no órgão, mantendo o fluxo sanguíneo e as trocas de nutrientes entre a mãe e o feto.

Parmley et al. (1984) analisando a presença dos GAGs no tecido placentário humano a termo através do método Spicer's high-iron diamine (HID), verificaram que a superfície do sinciciotrofoblasto era intensamente corado e continha o CS e a lâmina basal continha uma mistura de CS, marcada pela reação intensa e GAG N-sulfatada, corados fracamente. Já Wasserman et al. (1983) estudando histoquimicamente a composição dos GAGs em placentas no terço inicial e a termo tratadas com condroitinases ABC ou AC e hialuronidase, verificaram a presença de CS e AH principalmente no estroma, enquanto o HS e DS estavam associados as vilosidades dos vasos sanguíneos fetais e a superfície intervilosa do sinciciotrofoblasto.

Wasserman et al. (1980a) analisando a composição de GAGs em placentas de indivíduos diabéticos e placentas normais, observaram que na placenta diabética a

concentração dos GAGs estava muito elevada comparado a placenta normal, estando o AH e o HS em concentrações superiores e o DS abaixo do normal.

Considerando a localização dos GAGs placentários e correlacionando com sua função, pode-se inferir que o CS e o AH estariam desempenhando importante papel na manutenção da integridade estrutural da placenta, ao mesmo tempo em que o DS e o HS estariam envolvidos no processo de homeostase sanguínea e formando a barreira placentária (CALATRONI e DI FERRANTE, 1969; WASSERMAN et al., 1983; SAID, 2011).

Na subplacenta de cutia, estrutura característica dos cavídeos, localizada entre a placenta principal e a decídua, comportou-se quanto a concentração de GAGs semelhante a placenta, formada principalmente de CS e DS com baixas concentrações de HS. Na década de 70, Roberts e Perry (1974) especularam a presença de material PAS positivo na subplacenta de vários caviomorfos, inferindo a possibilidade desta estrutura estar envolvida no transporte de nutrientes, em especial, de polissacarídeos, transferindo-os da decídua para o feto. Verifica-se que na cutia o sinciotrofoblasto que está banhado pelo sangue materno próximo a subplacenta apresenta reação PAS positiva juntamente com células trofoblásticas que estão no interior dos septos subplacentários. Na zona juncional verifica-se que as células trofoblásticas gigantes apresentaram reação PAS positiva, o que nos faz acreditar que estas células sejam secretoras de polissacarídeos.

Segundo Bonatelli et al. (2005) estudando a placentação em pacas verificaram na zona juncional entre a subplacenta e decídua, a presença das células trofoblásticas gigantes PAS positivas, sugestivo que estas células secretem polissacarídeos concordando com o observado na cutia. Amarante-Paffaro et al. (2004) no camundongo acrescentam ainda que estas células possuem enzimas lisossomais, em sua grande maioria de natureza glicoproteica, fato que as tornam PAS positivas.

No que diz respeito à análise ao longo da gestação, verificou-se que na subplacenta da cutia, os GAGs apresentaram concentrações maiores no terço médio, mantendo-se praticamente constante até o final da gestação, reduzindo ao aproximar-se do parto, fato que pode estar associado as alterações degenerativas do órgão próximo do parto citadas por Rodrigues et al. (2006). Bonatelli et al. (2005) citam em pacas uma marcação fraca para Alcian Blue pH 2,5 junto a massa celular sincicial das lamelas da subplacenta e nas células trofoblásticas gigantes próximo a subplacenta no terço médio de gestação e ausentes no terço final, fato que pode estar associado a redução dos GAGs no terço final de gestação na cutia.

O estudo dos GAGs subplacentários são ainda preliminares e o primeiro a ser realizado no órgão, sendo necessário ainda outros estudos de modo a entender o

comportamento e a função destas moléculas ao longo da gestação nas espécies cujo órgão se faz presente. Acredita-se que esta estrutura seja uma zona de crescimento para proliferação de células trofoblásticas e um possível local de atividade endócrina placentária (DAVIES et al., 1961; MESS, 2004; KAUFFMAN, 2004), sendo esta produção direcionada para o feto (RODRIGUES et al., 2006). Dessa forma, o entendimento do padrão dos GAGs subplacentários poderá ser útil para identificar a função deste órgão ao longo da gestação.

A análise dos GAGs na placenta e na subplacenta sugerem que as mudanças na composição destes açúcares ao longo da gestação pode estar relacionado na regulação do transporte materno-fetal e na formação da barreira placentária.

5.6 CONCLUSÃO

A análise dos glicosaminoglicanos na placenta da cutia entre 25 a 100 dias de gestação mostra diferenças quanto à composição e localização destes polímeros com o avanço da idade gestacional. A placenta e subplacenta jovens contêm uma menor quantidade de GAGs, enquanto no terço médio e final de gestação possuem as maiores concentrações de polissacarídeos, fato que pode estar associado com o processo de maturação tecidual e o desenvolvimento fetal, que nestas fases é intensificado. Além disso, alterações na composição dos GAGs ao longo da gestação pode estar relacionado com as funções destas moléculas na regulação do transporte placentário e na formação da barreira placentária.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE-PAFFARO, A.; QUEIROZ, G. S.; CORRÊA, S. T.; SPIRA, B.; BEVILACQUA, E. Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells. **Reproduction**, Cambridge, v. 128, p.207-218, 2004.
- BONATELLI, B.; CARTER, A. M.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, M. F.; LIMA, M. C.; MIGLINO, M. A. Placentation in the paca (*Agouti paca* L). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 9, 2005.
- BATBAYAL, B.; ISHII, Y.; NOMURA, Y.; WATANABE, M.; YASUKO, T.; NAKAMURA, S. Change in Decorin during Aging of Rat Placenta. **Connective Tissue Research**, Nova Iorque, v. 47, n. 4, p. 235-241, 2006.
- CALATRONI, A.; DI FERRANTE, N. The Glycosaminoglycans of human term placenta. **Carbohydrate Research**, Amsteden, v. 10, n. 4, p. 535-548, 1969.

CHAUHAN, N. H.; OVBUDE, I. J.; HILLS, A. A.; SULLIVAN, M. H.; HILLS, F. A. Placental syndecan-1 and sulphated glycosaminoglycans are decreased in preeclampsia. **Journal of Perinatal Medicine**, Berlim, v.42, n.3, p. 329-338, 2014.

CHEN, J.; LIU, J. Characterization of the structure of antithrombin-binding heparan sulfate generated by heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 5. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1725, n. 2, p. 190–200, 2005.

DAVIES, J.; DEMPSEY, E. W.; AMOROSO, E. C: The subplacenta of the guinea-pig: development, histology and histochemistry. **Journal of Anatomy**, Londres, v. 95, p. 457-73, 1961.

DELORME, M. A.; XU, L.; BERRY, L.; MITCHELL, L.; ANDREW, M. Anticoagulant dermatan sulfate proteoglycan (decorin) in the term human placenta. **Thrombosis Research**, Elmsford, v. 90, n. 4, p. 147–153, 1998.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, Nova Iorque, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DIETRICH, C. P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 1, p. 5-15. 1984.

DREYFUSS, J. L.; REGATIERI, C. V.; JARROUGE, T. R.; CAVALHEIRO, R. P.; SAMPAIO, L. O.; NADER, H. B. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 3, p. 409-429, 2009.

FAMÁ, E. A.; SOUZA, R. S.; MELO, C. M.; MELO, P. L.; PINHAL, M. A. Evaluation of glycosaminoglycans and heparanase in placentas of women with preeclampsia. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 1, n. 437, p. 155-160, 2014.

GIRI, T. K.; TOLLEFSEN, D. M. Placental dermatan sulfate: isolation, anticoagulant activity, and association with heparina cofactor II. **Blood**, Nova Iorque, v. 107, n. 7, p. 2753–2758, 2006.

GREISS, F.C.; WAGNER, W. D. Glycosaminoglycans: Their distribution and potential vasoactive action in the nonpregnant and pregnant ovine uterus. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v. 145, n. 8, p. 1041-1048, 1983.

GUNATILLAKE, T N. **The role of placental heparan sulphate proteoglycans in the pathogenesis of pre-eclampsia**. 2015. Tese (Doutorado) - Melbourne Medical School, Melbourne, 2015.

LEE, T. Y.; JAMIESON, A. M.; SCHAFER, I. A. Changes in the composition and structure of glycosaminoglycans in the human placenta during development. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 7, n. 12, p. 965-977, 1973.

LOPES, C. C.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 2, p. 157-67, 2006.

LOVELL, D.; TIGHE, J. R.; CURRAN, R. C. The chemical determination of acido mucopolysaccharides and collagen of the normal human placenta. **Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonw**, Londres, v. 74, n. 4, p. 568-571, 1967.

MEYER, K.: Biochemistry and biology of mucopolysaccharides. **The American Journal of Medicine**, Nova Iorque, v. 47, p. 664, 1969.

NADER, H. B.; FERREIRA, T. M.; PAIVA, J. F.; MEDEIROS, M. G.; JERONIMO, S. M.; PAIVA, V. M.; DIETRICH, C. P. Isolation and structural studies of heparan sulfates and chondroitin sulfates from three species of molluscs. **The Journal of Biological and Chemistry**, Bethesda, v. 259, p. 1431-1435, 1984.

NADER HB, DIETRICH CP, BUONASSISI V AND COLBURN P. Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. **Proceedings of the National Academy of Science (PNAS)**, v. 84, p. 3565–3569, 1987.

OLIVEIRA, G. B.; VALE, A. M.; SANTOS, A. C.; MOURA, C. E. B.; ROCHA, H. A. O.; OLIVEIRA, M. F. Composition and Significance of Glycosaminoglycans in the Uterus and Placenta of Mammals. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.58, n.4, p. 512-520, 2015.

OTT, T. L.; WILEY, A. A.; BARTOL, F. F. Effects of Stage of Gestation and Uterine Ligation on Ovine Placentome Development and Glycosaminoglycans. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, n. 4, p. 1053-1062, 1997.

PARMLEY, R. T.; TAKAGI, M.; DENYS, F. R. Ultrastructural localization of glycosaminoglycans in human term placenta. **The Anatomical Record**, Nova Iorque, v. 210, n. 3, p.477-484, 1984.

RODRIGUES, R. F.; CARTER, A. M.; AMBROSIO, C. E.; SANTOS, T. C.; MIGLINO, M. A. The subplacenta of the red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* L). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 31, 2006.

ROBERT, C. M.; PERRY, J. S. Hystricomorph Embryology. **Symposia of the Zoological Society of London**, Londres, v. 34, p. 333-360, 1974.

SAID, J. M. The role of proteoglycans in contributing to placental thrombosis and fetal growth restriction. **Journal of Pregnancy**, Cairo, v. 2011, n. 928381, 2011.

SVEJCAR, J. The content of glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) in mouse fetus and placenta. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 84-88, 1968.

WARDA, M.; ZHANG, F.; RADWAN, M.; ZHANG, Z.; KIM, N; KIM, Y.N.; LINHARDT, R.J.; HAN, J. Is human placenta proteoglycan remodeling involved in pre-eclampsia? **Glycoconjugate Journal**, Hampshire, v. 25, n. 5, p. 441–450, 2008.

WASSERMAN, L.; BER, A.; GOLDMAN, J. A.; ALLALOUF, D. Composition of acidic glycosaminoglycans in human term placenta blood vessels. **Artery**, v.5, n. 1, p. 45-60, 1979.

WASSERMAN L, SHLESINGER H, ABRAMOVICI A, GOLDMAN JA, ALLALOUF D. Glycosaminoglycan patterns in diabetic and toxemic term placentas. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v. 138, n. 7, p. 769-773, 1980a.

WASSERMAN, L.; SHLESINGER, H.; ABRAMOVICI, A.; GOLDMAN, J. A.; ALLALOUF, D. Changes in glycosaminoglycan composition of normal human placentas with maturation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v. 138, n.7, p. 763-768, 1980b.

WASSERMAN, L.; ABRAMOVICI, A.; SHLESINGER, H.; GOLDMAN, J. A.; ALLALOUF, D. Histochemical localization of acidic glycosaminoglycans in normal human placentae. **Placenta**, Londres, v. 4, n. 1, p. 101-108, 1983.

YANG, W. C. V.; SU, T. H.; YANG, Y. C.; CHANG, S. C.; CHEN, C. Y.; CHEN, C. P. Altered perlecan expression in placental development and gestacional diabetes mellitus. **Placenta**, Londres, v. 26, n. 10, p. 780-788, 2005.

**6 CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO PÓS-IMPLANTACIONAL DE CUTIA
(*DASYPROCTA LEPORINA* LINNAEUS, 1758)**

Animal Reproduction Science, 09 de setembro de 2016

6 CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO PÓS-IMPLANTACIONAL DE CUTIA (*DASYPROCTA LEPORINA* LINNAEUS, 1758)

Desenvolvimento pós-implantacional de cutia (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758)

6.1 RESUMO

A cutia é um roedor da família Dasyproctidae com ampla distribuição no território brasileiro, que apresenta período médio de gestação de 117 dias e parindo de um a dois filhotes. O conhecimento sobre o desenvolvimento embrionário e fetal é essencial, servindo como base para a aplicação do exame ultrassonográfico e biotécnicas reprodutivas, contribuindo na identificação de anomalias congênitas durante o desenvolvimento. Dada a importância e a inexistência de dados na literatura sobre o assunto, realizou-se o estudo, com intuito de descrever as características morfológicas externas e a biometria dos embriões e fetos ao longo da gestação. Foram utilizadas 12 cutias fêmeas, adultas, prenhes entre as idades gestacionais de 30, 32, 35, 40, 45, 55, 65, 75, 85, 100 dias, sendo duas fêmeas para as idades de 55 e 100 dias, totalizando 24 embriões/fetos, somados a estes dois neonatos com 110 dias. As fêmeas foram eutanasiadas e os embriões/fetos, pesados, analisados e fotografados. Os embriões aos 30 dias pós cópula possuíam forma de “C”, com brotos dos membros em forma de remo, Crown-Rump (CR) de $10,75 \pm 0,11$ mm e peso de $0,17 \pm 0,03$ g. Aos 32 dias, iniciava-se a formação dos raios digitais no membro torácico, CR de $10,97 \pm 0,37$ mm e peso $0,192 \pm 0,039$ g; aos 35 dias, o valor de membro torácico em forma de remo e pélvicos de nadadeiras, saliência hepática evidente, CR de $15,6 \pm 0,16$ mm e peso de $0,39 \pm 0,023$ g; aos 40 dias a pele era lisa e transparente e saliência hepática e curvatura do corpo reduzidas, CR de $19,5 \pm 0,007$ mm e peso $1,34 \pm 0,01$ g; aos 45 dias, boca e narinas diferenciadas, dentes incisivos inferiores em processo de brotamento e presença de pelos tácteis próximo as narinas, CR de $40,8 \pm 0,4$ mm e peso $5,21 \pm 0,13$ g; aos 55 dias união das suturas cranianas, formação dos dentes incisivos superiores, dígitos dos membros totalmente separados, início da formação das unhas e CR de $58,8 \pm 0,1$ mm e peso de $11,77 \pm 0,03$ g; aos 65 dias, o tubérculo genital já estava diferenciado e CR observado foi de $83 \pm 0,08$ mm e peso de $29,22 \pm 0,46$ g; aos 75 dias, pele espessa, formação dos toros palmares e plantares e mamas, CR de $97,1 \pm 0,35$ mm e peso de $56,27 \pm 1,43$ g; aos 85 dias, presença de pelos curtos distribuídos pelo corpo, olhos parcialmente abertos, CR de $127,7 \pm 0,6$ mm e peso de $96,56 \pm 7,37$ g; aos 100 dias, feto maduro com pelos longos e em todo o corpo, unhas e dentes completamente formados e meato acústico externo aberto, CR foi de $164,3 \pm 10,4$ mm e peso de $166,5 \pm 7,79$ g; os neonatos apresentaram pelos eriçados e olhos abertos ao nascer, com CR de $179,1 \pm 0,5$ e peso de $201,88 \pm 1,89$ g. Conclui-se com, base nos dados morfométricos, que a idade do embrião/feto pode ser avaliada durante gestação para estimar idades gestacionais, e os dados podem ser usados como parâmetros para exames ultrassonográficos, ajudando na identificação de patologias ao longo do desenvolvimento.

Palavras-chave: Morfometria, embriologia, embriogênese, roedor.

6.2 INTRODUÇÃO

A cutia pertence à classe Mammalia, ordem Rodentia, subordem Hystricomorpha, família Dasyproctidae, estão representados por pelo menos 10 espécies distribuídas

geograficamente por quase todo o continente americano, a exemplo do sul do México, passando pela América Central, Argentina, Uruguai, Paraguai e em todo território brasileiro (DEUTSCH; PUGLIA, 1988), sendo no Brasil encontrado cinco espécies, *D. azarae*, *D. fuliginosa*, *D. prymnolopha*, *D. punctata* e *D. leporina* (WOODS; KILPATRICK, 2005). Esses roedores habitam regiões de floresta pluvial, semidecídua e ainda regiões de cerrado e caatinga. Particularmente a espécie *Dasyprocta leporina* distribui-se por quase todo território brasileiro, sendo encontrada na bacia amazônica ao sul do rio Amazonas, entre os rios Madeira e Tocantins, e no leste do Brasil, nos estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (REIS et al., 2011).

O comprimento médio de uma cutia é de 50 cm, medindo-se da base da cauda ao nariz externo, com altura média de 23 cm e peso não ultrapassando 3 kg (DEUTSCH; PUGLIA, 1988). As cutias apresentam uma fase impúbere que vai do nascimento até os cinco meses de idade, uma fase de transição da pré-puberdade à puberdade que vai de seis a oito meses, sendo esta última fase atingida entre nove a dez meses (ASSIS-NETO et al., 2003), podendo esta fase ser antecipada com a presença do macho (GUIMARÃES et al., 2009). As fêmeas são consideradas poliétricas contínuas, em que a frequência e o tipo de parto não sofrem influência da época do ano (CARLETON; MUSSER, 2005). O ciclo estral tem duração média de 28 dias (CAMPOS et al., 2015), período de gestação médio de 117 dias, parindo de um a dois filhotes com peso médio de $171,74 \text{ g} \pm 3,10$ e intervalo entre partos com média de $150,28 \text{ dias} \pm 4,41$ (PINHEIRO et al., 1989).

As cutias apresentam papel importante na natureza, pois as tocas feitas no solo para moradia servem também para aerar o terreno. São importantes ainda na dispersão de sementes e de frutos, uma vez que se alimentam destes e carregam por metros de distância, e muitas vezes enterrando-os (HOSKEN; SILVEIRA, 2001; GALETTI et al., 2010).

Em roedores a gestação é facilmente comprovada através de palpação abdominal, sendo identificada na cutia após 30 dias de gestação (HOSKEN e SILVEIRA, 2001), apresentando-se como uma esfera rígida no abdome. Ao exame ultrassonográfico, a visualização do embrião já é possível em exame ultrassonográfico a partir do 18º dia, com os batimentos cardíacos ouvidos aos 25 dias, brotos de membros e ossificação do crânio aos 27, cordão umbilical aos 30 dias, cabeça e corpo definidos aos 40 dias e órgãos como estômago, pulmões e fígado aos 50 e rins aos 55, enquanto os intestinos e a bexiga urinária só a partir do 85º dia de gestação (SOUSA et al., 2012).

A cutia tem sido bastante estudada e utilizada, sobretudo em pesquisas com modelo de placentação (MIGLINO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2003; CONCEIÇÃO et al., 2008;

OLIVEIRA, 2012). No entanto, nada se sabe, sobre o desenvolvimento embrionário e fetal em *D. leporina*, constando na literatura pouquíssimos estudos em roedores histricognatas (ROBERTS e PERRY, 1974; FELIPE e MASON, 2008; FRANCIOLLI et al., 2011a; FORTES et al., 2013). Considerando a inexistência de dados em *D. leporina* e sabendo que conhecimentos sobre o desenvolvimento fetal é fundamental para estudos em biotecnologia de reprodução, bem como serve de parâmetros para ultrassonografia como ferramenta para estudos com morfologia, contribuindo para determinar anomalias congênitas durante a fase de desenvolvimento e para o manejo reprodutivo em cativeiro, realizou-se o estudo, o qual teve como objetivos descrever a macroscopia e fornecer dados biométricos dos fetos entre 30 e 100 dias de gestação e neonatos.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados exames colpocitológicos diariamente em 12 fêmeas, adultas, as quais foram agrupadas em 3 boxes contendo quatro fêmeas para um macho, de modo, a caracterização do estro e a confirmação da cobertura pelo macho, com a visualização de espermatozoides nos esfregaços vaginais. As lâminas foram coradas pelo método Panótico Rápido (Laborclin®), e observadas em microscópio de luz, utilizando lente ocular de 10x e objetiva de 20x e 40x, e quando da identificação do espermatozóide na lâmina, a fêmea era imediatamente separada do grupo e o dia contado como dia “zero” da gestação e a data da coleta agendada, para comprovação da gestação. Deste modo foram utilizadas as fêmeas nas idades gestacionais de 30, 32, 35, 40, 45, 55, 65, 75, 85, 100, sendo duas fêmeas para as idades de 55 e 100 dias, totalizando 24 embriões/fetos, somados a estes dois neonatos com 110 dias.

Para comprovação da gestação, foi realizado inicialmente palpação abdominal e exames ultrassonográficos utilizando transdutor de 8 MHz e Scanner portátil (Aquila Vet, Pie Medical®, Nutricell, Campinas, SP, Brazil). Ao atingir as idades gestacionais pré-determinadas, os animais foram eutanasiados, recebendo inicialmente dose pré-anestésica de cetamina (12 mg/kg) e xilazina (2 mg/kg) por via intramuscular, seguida da realização da anestesia, através da canulação da veia cefálica e administração de propofol (8mg/kg). Após a identificação do 3º plano anestésico, procedia-se a eutanásia do animal, injetando-se solução de cloreto de potássio (1 mL/kg) por este mesmo acesso venoso.

Os embriões e fetos foram pesados em balança analítica (MARTE®, Japão) e mensurados com paquímetro digital (MITUTOYO®, Japão) e fio de algodão. Posteriormente

foram fixados em solução de formaldeído tamponado a 10%. Foram considerados para a mensuração dos fetos e embriões as medidas de comprimento: CR (crown-rump), comprimento total, cefálico, céfalo-caudal; cauda; circunferência cefálica, diâmetro biparietal, diâmetro do olho; comprimento do olho; orelha; dos membros torácicos e pélvicos; da tíbia; do rádio-ulna; das unhas do membro torácico e pélvico; largura das unhas do membro torácico e pélvico; comprimento dos dentes incisivos superiores e inferiores, perímetro torácico e perímetro abdominal, expressas em mm. Quando o espécime em desenvolvimento apresentava características próprias da espécie passava a ser denominado feto (MELLO, 1989; MOORE e PERSAUD, 2004).

As mensurações de comprimento “crown-rump”, peso, comprimento do olho, diâmetro do olho, comprimento total, céfalo-caudal, cefálico, membro torácico, membro pélvico, da cauda, diâmetro biparietal, circunferência cefálica, e perímetro torácico e abdominal foram realizados em todas as idades; o comprimento da orelha a partir dos 40 dias; e o comprimento da tíbia, rádio/ulna, comprimento e largura das unhas dos membros pélvicos e torácicos, bem como o comprimento dos dentes superiores e inferiores, a partir dos 45 dias. A média e desvio padrão foram calculados com o auxílio da ferramenta Excel, do pacote Microsoft Office 2013.

Os protocolos utilizados nesse estudo foram autorizados pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio (SISBIO N° 37987-3) e aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (Parecer 16/2014, Processo n° 23091.005467/2013-01).

6.4 RESULTADOS

Com base na análise morfológica externa dos fetos de cutias, nas diferentes idades gestacionais, verificaram-se as seguintes características:

6.4.1 Embrião 30 dias

Verificou-se nesta idade a presença das vesículas encefálicas (prosencélafo, mesencéfalo e rombencéfalo), placóide cristalino assimétrico (com pigmentação cinza), fosseta óptica (primórdios das saliências auriculares), meato acústico externo presente, início da formação do nariz, presença dos arcos faríngeos (mandibular; hioideo; terceiro arco branquial; quarto arco branquial). A face do embrião estava voltada para a proeminência cardíaca, reduzindo assim a distância entre a cauda e a cabeça e dando a forma do embrião de um “C”, característica desta fase. O coração com saliência cardíaca e vasos superficiais foram

observados. Os brotos dos membros torácicos e pélvicos estavam presentes e possuíam formato de remo (Figura 1A).

6.4.2 Embrião aos 32 dias

A face do embrião ainda estava voltada para a proeminência cardíaca, no entanto, verificou-se uma redução na curvatura do embrião. Os somitos estavam localizados dorsalmente, próximo a região caudal, os brotos dos membros torácicos foram mais desenvolvidos, apresentando o primórdio dos dedos (raios digitais) e membrana interdigital, ainda em forma de remo, enquanto os raios digitais dos membros pélvicos não foram evidenciados e estes possuíam forma de nadadeiras. O cordão umbilical e o primórdio do tubérculo genital estavam presentes e a cauda era longa e com uma pequena curvatura na porção distal (Figura 1B).

6.4.3 Embrião aos 35 dias

Nesta idade as estruturas embrionárias foram mais proeminentes quando comparado ao estágio anterior, especialmente para a vesícula mesencefálica. A curvatura do embrião estava mais reduzida, o placóide óptico possuía forma oval (Figura 1 C), e verificava-se o início da formação das pálpebras e das saliências auriculares (conduto auditivo externo) com o desenvolvimento do pavilhão auricular externo, divisão da cavidade oral e nasal (início da formação da boca e narinas), início da formação das costelas e articulação do cotovelo e joelho. Os dedos eram mais longos em relação ao estágio anterior e permanecia a membrana interdigital (Figura 3A). A saliência hepática foi bem evidente e o tubérculo genital estava mais desenvolvido (Figura 1 C).

6.4.4 Embrião de 40 dias

As estruturas embrionárias foram mais desenvolvidas comparado ao estágio anterior, especialmente para a vesícula mesencefálica, curvatura reduzida do embrião, verificada pela mudança do formato do embrião, devido o distanciamento da cabeça à cauda, em relação à idade anterior. Possuíam pele lisa e transparente, sendo possível a visualização de vasos sanguíneos na região da cabeça e dos membros pélvicos e torácicos (e no cordão umbilical) (Figura 1D). As vesículas ópticas possuíam forma oval, as pálpebras eram pouco evidentes, as saliências auriculares (meato acústico externo) encontravam-se em desenvolvimento para formação do pavilhão auricular externo (Figura 3B). Nesta fase a cavidade oral e nasal separavam-se e visualizava-se os ductos nasais e a boca já formada e aberta. As costelas

estavam mais desenvolvidas, a articulação do cotovelo e joelho eram pouco desenvolvidas, os raios dos dedos dos membros torácicos e pélvicos eram evidenciados, mas com presença de membrana interdigital. A saliência hepática estava menos evidente que o estágio anterior, sendo verificado uma mancha escura localizada na região torácica e abdominal, caracterizando a formação dos órgãos abdominais e torácicos, estando o tubérculo genital mais desenvolvido e a cauda mais curta e rombuda que na fase anterior (Figura 1D).

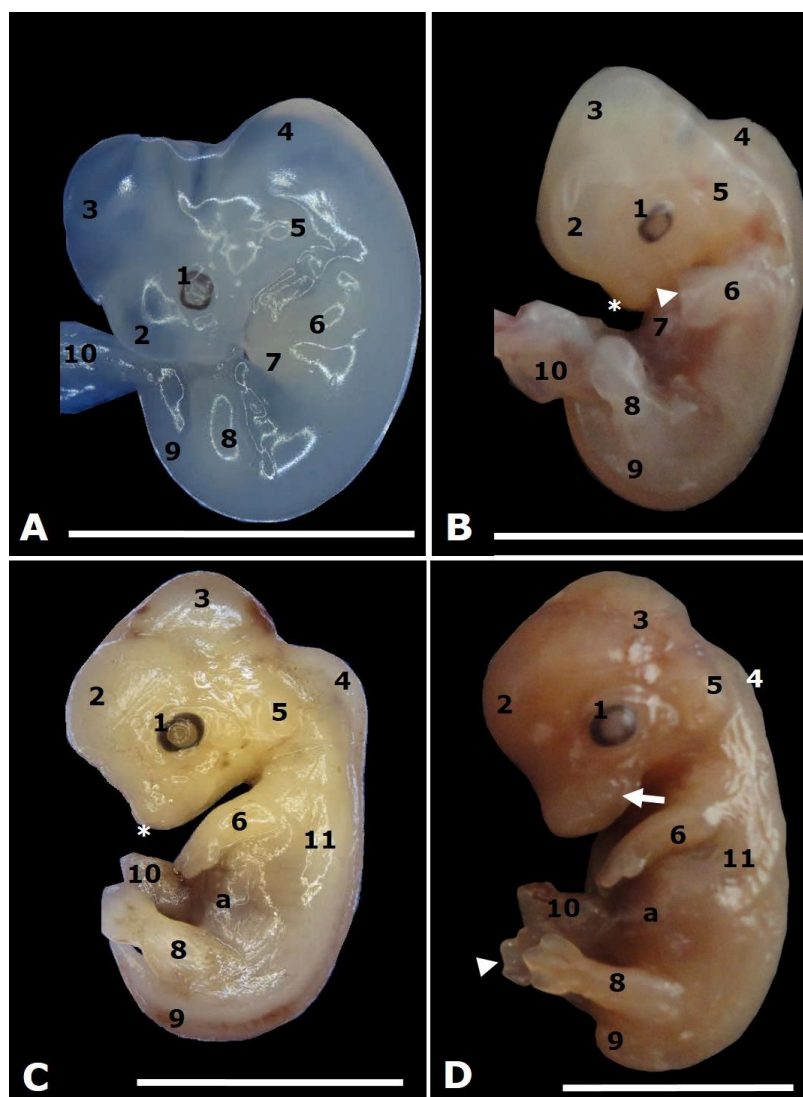


Figura 1- Embriões de cutia. A: embrião aos 30 dias de idade com membros em formato de remo. B: embrião aos 32 dias, com o início da formação do focinho (*) e dos dígitos (cabeça de seta). C: embrião aos 35 dias com membros em formato de nadadeiras, formação do focinho e saliência hepática (a). D: embrião aos 40 dias com redução da saliência hepática e início da formação do sulco labial (seta), diferenciação da boca e narinas e presença dos raios digitais com membrana interdigital (cabeça de seta). Têm-se ainda o placóide óptico (1), vesícula prosencéflica (2), mesencéfalo (3) e rombencéfalo (4), saliência auricular (5), membro

torácico (6), saliência cardíaca (7), membro pélvico (8), cauda (9), cordão umbilical (10), costelas (11). Barra= 1cm.

6.4.5 Feto de 45 dias

Aos 45 dias os embriões possuíam uma curvatura dorsal menos acentuada, perdendo o formato de “C” observado anteriormente. A pele era fina e transparente, porém mais opaca que nas idades anteriores, não sendo possível mais a visualização de vasos sanguíneos. Os poros estavam presentes, mas sem pelos, com exceção de pequenos pelos tácteis na região facial, próximo as narinas. A cabeça estava bem diferenciada com crânio em formação, vesículas encefálicas desenvolvidas e não apresentava uma proeminência externa, as vesículas ópticas encontravam-se simétricas, e de forma circular e retina pigmentada e pálpebras em formação. O pavilhão auricular externo encontra-se diferenciado, com características faciais detectadas, sendo possível fazer a diferenciação da boca e narinas com ductos nasais presentes, e as narinas fechadas. O sulco labial estava presente, a boca aberta, a língua formada, os dentes incisivos superiores ausentes, e incisivos inferiores em erupção.

A caixa torácica estava em formação, com marcas escuras observados na região torácica e abdominal indicando a presença de órgãos como o coração, fígado e vísceras do trato gastrointestinal. Os membros torácicos possuíam cinco dígitos e os membros pélvicos, três dígitos cada, ambos separados, com unhas ainda ausentes (Figura 2A). O cordão umbilical estava na porção caudoventral do abdome com tubérculo genital pequeno na região perineal e cauda pequena (Figura 3E).

6.4.6 Feto 55 dias

Nesta idade, as regiões do corpo estavam bem definidas, a pele era lisa e transparente (Figura 2B), continha pelos tácteis na região facial, na porção médio-ventral da mandíbula, próximo as narinas e alguns pelos nas sobrancelhas (Figura 3B). O crânio era bem desenvolvido e percebia-se a união das suturas coronal, sagital, lambóide e frontonasal (Figura 3D). As vesículas ópticas possuíam retina pigmentada e sem a presença de cílios, pálpebras mais desenvolvidas e delimitadas, pavilhão auricular externo proeminente, narinas fechadas e boca aberta com sulcos labiais laterais, formação dos dentes incisivos superior e inferior e visualização da língua. Visualizava-se ainda as veias facial, oftálmica externa dorsal, angular do olho, jugular externa, cefálica, axilar, mamárias, safena e femoral, estando a caixa torácica formada, garantindo a proteção de órgãos nobres. Os ossos estavam diferenciados com os membros torácicos contendo cinco dígitos e os membros pélvicos três

dígitos, completamente separados e com delimitação de ossos do carpo, tarsos, metacarpos, metatarsos e falanges proximal, média e distal e início da formação das unhas. Na região perineal foram observados o tubérculo genital indiferenciado (Figura 3F) e a borda anal e uma cauda pequena, característica peculiar para o animal adulto (Figura 2B).

6.4.7 Feto de 65 dias

Nessa fase o animal apresenta pele lisa e coloração esbranquiçada, percebendo-se uma mancha escura na região torácica e abdominal, indicando a formação dos órgãos dessas cavidades, pequenos pelos tácteis na região facial, na porção médio-ventral da mandíbula, próximo as narinas e alguns pelos nas sobrancelhas e na região caudal, entre olho e orelha. Poros definidos foram observados com folículos pilosos, na região da dorsocaudal, na face e nuca, corados em castanho. O pavilhão auricular apresentava cor branco-acastanhado, estando o canal auditivo ainda fechado, narina externa está bem desenvolvida e fechada internamente. Os olhos achavam-se fechados, sendo possível visualizar a esclerótica pigmentada (escura), e retina branca; vasos sanguíneos visíveis como veias facial, jugular externa, cefálica, axilar, safena e as veias metacárpicas e metatarsais. A parte dorsal das unhas possuía cor acastanhada, enquanto a parte palmar e/ou plantar eram esbranquiçadas. Nesta fase verificou-se diferenciação sexual com a identificação nos machos do prepúcio, glândula do pênis e escroto (Figura 3G) e nas fêmeas a vulva.

6.4.8 Feto de 75 dias

Os fetos mostraram diferenciação completa das regiões do corpo, com pele mais espessa e pigmentada, pálpebra desenvolvidas e cobrindo os olhos ainda fechados, presença de cílios curtos, esclera visível ao abrir o olho, retina pigmentada, pavilhão auricular externo desenvolvido e iniciando a abertura do canal auditivo, narinas abertas bem desenvolvidas com o canal nasal ainda se formando. Os dentes incisivos superior e inferior já estavam presentes e eram rígidos. Percebia-se pelos tácteis na região facial, na porção ventral média da mandíbula, próximo as narinas (grandes e coradas em castanho), nas sobrancelhas, na margem caudal do olho e alguns pelos tácteis finos e incolores na região caudal do antebraço (ulna). As vibrissas eram bem desenvolvidas, incolores e evidenciadas em torno da boca. Os pelos estavam presentes possuía cor castanha na região da cabeça, nuca e garupa. Visualiza-se as veias superficiais ao longo da extensão da pele como as veias facial, angular do olho, cefálica, safena e femoral, sendo mais evidentes em regiões onde a pele era mais delgada. Percebia-se as unhas de cor escura na parte dorsal e branco na face palmar e/ou plantar. A pele da região

posterior dos membros pélvicos na região plantar metatarsal era espessa, lisa e pouco mais escura (marrom claro) em comparação ao restante do corpo; toros dos membros pélvicos e torácicos estavam em formação, com coloração esbranquiçada. Na região perianal foram observados, o ânus e no períneo a genitália diferenciada e pequena cauda formada e sem a presença de pelos, característica peculiar para o animal adulto (Figura 2D). Podia-se verificar nessa idade a presença das mamas.

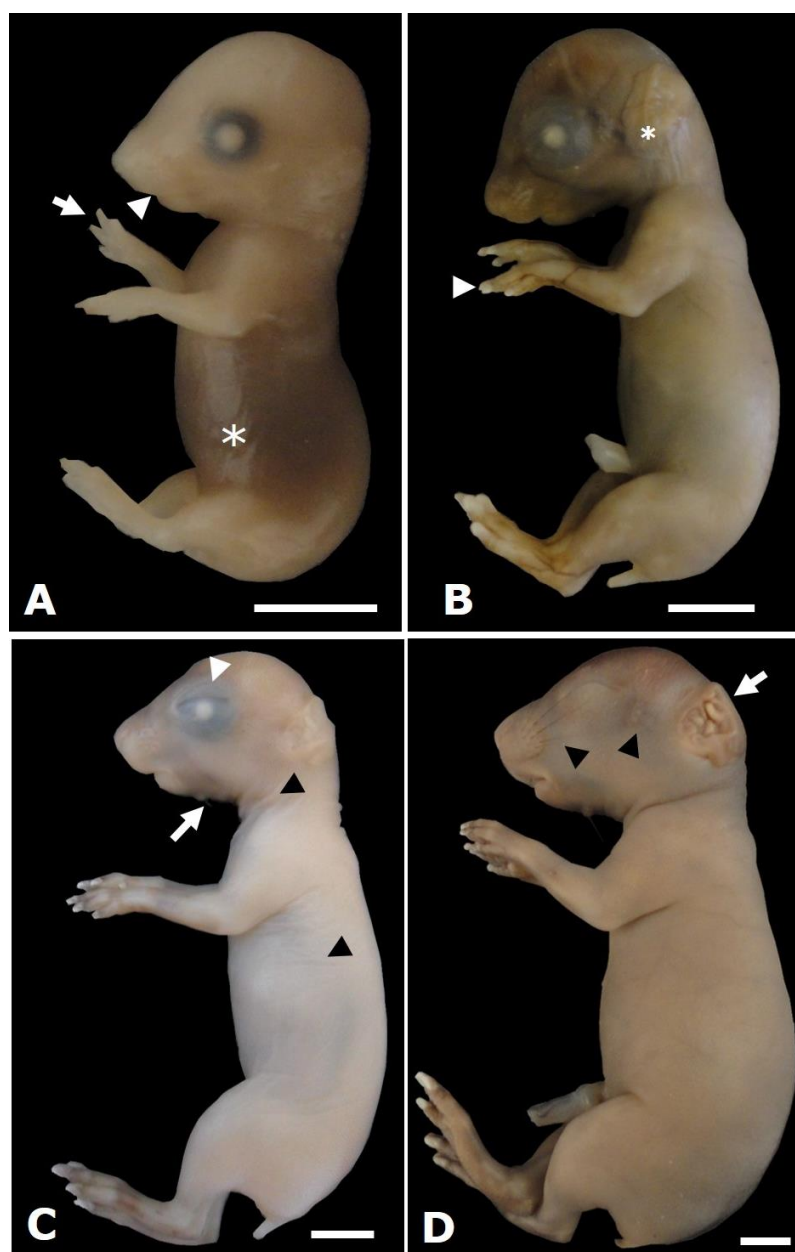


Figura 2- Fetos de cutia no terço médio de desenvolvimento. A: feto aos 45 dias, identificando o sulco labial (cabeça de seta) e dedos totalmente separados (seta). B: feto aos 55 dias, verificando-se o pavilhão auricular (*) e início da formação das unhas (cabeça de seta). C: feto aos 65 dias, observando-se a formação da pálpebra (cabeça de seta branca),

rugas na pele (cabeças de seta preta) e pelo táctil (seta). D: feto aos 75 dias, observando-se o pavilhão auricular formado (seta) e pelos tácteis na face (cabeça de seta). Barra= 1cm

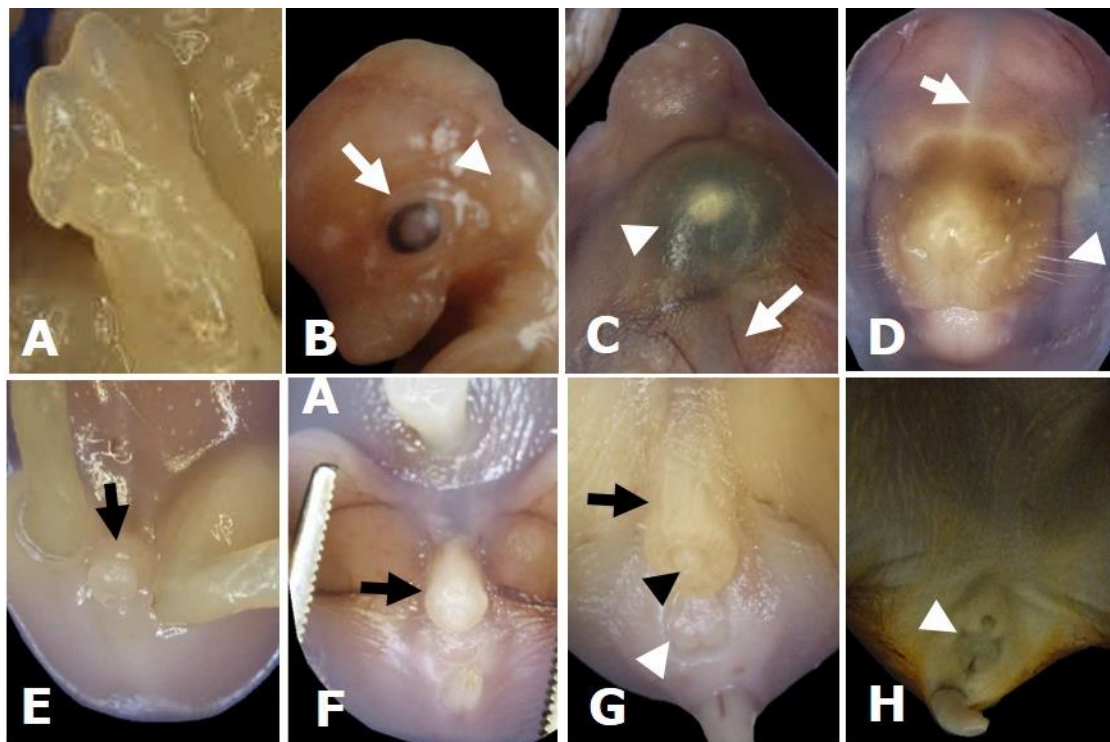


Figura 3 – Detalhe das estruturas dos embriões/fetos de cutia ao longo do desenvolvimento. A: embrião aos 35 dias com broto do membro torácico em formato de nadadeira e presença de membrana interdigital. B: saliência auricular (cabeça de seta) de embrião aos 40 dias, formação da órbita ocular (seta). C: feto aos 55 dias detalhe dos vasos superficiais (seta) e olho com retina pigmentada e com membrana ocular (cabeça de seta); D: feto aos 55 dias com formação das suturas dos ossos cranianos (seta) e formação das vibrissas (cabeça de seta). E: tubérculo genital indiferenciado (seta) aos 45 dias. F: tubérculo genital em processo de diferenciação aos 55 dias. G: feto aos 65 dias com identificação da glândula (cabeça de seta preta) do pênis (seta), e escroto (cabeça de seta branca). H: feto aos 100 dias com vulva fechada (cabeça de seta).

6.4.9 Feto de 85 dias

Os fetos mostraram diferenciação completa das regiões do corpo, mais avançadas que em comparação ao estágio anterior; pele mais espessa e pigmentada em cinza, com exceção do ventre, que se apresentou na coloração branco amarelada. Os pelos eram mais espessos que no estágio anterior e ao longo do corpo, estando corados em castanho e dourado nas regiões da cabeça, pescoço e garupa. Os pelos tácteis eram maiores, mais espessos e corados, com

exceção de alguns pelos tácteis incolores na região ventral média da mandíbula, e na região caudal do antebraço (ulna), com vibrissas incolores em torno da boca. Os olhos estavam parcialmente abertos com presença de cílios e esclera visível ao abrir o olho e retina pigmentada. As pálpebras desenvolvidas e cobrindo parcialmente o olho, conjuntiva pouco visível e coloração esbranquiçada (em formação). O pavilhão auricular externo era desenvolvido e presença de pequenos pelos, canal auditivo completamente aberto, narinas e cavidade nasal desenvolvido e abertos, apresentando sulcos nasais. Os dentes incisivos superiores ainda estavam em processo de calcificação e inferior já calcificados e, maiores que superiores, estando a língua maior e mais espessa que estágio anterior. Não era mais possível visualizar vasos sanguíneos superficiais e as unhas estavam formadas e de coloração escura na face dorsal (cinza/preto) e branco na face palmar e/ou plantar (Figura 4A). A pele da região caudal dos membros pélvicos, na região plantar metatarsal era espessa, apresentando rugas (sulcos plantares) e pouco escura (cinza/preto) em comparação ao restante do corpo. Observava-se quatro toros nos membros torácicos e dois nos membros pélvicos mais desenvolvidos que estágio anterior possuindo coloração cinza claro, mamas presentes, cauda maior que estágio anterior, mais espessa e ausência de pelos, iniciando a formação de rugas, característica peculiar para o animal adulto.

6.4.10 Feto de 100 dias

Esta fase foi caracterizada como a fase de feto maduro, pois todas as regiões do corpo foram diferenciadas, estando a pele mais espessa e pigmentada com pelos tácteis maiores, mais espessos e corados em preto, com exceção de alguns pelos tácteis incolores na região ventral média da mandíbula e com vibrissas em torno da boca e incolores e pelos ásperos e corados distribuídos por todo o corpo de acordo com as características da espécie (preto/dourado/marrom), com exceção para a cauda, região posterior dos membros pélvicos e da região metatarsal plantar. Os olhos estavam abertos com presença de cílios e pestanas, esclera visível, retina pigmentada, conjuntiva bem visível, desenvolvida, e de coloração cinza e pálpebras desenvolvidas. O pavilhão auricular externo estava desenvolvido e com presença de pelos maiores e mais espessos que no estágio anterior e canal auditivo completamente aberto. As narinas estavam abertas e desenvolvidas e dentes incisivos superiores (menores) e inferiores (maiores), ambos calcificados com língua maior e mais espessa que estágio anterior, unhas maiores, toros dos membros pélvicos (2) e torácicos (4) mais desenvolvidos que o estágio anterior de coloração cinza escura. A cauda era maior que estágio anterior, mais espessa e pelos ausentes, apresentando rugas, característica peculiar para o animal adulto. Em

fêmeas foi observado que a vulva estava fechada (Figura 3H) e identificou-se a presença de espículas clitorianas.

6.4.11 Neonato

Os neonatos aos 110 dias apresentaram olhos completamente abertos e pelos eriçados ao nascer.

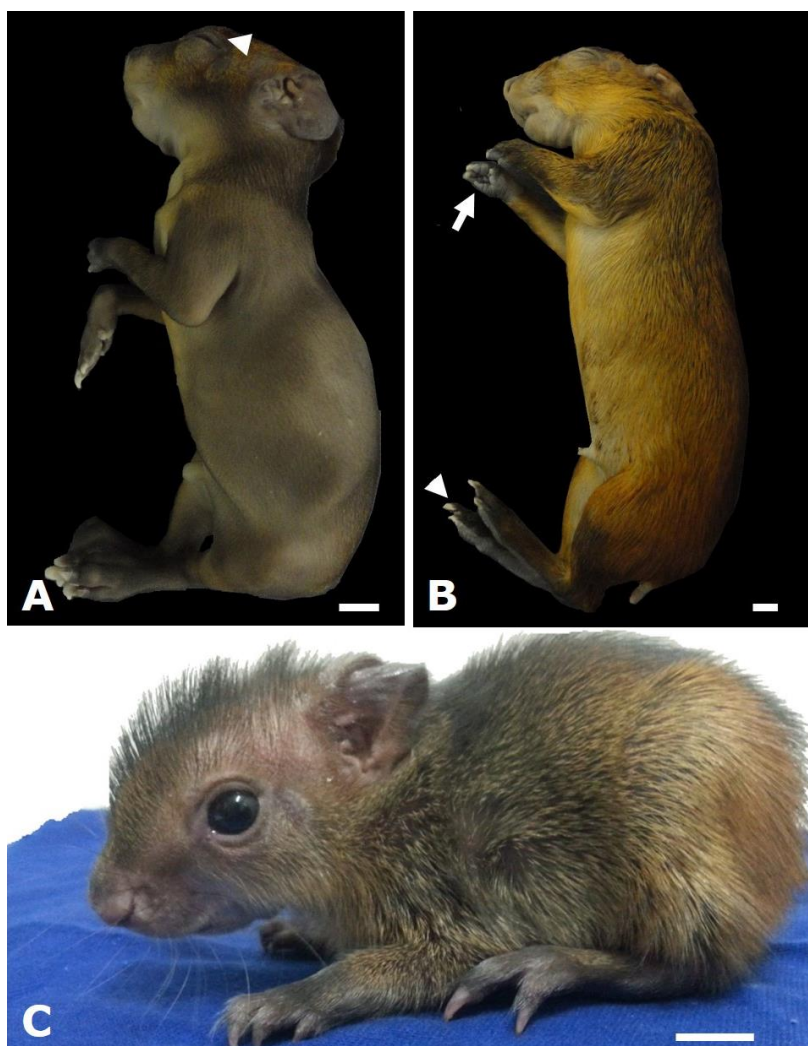


Figura 4- Fetos no terço final de desenvolvimento e neonato de cutia. A; feto aos 85 dias, observa-se pelos distribuídos pelo corpo e os olhos parcialmente abertos. B: feto maduro aos 100 dias pós cópula, verificando-se a presença dos toros palmares (cabeça de seta) e unhas formadas (seta). C: neonato de cutia aos 110 dias com os olhos completamente abertos. Barra= 1 cm.

6.4.12 Dados biométricos

Distribuídos os dados das variáveis “crown-rump” e “peso” no decorrer da gestação verifica-se que estes não apresentaram curva linear, tendo o peso permanecido praticamente constante entre 30 e 45 dias, passando a ter um aumento mais expressivo a partir do 55º dia. Já com o crown-rump foi possível inferir que o embrião/feto cresce pouco na fase inicial de gestação e intensifica-se a partir dos 40 dias (Figura 5 e Tabela 1).

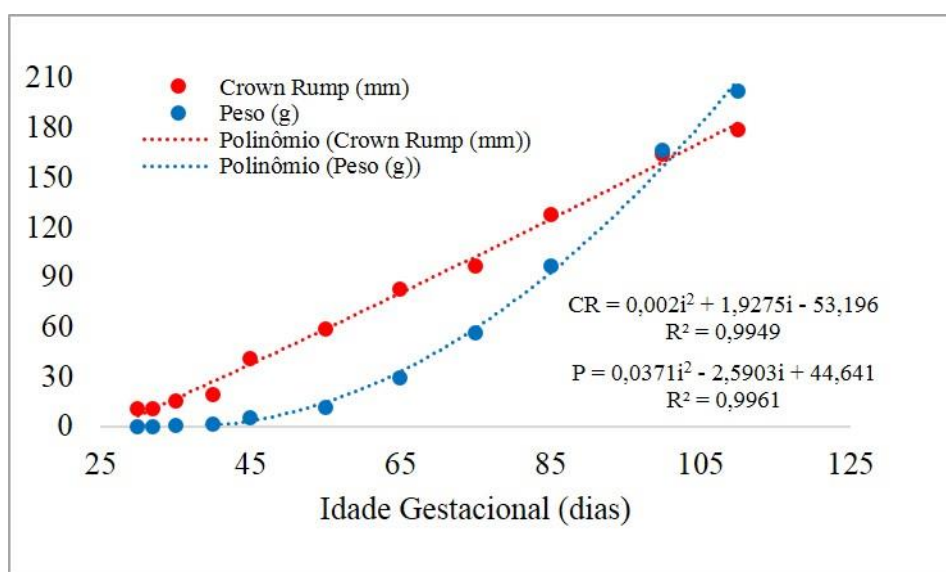


Figura 5- Variação em peso (P) e crown rump (CR) ao longo do desenvolvimento fetal (i) de cutias.

As variáveis comprimento total (CT), céfalo-caudal (CC), perímetros torácico (PT) e abdominal (PA) e os comprimentos dos membros torácico (CMT) e pélvico (CMP) apresentaram curva de crescimento linear, com um aumento no crescimento a partir do 45º dia (Fig.6A, 6C e 6D).

As variáveis circunferência cefálica (HC), comprimento cefálico (CEF), diâmetro biparietal (DBP), diâmetro maior do olho (OL) e diâmetro menor do olho (DO) apresentaram um pequeno crescimento até os 40 dias e posteriormente intensificando o crescimento ao longo do desenvolvimento (Figura 6B e 6E). Já a cauda inicia um processo de regressão de tamanho a partir do 40º dia (Figura 6E), ocorrendo posteriormente um leve crescimento aos 45 dias e depois a taxa torna-se estável até o 65º dias, intensificando-se após o 75º dia, acompanhando o crescimento corpóreo. Esta mudança no tamanho da cauda ao longo da gestação, mostra o processo de adequação da estrutura para espécie.

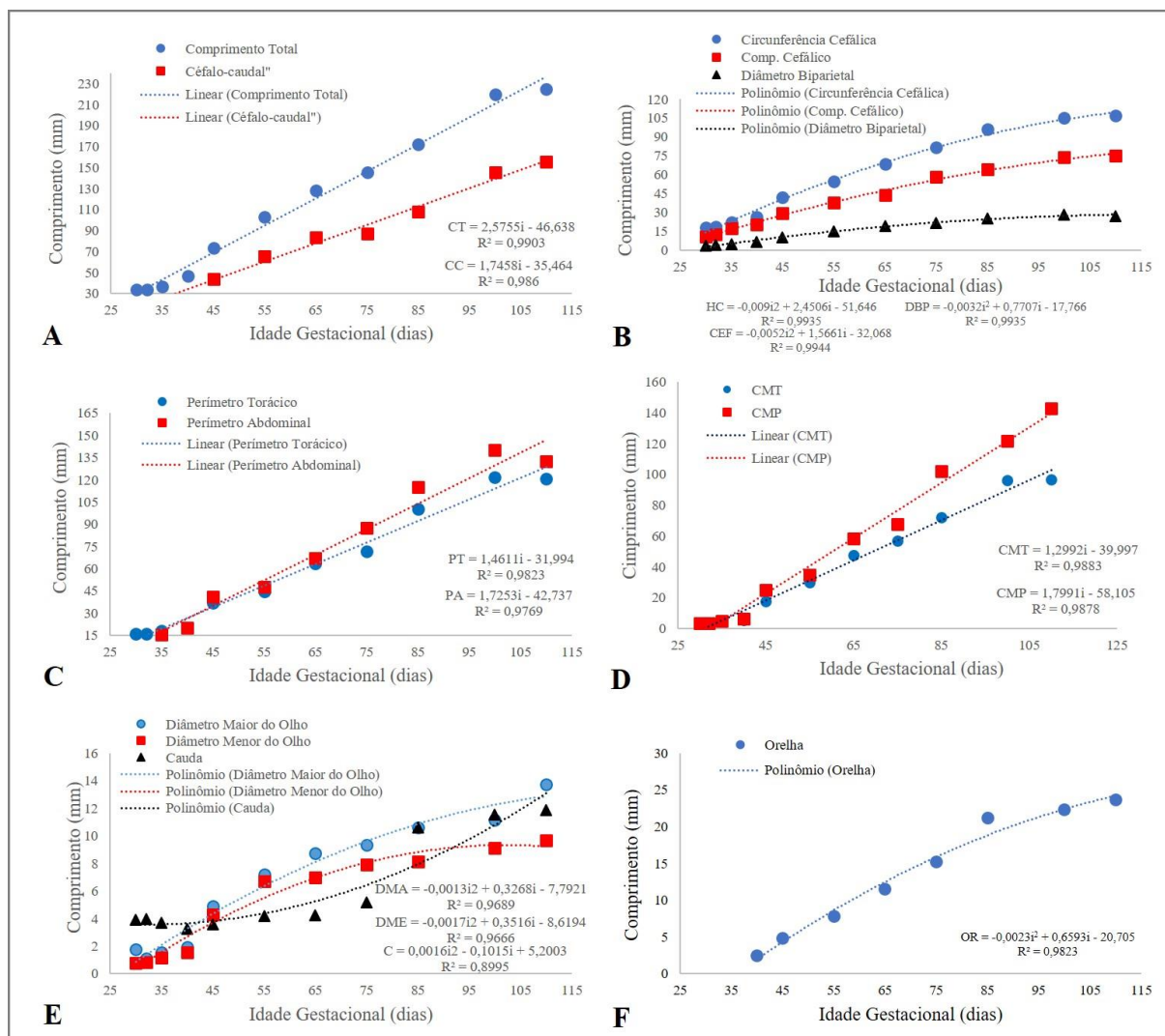


Figura 6- Análise das medidas corpóreas ao longo do desenvolvimento embrionário/fetal (i). A: comprimento total (CT) e céfalo-caudal (CC). B: comprimento cefálico (CEF), diâmetro biparietal (DBP) e circunferência cefálica (HC). C: perímetro torácico (PT) e abdominal (PA). D: comprimento dos membros pélvicos (CMT) e comprimento dos membros pélvicos (CMP). E: diâmetro maior do olho (DMA), diâmetro menor do olho (DME) e comprimento de cauda (C). F: comprimento da orelha (OR) no decorrer da gestação (i).

As medidas de comprimento de rádio (R), tíbia (T), dentes incisivos superiores (DIS) e inferiores (DII) e largura das unhas pélvicas (LUP) tiveram um crescimento formando uma curva linear (Figura 7A). As medidas de comprimento das unhas dos membros torácicos (UT) e pélvicos (UP) possuíam um crescimento contínuo até o 100º dia de desenvolvimento, ocorrendo uma regressão de tamanho verificada ao nascimento (Figura 7B). Por sua vez, a largura das unhas do membro pélvico (LUP), tiveram um crescimento até o 75º dia, reduzindo de tamanho até o 85º, com um novo aumento até o 100º dia e posteriormente têm-se uma leve redução verificada ao nascimento (Fig. 7C), diferente do que ocorre na variável LUT, em que ocorre um leve aumento até o final do desenvolvimento. Quanto ao DIS e DII, verificou-se

que entre o estágio de 45 e 55 dias os valores de comprimento permaneceram praticamente estáveis, ocorrendo um crescimento a partir dos 55 dias até o final da gestação. O DII possui crescimento inferior ao DIS, fato que foi observado no animal adulto, com dentes incisivos superiores maiores do que os inferiores (Figura 7D).

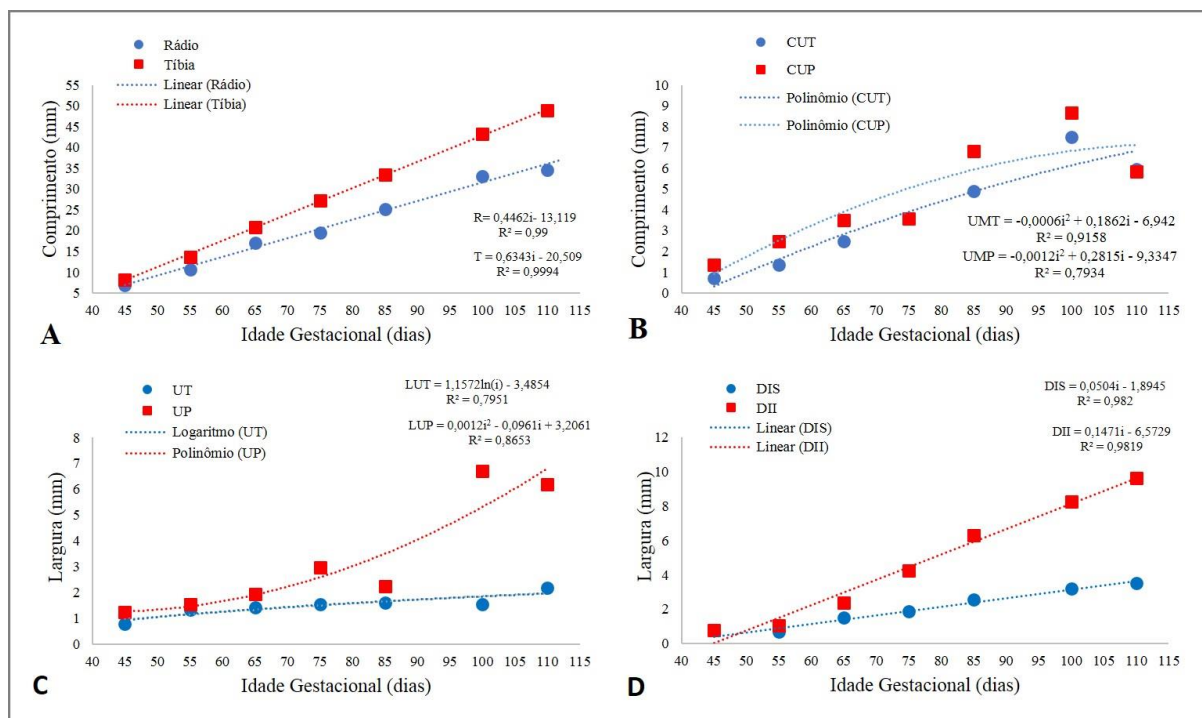


Figura 7- Análise das medidas corpóreas ao longo do desenvolvimento embrionário/fetal (i). A: comprimento do rádio (R) e tibia (T). B: comprimento das unhas dos membros torácicos (UMT) e unhas dos membros pélvicos (UMP). C: largura das unhas dos membros torácicos (LUT) e unhas dos membros pélvicos (LUP). D: comprimento dos dentes incisivos superiores (DIS) e comprimento dos dentes incisivos inferiores (DII) no decorrer da gestação (i).

6.5 DISCUSSÃO

As características morfológicas e os dados biométricos nos embriões e fetos de cutia se mostraram típicos para cada período de desenvolvimento, fato que permite estimar a idade gestacional na espécie. Na literatura pode-se encontrar dados de embriologia e organogênese em roedores tais como *Octodon degus* (ROJAS et al., 1982), *Myocastor coypus* (FELIPE et al., 2006; FELIPE e MASSON, 2008), *Mus musculus* (KAUFMANN, 2008; SALVADORI et al., 2012), *Cavia porcellus* (BARBINO et al., 2011a,b), *Oligoryzomys sp.* (FAVARON et al., 2012), *D. prymnolopha* (FORTES et al., 2013), *Necomys lasiurus* (OLIO et al., 2014) e de maneira comparativa e simplificada em *Cuniculus paca*, *Galea spixii* e *Hydrochaeris hydrochaeris* e *D. leporina* (FRANCIOLLI et al., 2011a).

Quanto a definição do número de estádios de desenvolvimento embrionário e fetal, há uma certa divergência na literatura. A Nomina Embriológica Veterinária (2006) estabelece 15

estádios, o sistema Theiler (1972) cita 27 em ratos, Sterba (1975) cita 27 estádios, o critério de Carnegie que estabelece 23 estádios para embriões de vertebrados, delineados a partir do desenvolvimento das estruturas (MOORE e PERSAUD, 2004) e por fim, em humanos, em que Mello (1989), menciona 3 etapas distintas, o período pré-embrionário que vai da fecundação à terceira semana de desenvolvimento, o período embrionário da 4ª a 8ª semana e o período fetal que se estende do 3º mês ao término da gestação (MELLO, 1989). De uma forma geral, a descrição do desenvolvimento embrionário e fetal em outras espécies foi baseada no aparato de informações que levam em consideração a idade, as mudanças corporais por diferenciação gradual, aumento do tamanho do corpo e peso, e desenvolvimento total de sistemas e órgãos (THEILER, 1972; KNOSPE, 2002; BEAUDOIN et al., 2003), método este escolhido para padronizar o desenvolvimento pré-natal na cutia.

Na cutia, os embriões de 30 e 32 dias apresentaram características que se assemelharam ao estágio 13-14 de Carnegie, estando encurvado e em forma de “C”, quatro pares de arcos branquiais visíveis, fossetas óticas presentes e pigmentadas e uma saliência cardíaca distinta, características também descritas por Francioli et al. (2011a) em embriões de *Dasyprocta leporina* com 11mm de CR, em *Galea spixii* com 17 mm de CR e em *Cuniculus paca* com 18 mm de CR, por Fortes et al. (2013) em *Dasyprocta prymnolopha* na idade de 30 dias e 9,5 mm de CR, por Olio et al. (2014) em embriões de *Necomys lasiurus* com idade estimada de 14 dias e 9 mm de CR e também em ratos entre 10,5 a 11 dias pós cópula e estágio Theiler 16-17 (THEILER, 1972; KAUFMANN, 2008). Da mesma forma, Favaron et al. (2012) estudando roedores do gênero *Oligoryzomys sp.* observaram que nestas espécies os embriões com 4 a 5 mm de CR, apresentavam formato de “C”, o nariz era curto, a vesícula óptica era de forma esférica, os botões dos membros torácicos e pélvicos estavam presentes, mas em estágio inicial de desenvolvimento, existindo uma protuberância torácica devido o coração e uma abdominal decorrente do crescimento do fígado, protuberâncias vistas em *D. leporina* entre 30 e 35 dias, respectivamente.

Por sua vez, Rojas et al. (1982) estudando o desenvolvimento embrionário em *Octodon degus*, mencionaram que entre 29 e 31 dias os embriões apresentavam curvatura acentuada em forma de “C”, três arcos branquiais, brotos dos membros torácicos reconhecíveis e ovais, diferente do observado em *D. leporina*, espécie a qual parece ter o desenvolvimento inicial mais precoce, cujo período os embriões já apresentavam os brotos dos membros pélvicos, apesar de possuírem período de gestação mais longo.

Aos 35 dias de desenvolvimento em *D. leporina*, verificou-se que a curvatura do embrião é mais reduzida, têm-se uma vesícula mesencefálica proeminente, início da formação

das pálpebras e formação das saliências auriculares, divisão da cavidade oral e nasal com ductos nasais presentes, saliência hepática, dedos com raios digitais evidentes nos membros torácicos e pouco evidentes nos membros pélvicos e ainda interligados, características que assemelham-se ao relatado em ratos aos 11,5 a 12 dias no estágio Theiler 19 (THEILER, 1989) e em embriões de *Cavia porcellus* entre 16 e 22 dias de gestação (EVANS; SACK, 1973).

Olio et al (2014) citam em *N. lasiurus* que entre 14,5 e 15 dias de desenvolvimento com 10 a 11 mm de CR na espécie, os embriões possuíam os membros torácicos mais desenvolvidos que os membros pélvicos e sulcos interdigitais ainda em formação. Na cutia, esta fase compreende o período de 40 dias, com embriões com 19,5 mm de CR, possuindo curvatura do corpo menos acentuada e protuberâncias torácica e abdominal reduzidas características similares apresentadas em embriões humanos aos 48 dias e no estágio Carnegie 19. Favaron et al. (2012) citam em *Oligoryzomys sp.* que a diferenciação dos dígitos na espécie inicia-se em embriões aos 12,5 dias e 5 mm de CR, estando os dígitos totalmente formados e individualizados em embriões entre 14,5 a 16 dias com 1 e 14 mm de CR, situação encontrada em *D. leporina* aos 45 dias e com 40,8 mm de CR.

Em *D. leporina* ao 45° dia, o conceito assume a conformação de feto em desenvolvimento, com conformação característica de indivíduo adulto possuindo nariz alongado, pele tornando-se opaca, com cabeça, cauda e membros claramente visíveis, vibrissas próximo as narinas e um tubérculo genital indiferenciado, a exemplo do citado em fetos de *D. prymnolopha* (FORTES et al., 2013), em *Oligoryzomys sp.* (FAVARON et al., 2012) entre 17 e 18,5 dias com 18 a 22 mm de CR, em fetos de *N. lasiurus* com 18 e 18,5 dias (OLIO et al., 2014). Da mesma forma Evans e Sack (1973) descreve no *Cavia porcellus* aos 31 dias de desenvolvimento um plano nasal evidente, dígitos separados e os membros em grau igualitário de desenvolvimento, similar ao observado em *D. leporina* ao 45° dia. Já em *Octodon degus* (ROJAS et al., 1982), os membros torácicos apresentavam dígitos formados entre 41 e 45 dias, estando os membros pélvicos somente com os raios digitais formados, diferindo do observado em *D. leporina*, em que nesta idade os dígitos dos membros torácicos e pélvicos estavam completamente formados. Fortes et al. (2013) acrescentam que nesta fase em fetos de *D. prymnolopha*, nota-se as costelas através de marcas claras na região torácica e os órgãos internos abdominais visualizados através de marcas escuras, ausência de saliência hepática, vesículas ópticas simétricas e circulares com retina pigmentada e cordão umbilical na região caudal, semelhante ao verificado em *D. leporina*.

Ao 55º dia os fetos de *D. leporina* possuem as regiões do corpo bem definidas, pele lisa e ainda transparente, pavilhão auricular externo é proeminente, formação de unhas e presença do tubérculo genital, corroborando com os dados em fetos de *C. paca* (FRANCIOLLI, 2007) com 57 a 68 mm de CR e em *N. lasiurus* (OLIO et al., 2014) entre 16,5 e 17,5 dias com 16,5 a 18 mm de CR, respectivamente. Para Rojas et al. (1982) aos 56 dias em fetos de *Octodon degus*, as pálpebras estavam presentes e ainda fundidas, o pavilhão auricular era mais desenvolvido, a hérnia umbilical tinha sido reduzida e os dentes começavam a surgir, iniciando também nesta fase o processo de diferenciação sexual, semelhante ao que relatado em *Myocastor coypus* (FELIPE et al., 2006) e o observado em *D. leporina*. Por sua vez, os resultados observados em *D. leporina* diferem do descrito em *M. coypus* por Felipe et al. (2006), quando estes citam que nesta espécie ocorre a presença de membrana interdigital nos dedos dos membros pélvicos aos 60 dias pós cópula, estrutura característica para espécie.

No 65º dia em *D. leporina*, a pele é lisa e de coloração esbranquiçada, percebendo-se uma mancha escura na região torácica e abdominal, indicando a formação dos órgãos presentes nessas cavidades; pequenos pelos tácteis na região facial, na porção médio-ventral da mandíbula e alguns pelos nas sobrancelhas e na região caudal entre olho e orelha. Estas características foram relatadas no *Octodon degus* aos 66 dias (ROJAS et al., 1982) e em fetos de *C. paca* (FRANCIOLLI, 2007) com 96 a 105 mm de CR. Em *D. leporina*, a partir dos 65 dias é possível identificar o sexo, diferente do relatado em fetos de *Octodon degus*, cuja diferenciação ocorre entre 72 e 82 dias (ROJAS et al., 1982), em *M. coypus* que ocorre aos 90 dias pós cópula (FELIPE; MASSON, 2008) e em *D. prymnolopha*, onde Fortes et al. (2013) relata a definição do sexo aos 75 dias de desenvolvimento. Neste último caso a diferença entre as espécies de cutia pode estar relacionado ao fato dos autores não terem estudado um período intermediário entre 55 e 75 dias, haja visto que aos 75 dias em *Dasyprocta leporina*, a diferenciação está completa. Por sua vez, Santos et al. (2014) citam que no *Galea spixii*, o sexo pode ser diferenciado a partir do 20º dia de desenvolvimento, diferente do verificado em *Dasyprocta leporina*. Esta diferença entre os dois cavídeos pode estar associada ao período curto de gestação do *Galea spixii*.

Aos 75 dias em *D. leporina* os fetos mostraram diferenciação completa das regiões do corpo, com pele mais espessa e pigmentada com pelos finos distribuídos por todo corpo, pavilhão auricular externo desenvolvido, boca com dentes incisivos superior e inferior em fase de erupção e mamas presentes, características semelhantes ao relatado em fetos de *Octodon degus* entre 72 e 82 dias (ROJAS et al., 1982), de *M. coypus* aos 90 dias pós cópula

(FELIPE; MASSON, 2008) e aos de *Dasyprocta prymnolopha* aos 75 dias de desenvolvimento (FORTES et al., 2013).

Aos 85 dias em *D. leporina* os fetos mostraram diferenciação completa das regiões do corpo, pele espessa e pigmentada em cinza, com exceção do ventre, que se apresentou na coloração clara, pelos tácteis maiores e olhos, nariz, mandíbula e cavidade oral definidos, dentes bem desenvolvidos, cauda maior que estágio anterior, características semelhantes ao descrito por Olio et al. (2014) em fetos no estágio que compreende 28 a 30 mm de CR. Da mesma forma, em *Necomys lasiurus* (OLIO et al., 2014) nas idades gestacionais estimadas entre 19 e 19,5 dias pós cópula, os fetos possuíam uma região craniana formada com uma mandíbula desenvolvida e região nasal formada com pelos tácteis espessos e canal auditivo fechado, semelhante ao verificado em *D. leporina*.

Aos 100 dias os fetos de *D. leporina*, encontravam-se totalmente formados com os pelos distribuídos por todo o corpo, garras e dentes completamente desenvolvidos, característico de fetos maduros em final de gestação, possuindo corpo totalmente formado e tamanho bem próximos aos animais dos recém-nascidos, corroborando com o citado em outros roedores (EVANS; SACK, 1973; FRANCIOLLI, 2007; OLIO et al., 2014). Este estágio de desenvolvimento em *D. leporina*, equivale ao descrito em *M. coypus* (FELIPE; MASSON, 2008), na idade entre 120 e 135 dias pós cópula, cujos autores observaram uma cobertura corporal constituída por pelos densos, característica do animal recém-nascido. Em *D. prymnolopha*, Fortes et al. (2013) acrescentam ainda que aos 100 dias, os olhos, narinas e os condutos auditivos estavam abertos, os cílios e pavilhões auriculares completamente formados e unhas bem desenvolvidas, a exemplo do observado neste estudo em *D. leporina*. Por sua vez, em ratos (THEILER, 1989; KAUFMANN, 2007) os olhos permanecem fechados até o final da gestação, diferente do encontrado em *D. leporina*. No *G. spixii*, Santos et al. (2014) mencionam que aos 50 dias, os fetos machos apresentavam um pênis com óstio uretral e uma cavidade prepucial, enquanto, na fêmea, tinha-se o clitóris com uma abertura de óstio da uretra e a vagina possuindo a membrana de oclusão vaginal, características que assemelham-se ao observado em *D. leporina* aos 100 dias de desenvolvimento.

Ao nascimento, os filhotes de *D. leporina* apresentavam-se com os pelos eriçados e os olhos abertos, diferindo do relatado em *Octodon degus* (ROJAS et al., 1982), em que os filhotes podem apresentar os olhos fechados ao nascer.

Os valores de CR obtidos em *D. leporina* no início da gestação aos 35 dias ($15,6 \pm 0,16$ mm), assemelharam-se ao relatado em *D. prymnolopha* (FORTES et al., 2013), entretanto difere desta última no final da gestação, mais especificamente no estágio de 100 dias p.c.,

sendo que os fetos de *D. leporina* possuíram valores de $164,3 \pm 10,4$ mm, valores acima do relatado em *D. prymnolopha* com $137,5 \pm 4,9$ mm.

Quanto aos valores de peso dos fetos aos 100 dias p.c. em *D. leporina* verificou-se que o peso foi de $166,5 \pm 7,8$ g superiores ao relatado em *D. prymnolopha*, onde Fortes et al. (2013) citam $136,65 \pm 9,4$ g, sendo possível inferir que os fetos de *D. leporina* ao final da gestação são maiores e mais pesados, fato que pode estar atrelado a variação interespecífica e/ou individual ou ainda ao número de fetos por parto, haja visto que em *D. leporina* os fetos de 100 dias foram provenientes de fêmeas diferentes, enquanto em *D. prymnolopha* os fetos foram de uma única fêmea.

Ao nascimento, os neonatos de *D. leporina* apresentaram peso médio de $201,88 \pm 1,896$ g, diferindo do relatado por Pinheiro et al. (1989), quando observaram um peso médio de $171,74 \pm 3,10$ g, variação que pode estar atrelada ao número de neonatos por parto ou até mesmo dieta alimentar.

6.6 CONCLUSÃO

A morfogênese do concepto em *D. leporina* entre 30 a 100 dias de gestação, permitiu estabelecer o desenvolvimento embrionário e fetal, possibilitando a comparação com outros roedores, como pacas, ratos, cobaias nos diferentes estádios de desenvolvimento, dando a devida atenção para as etapas gestacionais e particularidades de cada espécie. Os dados biométricos realizados nas diferentes idades gestacionais e em recém-nascidos determinaram a curva de crescimento intrauterino na espécie, permitindo que a idade gestacional possa ser estimada por exame ultrassonográfico e/ou em casos de abortos, contribuindo para o manejo reprodutivo racional da espécie em cativeiro.

Os dados permitem ainda que se possa afirmar que as espécies mamíferas guardam entre si um padrão de desenvolvimento embrionário comum, que se particulariza com o amadurecimento do feto.

REFERÊNCIAS

ASSIS-NETO, A. C.; MELO, M. I. V.; CARVALHO, M. A. M.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F.; MENEZES, D. J. A.; PAPA, P. C.; KFOURY JÚNIOR, J. R. Análise qualitativa do estabelecimento da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n.3, p. 180-184, 2003a.

BARBINO, M. T.; OLIVEIRA, C. M.; FONSECA, E. T.; FAVARON, P. O.; RODRIGUES, M. N. et al. Anatomia do coração de fetos de Guiné pig em final de gestação (*Cavia porcellus* [Linnaeus, 1758]). **Biotemas**, Florianópolis, 24: 91-96, 2011.

BARBINO, M. T.; OLIVEIRA, C. M.; FONSECA, E. T.; FAVARON, P. O.; RODRIGUES, M. N. et al. Anatomia do fígado de fetos de Guiné pig em final de gestação (*Cavia porcellus* [Linnaeus, 1758]). **Biotemas**, Florianópolis, v. 24, p. 97-103, 2011.

BEAUDOIN, S.; BARBET, P.; BARGY, F. Developmental stages in the rabbit embryo: Guidelines to choose an appropriate experimental model. **Fetal Diagnosis and Therapy**, Basel, v. 18, p. 422-427, 2003.

CAMPOS, L. B.; PEIXOTO, G. C. X.; LIMA G.L.; CASTELO T. S.; SOUZA A. L. P.; OLIVEIRA M. F.; SILVA A. R. Monitoramento do ciclo estral de cutias (*Dasyprocta leporina* Lichtenstein, 1823) através de citologia esfoliativa vaginal e ultrassonografia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 35, n.2, p.188-192, 2015.

CARLETON, M.D.; MUSSER, G.G. **Order Rodentia**. In: Mammal Species of the World - A Taxonomic and Geographic Reference, v.2.ed. D.E. Wilson e D. M. Reeder, Baltimore: JHU Press, 2005. p. 745-752.

CONCEIÇÃO, R. A.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; CARVALHO, A. F.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Aspectos morfológicos do saco vitelino em roedores da Sub-Ordem Hystricomorpha: paca (*Agouti paca*) e Cutia (*Dasyprocta agouti*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 28, p. 553-259. 2008.

DEUTSCH, L.A.; PUGLIA, L.R. **Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo**. São Paulo: Globo, 2ª ed., 1990. 191p.

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

FAVARON, P. O.; RODRIGUES, M. N.; OLIVEIRA, M. F.; BIASI, C. M.; MIGLINO, M. A. Embryonic and Fetal Development in – Pigmy RiceRat – *Oligoryzomys* sp. (Rodentia, Sigmodontinae) and its Significance for Being a new Experimental Model. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlim, v. 41, p. 286–299, 2012.

FELIPE, A. E.; MASSON, P. G.; RODRÍGUEZ, J. A.; ALZOLA, R. H. External morphological characterization of 60-days gestation *Myocastor coypus* (Coipu) fetuses. **International Journal of Morphology**, Misión, v. 24, n. 1, p.71-76, 2006.

FELIPE, A. E.; MASSON, P. G. Observations on the fetal morphology in *Myocastor coypus* Bonariensis (*Coypu*) (Rodentia Myocastoridae). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlim, 37, 469–474, 2008.

FORTES, E. A. M.; FERRAZ, M. S.; BEZERRA, D. O.; CONDE JÚNIOR, A. M.; CABRAL, R. M.; SOUSA, F. C. A.; ALMEIDA, H.M.; PESSOA, G.T.; MENEZES, D. J. A.; GUERRA, S. P. L.; SAMPAIO, I. B. M.; ASSIS NETO, A. C.; CARVALHO, M. A. M.

Prenatal development of the agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831): external features and growth curves. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 140, p. 195-205-205, 2013.

FRANCIOLLI, A. L. R. **Desenvolvimento embriológico e fetal em pacas (Agouti paca, Linnaeus 1766): estabelecimento de modelo experimental análogo murino para detecção de linhagens “Germ Cells”**. 2007. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

FRANCIOLLI A, L.R.; AMBRÓSIO, C.E.; OLIVEIRA, M.F.; MORINI, A.C.; FAVARON, P.O.; MACHADO, M.R.F.; MIGLINO, M.A. South-American hystricomorphs: A comparative analysis of embryological development. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 31, n. 5, p. 441-446, 2011a.

GALETTI, M.; DONATTI, C. I.; STEFFLER, C.; GENINI, J.; BOVENDORP, R. S.; FLEURY, M. The role of seed mass on the caching decision by agoutis, *Dasyprocta leporina* (Rodentia: Agoutidae). **Zoologia (Curitiba)**, Curitiba, v. 27, n. 3, p. 472-476, 2010.

GUIMARÃES, D. A. A.; RAMOS, R. S. L.; GARCIA, G. W.; OHASHI, O. M. The stimulatory effect of male agouti (*Dasyprocta prymnolopha*) on the onset of female puberty. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 4, p. 759-762, 2009.

HITTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Essentials of domestic animal embryology**. China: Saunders Elsevier. 2010. 472p.

HOSKEN, F. M.; SILVEIRA, A. C. **Criação de cutias**. 4 ed. Viçosa: Aprenda fácil, p. 231, 2001.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY EMBRYOLOGICAL NOMENCLATURE: **Nomina anatômica veterinária**. 2. ed. Knoxville: World Association on Veterinary Anatomist, 2006. 36 p.

KAUFMANN, M. H. **The Atlas of Mouse Development**. London: Elsevier Academic Press. 2008. 305 p.

KNOSPE, C. Periods and stages of the prenatal development of the domestic cat. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 31, p. 37-51, 2002.

MELLO, R. A. **Embriologia comparada e Humana**. Atheneu editora, São Paulo. 1989.

MIGLINO, M. A.; CARTER, A.; DOS SANTOS FERRAZ, R. H.; FERNANDES MACHADO, M. R. Placentation in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), agouti (*Dasyprocta agouti*) and paca (*Agouti paca*). **Placenta**, Londres, v. 23, p. 416-428, 2002.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda, 2004. 609 p.

OLIO, R. L.; FAVARON, P. O.; LOBO, L. M.; LIMA, W. S.; SANTOS, A. C.; VIANA, D. C.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Characterization of Embryonic and Fetal

Development of *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae). **Journal of Cytology and Histology**, Pittsburgh, v. 5, n.4, 2014.

OLIVEIRA, G. B. **Desenvolvimento placentário em cutias (*Dasyprocta aguti* Linnaeus, 1766)**. 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2012.

PINHEIRO, R. M.; ANDRADE, S. A.; CUNHA, J. N. Preservação e exploração de animais silvestres nativos: preá, cutia e mocó. **Caatinga**, Mossoró, v. 6, p.28-49, 1989.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 2 ed. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2011. 439p.

ROBERTS, C. M.; PERRY, J. S. Hystricomorph embryology. **Symposia of the Zoological Society of London**, Londres, v. 34, p. 333–360, 1974.

RODRIGUES, R. F.; MIGLINO, M. A.; FERRAZ, R. H. S.; MORAIS-PINTO, L. Placentação em cutias (*Dasyprocta aguti*, CARLETON, M.D.): aspectos morfológicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, p. 133-137, 2003.

ROJAS, M. A.; MONTENEGRO, M. A.; MORALES, B. Embryonic development of the degu, *Octodon degus*. **Journal of Reproduction Fertility**, Avicena, v. 66, p. 31-38, 1982.

SALVADORI, M. L.; LESSA, T. B.; RUSSO, F. B.; FERNANDES, R. A.; KFOURY, J. R. J.; BRAGA, P. C. B. B.; MIGLINO, M. A. Mice embryology: a microscopic overview. **Microscopy Research and Technique**, Nova Iorque, v.75, n. 10, p.1437-1444, 2012.

SANTOS, A. C.; OLIVEIRA, M. F.; VIANA, D. C.; ASSIS NETO, A. C. Sexual differentiation of the external genitalia in embryos and fetuses in the Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii*). **Placenta**, Londres, v. 35, n. 9, 2014.

SOUSA, F.C.A.; ALVES, F.R.; FORTES, E.A.M.; FERRAZ, M.S.; MACHADO JÚNIOR, A.A.N.; MENEZES, D.J.A.; CARVALHO, M.A.M. Pregnancy in Hystrico-morpha: gestational age and embryonic-fetal development of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler 1831) estimated by ultrasonography. **Theriogenology**, Stoneham, v.78, p.1278–1285, 2012.

STERBA, O. Prenatal growth of the mole, *Talpa europaea* Linn., 1758. **Folia Morphology**, v. 23, p.282-286, 1975.

WOODS, C.A.; KILPATRICK, C.W. Infraorder Hystricognathi. In: WILSON, D.A.M.; REEDER, D.A. (Ed.) **Mammal Species of the World**. A Taxonomic and Geographic Reference, Baltimore: JHU Press, 2005, p. 1556.

THEILER, K. **The House Mouse: Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age**. Springer Verlag, New York. 1972.168p.

ANEXOS

ANEXO A- TABELA 1 (CAPÍTULO 2)

ANEXO B- TABELA 2 (CAPÍTULO 2)

mANEXO C- TABELA 1 (CAPÍTULO 4)

ANEXO D- TABELA 2 (CAPÍTULO 4)

ANEXO E- TABELA 3 (CAPÍTULO 4)

**ANEXO F- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
(CEUA/UFERSA)**

**ANEXO G- SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE (SISBIO)**

ANEXO A

Tabela 1- Anticorpos Utilizados para marcação do condroitim sulfato e ácido hialurônico nos órgãos reprodutores e na placenta e subplacenta de cutias fêmeas.

Produto	Descrição	Diluição	Referência
Anti-Chondroitin Sulfate antibody [CS-56]	Anticorpo monoclonal de camunundongo [CS-56] contra Condroitim Sulfato	1:300	Ab11570
Anti-Hyaluronic acid antibody	Anticorpo policlonal de ovelha contra ácido hialurônico	1:300	Ab53842

ANEXO B

Tabela 2- Correlação dos níveis séricos de estradiol e glicosaminoglicanos totais nos órgãos reprodutores de cutias fêmeas nos terços inicial, médio e final de gestação.

Órgão	Fases da gestação					
	Terço Inicial		Terço Médio		Terço final	
	p	r	p	r	p	r
Corno Uterino gestante	0.5689	-0.62658	0.9651	-0.05474	0.9483	0.08104
Corno Uterino não gestante	-	-	0.5527	0.64626	-	-
Corpo do Útero	-	-	0.6535	0.51775	0.6688	0.49707
Cérvix	-	-	0.5670	0.62890	0.2959	0.89389
Vagina	-	-	0.3267	0.87116	0.7193	-0.42673

*p<0,05

ANEXO C

Tabela 1- Média e desvio padrão do peso e comprimento crown-rump de embriões e fetos de cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758).

Idade (dias p. c.)	CR (mm)	Peso (g)
30	10,75 ± 0,106066	0,1745 ± 0,028
32	10,97 ± 0,367696	0,192 ± 0,039
35	15,585 ± 0,162635	0,392 ± 0,023
40	19,465 ± 0,077782	1,344 ± 0,011
45	40,82 ± 0,424264	5,208 ± 0,131
55	58,815 ± 0,106066	11,777±0,035
65	83,02 ± 0,084853	29,220 ± 0,467
75	97,075 ± 3,514321	56,269 ± 1,438
85	127,725 ± 0,586899	96,565 ± 7,375
100	164,265 ± 10,41568	166,5 ± 7,778
RN (110 dias)	179,085 ± 0,544472	201,88 ± 1,896

CR: comprimento crown-rump; p.c.: pós-cópula; RN: recém-nascido.

ANEXO D

Tabela 2- Média e desvio padrão das medidas corpóreas de embriões e fetos de cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758), em diferentes idades pós-cobertura, medidas em milímetros.

Idade (dias p.c.)	CT	CEF	CC	HC	DBP	DMA	DME	OR	CMT	CMP	PT	PA	C
30	33,56 ± 0,59	10,44 ± 0,35	23,11 ± 0,94	17,97 ± 0,13	3,72 ± 0,55	1,07 ± 0,01	0,78 ± 0,04	-	2,96 ± 0,01	3,23 ± 0,01	15,93 ± 0,08	11,58 ± 2,99	3,89 ± 0,15
32	33,82 ± 0,91	12,83 ± 3,69	23,80 ± 0,64	18,29 ± 0,42	3,88 ± 0,95	1,11 ± 0,03	0,85 ± 0,11	-	3,02 ± 0,19	3,48 ± 0,79	16,03 ± 1,42	12,09 ± 3,479	3,98 ± 0,09 9
35	36,79± 0,01	17,38 ± 0,44	19,41 ± 0,45	22,04 ± 0,11	5,02 ± 0,05	1,54 ± 0,05	1,15 ± 0,01	-	4,72 ± 0,16	4,95 ± 0,17	17,94 ± 0,20	15,34 ± 0,44	3,69 ± 0,13
40	46,55 ± 2,68	20,275 ± 0,02	26,27 ± 2,70	26,58 ± 3,48	6,59 ± 0,41	1,95± 0,04	1,53 ± 0,12	2,46 ± 0,01	5,35 ± 0,30	6,165 ± 0,19	20,15 ± 0,75	20,035 ± 0,176	3,27 5 ± 0,05
45	73,77 ± 0,62	29,54 ± 0,19	44,24 ± 0,43	41,95 ± 0,42	10,0 4 ± 0,08	4,88 ± 0,14	4,32 ± 0,16	4,78 ± 0,04	17,74 ± 0,46	24,86 ± 0,078	36,94 ± 0,03	40,84 ± 0,06	3,61 ± 0,06
55	103,02 ± 0,21	37,56 ± 0,03	65,46 ± 0,18	54,92 ± 0,23	14,7 9 ± 0,11	7,23 ± 0,12	6,71 ± 0,06	7,78 ± 0,26	29,89 5 ± 0,16	34,63 ± 0,1	44,64 ± 0,17	47,54 ± 0,30	4,19 ± 0,06
65	127,94 ± 0,44	44,07± 0,29	83,87 ± 0,35	68,31 ± 0,38	18,9 2 ± 0,16	9,33 ± 0,21	7,01 ± 0,57	11,5 4 ± 0,47	47,4 ± 0,11	58,57 ± 0,18	63,61 ± 0,29	66,98 ± 0,67	4,26 ± 0,7
75	145,46 ± 5,13	58,115 ± 3,66	87,35 ± 1,48	81,67 ± 1,39	21,8 4 ± 0,68	9,76 ± 0,20	7,91 ± 0,007	15,1 7 ± 0,11	56,83 ± 3,97	67,55 ± 0,31	71,67 ± 1,02	87,51 ± 0,43	5,2 ± 0,01
85	172,43 ± 5,89	64,04 ± 1,37	108,39 ± 4,53	96,23 ± 3,68	25,3 4± 0,50	10,6 ± 0,49	8,16 ± 0,30	21,1 9 ± 0,14	72,40 5 ± 3,22	101,97 ± 0,73	100,45 ± 3,03	115,13 ± 0,17	10,6 ± 0,97
100	219,72 ± 21,97	74,22 ± 2,01	145,5 ± 19,69	105,25 ± 10,87	28,2 ± 1,05	11,17 ± 1,10	9,1 ± 0,14	22,2 6 ± 0,40	96,21 5 ± 1,32	121,75 ± 7,5	121,64 ± 9,25	139,9± 11,6	11,5 5 ± 0,09
RN	224,68 ± 1,82	75,08 ± 10,45	155,7 ± 18,82	106,98 ± 3,55	27,2 8 ± 0,52	13,71 ± 1,02	9,65 ± 0,13	23,6 7 ± 0,85	96,57 ± 0,16	142,68 ± 5,01	120,92 ± 2,45	132,33 ± 5,01	11,8 8±0, 6

CT: comprimento total; CEF: comprimento cefálico; CC: céfalo-caudal; HC: circunferência cefálica; DBP: diâmetro biparietal; DMA: diâmetro maior do olho; DME: diâmetro menor do olho; OR: comprimento da orelha; CMT: comprimento do membro torácico; CMP: comprimento do membro pélvico; PT: perímetro torácico; PA: perímetro abdominal; C: cauda.

ANEXO E

Tabela 3- Média e desvio padrão das medidas corpóreas de embriões, fetos e animais recém-nascidos aos 110 dias, de cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758), medidas em milímetros.

Idade (dias p.c.)	TB	RU	CUT	CUP	LUT	LUP	DIS	DII
45	8,28 ± 0,06	6,96 ± 0,04	0,71 ± 0,03	1,36 ± 0,05	0,78 ± 0,03	1,22 ± 0,06	-	0,8 ± 0,03
55	13,75 ± 0,16	10,58 ± 0,08	1,37 ± 0,03	2,5 ± 0,06	1,33 ± 0,03	1,55 ± 0,04	0,69 ± 0,02	1,06 ± 0,05
65	20,92 ± 0,31	16,98 ± 0,05	2,49 ± 0,38	3,5 ± 0,01	1,41 ± 0,03	1,93 ± 0,05	1,50 ± 0,04	2,39 ± 0,03
75	27,15 ± 1,31	19,58 ± 0,15	3,59 ± 0,05	3,59 ± 0,04	1,54 ± 0,08	2,97 ± 0,22	1,89 ± 0,13	4,26 ± 0,54
85	33,5 ± 0,14	25,13 ± 0,56	4,89 ± 0,06	6,82 ± 0,33	1,60 ± 0,007	2,25 ± 0,007	2,56 ± 0,15	6,31 ± 0,11
100	43,32 ± 1,43	33,01 ± 0,48	7,51 ± 2,59	8,66 ± 2,98	1,53 ± 0,35	6,72 ± 1,68	3,18 ± 0,95	8,26 ± 0,55
RN-110	48,86 ± 1,03	34,62 ± 0,93	5,95 ± 0,33	5,83 ± 0,24	2,19 ± 0,04	6,18 ± 0,30	3,5 ± 0,42	9,63 ± 0,15

TB: comprimento da tíbia; RU: rádio/ulna; CUT: comprimento das unhas dos membros torácicos; CUP: comprimento das unhas dos membros pélvicos; LUT: largura das unhas dos membros torácicos; LUP: largura das unhas dos membros pélvicos; DIS: comprimento dos dentes incisivos superiores; DII: comprimento dos dentes incisivos inferiores.

ANEXO F



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROJETO ENCAMINHADO A CEUA-UFERSA

Parecer Nº 16/2014 PROCESSO Nº 23091.005467/2013-01

Data de Entrada: 17/12/2013 Aprovado: 31/07/2014

1. Responsável:

Moacir Franco de Oliveira

2. Título do Projeto

*GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS NOS EVENTOS REPRODUTIVOS DE CUTIAS FÊMEAS
(Dasyprocta aguti Linnaeus, 1766)*

Considerações:

Após apreciação pelos membros, a comissão julgou que os esclarecimentos ao memorando CEUA 01/2014 foram satisfatórios. O projeto tem relevância científica e está dentro das especificações da CEUA. Durante os procedimentos, os animais serão acondicionados adequadamente e serão submetidos a estresse ou sofrimento mínimos. O procedimento de eutanásia dos animais está de acordo com a Resolução n. 714 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Todo o procedimento de manipulação dos animais será realizado com acompanhamento técnico especializado e com o uso de material adequado.

3. Parecer final:

FAVORÁVEL à aprovação do projeto

Mossoró, 31 de julho de 2014.

Atenciosamente,

Profª Emanuelle Fontenele Rabelo
Emanuelle Rabelo
Presidente
Comissão de Ética no uso de animais
Emanuelle Fontenele Rabelo
Presidente CEUA

ANEXO G



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: 37987-3	Data da Emissão: 27/12/2015 22:14	Data para Revalidação*: 25/01/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: GLEIDSON BENEVIDES DE OLIVEIRA	CPF: 013.586.734-70
Título do Projeto: GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS EM EVENTOS REPRODUTIVOS DE CUTIAS FÊMEAS (<i>Dasyprocta aguti</i> Linnaeus, 1766)	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e processamento do material	11/2013	05/2014
2	Projeto Piloto	12/2013	02/2014
3	Formação de quatro grupos	02/2014	07/2014
4	Processamento do material com os dados de morfologia	06/2014	12/2014
5	Processamento de material para quantificação e identificação dos GAGs do plasma sanguíneo	04/2015	11/2015
6	Processamento do material coletado para isolamento e purificação dos GAGs sanguíneos	06/2015	12/2015
7	Análise do material coletado para quantificação química e determinação da massa molecular dos glicos	01/2016	07/2016
8	Defesa da Tese	12/2016	12/2016
9	Relatório final	01/2017	02/2017

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 passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas à autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de 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, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado 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).
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	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	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. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	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.

Outras ressalvas

1	- As fêmeas serão posteriormente eutanasiadas, porém por serem oriundas de criadouro, esta autorização cabe à administração do mesmo. - É obrigatório o acompanhamento do veterinário relacionado na equipe nas atividades que envolvem a sedação dos animais.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA	Orientador	325.949.504-59	552984 SSP-RN	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. 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: 62755486



Página 1/4



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: 37987-3	Data da Emissão: 27/12/2015 22:14	Data para Revalidação*: 25/01/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: GLEIDSON BENEVIDES DE OLIVEIRA	CPF: 013.586.734-70
Título do Projeto: GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS EM EVENTOS REPRODUTIVOS DE CUTIAS FÊMEAS (<i>Dasyprocta aguti</i> Linnaeus, 1766)	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

2	Hugo Alexandre de Oliveira Rocha	Co-Orientador	761.118.304-49	1163386 SSP-RN	Brasileira
3	CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA	Colaborador	035.979.594-31	1571286 SSP-RN	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MOSSORO	RN	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA)	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Dasyprocta aguti</i>

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Fragmento de tecido/órgão, Sangue
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Puça, Outros métodos de captura/coleta (Uso de medicação para anestesia e anestesia)
3	Método de marcação (Outros mamíferos)	Tatuagem (tinta)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	criadouro científico

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. 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: 62755486



Página 2/4



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: 37987-3	Data da Emissão: 27/12/2015 22:14	Data para Revalidação*: 25/01/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: GLEIDSON BENEVIDES DE OLIVEIRA	CPF: 013.586.734-70
Título do Projeto: GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS EM EVENTOS REPRODUTIVOS DE CUTIAS FÊMEAS (<i>Dasyprocta aguti</i> Linnaeus, 1766)	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, 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

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. 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: 62755486



Página 3/4



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: 37987-3	Data da Emissão: 27/12/2015 22:14	Data para Revalidação*: 25/01/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: GLEIDSON BENEVIDES DE OLIVEIRA	CPF: 013.586.734-70
Título do Projeto: GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS EM EVENTOS REPRODUTIVOS DE CUTIAS FÊMEAS (<i>Dasyprocta aguti</i> Linnaeus, 1766)	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. 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: 62755486



Página 4/4