

Marlúcia Bastos Aires

**Aspectos histológicos do útero, tuba
uterina e ovário de búfalas (*Bubalus bubalis*)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia - UNESP, Campus de Botucatu,
para a obtenção de título de Mestre, Área de
Concentração em Reprodução Animal

Orientadora: Prof. Dra. Eunice Oba

Botucatu - SP

2003

Marlúcia Bastos Aires

**Aspectos histológicos do útero, tuba
uterina e ovário de búfalas (*Bubalus bubalis*)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia - UNESP, Campus de Botucatu,
para a obtenção de título de Mestre, Área de
Concentração em Reprodução Animal

Orientadora: Prof. Dra. Eunice Oba

Botucatu - SP

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Aires, Marlúcia Bastos.

Aspectos histológicos do útero, tuba uterina e ovário de búfalos (*Bubalus bubalis*) / Marlúcia Bastos Aires. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2003.

Orientadora: Eunice Oba

Assunto CAPES: 50504002

1. Búfalo - Reprodução 2. Búfalo - Histologia

CDD 636.292

Palavras-chave: Útero; Tuba uterina; Ovário; Histologia; Morfometria; Búfala; Progesterona; Estradiol

“ O acaso vai me proteger enquanto eu
andar distraído “

Titãs

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, pela oportunidade concedida para realização dessa pesquisa.

Ao CNPq, pela bolsa concedida para a realização desse curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao projeto.

À Professora Dra. Eunice Oba, pela orientação, estímulo e paciência constantes.

Ao Professor Alcides de Amorim Ramos pela essencial ajuda na realização da análise estatística deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, em especial ao Prof. João Carlos Pinheiro Ferreira, Prof. Sony Dimas Bicudo e Profa. Maria Denise Lopes.

Aos professores, Profa. Maria Dalva Cesáreo, Prof. Sérgio Felisbino, Prof. Luiz Fernando e Profa. Maeli Dal Pai, e aos funcionários, Vicente, Ricardo, Sueli, José Eduardo e Jarbas do Departamento Morfologia do Instituto de Biociências, pelo respeito com que trataram o trabalho e pelos ensinamentos básicos em histologia, essenciais para a minha formação.

Aos amigos do curso de pós-graduação, Dorça Helena, Luciana Batalha, Luciana Leal e Ian Martin, pela convivência amigável. Em especial a minha amiga Fabíola Carvalho, pela animação e alto astral nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho e da vida.

Ao meu querido namorado Luiz Gonzaga, pelo amor e apoio em todos os momentos dessa jornada.

Aos meus pais, pelos ensinamentos e compreensão mesmo à distância.

SUMÁRIO:

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	10
1-INTRODUÇÃO.....	12
2-REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1-Útero.....	14
2.2-Tuba Uterina.....	22
2.3-Ovário.....	29
2.4-Concentração Hormonal Plasmática.....	32
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1-Microscopia de Luz.....	36
3.2-Análise Morfológica.....	38
3.3-Análise Morfométrica.....	40
3.3.1-Útero.....	40
3.3.2-Tuba Uterina.....	41
3.4-Concentração Hormonal Plasmática.....	41
3.5-Análise Estatística.....	42
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1-Análise Morfológica.....	43
4.1.1-Útero.....	44
4.1.2-Tuba Uterina.....	58
4.1.3-Ovário.....	67
4.2-Análise Morfométrica.....	72
4.2.1-Útero.....	72
4.2.2-Tuba Uterina.....	84
4.3-Concentração Hormonal Plasmática.....	87

5-CONCLUSÕES.....	90
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
7-APÊNDICE.....	104
RESUMO	105
ABSTRACT.....	107

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fotomicrografia das três camadas do útero: endométrio (E), miométrio (M) com as subcamadas circular interna (CI) apresentando vasos sangüíneos (seta), a longitudinal externa (LE), e o perimétrio (P). Masson, x 40.....45
- Figura 2:** Fotomicrografia do endométrio com os estratos compacto (EC), esponjoso (EE) e basal (EB). HE, x 40.....45
- Figura 3:** Fotomicrografia do endométrio com os estratos compacto (EC), esponjoso (EE) e o basal (EB) constituído de tecido conjuntivo denso com fibras colágenas coradas em verde (seta). Masson, x 40.....46
- Figura 4:** Fotomicrografias do epitélio luminal uterino do útero de búfalas. A) epitélio pseudo-estratificado (HE, x 100), B) epitélio cilíndrico simples (HE, x 992), C) células epiteliais com microvilosidades (PAS, x 250), D) células secretoras com núcleo mais basofílico, estreito e citoplasma eosinofílico com grânulos de secreção (seta) (HE, x 250).....49
- Figura 5:** Fotomicrografias de glândulas uterinas. A) tubular simples, B) ramificada. HE, A x 100, B x 992.....50
- Figura 6 A, B:** Fotomicrografias de glândulas uterinas superficiais com cílios (seta). HE, x 100.....50
- Figura 7:** Fotomicrografia mostrando glândulas uterinas com vacuolização supranuclear (seta). HE, x 100.....51
- Figura 8 A, B:** Fotomicrografias de glândulas uterinas com células epiteliais em mitose (seta) e com reação ao PAS (*). A x 992, B x 2470.....51
- Figura 9:** Fotomicrografia de glândulas uterinas com células secretoras (seta) apresentando reação ao PAS, x 100.....53
- Figura 10:** Fotomicrografia do endométrio apresentando edema no estroma evidenciado por mais espaço entre as células. HE, x 100.....53
- Figura 11:** Fotomicrografia de uma carúncula (seta). HE, x 40.....53

Figura 12: Fotomicrografia da camada serosa do útero constituída de tecido conjuntivo frouxo, vasos sangüíneos (seta) e coberta por um mesotélio (cabeça de seta). HE, x 992.....	55
Figura 13: Fotomicrografia da camada serosa (S) emitindo septos (seta) delicados corados em verde em direção à subcamada longitudinal externa (LE) do miométrio. Masson, x 80.....	55
Figura 14 A, B: Fotomicrografias mostrando fibrose periglandular (seta). HE, x 992.....	57
Figura 15 A, B: Fotomicrografias mostrando infiltrados inflamatórios (INF) no endométrio e ao redor de glândulas. HE, A x 250, B x 100.....	57
Figura 16: Fotomicrografia de um corte transversal da tuba uterina, na região do istmo, mostrando a mucosa (M), muscular (MU) e a serosa (S). HE, x 62.....	59
Figura 17: Fotomicrografia do epitélio de revestimento da tuba uterina, na região da ampola, mostrando células ciliadas (CC), secretoras (CS) e basais (CB). PAS, x 250.....	59
Figura 18 A Fotomicrografia do epitélio de revestimento da tuba uterina e lâmina própria com vasos sangüíneos (V) e fibras colágenas (seta). Masson, x 992.....	61
Figura 18 B Fotomicrografia a lâmina própria da tuba uterina com vasos sangüíneos (V) e um plasmócito (seta). HE, x 250.....	61
Figura 19: Fotomicrografias do epitélio de revestimento pseudo-estratificado alto na fase folicular (A) e baixo na fase lútea (B), na região da ampola, com protrusões citoplasmáticas das células secretoras apresentando grânulos com reação ao PAS (seta). x 250. 100.....	64
Figura 20: Fotomicrografia do epitélio de revestimento da tuba uterina apresentando protrusão citoplasmática com extrusão nuclear. HE, x 250.....	64
Figura 21: Fotomicrografia do epitélio de revestimento da tuba uterina	

apresentando células secretoras com grânulos com reação ao AT (seta), x 250..... 64

Figura 22: Fotomicrografia do epitélio germinativo cúbico simples (seta) e da túnica albugínea (TA). HE, x 100.....68

Figura 23: Fotomicrografias do ovário mostrando folículos: A) primordial, B) primário, C) secundário. Oo: oócito, N: núcleo do oócito, G: células da granulosa, vacúolos no citoplasma (seta). PAS, x 992.....68

Figura 24: Fotomicrografias mostrando folículos antrais: A) terciário, B) De Graff. Oo: oócito, N: núcleo do oócito, G: células da granulosa, zona pelúcida (seta), cúmulus oophorus (CO), tecas (T). PAS, A x 100, B x 62.....71

Figura 25: Fotomicrografia mostrando folículos primários atresícos com retração dos oócitos (seta) e desorganização das células da granulosa (*). HE, x 992.....71

Figura 26: Fotomicrografia mostrando células da granulosa com núcleos picnóticos (seta). HE, x 100.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos animais selecionados para a colheita de amostras da tuba uterina e do ovário.....	36
Tabela 2: Relação dos diferentes pHs e as correspondentes estruturas que reagem positivamente ao AT (PEARSE, 1968).....	37
Tabela 3: Critérios utilizados para classificar os cortes histológicos dos animais nas fases folicular e lútea.....	39
Tabela 4: Classificação de endometrite utilizada de acordo com o Departamento de Patologia Veterinária, FMVZ-UNESP-Botucatu.....	39
Tabela 5: Critérios utilizados para a análise qualitativa da tuba uterina.....	39
Tabela 6: Relação dos animais e suas respectivas fases.....	43
Tabela 7: Resultados histopatológicos da classificação de endometrite.....	56
Tabela 8: Resumo da análise de variância do diâmetro de glândulas uterinas basais e superficiais de búfalas adultas.....	72
Tabela 9: Valores médios do diâmetro (μm) de glândulas basais e superficiais do útero de búfalas adultas considerando as fases folicular e lútea, as regiões do útero e os animais pertencentes a cada uma das fases.....	74
Tabela 10: Resumo da análise de variância do diâmetro do lúmen de glândulas uterina basais e superficiais de búfalas adultas.....	76
Tabela 11: Valores médios do diâmetro (μm) luminal de glândulas basais e superficiais do útero de búfalas adultas considerando as fases folicular e lútea, as regiões do útero e os animais pertencentes a cada uma das fases.....	77
Tabela 12: Resumo da análise de variância da altura epitelial de glândulas uterina basais e superficiais de búfalas adultas.....	78

Tabela 13: Valores médios da altura epitelial (µm) de glândulas basais e superficiais do útero de búfalas adultas considerando as fases folicular e lútea, as regiões do útero e os animais pertencentes a cada uma das fases.....	80
Tabela 14: Resumo da análise de variância da altura do epitélio luminal do útero de búfalas adultas.....	81
Tabela 15: Valores médios da altura (µm) do epitélio luminal do útero de búfalas adultas considerando as fases folicular e lútea, as regiões do útero e os animais pertencentes a cada uma das fases.....	82
Tabela 16: Correlações entre todas as variáveis estudadas do útero de búfalas adultas.....	83
Tabela 17: Resumo da análise de variância da altura de células ciliadas e secretoras da tuba uterina de búfalas adultas.....	85
Tabela 18: Valores médios da altura (µm) de células ciliadas e secretoras da tuba uterina de búfalas adultas considerando as fases folicular e lútea, as regiões da tuba uterina e os animais pertencentes a cada uma das fases.....	86
Tabela 19: Resumo da análise de variância da concentração hormonal plasmática de progesterona e estradiol de búfalas adultas.....	87
Tabela 20: Valores plasmáticos de progesterona (ng/mL) e estradiol (pg/mL) de búfalas adultas.....	89
Tabela 21: Resumo de todos os achados observados nos cortes histológicos e na concentração hormonal plasmática dos animais das fases lútea e folicular.....	92

1- INTRODUÇÃO

Os bufalinos são criados nas mais variadas condições climáticas, estando presentes em todo o Brasil e em boa parte da América Latina e reproduzindo-se nas condições de clima tropical úmido amazônico, no nordeste, bem como nas regiões alagadiças e frias do extremo sul do país (VALE, 1999).

Segundo a Associação de Criadores de Búfalos, o Brasil possui aproximadamente três milhões de animais, com abate anual de 600 mil cabeças e consumo de 150 mil toneladas de carne (SILVA, 1996). Dados da FAO (1999) mostraram um crescimento do rebanho bufalino brasileiro de 1.340 % entre os anos de 1970 e 1998.

Os bufalinos possuem algumas peculiaridades na fisiologia reprodutiva que os diferem dos bovinos. Entre essas, está o ciclo estral que apresenta características típicas, tais como uma grande variação na duração e na expressão dos sintomas do estro, início de aceitação da monta pelo macho no proestro, ovulação sempre após cessarem os sintomas de cio, cios silenciosos, cio anovulatório no meio do ciclo, presença do tônus uterino bem superior ao da fêmea bovina, pouca secreção de muco e baixa atividade homossexual (VALE, 1988). A duração média do ciclo estral da búfala é de 21 dias (18 a 32) e, do mesmo modo como o é na maioria das espécies domésticas, está dividido em proestro, estro, metaestro e diestro. A ovulação ocorre entre 15 e 18 horas após o término do estro (35 a 45 horas após o início do estro) (JAINUDEEN & HAFEZ, 1995).

Nos últimos anos, várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo específico de desenvolver técnicas e procedimentos que favoreçam uma maior eficiência reprodutiva em espécies animais de interesse zootécnico. Entre esses estudos, aqueles que envolvem a organização morfológica do

sistema reprodutor feminino merecem atenção especial, visto que as modificações histofisiológicas que ocorrem no sistema genital durante o ciclo estral agem diretamente sobre o organismo, influenciando o metabolismo e o comportamento da fêmea. Entretanto, nessa área de estudo, poucos trabalhos foram executados na espécie bufalina, sobretudo em condições de manejo e clima tropicais.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de caracterizar os aspectos histológicos do útero, tuba uterina e ovário de búfalas durante as fases folicular e lútea do ciclo estral, visando a obtenção de mais subsídios para a aplicação de biotecnologias da reprodução como a inseminação artificial, a transferência de embrião, e a fertilização *in vitro*.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Útero

O útero é composto de dois cornos uterinos, um corpo e uma cérvix. É do tipo bipartido (*uterus bipartitus*) na vaca, ovelha e égua, pois apresenta um septo que separa os dois cornos e um proeminente corpo uterino. O útero é um órgão altamente capacitado e adaptado a reconhecer e nutrir o produto da fertilização, desde a implantação até o parto (HAFEZ, 2000). Dessa forma, este órgão desempenha um papel crítico na manutenção e desenvolvimento do embrião e o seu estudo fornece muitas informações úteis na avaliação da fertilidade bufalina.

A parede do útero é dividida em três camadas: a mucosa ou endométrio, a muscular ou miométrio e a serosa ou perimétrio. O endométrio é constituído por duas zonas que diferem em estrutura e função. A camada mais superficial chamada de zona funcional e uma camada mais profunda, a zona basal (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). A zona funcional é tradicionalmente dividida em dois estratos, o compacto e o esponjoso, baseado na aparência morfológica que esses estratos apresentam durante o ciclo estral (HENDRICKSON & KEMPSON, 1992).

Em ruminantes, o epitélio de superfície da zona funcional é pseudo-estratificado e/ou cilíndrico simples, podendo ser, em áreas isoladas, cúbico simples (DELLMANN & BROWN, 1982; BANKS, 1992; PRIEDKALNS & LEISER, 1998). As bordas apicais das células cilíndricas possuem microvilosidades, numerosas especializações digitiformes da membrana plasmática que variam de altura de acordo com a atividade

secretora do epitélio, apresentando-se mais longas na fase lútea que na fase folicular (STINSON et al., 1962).

O tecido sub-epitelial da região mais superficial da zona funcional (estrato compacto) consiste de tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado com muitos fibrócitos, macrófagos e mastócitos, podendo encontrar também neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos. A região mais profunda (estrato esponjoso) dessa zona constitui-se de tecido conjuntivo frouxo, sendo este menos celular. Em ruminantes, durante o estro, uma grande quantidade de fluido deposita-se nos espaços teciduais da zona funcional, dando origem ao edema endometrial (PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

Em todo o endométrio estão presentes glândulas uterinas tubulares simples, enoveladas e ramificadas, estando ausentes na região da carúncula em ruminantes (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). O epitélio glandular é similar ao luminal, exceto pela presença de cílios na superfície livre de muitas células cilíndricas (STINSON et al., 1962). As carúnculas são espessamentos circunscritos da lâmina própria, ricas em fibroblastos com extenso suprimento sangüíneo. Aproximadamente quatro fileiras com 15 carúnculas estão presentes em cada corno uterino (DELLMANN & BROWN, 1982; PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

O endométrio de búfalas possui quatro camadas semelhantes às aquelas descritas em bovinos: um epitélio de revestimento pseudo-estratificado cilíndrico; um estrato compacto constituído por tecido conjuntivo denso; estrato esponjoso, onde as glândulas uterinas se ramificam; estrato basal no qual as glândulas uterinas terminam (EL-SHEIKH & ABDELHADI, 1970). Além disso, ALBOGHOBEISH (2000) observou no epitélio pseudo-estratificado a presença de células ciliadas que se apoiavam na membrana basal.

Várias mudanças morfológicas ocorrem no endométrio de ruminantes durante o ciclo estral, provocadas pelos hormônios ovarianos estradiol e progesterona. Na vaca, durante os últimos três a quatro dias do diestro, a mucosa regride, com redução da altura do epitélio luminal, e as glândulas uterinas tornam-se curtas com epitélio baixo e sem secreção. Já durante o proestro sob a influência do estrógeno, o endométrio é restaurado, a mucosa torna-se espessa, congesta e edematosa com a predominância de células secretoras de mucos. Contudo, a proliferação glandular limita-se a um crescimento linear das glândulas, sem ramificação ou enovelamento. Durante o estro, o edema e a hiperemia endometriais são marcantes (PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

No metaestro, o edema diminui e hemorragias microscópicas ocorrem na zona funcional, caracterizando o processo de metrorragia. Na vaca, a metrorragia tem início antes da ovulação, atingindo o pico durante o edema endometrial e sendo mais proeminente nas regiões centrais das carúnculas, e termina abruptamente no 2º dia após o estro (PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

A atividade mitótica nos epitélios luminal e glandular e no estroma inicia-se durante o estro e continua por aproximadamente seis dias. Uma invasão de agranulócitos, essencialmente linfócitos, ocorre de três a cinco dias após o estro (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). No entanto, VANDER WIELEN & KING (1984) não observaram uma variação significativa do número de linfócitos no endométrio durante o ciclo estral.

O aumento do número de eosinófilos ocorre do estro para o meio do ciclo, assim como o número de mastócitos durante o edema endometrial, especialmente nas regiões intercarunculares (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). MATSUDA et al. (1983) descreveram um aumento significativo do número de eosinófilos no endométrio bovino durante o estro e o metaestro em relação a outras fases do ciclo estral.

Com o início do diestro, sob a influência da progesterona, o endométrio passa de um estágio proliferativo para um secretor, com espessamento do epitélio glandular, além de ramificação, enovelamento e secreção das glândulas. Durante os 11 dias iniciais do diestro, a secreção glandular é grande, mas, se a gestação não acontecer, ocorre regressão das glândulas após a luteólise nos últimos três dias do diestro (PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

Em bovinos e bufalinos, SUNDARAVADANAN & VENKATASWAMY (1973) verificaram que as modificações uterinas encontradas durante as fases folicular e lútea do ciclo estral estavam relacionadas à espessura e vascularização do endométrio e miométrio e ao crescimento das glândulas uterinas. Segundo WORDINGER & DICKEY (1971), as características histológicas do endométrio de vacas abatidas três dias após o cio foram: edema, aumento de vascularização na lâmina própria e no estroma tecidual.

O epitélio de revestimento do endométrio bufalino apresenta-se do tipo colunar alto durante a fase folicular, com uma borda superficial do epitélio positiva ao ácido periódico de Schiff (PAS). Na região glandular, o material positivo ao PAS está presente nas glândulas que se situam mais próximas ao lúmen. O material PAS positivo do epitélio uterino não é composto por glicosaminoglicanas (GAGs) ácidas, em contraste com o material encontrado na tuba uterina e cérvix (SUNDARAVADANAN & VENKATASWAMY, 1973a).

Bioquimicamente distinguem-se dois tipos de açúcares, os neutros e os ácidos, também chamados de GAGs. As glicosaminoglicanas são polissacarídeos ligados ou não a proteínas que formam polímeros lineares (não ramificados) de peso molecular elevado, constituídas por unidades dissacarídeas compostas por um ácido urônico e uma hexosamina. Entre as GAGs ácidas, existem aquelas que possuem grupamentos carboxílicos (COOH) e as com grupamentos éster sulfúrico (OSO₃H) (JUNQUEIRA &

CARNEIRO, 1999). Entre os açúcares neutros, destaca-se o glicogênio que é o único polissacarídeo livre no organismo dos mamíferos, podendo ser evidenciado pela reação ao ácido periódico de Schiff (PAS) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Há evidências de que os polissacarídeos produzidos nos epitélios de revestimento do útero e da tuba uterina possam ter papel importante nos fenômenos de fertilização (VARNER et al., 1990) e fixação inicial do conceito ao endométrio (LINDEBERG et al., 1990).

GONZALES et al. (1985) observaram, no endométrio de vacas normais, um epitélio com citoplasma eosinofílico homogêneo e com vacúolos, durante as fases folicular e lútea, respectivamente. As glândulas uterinas variavam de tubulares retas a tortuosas e não mostravam evidências de alterações degenerativas e necróticas. Além disso, um infiltrado de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e mastócitos encontrava-se distribuído uniformemente na lâmina própria, com a predominância de linfócitos.

No endométrio da porção média dos cornos uterinos de novilhas bovinas, OHTANI et al. (1993) relataram vários achados, tais como: mitoses glandulares durante o proestro e estro; metrorragia e edema no estroma durante o cio e no 1º dia do ciclo; vacuolização supranuclear no epitélio glandular entre o 3º e 7º dias; infiltração leucocitária no epitélio superficial no 7º e 8º dias; e mitoses nas células do estroma no estro e meio da fase lútea. Ao contrário das outras fases do ciclo estral, não ocorreram modificações progressivas no endométrio durante a fase lútea tardia.

Em búfalas Murrah, SINGH & SHARMA (1985) observaram glândulas uterinas distribuídas por todo o endométrio, exceto na região das carúnculas, e, em alguns casos, estendidas até o estrato submucoso do miométrio. O número de glândulas superficiais e a altura do epitélio glandular sofreram variação de acordo com as diferentes fases do ciclo

estral, estando em maior número no meio e em menor no final da fase lútea. Esse aumento é causado pelo crescimento em comprimento e pelo enovelamento das glândulas. Todavia, JANAKIRAMAN et al. (1976) verificaram um número maior de glândulas endometriais durante o estro e poucas glândulas na fase lútea do ciclo estral. Segundo esses autores, essas observações indicam que as glândulas crescem em tamanho e que a circunferência total das mesmas aumenta sob a influência da progesterona. A ocorrência em menor número por unidade de área é devido ao aumento do tamanho e da natureza tortuosa das glândulas uterinas.

SINGH & SHARMA (1985) também notaram que o diâmetro do lúmen glandular foi máximo no meio da fase lútea e mínimo na fase folicular. A secreção glandular apresentou-se do tipo apócrina, e foi visualizada ainda secreção merócrina. Em relação às glândulas basais, apresentaram o mesmo comportamento das superficiais quando ao diâmetro e à altura do epitélio glandular, porém não houve variação significativa quanto ao número durante o ciclo estral.

Em búfalas de rio com idade entre três e cinco anos, ALBOGHOBEISH (2000) relatou que, na fase lútea, a altura e atividade secretora, assim como a vacuolização das células do epitélio luminal, estavam aumentadas. O desprendimento do epitélio foi descrito na fase inicial do diestro. O estroma constituiu-se essencialmente de tecido conjuntivo fibroso com um pobre suprimento vascular, apresentando vasos estreitos e com parede fina. Os estratos compacto e esponjoso foram identificados logo abaixo do epitélio, com o último mais difuso durante a fase folicular, embora as duas camadas se apresentassem mais diferenciadas durante a fase lútea. Na fase folicular, tornaram-se evidentes o aumento da vascularização e da congestão, o edema na região do estrato esponjoso, o extravasamento de sangue e a necrose do epitélio.

Em relação ao miométrio, este é formado por uma espessa camada circular interna e uma camada longitudinal externa de células musculares lisas que aumentam em número e tamanho durante a gestação. Entre as duas camadas ou na parte mais profunda da camada interna, há uma zona vascular constituída de grandes artérias, veias e vasos linfáticos (DELLMANN & BROWN, 1982; BANKS, 1992).

O miométrio de búfalas é dividido em três zonas: o estrato submucoso, composto de fibras musculares lisas, irregulares, circulares, longitudinais e oblíquas; o estrato vascular, composto de tecido conjuntivo frouxo, altamente vascularizado e com fibras musculares irregulares dando-lhe uma aparência esponjosa; e o estrato subseroso formado por fibras musculares longitudinais (EL-SHEIKH & ABDELHADI, 1970). Durante o ciclo estral, SHUKLA et al. (1973) observaram que a espessura do miométrio aumentou a partir do 3º dia do ciclo, atingindo um pico no 15º dia, quando começou a diminuir. A espessura da camada muscular longitudinal modificou-se significativamente com o aumento da espessura no estro e diminuição no início da fase lútea. Ao contrário, a camada muscular circular apresentou-se menos espessa no estro.

A terceira camada do útero, o perimétrio ou serosa, é constituída de tecido conjuntivo frouxo coberto por mesotélio peritoneal, possuindo numerosos vasos sangüíneos, linfáticos e fibras nervosas (DELLMANN & BROWN, 1982; BANKS, 1992; PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

Os processos inflamatórios do útero têm sido destacados como uma das principais causas de subfertilidade ou, ainda, de infertilidade nas fêmeas domésticas. Na búfala, à semelhança do que ocorre em outras fêmeas domésticas, estes processos inflamatórios são importantes causas de redução de fertilidade, sendo os casos assintomáticos mais comuns que os clínicos. Alguns fatores são reportados como predisponentes para ocorrência de infecções uterinas na búfala, e, entre eles, está o tipo de

constituição anatômica dos lábios vulvares e o hábito dessa espécie de banhar-se em águas poluídas e contaminadas com fezes (SILVA, 1995).

Segundo OHASHI et al. (1982), nos casos de endometrite crônica leve, a caracterização típica do processo inflamatório é dada por uma infiltração de células inflamatórias do tipo mononuclear difusamente no tecido subepitelial e de localização perivascular e periglandular, com ausência parcial do epitélio de revestimento e discreta fibrose periglandular, não ocorrendo a formação de acúmulos linfóides nesta condição. A endometrite crônica moderada, além do infiltrado linfoplasmocitário no estrato compacto e da fibrose periglandular mais acentuada, apresenta ainda a formação de acúmulos linfóides. A endometrite crônica severa caracteriza-se pelo infiltrado difuso de células inflamatórias mononucleares no estrato compacto e um alto grau de fibrose periglandular e dilatação glandular cística.

Por sua vez, MOGHAMI et al. (1996) classificaram casos de endometrite em búfalas em quatro categorias. Na 1ª categoria, a mucosa foi considerada normal e apresentou graus moderados de congestão e muco, com 0-20 células como neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e mastócitos na lâmina própria, sem alterações degenerativas nas glândulas. Na 2ª categoria, o endométrio apresentava-se congesto e edematoso com quantidades moderadas de muco no lúmen e predominância de linfócitos na lâmina própria formando um a três focos, além de mastócitos e neutrófilos, e uma a três camadas de fibrose ao redor das glândulas. Na 3ª categoria, a mucosa mostrou-se de cor cinza escura com muito muco, grande infiltração de linfócitos formando quatro a cinco nódulos linfóides e quatro a cinco camadas de fibrose ao redor das glândulas. Na 4ª categoria, o endométrio possuía uma coloração cinza clara com aspecto enrugado e seco, muitas células inflamatórias formando focos especialmente ao redor de vasos

sangüíneos e glândulas, extensa fibrose (seis camadas ou mais) e presença de glândulas císticas.

2.2 – Tuba Uterina

A tuba uterina é uma estrutura vital e altamente especializada no processo reprodutivo das fêmeas, assumindo papéis importantes na reprodução animal e sendo, portanto, mais do que simples condutos para o transporte do ovócito, dos espermatozóides, do zigoto ou do embrião. As secreções do epitélio desse órgão formam um fluido que promove o meio necessário para a maturação dos gametas femininos e masculinos (capacitação espermática), a fertilização e, pela sua composição química, o desenvolvimento inicial do embrião (ABE,1996).

Anatomicamente, a tuba constitui-se em um tubo musculomembranoso de grande mobilidade com comprimento (20-30 cm para espécies de produção) e enovelamento variável de acordo com as diferentes espécies. Uma de suas extremidades abre-se na cavidade peritoneal, próxima ao ovário, e a outra atravessa a parede do útero e abre-se no interior deste órgão. Divide-se a tuba em quatro segmentos: infundíbulo, ampola, istmo e junção útero-tubárica (BEARDEN & FUQUAY, 2000). O infundíbulo é um grande orifício no formato de um funil, a ampola, um segmento de parede delgada e o istmo, um estreito segmento muscular que se une ao útero (DELLMANN & BROWN, 1982).

O infundíbulo apresenta, em sua extremidade livre, as fímbrias, que são prolongamentos caracterizados por pregas da mucosa. Estas são responsáveis pela captação e transporte dos ovócitos liberados no período da ovulação. Na maioria dos mamíferos, a porção da ampola é a região

com maior diâmetro e representa o local da fertilização. Essa região é altamente pregueada, com aproximadamente 40 pregas longitudinais primárias, cada uma com pregas secundárias e terciárias. A ampola continua-se em istmo, local de reserva de espermatozóides em algumas espécies (ABE, 1996). Na junção istmo-útero, onde o istmo está incluído na parede uterina, apenas quatro a oito pregas primárias são visíveis (DELLMANN & BROWN, 1982).

Histologicamente, a tuba uterina é dividida em: mucosa, com seu epitélio de revestimento; lâmina própria, que sustenta as pregas da mucosa; muscular, que inclui uma camada longitudinal e outra circular; e a serosa (ELLINGTON, 1991).

A mucosa é revestida por epitélio simples cilíndrico ou pseudo-estratificado cilíndrico, formado por células ciliadas e células secretoras (DELLMANN & BROWN, 1982; ELLINGTON, 1991; ABE, 1996). Alguns autores consideram ainda um terceiro tipo celular, a célula basal (ODOR, 1974).

As células ciliadas são responsáveis pelo transporte dos ovócitos no interior da tuba uterina e, durante o início da fase folicular, é formado um grande número de cílios, possibilitando o desenvolvimento de um epitélio ricamente ciliado no período da ovulação (RUMERY et al., 1978).

As células secretoras produzem e secretam ativamente, para a luz da tuba uterina, proteínas e glicoproteínas, formando o fluido, juntamente com o soro do transudato seletivo. Alguns desses produtos possuem um importante papel nos eventos reprodutivos. Assim, em alguns mamíferos, tem-se demonstrado a associação de algumas glicoproteínas e polipeptídeos com os ovócitos e embriões em desenvolvimento. As células secretoras da tuba também produzem várias moléculas funcionais, tais como enzimas e fatores de crescimento (LEESE, 1988; MENEZO & GUERIN, 1997; BUHI, 2002).

É conhecida a resposta da tuba uterina dos mamíferos aos hormônios ovarianos: estradiol e progesterona. A falta de esteróides ovarianos ou a presença de progesterona no plasma periférico causam atrofia do epitélio. A diferenciação celular (incluindo os grânulos de secreção) ocorre quando os níveis plasmáticos de estradiol são elevados e os de progesterona são baixos ou indetectáveis (LEESE, 1988; BUHI, 2002). Alterações hormonais regulam a quantidade e a composição do fluido da tuba uterina, acumulando-o e distendendo-a durante o estro, sob influência do estrógeno, enquanto a progesterona provoca diminuição da luz e reabsorção do fluido no estágio de diestro (MENEZO & GUERIN, 1997; BUHI, 2002). O tipo de grânulo de secreção formado durante a fase folicular do ciclo (sob o domínio do estradiol) e o mecanismo responsável pela sua secreção variam entre as espécies. No coelho, verificou-se a ocorrência de glicoconjugados neutros nas regiões do istmo e ampola, enquanto glicosaminoglicanas carboxiladas e sulfatadas estavam presentes apenas no istmo (MENGHI et al., 1984).

A lâmina própria da tuba uterina é contínua à submucosa do trato reprodutor porque a muscular da mucosa está ausente. Na tuba uterina, a lâmina própria-submucosa consiste de tecido conjuntivo frouxo típico (DELLMANN & BROWN, 1982).

A túnica muscular consiste essencialmente em feixes circulares de músculo liso, mas feixes longitudinais isolados e oblíquos também ocorrem. No infundíbulo e na ampola, a túnica muscular delgada é composta de uma camada circular interna e alguns feixes longitudinais externos de músculo liso. No istmo, a camada muscular é proeminente e une-se à camada muscular circular uterina. Uma túnica serosa está presente e contém muitos vasos sanguíneos e nervos (DELLMANN & BROWN, 1982).

Na espécie bufalina, a mucosa na região da ampola é composta de numerosas pregas primárias e secundárias revestidas por um epitélio predominantemente pseudo-estratificado cilíndrico com células ciliadas e

secretoras, apresentando sinais de atividade secretora antes e após o estro. A camada muscular é composta por uma camada interna circular, circundada por uma delgada camada muscular longitudinal (EL-SHEIKH & ABDELHADI, 1970; DANELL, 1987).

Na tuba uterina bovina, DUBOIS et al. (1980) observaram, durante o diestro, um aumento do número de mastócitos no istmo e uma diminuição dessas células na ampola que também ocorreu no metaestro. Em relação aos linfócitos, esses autores verificaram que a concentração dessas células na ampola e istmo era relativamente constante durante o ciclo, com exceção do diestro, quando os linfócitos na ampola aumentavam significativamente. A população de linfócitos na mucosa tubárica apresentou-se uniformemente distribuída entre a lâmina própria, a lâmina basal e o epitélio, exceto durante o diestro quando um aparente aumento foi observado no epitélio da ampola.

Na vaca, SUNDARAVADANAN & VENKATASWAMY (1973b) relataram que durante a fase folicular, a mucosa do infundíbulo apresentou-se altamente pregueada (35-40 dobras) com dobras terciárias ocupando grande parte do lúmen. O epitélio pseudo-estratificado consistia de células cilíndricas ciliadas altas, secretoras e *peg cells* (células secretoras com protrusão citoplasmática), com uma altura entre 25-40 micrômetros. O citoplasma das células secretoras apresentou muitos vacúolos e núcleos com localização basal. A lâmina própria mostrou riqueza de elementos celulares, fibras reticulares e colágenas, enquanto a camada muscular era entremeada com numerosas fibras elásticas e, na túnica serosa, vários capilares sangüíneos hipertrofiados foram observados. Na fase lútea, as dobras da mucosa do infundíbulo eram escassas (25-30 dobras) e as dobras terciárias estavam ausentes. A altura do epitélio variou de 15-20 micrômetros e constituía-se de células cilíndricas baixas, com muitas células apresentando protrusão citoplasmática com extrusão nuclear. A lâmina própria apresentou quantidades moderadas de elementos celulares e

riqueza em fibras reticulares. A camada muscular era entremeada com poucas fibras elásticas. Os capilares sangüíneos da serosa eram abundantes com lúmen estreito.

Em relação à ultra-estrutura do infundíbulo bovino, NAYAK & ELLINGTON (1977) descreveram cílios ativos no epitélio no ciclo estral, sem degeneração ciliar (deciliação) durante a fase lútea, como muitas vezes é relatado em macacos *Rhesus* e cadelas. A ausência de deciliação durante a fase lútea foi também relatada no infundíbulo de mulheres, porcas e ovelhas (NAYAK et al., 1971; NAYAK et al., 1973; PATEK et al., 1973). No estro, as células secretoras possuíam numerosos grânulos secretores, mostrando diferenciação máxima e um retículo endoplasmático granular com cisterna dilatada. No 3º dia do ciclo, verificou-se a liberação do conteúdo dos grânulos para o lúmen. Entre o 9º e 10º dia, sob influência de concentrações crescentes de progesterona, protrusões citoplasmáticas eram proeminentes com a extrusão do núcleo e de outras organelas que podiam encontrar-se livres no lúmen. Projeções citoplasmáticas também foram encontradas no 18º dia do ciclo estral. Testes ultracitoquímicos da tuba uterina mostraram que os grânulos secretores eram PAS positivos.

Em estudos com microscopia eletrônica da tuba bovina, ABE & OIKAWA (1993) relataram que, na fase folicular, as fímbrias, assim como a ampola, apresentaram-se densamente ciliadas, em contraste com o epitélio da junção ampola-istmo que se mostrou menos ciliado. As regiões do istmo e da junção útero-tubárica demonstraram pouca variação na ciliação entre as fases folicular e lútea, com as células ciliadas distribuídas irregularmente no epitélio. Durante a fase lútea, os processos bulbosos das células secretoras predominavam no epitélio das fímbrias, ampola e junção ampola-istmo, enquanto os cílios, nessas regiões, encontravam-se encobertos pelas células secretoras, visto que os processos bulbosos dessas células estendiam-se além da extremidade dos cílios. Estes

processos possuíam a forma elíptica e um tamanho uniforme e, algumas vezes, as protrusões apicais pareciam estar apenas tenuamente aderidas às células subjacentes. No istmo, as protrusões das células secretoras foram observadas durante todo o ciclo estral.

Esses mesmos autores também verificaram mudanças quantitativas das células ciliadas e secretoras durante o ciclo estral. Nas fímbrias e ampola, ocorreu um significativo decréscimo no número de células ciliadas e um aumento das secretoras durante a fase lútea quando comparada com a fase folicular. A porcentagem média de células ciliadas e secretoras nas regiões da junção ampola-istmo, istmo e junção útero-tubárica não diferiu significativamente entre as fases. Esses dados indicam que os epitélios da ampola e das fímbrias são semelhantes por sofrerem parcial deciliação durante a fase lútea, o que não ocorre nas outras regiões. No epitélio de todas as regiões, a altura das células ciliadas diminuiu significativamente na fase lútea, sendo mais dramática nas fímbrias, ampola e na junção ampola-istmo. A altura das células secretoras diminuiu em todas as regiões, entretanto, essa redução foi menos dramática em relação à altura das células ciliadas. Além disso, a altura das células secretoras nas fímbrias e ampola não mudou significativamente entre as fase folicular e lútea (ABE & OIKAWA, 1993).

No infundíbulo de ovelhas, NAYAK et al. (1976) relataram a existência de grânulos de glicogênio no citoplasma na região basal ou apical de células secretoras e ciliadas na fase folicular, sendo ausentes durante a fase lútea. Verificaram também a ausência de deciliação e a presença de projeções citoplasmáticas das células secretoras durante todo o ciclo, sendo essas projeções acompanhadas, na fase lútea, por extrusão nuclear, que muitas vezes destacavam-se do epitélio e encontravam-se livres no lúmen. MURRAY (1996) também observou, no estro e até o 16º dia de gestação, projeções apicais das células secretoras, com algumas dessas

células possuindo grânulos, mas nenhum tipo de liberação apócrina ou merócrina foi visualizado durante a gestação. Um epitélio cúbico baixo com 19 μm de altura foi visualizado em ovelhas ovariectomizadas e um cilíndrico alto de 21 μm e 24 μm , no estro e no 1º dia de gestação, respectivamente. No 2º dia de gestação, ocorreu um declínio da altura para 17 μm que permaneceu até o 6º dia, porém a atrofia do epitélio continuou até o 16º dia. Em todos os estágios examinados, as células ciliadas predominaram no epitélio, com o aumento de um tipo celular levando a uma diminuição de outro tipo.

Na ampola de ovelhas, MURRAY (1995) descreveu achados semelhantes àqueles do infundíbulo, em relação a mudanças na altura do epitélio e na porcentagem de células ciliadas e secretoras, em animais ovariectomizados e durante o estro e início de gestação. Porém, a produção e liberação de grânulos pela fusão destes grânulos com a membrana plasmática das células secretoras, indicando liberação do conteúdo pela exocitose ou secreção merócrina, ocorreu no estro até o 4º dia de gestação.

No istmo de ovelhas ovariectomizadas e de ovelhas durante o estro e início da gestação, MURRAY (1997) observou um 3º tipo celular de forma arredondada adjacente à membrana basal chamada de célula basal. Estas eram mais evidentes nos animais ovariectomizados e no 3º dia de gestação. Duas populações de células ciliadas estavam presentes representando 70 a 90% das células epiteliais, uma com grânulos elétrondensos e outra sem grânulos, porém nenhuma evidência de liberação desses grânulos foi observada nos animais em estro ou prenhes. As células secretoras não continham grânulos e nem emitiam protrusões para o lúmen. O autor comenta que, no istmo, as mudanças mais dramáticas ocorreram nas organelas secretoras das células ciliadas, em contraste com a ampola

e fímbrias em que as alterações eram mais evidentes nas células secretoras.

2.3 – Ovário

O ovário situa-se na cavidade abdominal e possui funções endócrinas (produção e liberação de hormônios esteróides) e gametogênicas (produção e liberação de oócitos) complementares, interdependentes e necessárias para o sucesso da reprodução (HAFEZ, 2000).

Histologicamente, o ovário é composto por uma região cortical e uma medular, sendo circundado por um epitélio superficial conhecido como epitélio germinativo que repousa sobre uma membrana basal. Logo abaixo, observam-se a túnica albugínea, uma camada espessa de tecido conjuntivo, e o estroma ovariano, constituído por tecido conjuntivo frouxo. No córtex ovariano, podem ser encontrados folículos ovarianos não atrésicos e atrésicos, corpos lúteos, corpos albicans e corpos hemorrágicos, além de colágeno dos tipos I e III, fibroblastos, vasos sangüíneos, linfáticos e terminações nervosas. A região medular é responsável pela nutrição e sustentação do ovário. Consiste em tecido conjuntivo frouxo e fibras musculares lisas contínuas com as do mesovário, nervos, numerosos vasos sangüíneos grandes e espiralados e vasos linfáticos (HAFEZ, 2000; BANKS, 1992).

O ovário bufalino é alongado e consideravelmente menor que o bovino. As dimensões médias variam entre 22-26 x 11-18 x 11-14 mm³, com um peso máximo e mínimo de 6,1 e 2,9 g, respectivamente. O corpo lúteo das búfalas é freqüentemente recoberto pelo estroma ovariano e é

menor que o bovino, com peso máximo de 2,3 g e diâmetro máximo de 15 mm (SINGH et al., 2000).

Segundo DANELL (1987), o epitélio de revestimento do ovário de búfalas consiste de células escamosas, mas algumas vezes cúbicas, com espessura entre 5 a 15 μ m. Enquanto PRASAD et al. (1979) descreveram um epitélio superficial cúbico simples, mas com estratificação em alguns locais, FADLE et al. (1974) relataram que as células cúbicas desse epitélio tornavam-se achatadas na região do corpo lúteo e dos folículos de De Graaf. O corpo lúteo bufalino apresenta abundância em grandes células poliedrais luteínicas derivadas da granulosa e pequenas células luteínicas tecais perifericamente distribuídas.

A túnica albugínea do ovário bufalino possui a espessura de 100-300 μ m, consistindo de duas a três camadas de tecido conjuntivo denso, com predominância de fibras colágenas, e poucas fibras elásticas e reticulares. O estroma cortical apresenta vários tipos de vasos sangüíneos e a medula é constituída por um tecido conjuntivo altamente vascular, além de células epiteliais intersticiais e *rete ovarii* (FADLE et al., 1974; PRASAD et al., 1979; DANELL, 1987).

No ovário, a população folicular é bastante heterogênea. Com a finalidade de estudar esta população, os folículos são classificados de acordo com: 1) o tamanho, tendo por base a média do diâmetro folicular; 2) o grau de evolução, consistindo na observação do número de camadas da granulosa e da presença ou ausência de antro; e 3) a viabilidade, classificando-se os folículos como normais ou atrésicos. Sendo assim, de acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em: a) folículos pré-antrais ou não cavitários (primordiais, primários e secundários) e b) folículos antrais ou cavitários (folículos terciários e de De Graaf) (SAUMANDE, 1981).

HULSHOLF et al. (1994) estabeleceram que os folículos primordiais e primários de bovinos não podem ser claramente distinguidos pelo seu diâmetro (30-60 μm), mas mostraram diferenças morfológicas entre eles. Segundo estes autores, nos folículos primordiais, o oócito é circundado por uma única camada de células da granulosa de forma pavimentosa, enquanto, nos folículos primários o oócito é circundado por células da granulosa de forma cúbica, também dispostas em uma única camada. Os folículos secundários se distinguem dos primários por possuírem várias camadas de células de granulosa de forma cúbica ao redor do oócito, que, por sua vez, apresenta-se de maior tamanho.

Os folículos antrais são caracterizados pela presença de uma cavidade em seu interior repleta de líquido folicular, denominada antro. Dois tipos de folículos antrais podem ser distinguidos: os folículos terciários e os folículos de De Graaf. Os folículos terciários são constituídos de um oócito circundado pela zona pelúcida, várias camadas de células da granulosa, uma pequena cavidade antral, uma membrana basal e duas camadas de células tecais (teca interna e teca externa) (GORDON, 1994). Quanto aos folículos de De Graaf ou folículos maduros, representam o estágio terminal do desenvolvimento folicular e possuem todos os componentes presentes nos folículos terciários, podendo ser denominados, ainda folículos pré-ovulatórios.

Apesar do grande número de folículos geralmente presentes nos ovários, a grande maioria deles não irá chegar até a ovulação, mas passará por um processo conhecido como atresia folicular. A atresia é um mecanismo fisiológico responsável pela perda da quase totalidade (99%) dos folículos de um ovário (GORDON, 1994). Considera-se que, em bovinos, de 1000 folículos primordiais que entram em crescimento, apenas um chegue ao estágio pré-ovulatório (SAUMANDE, 1991).

A atresia pode interromper o desenvolvimento folicular a qualquer momento, podendo ocorrer por via degenerativa (SAUMANDE, 1981) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO et al., 1995). A atresia por via degenerativa pode ser caracterizada, histologicamente, pela presença de corpos picnóticos ou desintegração generalizada das células da granulosa, associada ou não à retração e condensação da cromatina nuclear do oócito (CAHILL et al., 1979). Em ovelhas, JORIO et al. (1991) descrevem que a atresia do oócito é mais comum em folículos pré-antrais, enquanto a atresia relacionada à picnose das células da granulosa ocorre quase que exclusivamente em folículos antrais, tornando-se mais freqüente com o aumento do diâmetro folicular.

2.4 – Concentração Hormonal Plasmática

Os hormônios esteróides, progesterona e estradiol, provocam uma variedade de respostas fisiológicas nos tecidos-alvo, tais como divisão celular, diferenciação tecidual, crescimento, síntese de proteínas específicas e contração da musculatura lisa. Estas respostas são responsáveis por vários processos reprodutivos, incluindo comportamento sexual, receptividade sexual, preparo do útero para a implantação do blastocisto, preparação do desenvolvimento mamário para produção leiteira e regulação das contrações uterinas durante o parto (HAFEZ, 2000). Como a concentração sanguínea de progesterona reflete diretamente a função do corpo lúteo, ela é um indicador preciso da função ovariana e tem sido utilizada para monitorar a prenhez, ciclos estrais e atividade ovariana pós-parto (PETERS, 1984).

Em búfalas, PANDEY (1979) relata que a produção de progesterona plasmática é extremamente baixa no estro (dia 0), com o valor médio de

0,16-0,02 ng/mL, e, no 5º e 9º dia, é de $1,16 \pm 0,03$ ng/mL e $3,48 \pm 0,29$ ng/mL, respectivamente, alcançando um pico de $5,21 \pm 0,5$ ng/mL no 15º dia do ciclo. Por sua vez, CHAUHAN et al. (1983) encontraram a média de progesterona no soro sanguíneo de $0,06 \pm 0,01$ ng/mL a $0,17 \pm 0,06$ ng/mL, $0,08 \pm 0,02$ ng/mL a $0,35 \pm 0,38$ ng/mL, $1,47 \pm 0,27$ ng/mL a $0,07 \pm 0,01$ ng/mL no estro, metaestro e proestro respectivamente, enquanto SRIVASTAVA & SAHNI (1999) observaram que 3,45 e 8,62% das búfalas do seu estudo apresentam valores de progesterona no momento de inseminação, variando de $0,56 \pm 0,04$ a $0,90 \pm 0,17$ ng/mL.

SRIVASTAVA et al. (1999) encontraram variações nas concentrações plasmáticas de progesterona em búfalas Murrah durante três estações do ano (inverno, verão seco e verão úmido). Até o 5º dia do ciclo, a concentração de progesterona era de até 1 ng/mL, aumentando a partir do 7º dia (2 ng/mL) até o 15º dia (6 ng/mL), quando começou a declinar. De uma forma geral, a concentração de progesterona foi maior nos animais durante o inverno, indicando a presença de um corpo lúteo grande e funcional nesta estação.

Alguns trabalhos relatam a concentração de progesterona e estradiol conjuntamente. Para búfalas Carabao e Murrah, DOBSON & KAMONPATANA (1986) citam em sua revisão que a concentração de progesterona no sangue periférico foi de 0,13 a 0,27 ng/mL no cio. Esses valores aumentaram até o 14º-16º dia com a média de 1,51-2,6 ng/mL e 4,0-4,26 ng/mL para as duas raças, respectivamente. Para o estradiol, a concentração foi de 10-15 pg/mL na fase lútea e $31,34 \pm 1,70$ pg/mL no cio para búfalas da raça Murrah, e de 2,9 pg/mL na fase lútea e 9,0-13,0 pg/mL no cio para búfalas da raça Carabao.

Em novilhas Murrah, SINGH & MADAN (1999) relataram níveis plasmáticos de progesterona de $1,35 \pm 0,41$ ng/mL três dias após o estro, aumentando para $2,81 \pm 1,48$ ng/mL no 7º e 9º dias do ciclo estral e

diminuindo gradativamente com manutenção dos níveis acima de 1ng/mL no 18º dia do ciclo. Estes mesmos autores em 2002 utilizaram novilhas de 30 meses de idade para aplicação de PGF2 α (Dia 0 – 32 meses de idade) e 10 dias após o GnRH. Os animais que estavam na fase folicular (folículos palpáveis no ovário) apresentaram níveis plasmáticos de estradiol e progesterona variando entre 32,52 pg/mL a 86,15 pg/mL e 0,28 ng/mL a 0,75 ng/mL, respectivamente. Na fase lútea, a progesterona estava acima de 1 ng/mL (1,84 ng/mL a 2,93 ng/mL), entretanto, a concentração de estradiol apresentou-se menor (21,81 pg/mL a 24,11 pg/mL) em relação à fase folicular.

Em relação somente ao estradiol, SAMAD et al. (1988) observaram, que no proestro a concentração era de $19,25 \pm 1,39$ pg/mL para novilhas e $16,98 \pm 0,59$ pg/mL para vacas, no estro $29,60 \pm 3,05$ e $23,83 \pm 0,25$ pg/mL, no metaestro $14,23 \pm 0,96$ e $9,06 \pm 0,34$ pg/mL e no diestro $14,92 \pm 0,84$ e $10,34 \pm 0,33$ pg/mL, respectivamente. Enquanto OBA (1988) relatou valores de $43,32 \pm 10,51$ pg/mL no estro, $22,56 \pm 10,51$ pg/mL no metaestro e $22,61 \pm 10,51$ pg/mL no diestro em 24 búfalas mestiças Murrah adultas.

Em animais sincronizados com duas doses de PGF2 α (24 e 36 horas) no meio e no final da fase lútea, o pico de pré-ovulatório de estradiol foi de $15,06 \pm 4,54$ pg/mL e $10,16 \pm 0,84$ pg/mL, respectivamente. Com valores de 5,0 pg/mL a 6,0 pg/mL antes e após o tratamento para todos os animais (BEG et al., 1997). PORTO-FILHO (2000) observou, em uma novilha sincronizada com PGF2 α , um pico de estradiol de $8,9 \pm 1,7$ pg/mL.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, colheram-se útero, tuba uterina, ovário e sangue de 20 búfalas adultas, mestiças Murrah-Mediterrâneo, no matadouro Frigol em Lençóis Paulista-SP.

Imediatamente após a insensibilização com pistola automática, os animais foram erguidos e sangrados na canaleta de sangria, tendo-se, neste momento, efetuado a colheita de sangue em tubos de colheita a vácuo com heparina sódica. Após a abertura da cavidade abdominal, os tratos reprodutivos foram retirados e acondicionados em sacos plásticos, identificados com código que correspondia ao sangue colhido e resfriados para transporte até o Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp-Botucatu.

Inicialmente, os genitais foram cuidadosamente inspecionados e realizaram-se anotações, em uma ficha previamente elaborada (apêndice), como: presença de corpo lúteo, número e tamanho de folículos na superfície ovariana e secreções ou anormalidades uterinas. Realizaram-se duas incisões no sentido craniocaudal da cérvix uterina em direção aos cornos, e então colheram-se fragmentos com cerca de 2 cm da região do corpo, porções média e superior dos cornos uterinos, dando as denominações de regiões A para o corpo e B, C, D e E para os lados direito e esquerdo do útero, respectivamente (apêndice).

De 10 animais, colheram-se a tuba uterina e o ovário esquerdos e, do restante (10), a tuba uterina e o ovário direitos, de acordo com a tabela 1. Dessa forma, da tuba uterina, fragmentos do infundíbulo, ampola e istmo foram colhidos e incluídos no sentido longitudinal e transversal do órgão. Do

ovário, as regiões cortical e medular foram incluídas no sentido do diâmetro maior do órgão.

Tabela 1: Relação dos animais selecionados para a colheita de amostras da tuba uterina e do ovário.

Ovário direito/tuba direita	Ovário esquerdo/tuba esquerda
B1, B3, B6, B8, B14, B15	B2, B4, B5, B7, B9, B10,
B16, B18, B19, B20	B11, B12, B13, B17

3.1 – Microscopia de Luz

Para o estudo histológico, as amostras foram pré-fixadas em paraformaldeído a 4% diluído em água destilada a 60°C e posteriormente em solução de KARNOVSKY (1965), totalizando 24 horas de fixação. A desidratação foi realizada em etanol 70 % e etanol 95% por 4 horas cada.

Para a etapa de infiltração, utilizou-se resina a base de glicol metacrilato (Technovit 7100). Realizou-se a substituição progressiva do etanol pela mescla de infiltração (resina básica + ativador) e etanol 95 % por 4 horas, posteriormente trocada pela resina de infiltração em resina pura por no mínimo 12 horas.

Para a inclusão, foi preparada a mescla de inclusão adicionando-se ao líquido de infiltração o endurecedor. As amostras de tecido foram transportadas para histomoldes etiquetados (Histomold – LEICA), contendo a mescla de inclusão e sendo posteriormente colocados em estufa a 37° C durante 24 horas. A seguir, os blocos foram fixados em suporte de madeira com Araldite® e mantidos em estufa a 37° C até a polimerização da cola.

Os blocos foram cortados com 3 μm de espessura, utilizando-se navalhas de vidro e de tungstênio. Posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE), azul de toluidina (AT) diluído em tampão de McIlvaine nos pHs 2,5, 4,5 e 6,5 e ácido periódico de Schiff (PAS).

A coloração de HE é utilizada rotineiramente para cortes histológicos, com a finalidade de se observar a morfologia geral dos tecidos e órgãos (VIDAL & MELLO, 1987). Por sua vez, o AT é um corante catiônico que reage com os elementos ionizáveis nos tecidos os quais apresentam cargas negativas, os grupamentos aniônicos, mas a especificidade dos grupamentos depende do pH da solução em que o corante foi diluído (Tabela 2).

Tabela 2: Relação dos diferentes pHs e as correspondentes estruturas que reagem positivamente ao AT (PEARSE, 1968).

pH	Finalidade
0,5 - 2,5	corar grupos SO_4 (açúcares ácidos GAGs)
4,0 - 4,5	corar grupos SO_4 e PO_4 (DNA - RNA)
6,0 - 8,0	corar grupos SO_4 , PO_4 e COOH (carboidratos ácidos/proteínas)

A reação de PAS é muito utilizada para avaliações citoquímicas de polissacarídeos neutros, como o glicogênio, o amido e a celulose, além de glicoproteínas (CARVALHO & RECCO-PIMENTEL, 2001).

Para a realização da coloração tricrômica de Masson, alguns fragmentos foram desidratados e incluídos em parafina, e os blocos cortados com 4 μm com a finalidade de se observar a presença de fibras colágenas nos tecidos.

As lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss-Axiophoto HBO 100W/2 do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da

UNESP – Botucatu e em fotomicroscópio Zeiss Axioskop 20 do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ-UNESP – Botucatu.

3.2 – Análise Morfológica

Realizou-se uma análise morfológica dos cornos uterinos objetivando verificar o tipo de epitélio luminal, a presença e o tipo de glândulas uterinas, a classificação do epitélio glandular, a constituição do tecido conjuntivo nos estratos compacto, esponjoso e basal, da camada muscular e serosa.

Além disso, alguns critérios citados por OHTANI et al. (1993) e ALBOGHOBEISH (2000) foram adaptados para este trabalho, com a finalidade de se realizar uma análise qualitativa e de classificar os animais nas fases folicular e lútea, de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 Critérios utilizados para classificar os cortes histológicos dos animais nas fases folicular e lútea.

CRITÉRIO	INTENSIDADE
Critérios citados por OHTANI et al. (1993)	
Secreção glandular	0-nenhuma, 1-leve, 2-moderada, 3-intensa
Vacuolização supranuclear glandular	0-nenhuma, 1-moderada, 2-intensa
Mitose glandular	0-nenhuma, 1-moderada, 2-intensa
Critérios citados por ALBOGHOBEISH (2000)	
Vascularização	1-leve, 2-moderada, 3-intensa
Edema	0-nenhum, 1-leve, 2-moderado, 3-intenso
Reação de PAS	0-nenhuma, 1-moderada, 2-intensa

Para a descrição de casos de endometrite crônica, identificada em alguns animais, utilizou-se a seguinte classificação (Tabela 4):

Tabela 4: Classificação de endometrite utilizada de acordo o Departamento de Patologia Veterinária, FMVZ-UNESP – Botucatu.

ENDOMETRITE	FIBROSE	INFILTRADO CELULAR
Leve	+, 15%	Neutrófilos, linfócitos, Plasmócitos, macrófagos
Moderada	++, 25%	Poucos neutrófilos, mais linfócitos e plasmócitos
Acentuada	+++, 60%	Muitos linfócitos e plasmócitos, Nenhum neutrófilo

Na tuba uterina, observaram-se o tipo de epitélio de revestimento, presença e grau de pregueamento existente na mucosa, constituição da lâmina própria e disposição do tecido muscular e da serosa. Outras análises qualitativas foram utilizadas de acordo com a tabela 5.

Tabela 5: Critérios utilizados para a análise qualitativa da tuba uterina.

CRITÉRIO	INTENSIDADE*
Vacuolização citoplasmática com núcleo basal	0, 1, 2, 3
Protrusão citoplasmática	0, 1, 2, 3
Protrusão citoplasmática com extrusão nuclear	0, 1, 2, 3
Reação de PAS	0, 1, 2, 3

*0-nenhuma, 1-leve, 2-moderada, 3-intensa

Nos ovários, avaliaram-se a presença e a característica do epitélio de revestimento, a constituição da túnica albugínea, da medular e dos corpos lúteos e a presença de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, utilizando a classificação de HULSHOF et al. (1994) para folículos pré-antrais e a de GORDON (1994) para os folículos antrais. Verificou-se também a ocorrência de folículos morfologicamente normais ou degenerados (atrésicos).

3.3 – Análise Morfométrica

A mensuração das variáveis foi realizada através do analisador de imagens Leica DMLB, pelo programa Leica Qwin, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu. Para determinar o número de glândulas e células necessários para a realização da morfometria, foram calculadas as médias para vários tamanhos de amostras. O número que proporcionou a estabilização das médias (pouca variação) foi considerado o número ideal.

3.3.1 – Útero

Foram analisadas cinco lâminas histológicas coradas com HE de cada animal, contendo cada lâmina uma secção transversal do útero das regiões A, B, C, D e E. Em cada secção, dez (10) glândulas basais situadas no estrato basal e dez (10) superficiais presentes no estrato compacto foram escolhidas ao acaso para a realização, em μm , das seguintes medidas.

- a) Diâmetro total da glândula;
- b) Diâmetro do lúmen;
- c) Altura do epitélio glandular.

No epitélio luminal, vinte (20) células foram selecionadas para verificação da altura (μm) desde a membrana basal até o ápice da célula.

3.3.2 – Tuba Uterina

Para cada animal, utilizaram-se três lâminas coradas com PAS, contendo em cada lâmina, uma secção transversal da tuba uterina nas regiões do istmo, ampola e infundíbulo, das quais mensurou-se a altura (μm), desde a membrana basal até o ápice, de vinte (20) células ciliadas e vinte (20) células secretoras.

3.4 – Concentração Hormonal Plasmática

O sangue, colhido no momento da sangria, foi centrifugado por 10 minutos a 1200 g, sendo o plasma sanguíneo armazenado em tubos plásticos e congelado a -20°C até o momento da dosagem de progesterona e estradiol.

A determinação da concentração plasmática de progesterona baseou-se na técnica de radioimunoensaio descrita por KNICKERBOCKER et al. (1986) e padronizada por PINHEIRO et al. (1996), sendo que o antisoro específico contra progesterona bovina foi o mesmo utilizado por KNICKERBOCKER et al. (1986).

Para a determinação dos níveis plasmáticos de estradiol, utilizaram-se kits comerciais da 3 RD Generation Estradiol RIA DSL-39100 Diagnostic Systems Laboratories, conforme as especificações do fabricante, por procedimentos de radioimunoensaio (RIA) no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ-UNESP Botucatu.

3.5 – Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo método dos mínimos quadrados, conforme descrito na SAS V8 (1998), para as análises de variância, tendo como causas de variação as fases estudadas (1-folicular e 2-lútea), as regiões do útero (A, B, C, D, E) e da tuba uterina (istmo, ampola, infundíbulo) e o conjunto de animais de cada uma das fases, conforme o critério de classificação adotado. Admitiu-se serem os dados normais e independentes, distribuídos com variância igual a um (1) e média igual a zero. Para as diferenças entre médias observadas nas causas significativas, utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Análise Morfológica

Os animais que apresentaram, no endométrio, vascularização e mitose glandular de moderada a intensa e edema de leve a intenso foram classificados na fase folicular. Para a fase lútea, foi verificada a presença de secreção e vacuolização supranuclear glandular de moderada a intensa, de acordo com os critérios adotados na tabela 3. Os resultados dessa classificação foram confrontados com a dosagem hormonal de progesterona (P4) (Tabela 18), considerando como animais na fase folicular os que apresentaram P4 <1,0 ng/mL e, os acima desse valor, como pertencentes à fase lútea (Tabela 6).

Tabela 6: Relação dos animais e suas respectivas fases.

FASE FOLICULAR		FASE LÚTEA	
	B1		B2
	B3		B4
	B6		B5
	B11		B7
	B12		B8, B9
	B13		B10, B14
	B17		B15, B16
	B18		B19, B20
TOTAL	8		12

4.1.1 – Útero

Dos 20 animais utilizados, oito (38 %) encontravam-se na fase folicular e 12 (62 %) na fase lútea no momento da colheita do material. De uma forma geral, o útero era composto por três camadas: a mucosa ou endométrio, a muscular ou miométrio e a serosa ou perimétrio (Fig. 1). Estes achados estão de acordo com PRIEDKALNS & LEISER (1998), que descreveram essa distribuição para a maioria das fêmeas domésticas.

A mucosa apresentou-se dividida em estrato compacto, estrato esponjoso e estrato basal (Fig. 2), assim como observado por EL-SHEIK & ABDELHADI (1970). O estrato compacto consistiu em tecido conjuntivo frouxo com muitas células e mais vascularizado que o estrato esponjoso, possuindo muitos fibrócitos, fibroblastos, fibras colágenas e células inflamatórias, como mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos, conforme relatado por PRIEDKALNS & LEISER (1998). Entretanto, esse achado discorda do encontrado por EL-SHEIK & ABDELHADI (1970) que relataram o estrato compacto constituído de tecido conjuntivo denso.

Em alguns animais, observou-se um tecido conjuntivo denso no estrato basal próximo ao miométrio, o que pode ser visualizado pela coloração de tricrômio de Masson, pela qual as fibras colágenas foram coradas em verde (Fig. 3), semelhante ao descrito por MONTEIRO (1998) em vacas Nelore.

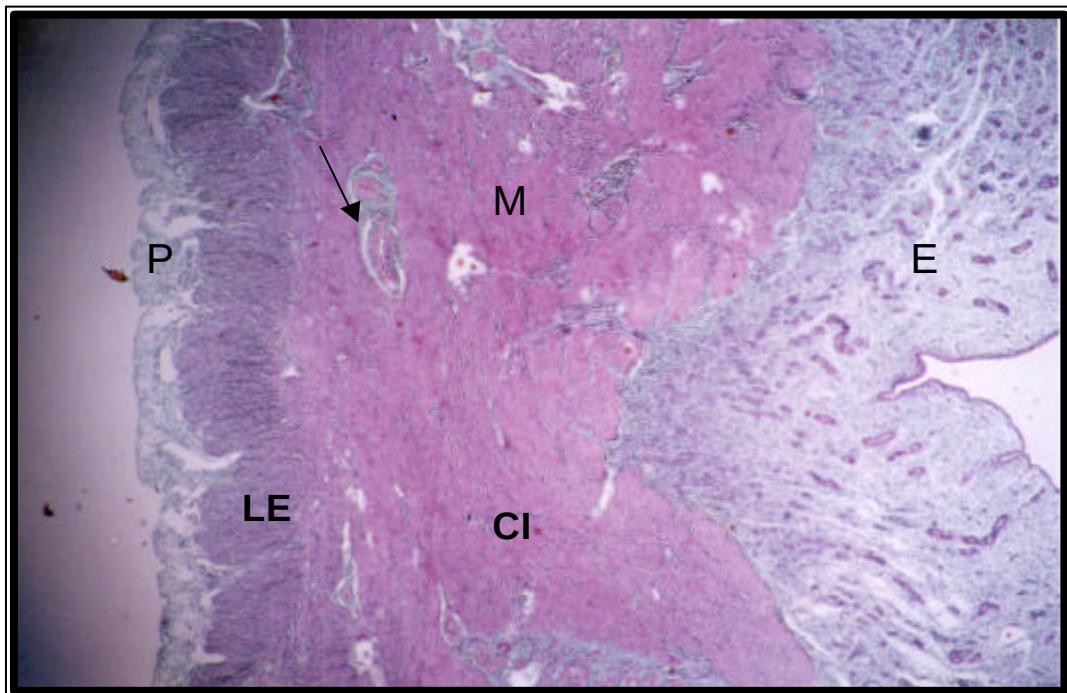


Figura 1: Fotomicrografia das três camadas do útero: endométrio (E), miométrio (M) com as subcamadas circular interna (CI) apresentando vasos sangüíneos (seta), a longitudinal externa (LE), e o perimetrio (P). Masson, x 40.

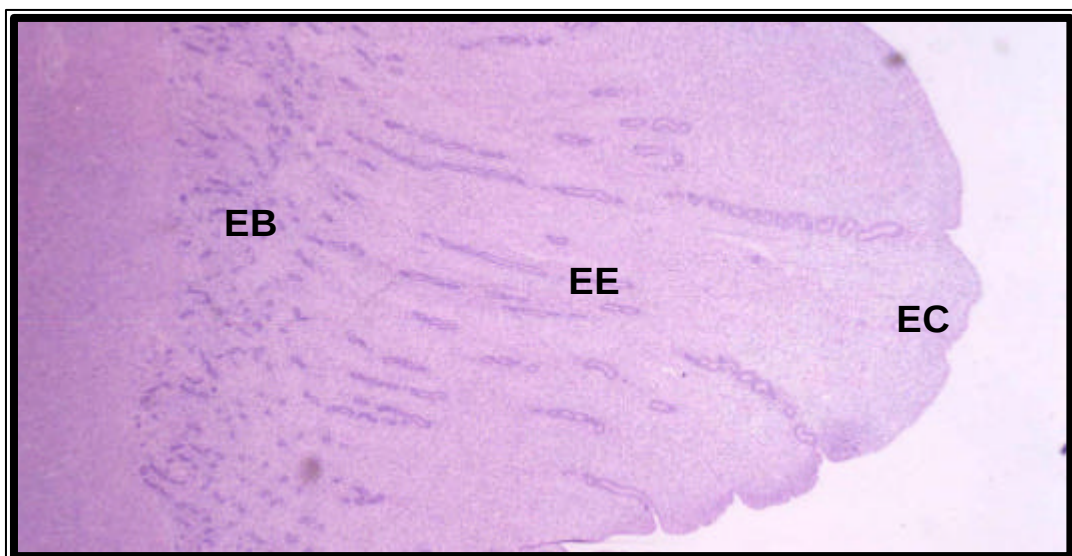


Figura 2: Fotomicrografia do endométrio com os estratos compacto (EC), esponjoso (EE) e basal (EB). HE, x 40.

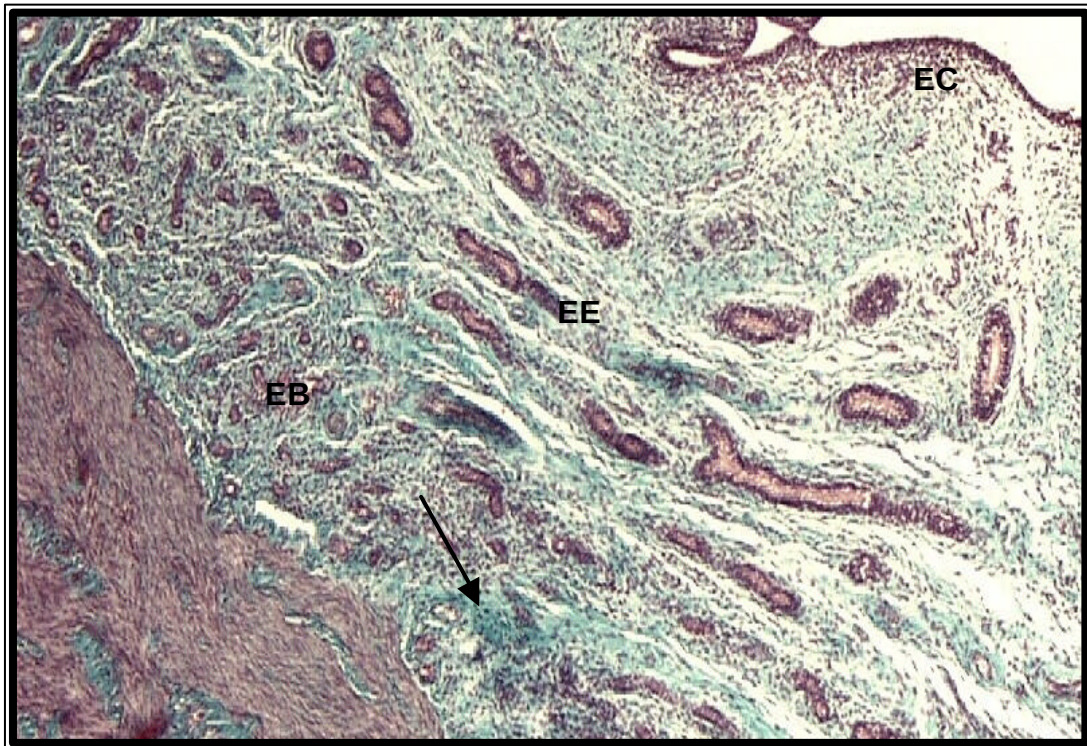


Figura 3: Fotomicrografia do endométrio com os estratos compacto (EC), esponjoso (EE) e o basal (EB) constituído de tecido conjuntivo denso com fibras colágenas coradas em verde (seta). Masson, x 40.

O epitélio de revestimento da superfície endometrial de todos os animais apresentou-se pseudo-estratificado (Fig. 4A) a cilíndrico simples (Fig. 4B) com células secretoras e células epiteliais não ciliadas com microvilosidades (Fig. 4C). EL-SHEIK & ABDELHADI (1970) e ALBOGHOBEISH (2000) verificaram a ocorrência de epitélio pseudo-estratificado sem mencionarem a fase do ciclo estral considerada e ALBOGHOBEISH (2000) observou células ciliadas nesse epitélio.

O epitélio pseudo-estratificado dos animais da fase folicular apresentou células secretoras com núcleo mais basofílico e comprimido e citoplasma eosinofílico com grânulos de secreção (Fig. 4D). Isso aconteceu por influência dos níveis plasmáticos de estradiol observados nos animais que estavam nesta fase, o que aumentou a produção de muco pelas células secretoras, como relatado na vaca por PRIEDKALNS & LEISER (1998).

As glândulas uterinas estavam presentes em grande quantidade, principalmente no estrato basal, em corte transversal, distribuídas regularmente pelo tecido, exceto nas regiões com vasos sangüíneos e nas carúnculas, o que está de acordo com PRIEDKALNS & LEISER (1998) e MONTEIRO (1998). Nos animais da fase folicular, as glândulas uterinas apresentavam-se mais retas (Fig. 5A), enquanto, na fase lútea, as mesmas se mostraram enoveladas e ramificadas (Fig. 5B). Achados como estes foram relatados em bovinos e bufalinos (SUNDARAVADANAN & VENKATASWAMY, 1973; JANAKIRAMAN et al., 1976; GONZALES et al., 1985; SINGH & SHARMA, 1985; OHTANI et al., 1993; PRIEDKALNS & LEISER, 1998) e revelam a ação dos níveis plasmáticos elevados de progesterona nos animais da fase lútea, sob o endométrio transformando-o de um estágio proliferativo para um estágio secretor.

As glândulas superficiais (porção superficial das glândulas uterinas) possuíam um epitélio semelhante ao da superfície, a não ser pelo fato de apresentarem células ciliadas (Fig. 6A, 6B). Esse epitélio apresentou

vacuolização supranuclear moderada a intensa das células secretoras (Fig. 7) e secreção glandular moderada a intensa nos animais que estavam na fase lútea, sendo esses achados provocados pelos níveis plasmáticos de progesterona encontrados nesta fase. As glândulas uterinas basais (porção basal das glândulas uterinas), por sua vez, possuíam um epitélio cilíndrico simples baixo ou cúbico simples com células secretoras e cílios nem sempre visíveis, porém poucas mudanças morfológicas foram observadas nessas glândulas entre as fases estudadas.

Mitoses em glândulas basais (porção basal) e superficiais (porção superficial), de intensidade moderada a intensa, foram encontradas em seis dos oito animais da fase folicular (Fig. 8A, 8B). Essas observações indicam o efeito dos níveis plasmáticos de estradiol elevado na fase folicular aumentando a atividade mitótica das células epiteliais glandulares. Achados semelhantes foram descritos em novilhas bovinas (OHTANI et al, 1993), mulheres (JOHANNISSON, et al., 1982), camundongos (FINN & MARTIN, 1971, 1973) e ratos (CLARK, 1971).

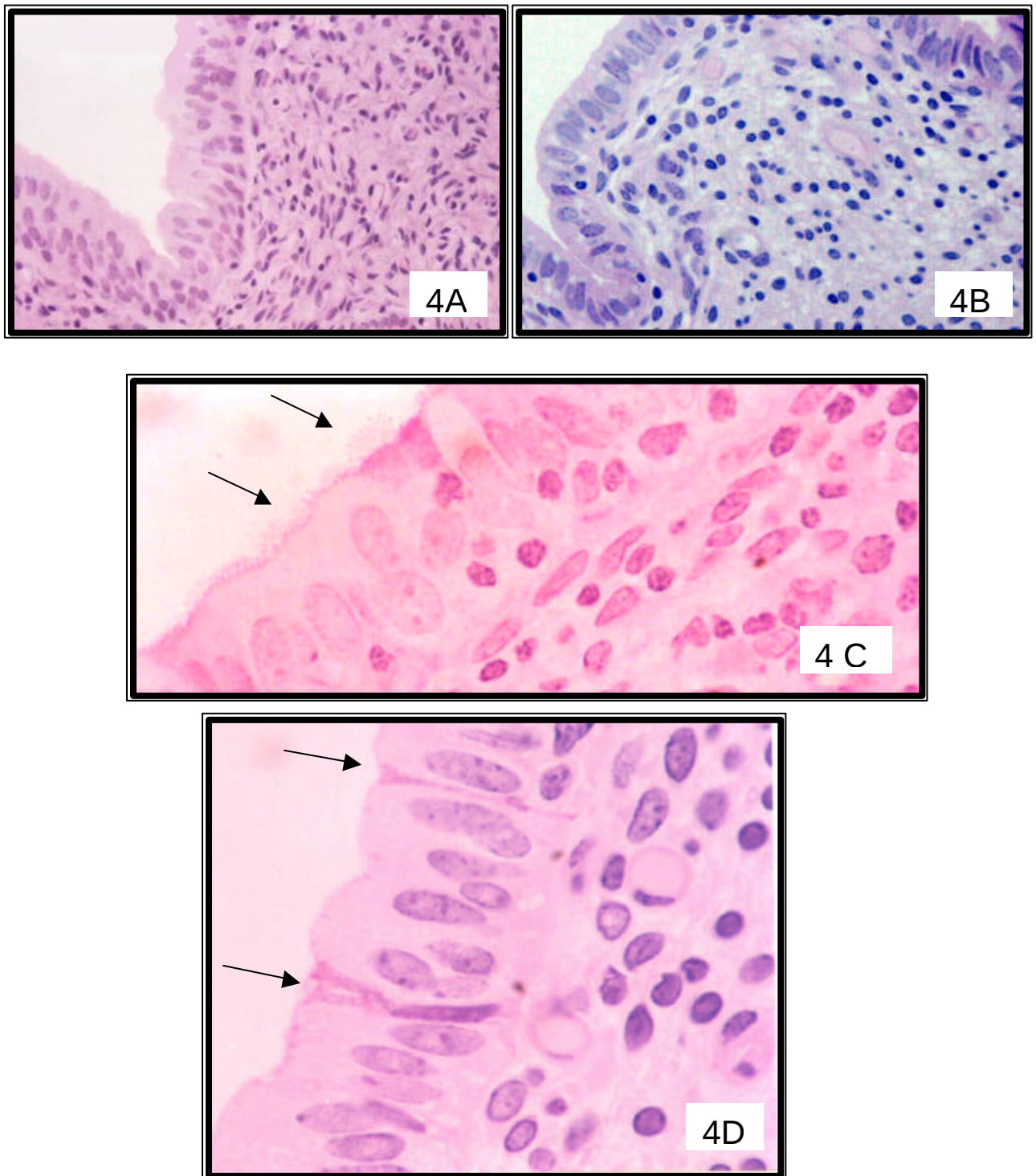


Figura 4: Fotomicrografias do epitélio luminal do útero de búfalas.

A) Epitélio pseudo-estratificado. HE, x 100.

B) Epitélio cilíndrico simples. HE, x 992.

C) Células epiteliais com microvilosidades. PAS, x 250.

D) Células secretoras com núcleo mais basofílico, comprimido e citoplasma eosinofílico com grânulos de secreção (seta). HE, x 250.

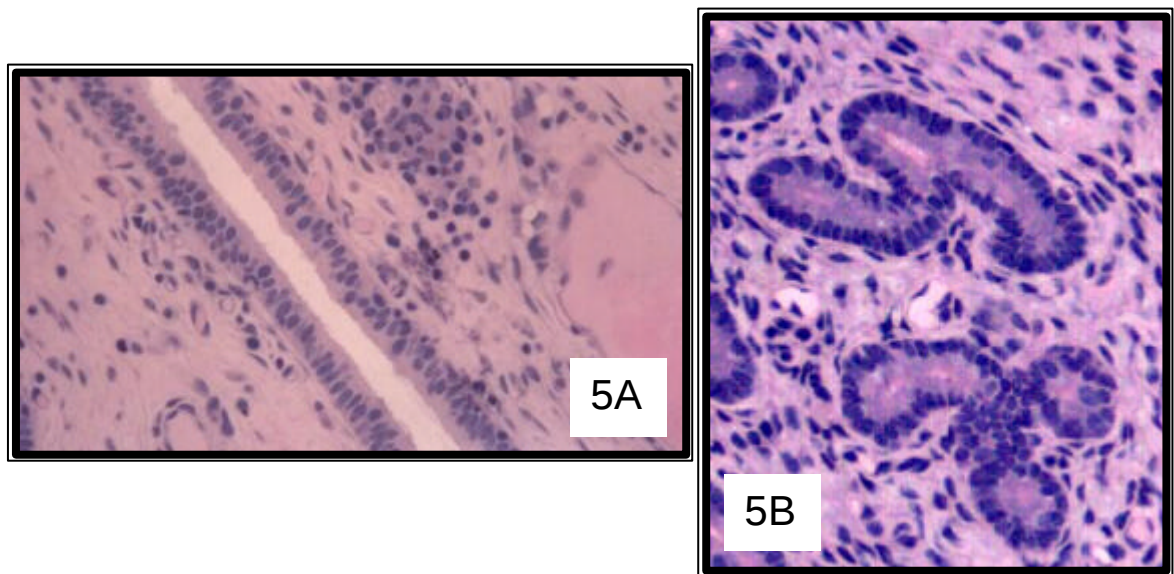


Figura 5: Fotomicrografias de glândulas uterinas:
A) Tubular simples. HE, x 100.
B) Ramificada. HE, x 992.

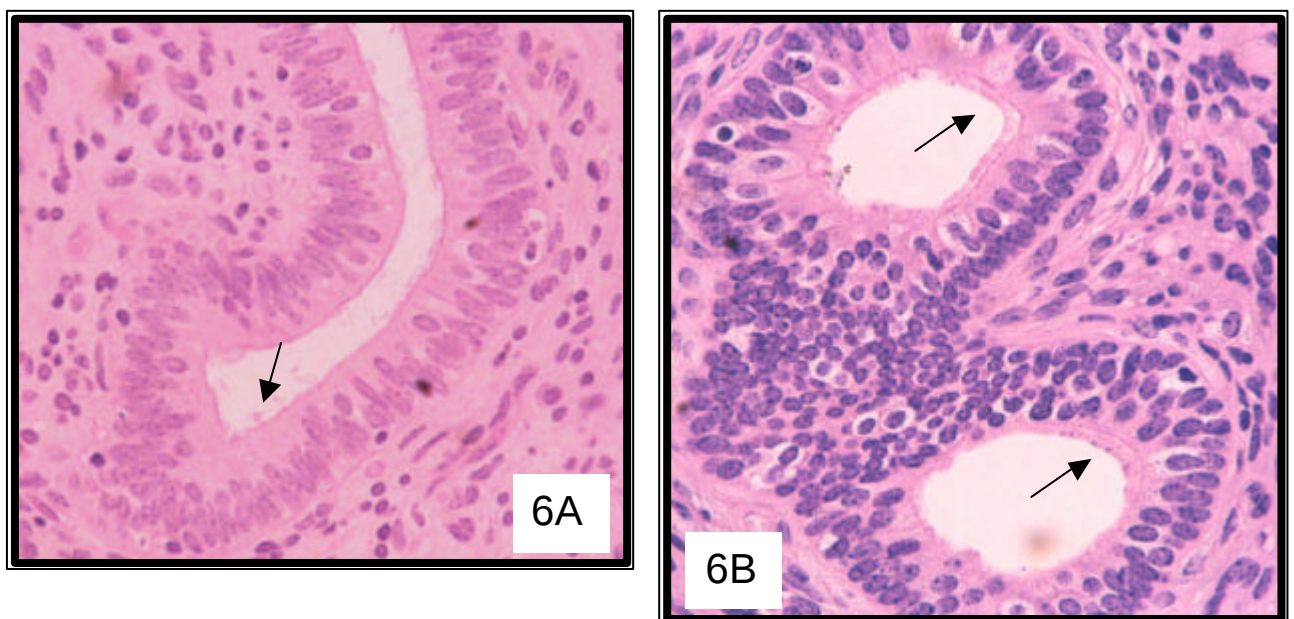


Figura 6 A, B: Fotomicrografias de glândulas uterinas superficiais (porção superficial das glândulas uterinas) com cílios (seta). HE, x 100.

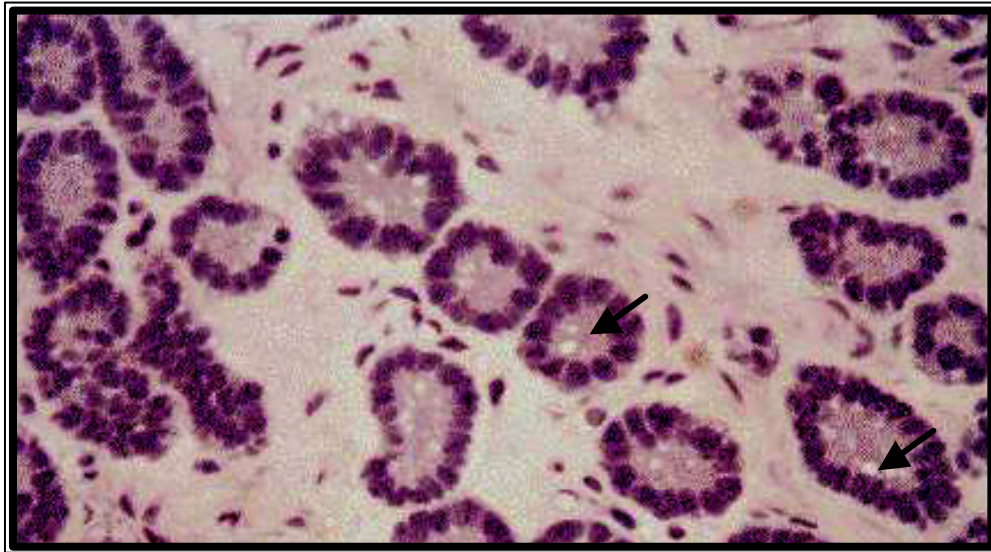


Figura 7: Fotomicrografia mostrando glândulas uterinas com vacuolização supranuclear (seta). HE, x 100.

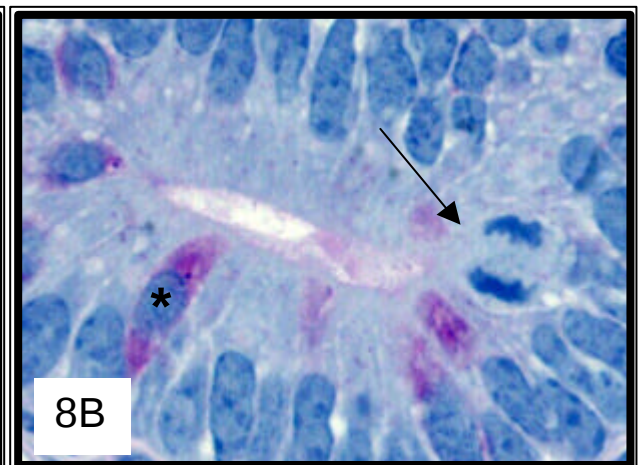
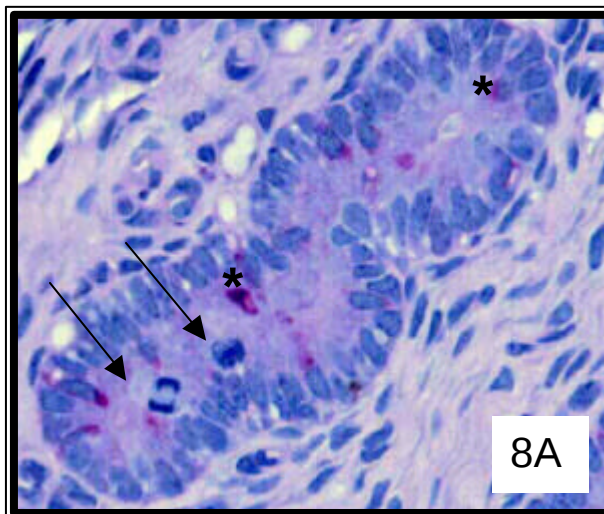


Figura 8 A, B: Fotomicrografias de glândulas uterinas com células epiteliais em mitose (seta) e com reação ao PAS(*). A , x 992, B, x 2470.

Observou-se reação positiva ao PAS (Fig. 9) em glândulas basais (porção basal) e superficiais (porção superficial) em todos os animais de ambas as fases, mas ocasionalmente ocorreu reação no epitélio luminal. Não foi possível identificar nenhuma correlação entre as fases e a intensidade da reação, em virtude de uma grande variação na reação entre cortes histológicos de um mesmo animal. No entanto, este achado evidencia que a secreção glandular é composta por açúcares neutros e não por GAGs ácidas já que não houve reação ao AT, assim como citado por SUNDARAVAN & VENKATASWAMY (1973).

Aumento de vascularização do endométrio, de moderado a intenso, foi observado em todos os animais que encontravam-se na fase folicular, mas edema endometrial, de leve a intenso, foi visualizado nas regiões do estrato compacto e esponjoso somente em dois animais dessa fase (Fig. 10). Os níveis plasmáticos elevados de estradiol nos animais dessa fase provocou um aumento da vascularização e consequentemente edema no endométrio como já foi observado em búfalas (SUNDARAVADANAN & VENKATASWAMY, 1973) e vacas (WORDINGER & DICKEY, 1971). PRIEDKALNS & LEISER (1998) corroboram estes achados na medida em que observaram edema e hiperemia marcantes durante o estro.

Áreas com agrupamentos vasculares sangüíneos de paredes espessas foram visualizadas, em alguns animais, entre as glândulas endometriais. As carúnculas (Fig. 11) eram formadas de tecido conjuntivo denso com vasos sangüíneos discretos, assim como descrito por MONTEIRO (1998) para vacas e novilhas bovinas.

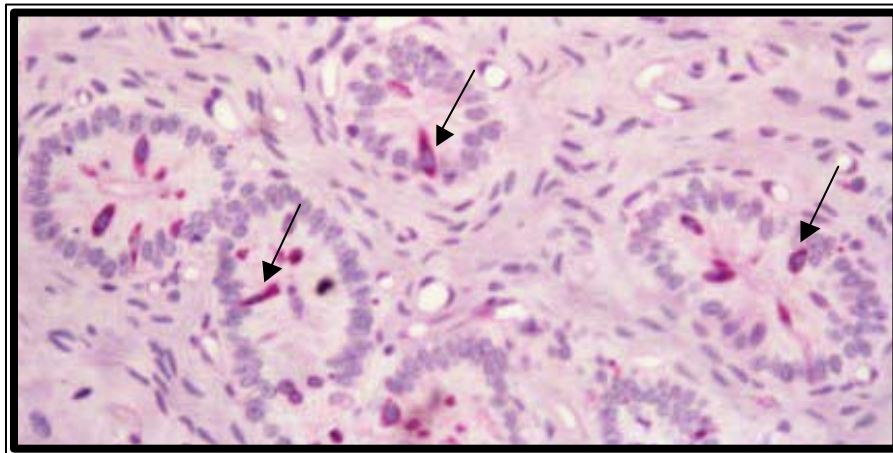


Figura 9: Fotomicrografia de glândulas uterinas com células secretoras (seta) apresentando reação ao PAS, x 100.

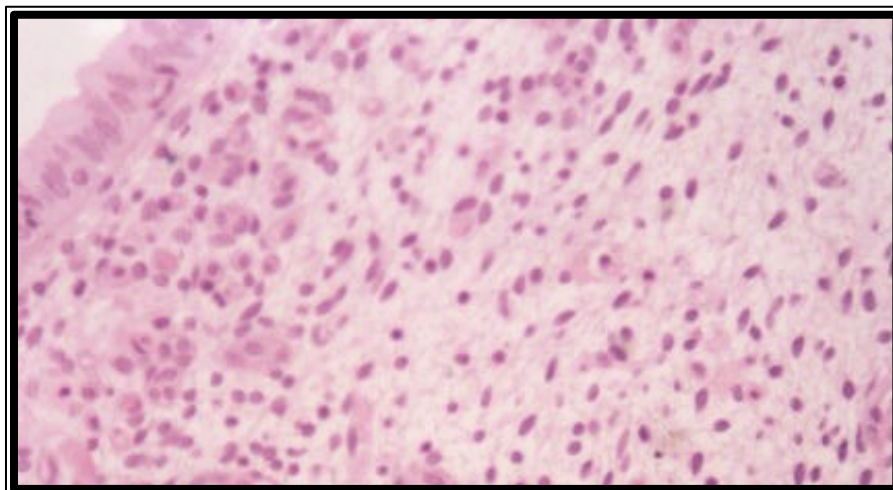


Figura 10: Fotomicrografia do endométrio apresentando edema no estroma evidenciado por mais espaço entre as células. HE, x 100.

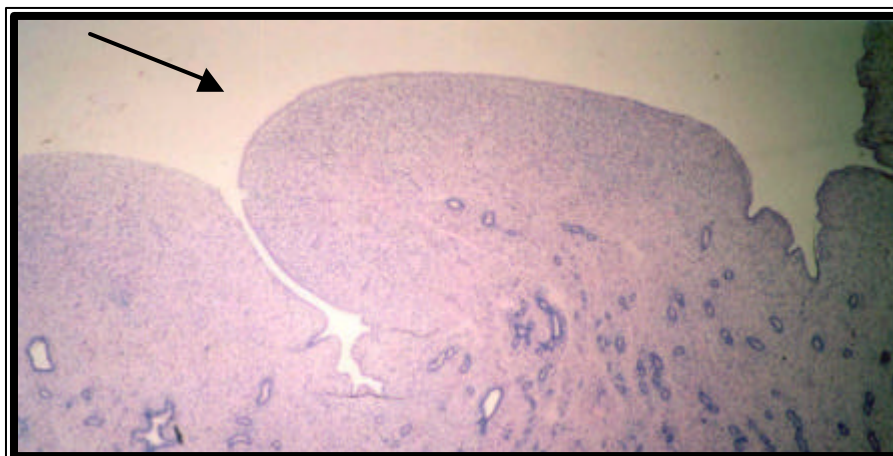


Figura 11: Fotomicrografia de uma carúncula (seta). HE, x 40.

Em relação ao miométrio, este foi dividido em uma subcamada circular interna, um estrato vascular e uma subcamada longitudinal externa (Fig. 3). A subcamada circular interna apresentou-se mais espessa que a subcamada longitudinal externa. Em alguns casos, as fibras musculares estavam bem ordenadas, mas a maioria mostrou áreas com intenso entrecruzamento dessas células. Verificou-se essa característica em áreas próximas ao endométrio, onde as fibras se apresentaram em grupos oblíquos ou irregulares. Constatou-se, em poucas situações, a invasão de grupos de glândulas endometriais nesta camada. Os vasos sangüíneos do estrato vascular estavam delimitados por uma camada de tecido conjuntivo, mas algumas vezes os vasos sangüíneos se encontravam no meio da camada circular interna. Em búfalas (EL-SHEIK & ABDELHADI, 1970) e vacas Nelore (MONTEIRO, 1998), já foi observada a presença das duas subcamadas e do estrato vascular.

A serosa apresentou-se constituída de tecido conjuntivo frouxo (Fig.12) e um mesotélio, com pequenos vasos sangüíneos e linfáticos discretos, como descrito para várias espécies (DELLMANN & BROWN, 1982; BANKS, 1992; PRIEDKALNS & LEISER, 1998). Pela coloração com tricrômio de Masson, constatou-se a presença de septos delicados corados em verde, indicando a presença de fibras colágenas, em direção à subcamada longitudinal externa do miométrio (Fig. 13), como relatado para novilhas Nelore (MONTEIRO, 1998).

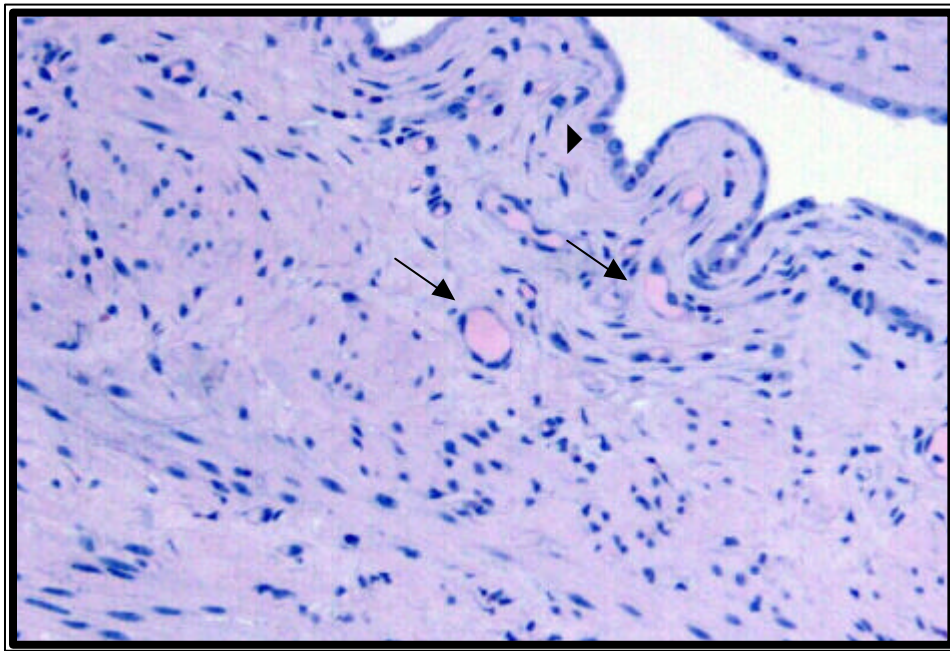


Figura 12: Fotomicrografia da camada serosa do útero constituída de tecido conjuntivo frouxo, vasos sangüíneos (seta) e coberta por um mesotélio (cabeça de seta). HE, x 992.



Figura 13: Fotomicrografia da serosa (S) emitindo septos (seta) delicados corados em verde em direção à subcamada longitudinal externa (LE) do miométrio. HE, x 80.

Dos 20 animais utilizados no experimento, 10 apresentaram quadros de endometrite (Tabela 7) caracterizada pela ocorrência de fibrose ao redor de algumas glândulas (Fig. 14 A, B) e de infiltrados inflamatórios nos estratos compacto, esponjoso (Fig. 15A) e de localização peri-glandular (Fig. 15B), compostos preferencialmente por linfócitos e plasmócitos, mas eosinófilos, mastócitos e neutrófilos também foram visualizados.

Tabela 7: Resultados histopatológicos da classificação de endometrite.

GRAU DE ENDOMETRITE	ANIMAL
LEVE	B4, B5, B6, B10, B13, B16
MODERADA	B3, B2, B8
ACENTUADA	B17

Neste trabalho, não se observou dilatação glandular cística, mas verificou-se a ocorrência de acúmulos linfóides e infiltração difusa de células inflamatórias em todos os graus de endometrite. Ao passo que OHASHI et al. (1996) relataram a formação de acúmulos linfóides somente em casos de endometrite crônica moderada à severa.

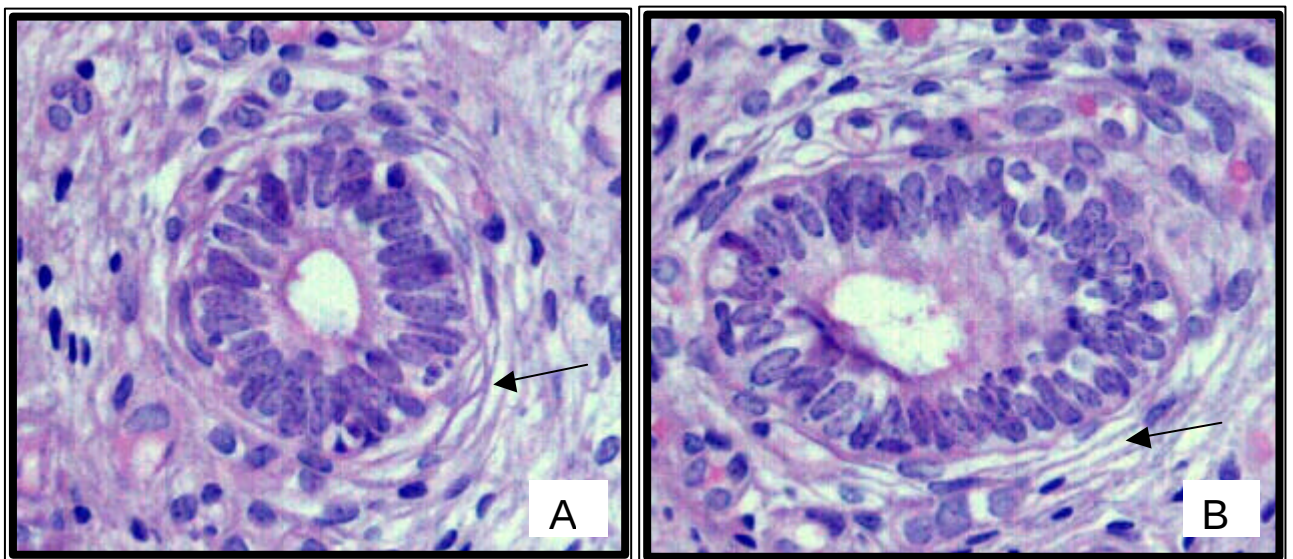


Figura 14 A, B: Fotomicrografias mostrando fibrose periglandular (seta). HE, x 992.

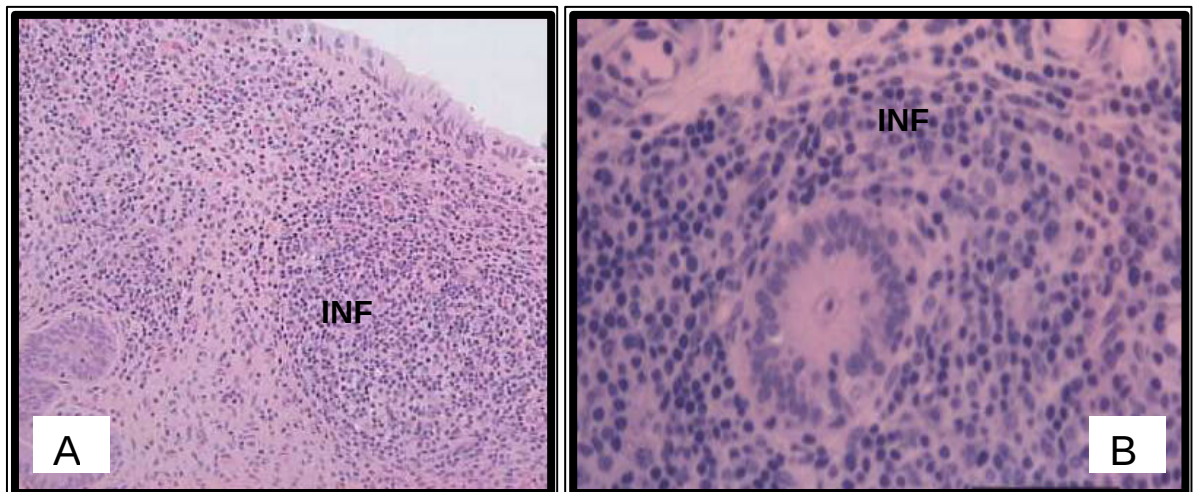


Figura 15 A, B: Fotomicrografias mostrando infiltrados inflamatórios (INF) no endométrio e ao redor de glândulas. HE, A x 250, B x 100.

4.1.2 – Tuba Uterina

A tuba uterina da búfala estava dividida em infundíbulo, ampola e istmo e, histologicamente, sua parede apresentou-se formada por três porções, a mucosa, a muscular e a camada serosa (Fig. 16). Essa descrição coincide com a de outros animais domésticos (DELLMANN & BROWN, 1982; ELLINGTON, 1991; BEARDEN & FUQUAY, 2000).

A mucosa possuía dobras longitudinais numerosas e ramificadas, variando essa disposição de acordo com o segmento da tuba. Nas secções da região do istmo, observaram-se pregas longitudinais curtas e largas, variando de quatro a seis e pregas menores delgadas em número de três a onze, média de seis, o que está de acordo com os achados de MONTEIRO (1998) em vacas e novilhas Nelore.

O epitélio da tuba uterina da búfala possuía dois tipos de células epiteliais, secretora e ciliada, e um terceiro tipo basal (Fig. 17). As células secretoras eram delgadas, caracterizadas pela presença de grânulos de secreção e superfície apical com microvilos. As células ciliadas apresentaram-se colunares e volumosas com cílios em suas superfícies apicais. E as células basais eram menores que as ciliadas e secretoras, localizadas na região basal do epitélio, com tamanho e forma variáveis. O núcleo volumoso variou de ovóide a piriforme. As células basais já foram descritas como células de origem não epitelial: linfócitos (HOLLIS et al., 1984; ERIKSEN et al., 1994; CROW et al., 1994) e macrófagos (BRENNER & SLAYDEN, 1994). Para MURRAY (1997), as estruturas nuclear e citoplasmática das células basais da tuba uterina do carneiro não eram típicas de linfócitos e macrófagos. A ultra-estrutura desse terceiro tipo celular já foi descrita em: carneiros (HOLLIS et al., 1984), coelhos (ODOR, 1974), vacas e porcas (NELLOR, 1965), e primatas (ODOR, 1982), embora a função ainda seja incerta.

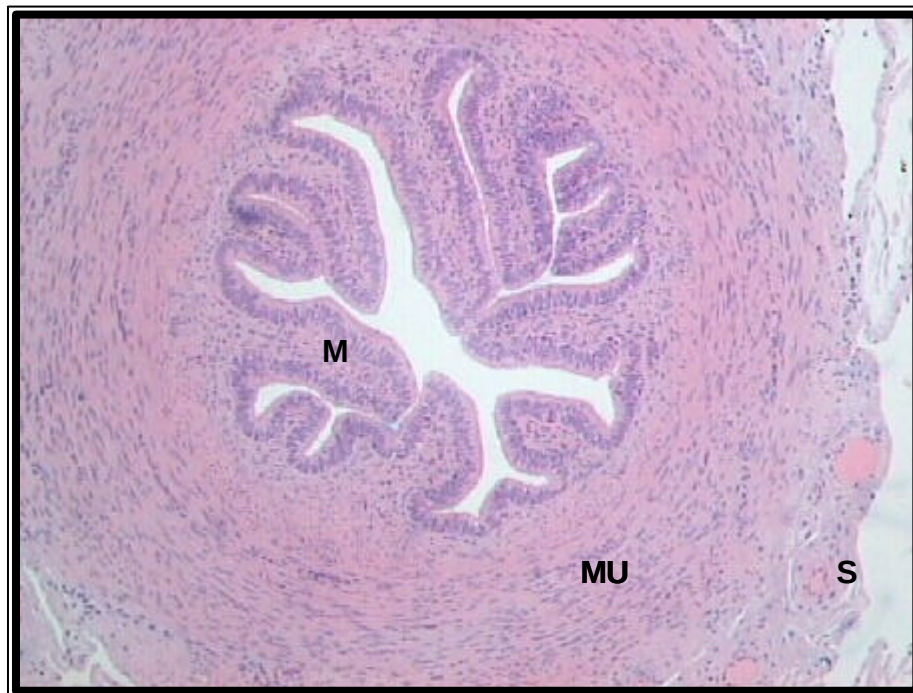


Figura 16: Fotomicrografia de um corte transversal da tuba uterina, na região do istmo, mostrando a mucosa (M), muscular (MU) e a serosa (S). HE, x 62.

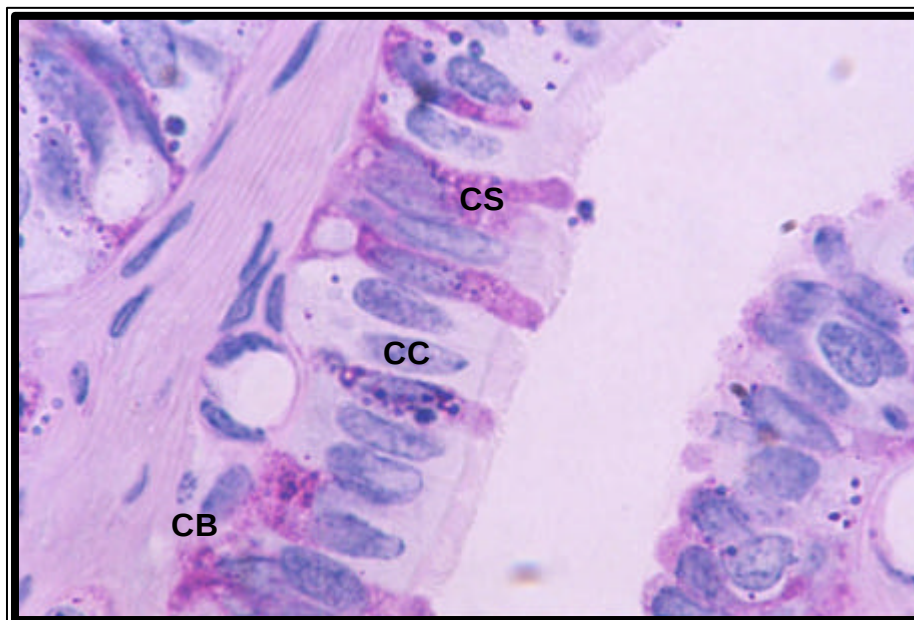


Figura 17: Fotomicrografia do epitélio de revestimento da tuba uterina, na região da ampola, mostrando células ciliadas (CC), secretoras (CS) e basais (CB). PAS, x 250.

No istmo, durante a fase folicular, as pregas estavam revestidas, na maioria dos casos, por epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado alto. Enquanto na fase lútea, a mucosa era revestida por epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado mais baixo e, em algumas regiões, por epitélio cilíndrico ciliado simples. De um modo geral, os cílios eram pequenos e escassos.

As células secretoras do istmo não continham protrusão citoplasmática e extrusão nuclear em nenhuma fase do ciclo estral, o que foi relatado em ovelhas (MURRAY, 1995), mas difere de achados de protrusões nas células secretoras do istmo bovino (ABE & OIKAWA, 1993). Todavia, essas células mostraram reação, leve a intensa, positiva ao PAS e, algumas vezes, ao AT em todos os pHs, indicando a presença de açúcares neutros e GAGs ácidas carboxiladas e sulfatas. No coelho, verificou-se a ocorrência de polissacarídeos neutros no istmo e na ampola, ao passo que GAGs carboxiladas e sulfatadas estavam presentes apenas no istmo (MENGHI et al., 1984).

A lâmina própria consistia em tecido conjuntivo frouxo bem celularizado, com fibras colágenas, linfócitos, plasmócitos e mastócitos (Fig. 18 A, B), assim como descrito por DELLMANN & BROWN (1982). Na fase folicular, notou-se o aumento do número de células e da vascularização no tecido.

A camada muscular apresentou uma espessa subcamada circular interna, na qual as fibras musculares lisas estavam distribuídas regularmente entremeadas com fibras musculares em corte oblíquo, e uma subcamada longitudinal externa delgada, e em alguns casos, as fibras tornavam-se dispersas formando grupos de diversos tamanhos até a camada serosa. Pequenos vasos sangüíneos foram visualizados entre as fibras musculares. Em vacas e novilhas, foi relatada a mesma distribuição das camadas musculares do istmo (MONTEIRO, 1998).



Figura 18 A: Fotomicrografia do epitélio de revestimento da tuba uterina e lâmina própria com vasos sanguíneos (V) e fibras colágenas (seta). Masson, x 992.

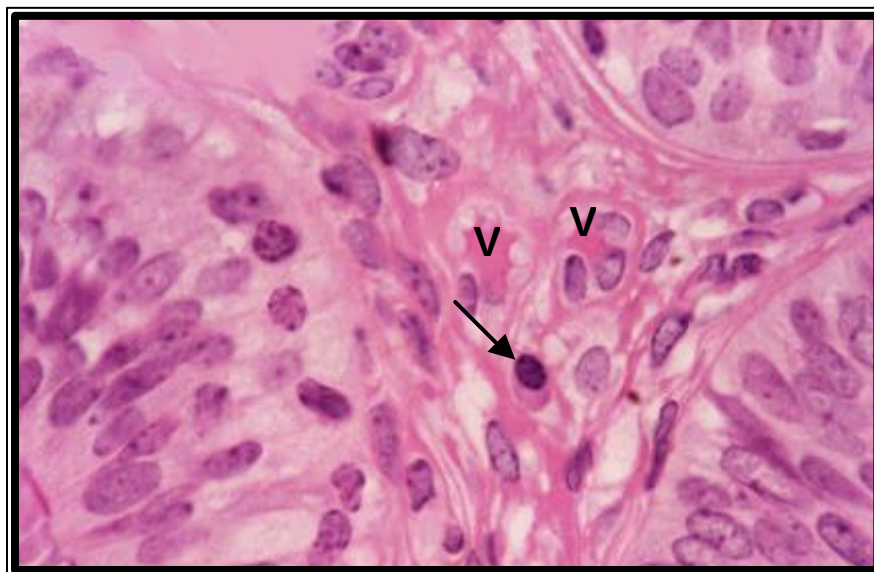


Figura 18 B: Fotomicrografia mostrando a lâmina própria da tuba uterina com vasos sanguíneos (V) e um plasmócito (seta). HE, x 250.

A camada serosa do istmo era formada de tecido conjuntivo frouxo com fibras colágenas, muito celular e irrigado por pequenos vasos sangüíneos. Em alguns casos, alguns vasos maiores, estendiam-se até o mesosalpinge. Verificou-se ainda, a presença de linfócitos e plasmócitos dispersos no tecido conjuntivo, estando este coberto por um mesotélio constituído por epitélio cúbico simples e algumas vezes pavimentoso.

Nas secções da região ampular da tuba uterina, a mucosa apresentou pregas primárias longas e delgadas, variando em número de 10 a 24, com três a seis pregas secundárias, porém nem todas as pregas primárias continham pregas secundárias. As pregas menores, de diversos tamanhos, estavam presentes em número de 18 a 26, sem pregas secundárias. Adicionalmente, observaram-se algumas pregas com origem distinta, unindo-se logo acima e formando apenas uma única estrutura. No entanto, MONTEIRO (1998) citou um número reduzido de pregas primárias (4-7) e pregas menores (10-25) em vacas Nelore.

Todas as pregas estavam revestidas por um epitélio pseudo-estratificado alto na fase folicular (Fig. 19 A) e mais baixo na fase lútea (Fig. 19 B), sendo, muitas vezes, esse epitélio, na base das pregas, cilíndrico simples (Fig. 17). De uma forma geral, o epitélio era ricamente ciliado quando comparado ao epitélio do istmo, especialmente na fase folicular.

Na ampola de todos os animais, verificaram-se protrusões citoplasmáticas com extrusão nuclear das células secretoras nas duas fases estudadas. Porém, na fase folicular, era muito mais evidente a ocorrência de protrusão citoplasmática com liberação de grânulos secretores e pouca extrusão nuclear (Fig. 19 A). Ao contrário, na fase lútea, a extrusão nuclear era mais intensa que a citoplasmática (Fig. 20). Esses resultados estão de acordo com as descrições, na ampola de ovelhas, de protrusões citoplasmáticas no estro até o 6º dia de gestação e extrusões nucleares no 16º dia de gestação (MURRAY, 1995), ao passo que ABE & OIKAWA

(1993) observaram somente protrusões citoplasmáticas na ampola de vacas na fase lútea.

Além disso, as células secretoras mostraram reação, leve a intensa, positiva ao PAS (Fig. 19 A, B) e ao azul de toluidina (Fig. 21) em todos os pHs, indicando a presença de açúcares neutros e GAGs ácidas, conforme descrito para o istmo.

A lâmina própria da ampola apresentou a mesma constituição da região do istmo, com os vasos sangüíneos dilatados em alguns exemplares. A camada muscular da ampola possuía as subcamadas circular interna e longitudinal externa bem delgadas, podendo, esta última, estar ausente em algumas áreas. Constatou-se a presença de pequenos vasos sangüíneos em meio às fibras musculares. A camada serosa desta região era sempre discreta, constituída por tecido conjuntivo frouxo com muitos vasos sangüíneos e linfócitos, plasmócitos e, algumas vezes, eosinófilos e mastócitos. O tecido conjuntivo era revestido por um mesotélio constituído por epitélio cúbico simples.

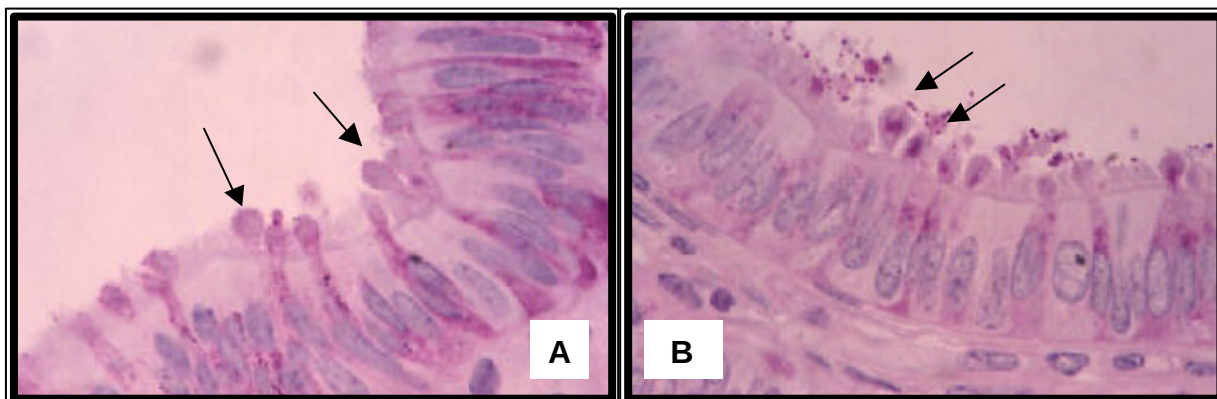


Figura 19: Fotomicrografias do epitélio de revestimento pseudo-estratificado alto na fase folicular (A) e baixo na fase lútea (B), na região da ampola, com protrusões citoplasmáticas das células secretoras apresentando grânulos com reação ao PAS (seta), x 250.



Figura 20: Fotomicrografia do epitélio de revestimento da tuba uterina apresentando protrusão citoplasmática com extrusão nuclear. HE, x 250.

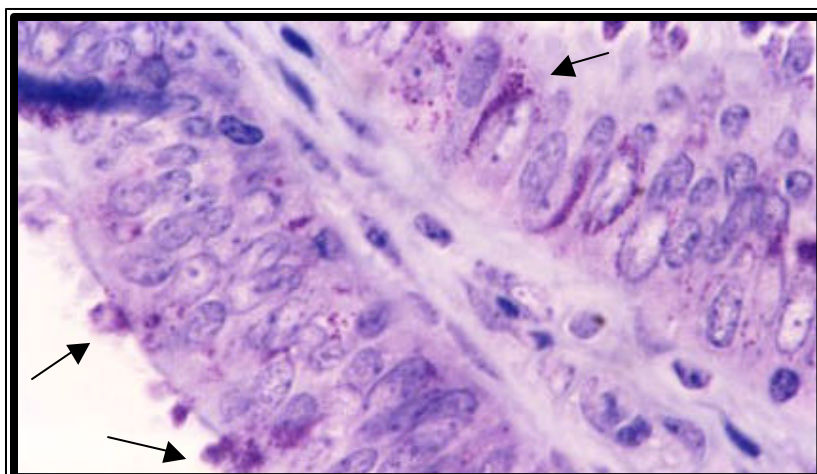


Figura 21: Fotomicrografia do epitélio de revestimento da tuba uterina apresentando células secretoras com grânulos com reação ao AT (seta), x 250.

No infundíbulo, notou-se a ocorrência de pregas primárias bem altas, estreitas e bastante ramificadas. Nas secções avaliadas, tais pregas variavam em número de 18 a 22, com até 10 pregas secundárias e 2-3 terciárias. As menores, de diversos tamanhos, variaram em número de 16 a 30 sem pregas secundárias. O epitélio de revestimento pseudo-estratificado era mais alto, com cílios mais longos e em grande quantidade na fase folicular. O infundíbulo de búfalas é altamente pregueado quando comparado ao infundíbulo de vacas, como citado por MONTEIRO (1998), no qual o número de pregas primárias maiores e menores variou de 5-10 e 12-28, respectivamente.

Assim como na ampola, foi observada, no infundíbulo, uma grande quantidade de protrusões citoplasmáticas com extrusão nuclear das células secretoras, as quais apresentaram o mesmo comportamento descrito para a ampola nas fases folicular e lútea. As células secretoras mostraram reação leve a intensa ao PAS e leve a moderada ao azul de toluidina em pH 6,0. No infundíbulo de vacas, NAYAK & ELLINGTON (1977) observaram protrusões citoplasmáticas com a liberação de grânulos durante o estro até o 3º dia do ciclo estral e nos dias nove e dez a ocorrência de protrusão citoplasmática com extrusão nuclear

Neste trabalho, verificou-se em um caso, a presença, em pequena quantidade, de células globosas com citoplasma claro e núcleo grande e arredondando no epitélio.

A lâmina própria era formada de tecido conjuntivo frouxo com muitas células e altamente vascularizado, com os vasos sangüíneos dilatados em alguns casos. O estrato muscular do infundíbulo apresentou ambas as subcamadas, a circular interna e a longitudinal externa, delgadas e em alguns momentos, a última não era visível. A camada serosa mostrou-se discreta, formada por tecido conjuntivo frouxo com vasos sangüíneos, muitas vezes, dilatados e linfócitos.

A ocorrência de um epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado alto com grânulos secretores, em todas as regiões da tuba, na fase folicular, é explicada pelo aumento dos níveis plasmáticos de estradiol causando diferenciação desse epitélio através de hipertrofia, hiperplasia celular e aumento da secreção tubárica, conforme relatado para várias espécies animais (LEESE, 1988; BUHI, 2002). Contudo, existem poucos trabalhos na literatura que comentem a função das protrusões citoplasmáticas com ou sem extrusão nuclear durante as fases folicular e lútea. Segundo alguns autores (SAWYER et al., 1984; BRENER & SLAYDEN, 1994), as células do epitélio tubárico são perdidas por extrusão ou apoptose celular, isto é, a protrusão citoplasmática com extrusão nuclear faz parte do processo de atrofia do epitélio provocado pela progesterona, durante a fase lútea. Não foi observado neste trabalho a ocorrência de deciliação na fase lútea e sim alterações na altura dos cílios, semelhante ao descrito para ovelhas (NAYAK et al., 1976).

4.1.3 – Ovário

O ovário da búfala apresentou-se constituído histologicamente de uma região cortical e outra medular. A região cortical era revestida por um epitélio germinativo do tipo simples, sendo cúbico (Fig. 22) na maior extensão e pavimentoso em algumas regiões, o que discorda de DANNEL (1987), que observou esse epitélio constituído de células pavimentosas e, em algumas regiões, cúbicas, ao passo que PRASAD et al. (1979) observaram células cúbicas, com estratificação em alguns locais. Abaixo desse epitélio, encontrou-se a túnica albugínea constituída de duas a três camadas de tecido conjuntivo denso, com as fibras de uma camada ordenadas em sentido perpendicular à próxima camada, como relatado por DANNEL (1987).

O estroma ovariano era formado de tecido conjuntivo frouxo no qual se encontravam os folículos ovarianos funcionais e atrésicos, corpos lúteos e corpos alvíscos. Essa organização é mencionada para a maioria das fêmeas domésticas, conforme HAFEZ (2000) e BANKS (1992). O córtex apresentou-se vascularizado, possuindo pequenos vasos sanguíneos e linfáticos, achado semelhante ao de DANNEL (1987).

De acordo com o estágio de desenvolvimento, os folículos pré-antrais foram classificados em: primordiais (oócito circundado por uma única camada de células da granulosa ou foliculares de forma pavimentosa), primários (caracterizados pela presença de uma única camada de células da granulosa de forma cúbica em torno do oócito) e secundários (oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica) (Fig. 23 A, B, C); e com base em sua qualidade morfológica, em folículos normais ou degenerados.

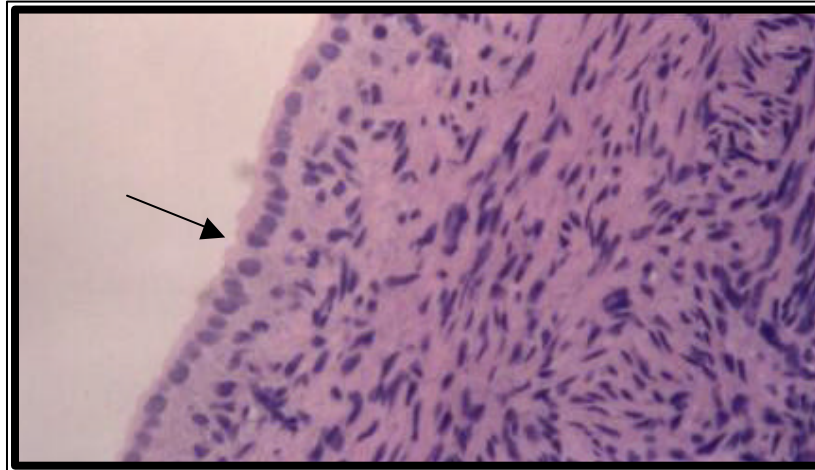


Figura 22: Fotomicrografia do epitélio germinativo cúbico simples (seta) e da túnica albugínea (TA). HE, x 100.

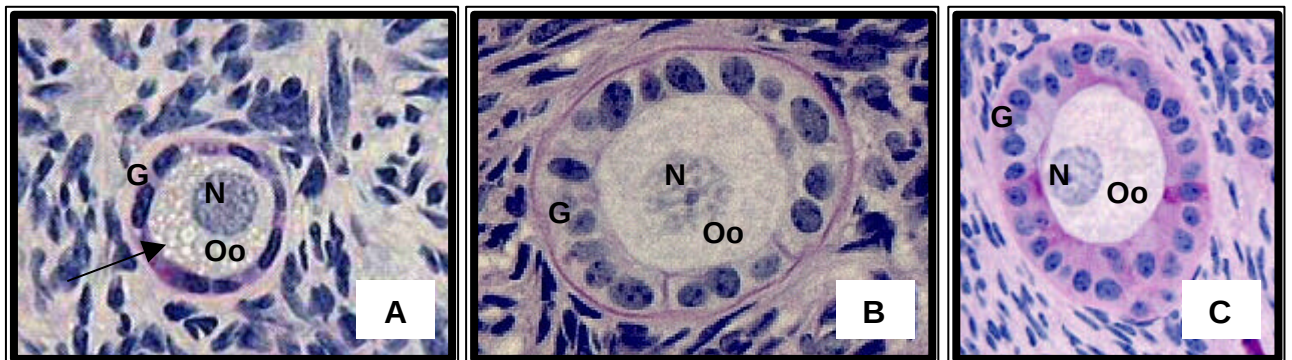


Figura 23: Fotomicrografias do ovário mostrando folículos: A) primordial, B) primário, C) secundário. Oo: oócito, N: núcleo do oócito, G: células da granulosa, vacúolos no citoplasma (seta). PAS, x 992.

Os folículos primordiais estavam distribuídos, preferencialmente, na parte periférica do córtex, notadamente abaixo da túnica albugínea. O núcleo dos oócitos apresentou forma arredonda ou ovalada, com cromatina distribuída por todo o núcleo. O citoplasma apresentou-se vacuolado (Fig. 23 A), não sendo possível identificar a natureza desses vacúolos. Os folículos primários e secundários encontravam-se um pouco mais profundos no córtex, com núcleo e citoplasma semelhantes aos primordiais. O aparecimento da zona pelúcida e o início de formação das tecas aconteceram nos folículos secundários.

Os folículos antrais foram caracterizados pelo aparecimento de uma cavidade em seu interior, denominada antro, na qual estava o líquido folicular. Dois tipos de folículos antrais puderam ser distinguidos: os folículos terciários (Fig. 24 A) e os de De Graaf (Fig. 24 B). Os folículos terciários apresentaram o oócito circundado pela zona pelúcida, várias camadas de células da granulosa, uma pequena cavidade antral, uma membrana basal e duas camadas de células tecais (teca interna e a teca externa). Os folículos de De Graaf apresentaram todos os componentes presentes nos folículos terciários e ainda, ao redor do oócito deslocado para a periferia, observou-se o *cumulus oophorus*, que se constituiu em uma camada de células da granulosa. A teca interna era formada por células epitelióides entremeadas por vasos sanguíneos e a teca externa, de tecido conjuntivo frouxo.

Os folículos pré-antrais atrésicos apresentaram alterações degenerativas como retração e condensação da cromatina nuclear do oócito, retração do citoplasma e desorganização das células da granulosa (Fig. 25), porém não se verificou picnose das mesmas. Nos folículos antrais atrésicos, verificaram-se picnose (Fig. 26) e desorganização das células da granulosa e as mesmas alterações do oócito encontradas no folículos pré-antrais. Em ovelhas, JORIO et al. (1991) descreveram que a atresia do oócito é mais comum em folículos pré-antrais, enquanto a atresia

relacionada à picnose das células da granulosa ocorre, quase que exclusivamente, em folículos antrais, tornando-se mais freqüente com o aumento do diâmetro folicular.

O corpo lúteo, na maioria dos animais, encontrava-se imerso no estroma ovariano e apresentava septos de tecido conjuntivo frouxo invadindo a região central a partir da periferia, nos quais observaram-se vasos sangüíneos. Os corpos lúteos examinados possuíam muitas células luteínicas poligonais, com citoplasmas eosinofílicos, vacuolados e núcleos esféricos, entremeadas por pequenas células luteínicas. Estes achados são semelhantes aos descritos por DANELL (1987), a não ser pelo fato desse autor ter observado corpos lúteos cavitários em novilhas bufalinas.

A região medular apresentou-se formada por tecido conjuntivo frouxo, nervos, numerosos vasos sangüíneos, a *rete ovarii*, que são cordões ou canais formados por células epiteliais cúbicas, e as células do hilo que constituem um grupo de células epitelióides. DANELL (1987) também observou a *rete ovarii*, mas não fez nenhuma citação a respeito das células do hilo.

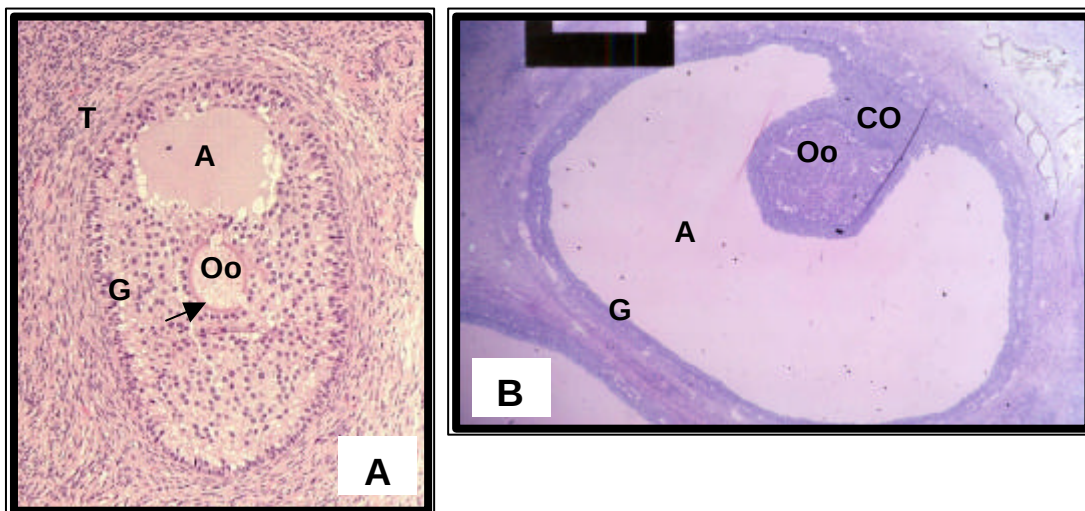


Figura 24: Fotomicrografias mostrando folículos antrais: A) terciário, B) De Graff. Oo: oócito, N: núcleo do oócito, G: células da granulosa, zona pelúcida (seta), cúmulus oophorus (CO), tecas (T). PAS, x 100 (A), x 62 (B).

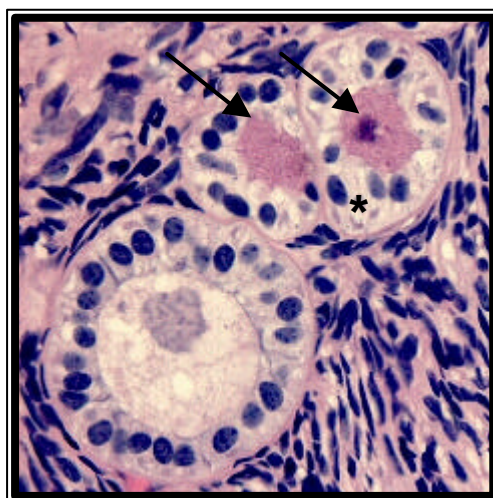


Figura 25: Fotomicrografia mostrando folículos primários atréticos com retração dos oócitos (seta) e desorganização das células da granulosa (*). HE, x 992.

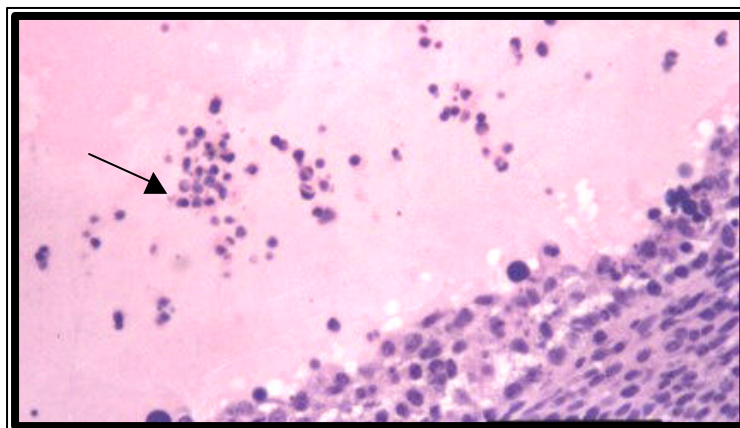


Figura 26: Fotomicrografia mostrando células da granulosa com núcleos picnóticos (seta). HE, x 100.

4.2 – Análise Morfométrica

4.2.1- Útero

Neste trabalho, para 85 observações de 20 animais, obteve-se média de $36,53 \mu\text{m} \pm 8,86$ com $\text{cv}=24,27$ para o diâmetro das glândulas basais (porção basal) e média de $62,31 \mu\text{m} \pm 10,40$ com $\text{cv}=16,70$ para o diâmetro das glândulas superficiais (porção superficial). Estes valores estão de acordo com SINGH & SHARMA (1985), que encontraram diâmetros médios de glândulas superficiais de $99,87 \mu\text{m}$ a $61,03 \mu\text{m}$ e de $24,13 \mu\text{m}$ a $36,48 \mu\text{m}$ para as basais, de acordo com as fases do ciclo estral.

A análise de variância dos dados referentes ao diâmetro das glândulas basais e superficiais encontra-se na tabela 8. Para o diâmetro das glândulas basais, verificou-se que não houve diferença significativa entre as fases e sim entre as regiões do útero ($P<0,05$) e entre os animais da fase folicular ($P<0,01$). Para o diâmetro das glândulas superficiais, houve diferença significativa entre as fases ($P<0,01$), as regiões do útero ($P<0,05$) e entre os animais dentro das fases folicular e lútea ($P<0,05$).

Tabela 8 Resumo da análise de variância do diâmetro de glândulas uterinas basais e superficiais de búfalas adultas.

CV	GL	QM	
		Gl. basal (μm)	Gl. superf. (μm)
Fases	1	260,1659	1722,7639**
Regiões	4	257,9324*	340,8047*
Animal: Fase			
Animal: 1	7	429,4383*	255,2203*
Animal: 2	11	151,8311	261,6653*
Resíduo	61	78,5998	108,2294

(*)- $P<0,05$; (**) - $P<0,01$

A tabela 9 mostra as médias dos diâmetros das glândulas basais e superficiais, sendo possível observar que os diâmetros das glândulas basais não variaram entre as fases, enquanto o diâmetro das superficiais foi maior na fase folicular, o que difere dos achados de JANAKIRAMAN et al. (1976) nos quais os diâmetros foram maiores no início até o final da fase lútea, e de ALBOGHOBESH (2000), que relatou valores maiores para essas glândulas durante a fase lútea. Essa discrepância pode ter acontecido porque alguns animais classificados como pertencentes a fase folicular poderiam estar entrando na fase lútea.

Entre as regiões, houve diferença para as duas glândulas. Nas glândulas basais, a região A diferiu das regiões B, C e E, mas foi igual à região D. Nas glândulas superficiais, a região B diferiu da C. De toda a bibliografia consultada, existe somente um relato sobre diferenças regionais no útero, mencionada por GONZALES et al. (1985), que observaram glândulas superficiais maiores no corpo do útero (60,5 μm) em relação aos cornos (53,4 μm), sem especificar a região do corno utilizada. Faz-se necessária a realização de mais estudos nesse sentido com a finalidade de se esclarecer as causas dessas diferenças entre as regiões do útero.

Tabela 9: Valores médios do diâmetro (μm) de glândulas basais e superficiais do útero de búfalas adultas considerando as fases folicular e lútea, as regiões do útero e os animais pertencentes a cada uma das fases.

Variáveis		N	Gl. basal	Gl. superf
Fases				
1		34	39,31	68,00
2		51	35,64	58,55
Regiões				
A		14	45,17 a	64,30 ab
B		20	36,16 b	67,59 a
C		17	34,32 b	55,70 b
D		20	36,62 ab	63,93 ab
E		14	35,11 b	64,85 ab
Animal: Fase				
1	1	5	29,38	54,09
3	1	4	53,68	68,55
6	1	5	28,09	73,38
11	1	4	45,63	79,57
12	1	4	28,44	64,04
13	1	3	40,79	72,22
17	1	4	49,78	66,77
18	1	5	38,70	65,36
2	2	5	33,16	59,34
4	2	5	32,14	48,92
5	2	4	39,30	74,66
7	2	4	24,23	44,10
8	2	4	43,21	57,75
9	2	4	34,86	60,84
10	2	2	38,36	56,93
14	2	5	43,02	61,19
15	2	4	37,04	59,26
16	2	4	30,82	53,47
19	2	5	29,54	58,95
20	2	5	42,00	67,21
TOTAL		85	36,53	62,30

Fase 1: folicular, Fase 2: lútea, Regiões A: corpo do útero, B: região média do corno direito e C: região superior do corno direito, D: região média do corno esquerdo e E: região superior do corno esquerdo.

Médias seguidas de mesma letra nas colunas são iguais entre si em nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Pela análise de variância, houve diferença entre os animais da fase folicular para o diâmetro das glândulas basais, apresentando valores de média máximos e mínimos de 53,68 μm e 28,09 μm , respectivamente (Tabela 9). Para o diâmetro das glândulas superficiais, a diferença apareceu entre os animais das duas fases, com os valores máximos de 79,57 μm e mínimo de 54,09 μm para a fase folicular e máximo de 74,66 μm e mínimo de 44,10 μm para a fase lútea, sendo as diferenças significativas.

As diferenças entre animais na mesma fase podem ter ocorrido por causa da divisão do ciclo estral adotada neste trabalho que foi de apenas duas fases, não considerando as subdivisões dentro das mesmas que influenciam o comportamento das glândulas. SINGH & SHARMA (1985) que dividiram o ciclo estral em cinco fases (folicular inicial e tardia, lútea inicial, média e tardia), relataram diferenças no diâmetro das glândulas tanto superficiais como basais entre as fases lúteas e verificaram valores máximos no diâmetro das glândulas no início e meio da fase lútea e mínimos na fase lútea tardia. E entre as fases foliculares, com o diâmetro maior na folicular tardia. Outra razão para esse fato é a existência de uma variação individual entre os animais que certamente influencia os resultados histológicos e morfométricos.

De 85 observações, obteve-se média de 6,99 $\mu\text{m} \pm 4,17$ com $\text{cv}=59,71$ para o diâmetro do lúmen das glândulas basais, e média de 13,20 $\mu\text{m} \pm 4,27$ com $\text{cv}=32,35$, para o diâmetro do lúmen das glândulas superficiais. Os diâmetros dos lúmens das glândulas basais estão um pouco acima e os dos lúmens das glândulas superficiais abaixo dos valores citados por SINGH & SHARMA (1985): para lúmen basal (2,82 – 4,57 μm) e superficial (19,81 – 27,30 μm).

O diâmetro do lúmen das glândulas basais não diferiu significativamente entre as fases e entre as regiões do útero, mas notou-se diferença entre os animais da fase folicular ($P<0,05$) (Tabela 10).

O diâmetro do lúmen das glândulas superficiais foi diferente entre as fases ($P<0,01$) e entre os animais da fase folicular ($P<0,05$) e da lútea ($P<0,01$).

Tabela 10: Resumo da análise de variância do diâmetro do lúmen de glândulas uterinas basais e superficiais de búfalas adultas.

CV	GL	QM	
		Lu. basal (μm)	Lu. superf. (μm)
Fases	1	6,1519	285,6253**
Regiões	4	18,1000	31,9300
Animal: Fase			
Animal: 1	7	43,9528*	52,3041*
Animal: 2	11	24,8042	49,1969**
Resíduo	61	17,3978	18,2447

(*)- $P<0,05$; (**) - $P<0,01$

Na tabela 11, encontram-se os valores médios dos diâmetros dos lúmens das glândulas basais e superficiais. Na fase folicular, o diâmetro do lúmen das glândulas superficiais apresentou-se maior (15,66 μm) em relação à fase lútea (11,81 μm). Estes dados estão em concordância com os dados de JANAKIRAMAN et al. (1976), que encontraram o diâmetro máximo dessas glândulas durante o estro. Entretanto, discordam dos achados de SINGH & SHARMA (1985), que relataram um diâmetro máximo no meio da fase lútea.

Para o diâmetro luminal das glândulas basais, verificou-se o valor máximo de 13,86 μm e mínimo de 4,01 μm entre os animais da fase folicular. Para o diâmetro luminal das glândulas superficiais, observou-se o valor máximo de 19,56 μm e mínimo de 9,78 μm para a fase folicular e o valor máximo de 16,69 μm e mínimo de 7,57 μm para a fase lútea. Essas diferenças também podem ter sido influenciadas pelas mesmas razões citadas anteriormente para o diâmetro das glândulas.

Tabela 11: Valores médios do diâmetro (μm) luminal de glândulas basais e superficiais do útero de búfalas adultas considerando as fases folicular e lútea, as regiões do útero e os animais pertencentes a cada uma das fases.

Variáveis		N	Lu. basal	Lu. superf
Fases				
1		34	7,53	15,66
2		51	6,96	11,81
Regiões				
A		14	8,95	13,58
B		20	7,70	13,45
C		17	6,01	11,92
D		20	6,94	13,67
E		14	6,62	16,07
Animal: Fase				
1	1	5	5,53	12,14
3	1	4	9,44	19,56
6	1	5	5,04	13,86
11	1	4	13,86	19,32
12	1	4	4,01	14,94
13	1	3	5,92	17,61
17	1	4	9,81	9,78
18	1	5	6,79	18,04
2	2	5	6,09	11,38
4	2	5	5,32	7,98
5	2	4	10,18	16,69
7	2	4	4,20	7,57
8	2	4	6,08	13,46
9	2	4	7,57	8,89
10	2	2	8,28	12,32
14	2	5	4,29	8,30
15	2	4	12,67	9,79
16	2	4	6,61	13,69
19	2	5	6,01	16,29
20	2	5	5,69	15,39
Total		85	6,98	13,20

Fase 1: folicular, Fase 2: lútea, Regiões A: corpo do útero, B: região média do corno direito e C: região superior do corno direito, D: região média do corno esquerdo e E: região superior do corno esquerdo.

Médias seguidas de mesma letra nas colunas são iguais entre si em nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Para a altura epitelial das glândulas basais, obteve-se média de 15,67 $\mu\text{m} \pm 3,69$ com $\text{cv}=23,58$ e média de 26,83 $\mu\text{m} \pm 3,67$ com $\text{cv}=13,69$ para a altura epitelial das glândulas superficiais. Esses valores foram concordantes com os estudos de SINGH & SHARMA (1985).

Na análise de variância (tabela 12), foi possível verificar que houve diferença entre as regiões ($P<0,01$) e entre os animais da fase folicular ($P<0,01$) e da lútea ($P<0,01$) para a altura do epitélio das glândulas basais e entre as fases ($P<0,05$) e animais da fase folicular ($P<0,01$) e lútea ($P<0,05$) para a altura do epitélio das glândulas superficiais.

Tabela 12: Resumo da análise de variância da altura epitelial de glândulas uterinas basais e superficiais de búfalas adultas.

CV	GL	QM	
		Ep. basal (μm)	Ep. superf. (μm)
Fases	1	40,2598	81,9833*
Regiões	4	50,9226**	7,0989
Animal: Fase			
Animal: 1	7	71,8638**	54,2403**
Animal: 2	11	35,2341**	27,2380*
Resíduo	61	13,6514	13,5069

(*)- $P<0,05$; (**) - $P<0,01$

Na tabela 13, encontram-se os valores médios da altura epitelial das glândulas basais e superficiais. Assim como aconteceu com as outras variáveis relacionadas às glândulas superficiais, a altura do epitélio das mesmas mostrou-se maior na fase folicular (28,22 μm), o que discorda dos achados de SINGH & SHARMA (1985) e JANAKIRAMAN et al. (1976), que encontraram os maiores valores desse epitélio no início da fase lútea. Além disso, houve diferença entre animais da fase folicular (máximo 32,09 μm ; mínimo 21,92 μm) e da fase lútea (máximo 28,82 μm ; mínimo 22,29 μm).

Para a altura epitelial das glândulas basais, a região A diferiu das regiões C e E, à semelhança do que aconteceu no diâmetro das glândulas basais, não se sabendo o porquê dessas diferenças regionais do útero para essa variável. Apresentou, ainda, os valores máximos de 22,46 μm e mínimo de 12,42 μm , entre os animais da fase folicular, e máximo de 19,57 μm e mínimo de 9,43 μm , entre os animais da fase lútea.

A diferença entre os animais de uma mesma fase para essas variáveis pode ser explicada como citado anteriormente para o diâmetro das glândulas basais.

Tabela 13: Valores médios da altura epitelial (μm) de glândulas basais e superficiais de útero de búfalas adultas considerando as fases folicular e lútea, as regiões do útero e os animais pertencentes a cada uma das fases.

Variáveis		N	Ep. basal	Ep. superf
Fases				
1		34	16,71	28,22
2		51	15,27	26,15
Regiões				
A		14	19,36 a	27,46
B		20	15,67 ab	27,17
C		17	14,63 b	26,05
D		20	15,74 ab	27,60
E		14	14,55 b	27,64
Animal: Fase				
1	1	5	12,42	21,92
3	1	4	22,46	31,53
6	1	5	12,44	26,80
11	1	4	17,36	31,31
12	1	4	12,55	26,44
13	1	3	17,22	29,29
17	1	4	22,16	32,09
18	1	5	17,09	26,35
2	2	5	15,53	25,81
4	2	5	13,55	22,29
5	2	4	15,95	31,59
7	2	4	9,43	22,80
8	2	4	18,86	25,76
9	2	4	14,85	27,66
10	2	2	16,08	25,86
14	2	5	19,57	26,50
15	2	4	16,44	26,57
16	2	4	12,75	24,17
19	2	5	12,70	26,03
20	2	5	17,53	28,82
Total		85	15,67	26,83

Fase 1: folicular, Fase 2: lútea, Regiões A: corpo do útero, B: região média do corno direito e C: região superior do corno direito, D: região média do corno esquerdo e E: região superior do corno esquerdo.

Médias seguidas de mesma letra nas colunas são iguais entre si em nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Em relação a altura do epitélio luminal, de 85 observações, obteve-se média de $39,95 \mu\text{m} \pm 7,48$ com $\text{cv}=18,73$. Na análise de variância (Tabela 14), verificou-se diferença entre as fases ($P<0,01$) e entre os animais das duas fases ($P<0,01$).

Tabela 14: Resumo da análise de variância da altura do epitélio luminal do útero de búfalas adultas.

CV	GL	QM
		Epitélio luminal (μm)
Fases	1	667,3573**
Regiões	4	75,4118
Animal: Fase		
Animal: 1	7	245,0613**
Animal: 2	11	487,8372**
Resíduo	61	50,0027

(*)- $P<0,05$; (**) - $P<0,01$

Na tabela 15, observou-se média de $43,87 \mu\text{m}$ para altura do epitélio luminal na fase folicular e $38,00 \mu\text{m}$ na fase lútea. SUNDARAVADANAN & VENKATASWAMY (1973) relataram que o epitélio pseudo-estratificado do lúmen uterino era mais alto na fase folicular do que na fase lútea. Entretanto, ALBOGHOBEISH (2000) observaram que a altura das células desse epitélio era maior na fase lútea. Porém, em nenhum desses trabalhos os autores realizaram medições do epitélio.

Entre os animais da fase folicular, verificaram-se valores máximos e mínimos da altura do epitélio luminal de $55,05 \mu\text{m}$ e $33,38 \mu\text{m}$, respectivamente. E na fase lútea, máximo de $53,15 \mu\text{m}$ e mínimo de $25,20 \mu\text{m}$. Da mesma forma, como mencionado para o diâmetro das glândulas basais, podem-se explicar as diferenças entre os animais.

Tabela 15: Valores médios da altura (μm) do epitélio luminal do útero de búfalas adultas considerando as fases folicular e lútea, as regiões do útero e os animais pertencentes a cada uma das fases.

Variáveis		N	Ep. Luminal
Fases			
1		34	43,87
2		51	38,00
Regiões			
A		14	40,48
B		20	44,33
C		17	38,93
D		20	40,83
E		14	40,11
Animal: Fase			
1	1	5	34,97
3	1	4	39,95
6	1	5	46,27
11	1	4	55,05
12	1	4	48,55
13	1	3	50,13
17	1	4	42,69
18	1	5	33,38
2	2	5	36,25
4	2	5	29,85
5	2	4	50,63
7	2	4	33,58
8	2	4	25,45
9	2	4	32,93
10	2	2	49,10
14	2	5	43,18
15	2	4	51,14
16	2	4	25,20
19	2	5	25,50
20	2	5	53,15
Total		85	39,95

Fase 1: folicular, Fase 2: lútea, Regiões A: corpo do útero, B: região média do corno direito e C: região superior do corno direito, D: região média do corno esquerdo e E: região superior do corno esquerdo.

Médias seguidas de mesma letra nas colunas são iguais entre si em nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Observou-se correlação significativa entre: a variável glândula basal e as variáveis lúmen e epitélio basais ($P<0,01$); a glândula superficial com o lúmen e o epitélio superficiais ($P<0,01$); o lúmen e o epitélio basais ($P<0,05$); e entre o lúmen e o epitélio superficiais ($P<0,01$). Essas correlações indicam que há uma dependência entre os diâmetros das glândulas basais e superficiais e seus respectivos lúmens e epitélios, o que afeta o seu desenvolvimento durante o ciclo estral. As outras variáveis que não apresentaram correlação significativa agem de forma independente.

Tabela 16: Correlações entre todas as variáveis estudadas do útero de búfalas adultas.

VARIÁVEIS		CORRELAÇÃO
Gl. Basal	Gl. superf	- 0,09
Gl. Basal	Lu. basal	0,39**
Gl. Basal	Lu. superf	0,01
Gl. Basal	Ep. basal	0,91**
Gl. Basal	Ep. superf	0,08*
Gl. Basal	Ep. luminal	- 0,04
Gl. Superf	Lu. basal	0,05
Gl. Superf	Lu. superf	0,46**
Gl. Superf	Ep. basal	- 0,07
Gl. Superf	Ep. superf	0,37**
Gl. Superf	Ep. luminal	0,08
Lu. Basal	Lu. superf	- 0,08
Lu. Basal	Ep. basal	0,21*
Lu. Basal	Ep. superf	0,02
Lu. Basal	Ep. luminal	- 0,13
Lu. Superf	Ep. basal	0,04
Lu. Superf	Ep. superf	0,32**
Lu. Superf	Ep. luminal	- 0,16
Ep. basal	Ep. superf	0,02
Ep. basal	Ep. luminal	0,01
Ep. superf	Ep. luminal	- 0,05

(*)- $P<0,05$; (**) - $P<0,01$

Dos 10 animais que apresentaram quadros de endometrite, quatro estavam na fase folicular e seis na fase lútea. Existem poucos trabalhos na literatura que relacionem alterações morfométricas das glândulas uterinas em animais com endometrite. No entanto, GONZALES et al. (1985) não encontraram correlação entre a categoria de endometrite e o diâmetro das glândulas em vacas, assim como NUNES (2003) também não verificou correlação entre o tamanho da célula epitelial da glândula e do lúmen uterino e as categorias de endometrite, porém observou alterações na área do lúmen glandular nas categorias mais graves de endometrite em éguas.

MOCHOW & OLDS (1966) relataram anormalidades no diâmetro de glândulas superficiais, somente naquelas que se encontravam císticas (acima de 125 μm), o que foi um achado comum nos animais com ovários císticos, e, segundo GONZALES et al. (1985), podem acontecer em animais com endometrite severa, apesar de não ser um achado comum.

4.2.2 – Tuba Uterina

As células ciliadas e secretoras da tuba uterina fazem parte do epitélio de revestimento desse órgão, sendo, portanto, as células que estão mais propícias às modificações causadas pela variações hormonais que acontecem durante o ciclo estral. Neste trabalho, para 45 observações de 20 animais, a média foi de 33,28 $\mu\text{m} \pm 7,19$ com $\text{cv}=21,61$, para a altura das células ciliadas, e 34,29 $\mu\text{m} \pm 8,43$ com $\text{cv}=24,60$, para a altura das células secretoras.

De acordo com a análise de variância, não houve diferença entre fases e regiões para a altura das células secretoras e ciliadas. Dentro das fases, houve diferença entre os animais da fase folicular para a altura da célula secretora ($P<0,01$), conforme está na tabela 17.

Tabela 17: Resumo da análise de variância da altura de células ciliadas e secretoras da tuba uterina de búfalas adultas.

CV	GL	QM	
		Cel. ciliada (μm)	Cel. secretora (μm)
Fases	1	44,6111	53,3979
Regiões	2	9,3334	50,9423
Animal: Fase			
Animal: 1	6	81,9734	148,4338**
Animal: 2	7	69,3812	79,9139
Resíduo	28	51,7421	71,1443

(**)- $P < 0,01$

Na tabela 18, encontram-se as médias das alturas das células ciliadas e secretoras. Apesar de não ser estatisticamente significativa, há diferença entre as alturas das células ciliadas e secretoras entre as fases, com a média maior para a fase folicular (34,35 μm e 35,45 μm) em relação à fase lútea (32,35 μm e 33,27 μm). Esses resultados estão de acordo com ABE & OIKAWA (1993), que relataram uma maior altura de ambas as células na fase folicular, sendo a diferença mais expressiva nas fímbrias e na ampola. Talvez a diferença entre as fases observada neste trabalho não seja significativa, devido à grande variação entre os animais dentro das fases como mencionado a seguir.

Para a altura das células secretoras, observaram-se, entre os animais da fase folicular, os valores máximos e mínimos de 50,59 μm e 30,64 μm , respectivamente. Essa diferença significativa entre os animais pode ter acontecido porque, assim como relatado para as glândulas, alguns animais classificados na fase folicular poderiam estar entrando na fase lútea (3 dias iniciais) e isso aumenta a atividade secretora e, conseqüentemente, a altura dessas células pelo aumento do número de protrusões citoplasmáticas, conforme relatado por LOMBARD et al. (1950).

Tabela 18: Valores médios da altura (μm) de células ciliadas e secretoras da tuba uterina de búfalas adultas considerando as fases folicular e lútea, as regiões da tuba uterina e os animais pertencentes a cada uma das fases.

Variáveis		N	Células ciliadas	Células secretoras
Fases				
1		21	34,35	35,45
2		24	32,35	33,27
Regiões				
Istmo		15	33,90	36,09
Ampola		15	32,44	32,42
Infundíbulo		15	33,69	34,56
Animal: Fase				
1	1	3	33,91	32,80
3	1	3	29,30	30,64
11	1	3	35,71	36,08
12	1	3	44,51	50,59
13	1	3	29,57	31,33
17	1	3	31,52	30,99
18	1	3	35,89	35,72
4	2	3	33,07	34,35
5	2	3	23,36	24,86
8	2	3	32,96	33,38
14	2	3	28,76	29,64
15	2	3	37,86	40,45
16	2	3	38,22	39,85
19	2	3	31,16	31,53
20	2	3	33,39	32,45
Total		45	33,28	34,36

Fase 1: folicular, Fase 2: lútea.

Observou-se uma dependência altamente significativa ($P < 0,01$) entre a altura das células ciliadas e secretoras ($r = 0,97$), mostrando alta correlação no comportamento dessas células durante o ciclo estral.

Mais estudos envolvendo a morfometria do útero e tuba uterina de búfalas precisam ser realizados com o objetivo de esclarecer algumas dúvidas em relação às diferenças regionais do útero e às mudanças que ocorrem nas fases do ciclo estral. Para isso, o ideal é que sejam utilizados animais com ciclo estral conhecido e acompanhado por ultra-sonografia,

palpação retal, etc..., com a finalidade de se ter certeza da fase do ciclo estudada, o que não foi possível neste trabalho devido à utilização de animais provenientes de matadouro.

4.3. – Concentração Hormonal Plasmática

No ensaio realizado, a recuperação da extração de progesterona plasmática foi de 91,81 %, a concentração de progesterona detectável a 90% do BO foi de 125 pg/tubo ou 0,625 ng/mL, a ligação inespecífica de 2,76 % e os coeficientes de variação intraensaio de $3,68 \pm 0,8\%$.

Pela análise de variância foi possível observar que houve diferença significativa ($P < 0,01$) entre as fases para os dois hormônios analisados de acordo com a tabela 19.

Tabela 19: Resumo da análise de variância da concentração hormonal plasmática de progesterona e estradiol de búfalas adultas.

CV	GL	QM	
		Progesterona (ng/mL)	Estradiol (pg/mL)
Fases	1	112,30**	3892,30**
Resíduo	18	2,95	232,70

(**)- $P < 0,01$

Os resultados das dosagens hormonais efetuadas por radioimunoensaio de progesterona e estradiol estão expressos na tabela 20. Os valores máximo, mínimo e as médias encontrados para as dosagens plasmáticas dos animais na fase folicular foram 0,548 ng/mL e 0,324 ng/mL, $0,37 \pm 0,07$ ng/mL para progesterona e 70,09 pg/mL e 27,61 ng/mL, $47,19 \pm 13,35$ pg/mL para o estradiol.

Neste trabalho, a concentração de progesterona encontrada nos animais da fase folicular está acima dos achados de CHAUHAN et al.

(1983), DOBSON & KAMONPATANA (1986) e PANDEY (1979), que variaram de 0,06 ng/mL a 0,27 ng/mL. Entretanto, estão de acordo com SRIVASTAVA & SAHNI (1999), que relatam valores de 0,56 ng/mL a 0,90 ng/mL, e com SINGH & MADAN (2002), que encontraram concentrações plasmáticas de progesterona, em novilhas na fase folicular, de 0,28 ng/mL a 0,75 ng/mL.

A concentração plasmática de estradiol, nessa fase, está próxima da variação de 32,52 pg/mL a 86,15 pg/mL observada por SINGH & MADAN (2002) e próxima aos valores de $31,34 \pm 1,70$ pg/mL, $43,32 \pm 10,51$ pg/mL e 29,60 pg/mL relatados por DOBSON & KAMONPATANA (1986), OBA (1988) e SAMAD et al. (1988) durante o estro. Contudo, estão acima dos achados de 9,0-13,0 pg/mL para a raça Carabao no estro (DOBSON & KAMONPATANA, 1986), e de $15,06 \pm 4,54$ pg/mL e $10,16 \pm 0,84$ pg/mL a $8,9 \pm 1,7$ pg/mL durante o pico de estradiol em búfalas e novilhas sincronizadas com PGF2 α (BEG et al., 1997; PORTO-FILHO, 2000).

Os animais da fase lútea apresentaram valores máximo, mínimo e média de 7,74 ng/mL e 1,23 ng/mL, $5,21 \pm 2,19$ ng/mL para progesterona e 46,43 pg/mL e 3,08 pg/mL, $18,72 \pm 16,34$ pg/mL para o estradiol, respectivamente. Os níveis plasmáticos de progesterona estão um pouco acima da média referida por alguns trabalhos na literatura, como 4,0-4,26 ng/mL para búfalas Murrah no 14^o-16^o dia (DOBSON & KAMONPATANA, 1986), $2,81 \pm 1,48$ ng/mL no 7^o e 9^o dia (SINGH & MADAN, 1999) e 1,84 ng/mL a 2,93 ng/mL na fase lútea (SINGH & MADAN, 2002) para novilhas Murrah. Contudo, concordam com SRIVASTAVA et al. (1999), que mencionaram valores de 2 ng/mL no 7^o dia e 6 ng/mL no 15^o dia do ciclo estral.

Em relação ao estradiol, a média verificada neste trabalho para a fase lútea está um pouco acima do encontrado: em búfalas Murrah de 10-15 pg/mL nessa mesma fase (DOBSON & KAMONPATANA, 1986); de 14,23

$\pm 0,96$ pg/mL e $9,06 \pm 0,34$ pg/mL no metaestro e $14,92 \pm 0,84$ pg/ml e $10,34 \pm 0,33$ pg/mL no diestro (SAMAD et al., 1988). Porém, está abaixo da variação de 21,81 pg/mL a 24,11 pg/mL em novilhas Murrah (SINGH & MADAN, 2002), e aos valores de $22,56 \pm 10,51$ pg/mL no metaestro e $22,61 \pm 10,51$ pg/mL no diestro (OBA, 1988).

Tabela 20: Valores plasmáticos de progesterona (ng/mL) e estradiol (pg/mL) de búfalas adultas.

Animal	Progesterona	Estradiol
FASE FOLICULAR		
B1	0,411 a	70,09 a
B3	0,324 a	36,95 a
B6	0,348 a	47,32 a
B11	0,349 a	40,13 a
B12	0,324 a	47,17 a
B13	0,548 a	60,85 a
B17	0,324 a	27,61 a
B18	0,373 a	47,47 a
Média ± sd	0,37 ± 0,07	47,19 ± 13,35
FASE LÚTEA		
B2	4,379 b	8,47 b
B4	5,766 b	3,08 b
B5	6,220 b	11,17b
B7	5,946 b	21,63 b
B8	7,351 b	4,91 b
B9	2,334 b	9,05 b
B10	1,234 b	14,88 b
B14	5,855 b	35,53 b
B15	6,915 b	49,47 b
B16	6,676 b	16,28 b
B19	2,073 b	46,43 b
B20	7,774 b	3,77 b
Média ± sd	5,21 ± 2,19	18,72 ± 16,34

Médias seguidas de mesma letra nas colunas são iguais entre si em nível de 5 % pelo teste de Tukey.

5- CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste estudo, pode-se chegar as seguintes conclusões:

Análise morfológica

- 1- O epitélio de revestimento do útero de búfalas é predominantemente pseudo-estratificado, sendo, em algumas regiões, cilíndrico simples.
- 2- Na fase folicular, as glândulas uterinas basais e superficiais eram mais retas e apresentaram células epiteliais em mitose. Aumento de vascularização de moderado a intenso foi observado em todos os animais dessa fase, embora edema endometrial tenha aparecido em apenas dois animais.
- 3- Na fase lútea, as glândulas uterinas se mostraram enoveladas e ramificadas com vacuolização supranuclear nas células secretoras e secreção glandular de moderada a intensa.
- 4- Dos 10 animais que apresentaram endometrite, 90 % possuía endometrite leve a moderada. Em todos os graus de endometrite, verificou-se a ocorrência de fibrose peri-glandular, infiltração difusa de células inflamatórias e acúmulos linfóides.
- 5- A secreção uterina era constituída de açúcares neutros evidenciados pela reação ao PAS, enquanto, na tuba uterina, a secreção possuía açúcares neutros e GAGs ácidas carboxiladas e sulfatadas.
- 6- O epitélio de revestimento da tuba uterina da búfala é pseudo-estratificado cilíndrico ciliado alto na fase folicular e pseudo-estratificado cilíndrico ciliado baixo ou cilíndrico ciliado simples na fase lútea. Os cílios eram mais longos e evidentes na ampola e no infundíbulo, notadamente na fase folicular.

- 7- Na ampola e infundíbulo de todos os animais, verificaram-se protrusões citoplasmáticas com extrusão nuclear das células secretoras. Porém, na fase folicular, era muito mais evidente a ocorrência de protrusão citoplasmática com liberação de grânulos secretores e pouca extrusão nuclear. Na fase lútea, a extrusão nuclear era mais intensa que a citoplasmática.
- 8- No ovário, foram observados folículos primordiais, primários, secundários, terciários e de De Graff. Os folículos pré-antrais atrésicos apresentaram mais alterações degenerativas no oócito do que nas células da granulosa. Nos folículos antrais atrésicos, verificaram-se alterações degenerativas no oócito e nas células da granulosa.

Análise morfométrica

- 1- A média do diâmetro das glândulas basais e superficiais foi, respectivamente, de $36,53 \mu\text{m} \pm 8,86$ e $62,31 \mu\text{m} \pm 10,40$.
- 2- Observou-se correlação significativa entre: a variável glândula basal e as variáveis lúmen e epitélio basais; entre a glândula superficial e o lúmen e o epitélio superficiais; entre o lúmen e o epitélio basais; e entre o lúmen e o epitélio superficiais.
- 3- Na tuba uterina, não houve diferença entre as fases e regiões estudadas para a altura das células ciliadas e secretoras, ocorrendo somente diferença, entre os animais da fase folicular, para a altura das células secretoras.

Concentração hormonal plasmática

- 1- Os valores plasmáticos médios dos animais da fase folicular foram $0,37 \pm 0,07 \text{ ng/mL}$ e $47,19 \pm 13,35 \text{ pg/mL}$ para progesterona e estradiol, respectivamente.

- 2- Os valores plasmáticos médios dos animais da fase lútea foram $5,21 \pm 2,19$ ng/mL e $18,72 \pm 16,34$ pg/mL para progesterona e estradiol, respectivamente.

Na tabela 21 encontra-se um resumo de todos os achados observados nos cortes histológicos e na concentração hormonal plasmática dos animais que estavam nas fases folicular e lútea.

Tabela 21: Resumo de todos os achados observados nos cortes histológicos e na concentração hormonal plasmática dos animais das fases lútea e folicular.

Fase lútea	
Útero	Tuba uterina
Glândulas uterinas enoveladas e ramificadas, apresentando secreção e vacuolização supranuclear	Mucosa revestida por epitélio pseudo-cilíndrico ciliado simples, com protrusões citoplasmáticas e extrusão nuclear nas regiões da ampola e infundíbulo
Níveis plasmáticos de progesterona acima de 1 ng/mL	
Fase folicular	
Útero	Tuba uterina
Endométrio com aumento de vascularização e edema, glândulas uterinas com células epiteliais em mitose	Mucosa revestida por epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado alto apresentando protrusões citoplasmáticas com liberação de grânulos secretores e pouca extrusão nuclear nas regiões da ampola e infundíbulo
Níveis plasmáticos de progesterona abaixo de 1ng/mL	

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABE, H. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in citological and functional aspects of the oviductal secretory cells. **Histol. Histopathol.**, v.11, p.743-68,1996.
- ABE, H., OIKAWA, T. Observations by scanning electron microscopy of oviductal epithelial cells from cows at follicular and luteal phases. **Anat. Rec.**, v.235, p.399-410, 1993.
- ALBOGHOBEISH, N. Histological changes in endometrium during follicular and luteal phases in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Indian J. Anim. Sci.**, v.70, p.462-4, 2000.
- BANKS, W.J. **Histologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 631p.
- BATRA, S.K., ARORA, R.C., BACHLAUS, N.K., PANDEY, R.S. Progesterone and oestradiol 17 β in buffaloes showing gestational oestrus. **Zentralbl. Veterinarmed. A**, v.26, p.502-5, 1979.
- BEARDEN, H. J., FUQUAY, J. W. The female reproductive system. In: BEARDEN, H. J., FUQUAY, J. W. (Eds). **Applied animal reproduction**. London: Prentice-Hall, 2000. p.7-20.
- BEG, M.A., SANWAL, P.C., YADAV, M.C. Ovarian response and endocrine changes in buffalo superovulated at midluteal and luteal stage of the estrous cycle: a preliminary report. **Theriogenology**, v. 47, p. 423-32, 1997.
- BRENNER, R.M., SLAYDEN, O.D. Cyclic changes in the primate oviduct and endometrium. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. (Eds). **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p.541-69.

*UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da Unesp**. São Paulo: Editora Unesp, 1994. V.2: Referências Bibliográficas.

- BIOSIS. **Serial sources for the Biosis preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.
- BUHI, W. C. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. **Reproduction**, v.123, p.355-62, 2002.
- CAHILL, L.P., MARIANA, J. S., MAULÉON, P. Total follicular population in ewes of high and low ovulation rates. **J. Reprod. Fertil.**, v.55, p.27-36, 1979.
- CARVALHO, H. F., RECCO-PIMENTEL, S.M. **A célula 2001**. São Paulo: Manole, 2001. 283p.
- CHAUHAN, F.S., SHARMA, R.D., SINGH, G.B. Serum progesterone concentrations in normal cycling and suboestrous buffaloes. **Indian J. Dairy Sci.**, v.36, p.28-33, 1983.
- CLARK, B.F. The effects of oestrogen and progesterone on uterine cell division and epithelial morphology in spayde, adrenalectomized rats. **J. Endocrinol.**, v.50, p. 527-8, 1971.
- CROW, J., AMSO, N.N., LEWIN, J., SHAW, R.W. Morphology and ultrastructure of fallopian tube epithelium at different stages of the menstrual cycle and menopause. **Hum. Reprod.**, v.9, p. 2224-33, 1994.
- DANEL, B. **Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers**. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1987. 124p.
- DELLMANN, H. D., BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 397p.
- DOBSON, H., KAMONPATANA, M. A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes, cows and zebu. **J. Reprod. Fertil.**, v.77, p.1-36, 1986.

- DUBOIS, J. A., WORDINGER, R. J., DICKEY, J. F. Tissue concentrations of mast cells and lymphocytes of the bovine tube (oviduct) during the estrous cycle. **Am. J. Vet. Res.**, v.41, p.806-8, 1980.
- DWIVEDI, J. N., SINGH, C. M. Histochemical observations on the endometrium of indian buffalo. **Indian J. Anim. Health**, p.31-4, 1972.
- ELLIGTON, J. E. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. **Cornell Vet.**, v.81, p.313-28, 1991.
- EL-NAGAR, M.A., EL-BAB, F. M. R. Studies on the gestational changes in buffalo uterus: the histochemical characteristics. **Zentralbl. Veterinarmed. A.**, v.21, p.671-80, 1974.
- EL-SHEIKH, A. S., ABDELHADI, H.A. Anatomy and histology of the reproductive tract in the Egyptian buffalo. **Indian J. Anim. Sci.**, v.40, p. 213-22, 1970.
- ERIKSEN, T., TERKELSEN, O., HYTTEL, P., GREVE, T. Ultrastructural features of secretory cells in the bovine oviduct epithelium. **Anat. Embryol.**, v.190, p.583-90, 1994.
- FAO – Food and Agriculture Organization, FAOSTAT: agriculture data. Disponível em: <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture/.1999>.
- FADLE, W. S. A, FAHMY, M. F. A. A., EL SHAFEY, S. M. Histological studies on the ovaries of Egyptian Buffaloes with special reference to the corpus luteum. **Zentralbl. Veterinarmed. A.**, v.21, p. 581-91, 1974.
- FIGUEIREDO, J. R., HULSHOF, S. C. J., BECKERS, J. F. Nova biotecnologia: isolamento, caracterização e cultura de folículos ovarianos pré-antrais em bovinos. In: **Simpósio Nacional De Biotecnologia Da Reprodução De Mamíferos Domésticos 1**, 1995, Fortaleza. Anais....Fortaleza, 1995, p. 1-11.
- FINN, C.A, MARTIN, L. Endocrine control of gland proliferation in the mouse uterus. **Biol. Reprod.**, v.8, p. 585-8, 1973.

- GONZALES, H. E., CROWELL, W. A., CAUDLE, A. B., THOMPSON, F. N.,
Morphometric studies of the bovine uterus: Microscopic lesions and
retrospective history. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, p.2588-95, 1985.
- GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: CAB
International, 1994. 640p.
- HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. Anatomy of female reproduction. In: HAFEZ, B.,
HAFEZ, E.S.E. (Eds). **Reproduction in farm animals**. Philadelphia:
Lipincott Williams & Wilkins, 2000. p.13-27.
- HENDRICKSON, M.R., KEMPSON, R.L. Uterus and fallopian tubes. In:
STERNBERG, S.S. (Eds). **Histology for pathologists**. New York:
Raven Press, 1992. p.797-834.
- HOLLIS, D. E., FRITH, P.A., VAUGHAN, J. D., CHAPMAN, R. E.,
NANCARROW, C.D. Ultrastructural changes in the oviductal epithelium
of merino ewes during the estrous cycle. **Am. J. Anat.**, v.171, p.441-56,
1984.
- HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J. R., BECKERS, J.F., BEVERS, M.M.,
VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles
from foetal bovine ovaries. **Vet. Q.**, v.18, p.78-80, 1994.
- JAINUDEEN, M.R., HAFEZ, E.S.E. Ciclos reprodutivos: bovinos e bubalinos
.In: HAFEZ,E.S.E. (Eds). **Reprodução animal**. São Paulo: Manole,
1995. p.319-34.
- JANAKIRAMAN, P.M., ZALA, P.M., SAROJINI, C.K. Uterine endometrial
gland characteristics during estrous cycle in the water buffalo. **Indian
Vet. J.**, v.53, p.190-3,1976.
- JOHANNISSON, E., PARKER, R.A, LANDGREN, B., DICZFALUSY, E.
Morphometric analysis of the human endometrium in relation to
peripheral hormone levels. **Fertil. Steril.**, v. 38, p.564-71, 1982.

- JORIO, A., MARINA, J.C., LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D´man and Timahdite sheep. **Anim. Reprod. Sci.**, v.26, p.239-50,1991.
- JUNQUEIRA, L.C.U., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.
- KANAI, Y., SHIMIZU, H. Plasma concentration of LH, progesterone and oestradiol during the oestrous cycle in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **J. Reprod. Fertil.**, v.70, p.507-10,1984.
- KARNOVSKY, M.I. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v.27, p.37-8,1965.
- KNICKEBOCKER, J.J., THATCHER, W.W., BAZER, F.W., DROST, M., BARRON, D.H., FINCHER, K.B., ROBERTS, R.M. Protein secreted by day 16 to 18 bovine conceptuses extends corpus luteum functions in cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.77, p.381-91, 1986.
- LARSON, L.L., MARION, G.B., GIER, H.T. Glycogen metabolism in bovine endometrium. **Am. J. Vet. Res.**, v.31,p.1929-35,1970.
- LEESE, H.J. The formation and function of oviduct fluid. **J. Reprod. Fertil.**, v.82, p.843-56,1988.
- LINDEBERG, G.S., KIMBER, S.J., KALLIN, E. Carbohydrate binding properties of mouse embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v.89, p.431-9,1990.
- LOMBARD, L., BANNER, B.M., MCNUTT, S.H. The morphology of the oviduct of virgin heifers in relation to the estrous cycle. **J. Morph.**, v.86, p.1-15, 1950.
- MATSUDA, H., OKUDA, K., IMORI, T. Tissue concentrations of eosinophils in in the bovine oviduct and uterus at different stages of the estrous cycle. **Res. Vet. Sci.**, v.34, p.369-70, 1983.
- MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C. **Práticas em biologia celular**. São Paulo: Edgard Blücher, 1980. 69p.

- MENEZO, Y., GUERIN, P. The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. **Euro. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.73, p.99-104,1997.
- MENGHI, G., BONDI, A.M., ACCILI, D., MATERAZZI, G. Fine localization of sulphated and nonsulphated glycoconjugates in the rabbit oviduct during the estrous cycle. **Acta Histochem.**,v.74,p.121-32,1984.
- MOCHOW, R., OLDS, D. Effect of age and number of calvings on histological characteristics of the bovine uterus. **J. Dairy. Sci.**, v. 49, p.642-6, 1966.
- MOGHAMI, S.M., SAIYARI, M., MAYARI, M., SHARMA, R.N. Pathology of uterus in buffaloes slaughtered in Ahwas (Iran) abattoir. **Buffalo J.**, v.12, p.213-8,1996.
- MONTEIRO, C.M.R. **Estudo comparativo das características anatômicas e histológicas do útero e tuba uterina de vacas e novilhas Nelore (*Bos indicus*)**. São Paulo, 1998. 121p. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- MURRAY, M.K. Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy - associate morphological changes in secretory status and cell height. **Biol. Reprod.**,v.53, p.653-63, 1995.
- MURRAY, M.K. Changes in secretory status, cell height and percentage ciliation of the epithelial lining of sheep fimbria oviduct during early pregnancy. **J. Reprod. Fertil.**, v.170, p.173-83,1996.
- MURRAY,M.K. Morphological features of epithelial cells in the sheep isthmus oviduct during early pregnancy. **Anat. Rec.**, v.247, p.368-78,1997.
- NAYAK, R.K., ZIMMERMAN, D.R. Ultrastructural changes in porcine oviduct epithelium during the estrous cycle (abstr). **J. Anim. Sci.**, v.33, p.262, 1971.

- NAYAK, R.K., BRINSFIELD, T.H. Fine structure of infundibular epithelium in the ewe (abstr). **J. Anim. Sci.**, v.37, p.322, 1973.
- NAYAK, R.K., ELLINGTON, E.F. Ultrastructural and ultracytochemical cyclic changes in the bovine uterine tube (oviduct) epithelium. **Am. J. Vet. Res.**, v.38, p.157-68, 1977.
- NAYAK, R.K., ALBERT, E.N., KASSIRA, W.N. Cyclic ultrastructural changes in ewe uterine tube (oviduct) infundibular epithelium. **Am. J. Vet. Res.**, v.37, p.923-33, 1976.
- NELLOR, J.E. The leucocyte-like cells of the oviducts during the normal estrous cycle and their modification by progestin and estrogen treatment. **Anat. Rec.**, v.151, p.171-81, 1965.
- NUNES, L.C. **Avaliação histopatológica, histoquímica, imunoistoquímica e morfométrica das endometrites crônicas em éguas**. Botucatu, 2003. 108p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- OBA, E. **Estudo histocitofisiológico da atividade reprodutiva de búfalas – *Bubalus bubalis***. Botucatu, 1988. Tese de Livre Docência – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- ODOR, D.L. The question of “basal” cells in oviductal and endocervical epithelium. **Fertil. Steril.**, v.25, p.1047-62, 1974.
- ODOR, D.L. Migratory cells and large heterogeneous dense bodies in the oviductal epithelium of primates. **Anat. Rec.**, v.204, p.402, 1982.
- OHASHI, O.M. **Ocorrência de alterações do ovário, tuba uterina e útero, em búfalas (*Bubalus bubalis* Lin) abatidas em matadouro, no Estado do Pará**. Belo Horizonte, 1982. 62p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

- OHTANI, S., OKUDA, K., NISHIMURA, K., MOHRI, S. Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. **Theriogenology**, v.39, p.1033-42, 1993.
- PANDEY, R.S. Hormonal status of female and induced breeding in Murrah buffaloes. In: SEMINAR BUFFALO REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 1979, Roma. **Proceedings.....Roma: FAO/SIDA, 1979.** p.185-210.
- PATEK, E., NILSSON, L., HELLEMA, M. Scanning electron microscopic study of the human fallopian tube. Report IV. At term gestation and in the puerperium. The effect of a syntetic progestin on the postmenopausal tube. **Fertil. Steril.**, v.24, p.832-43, 1973.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theorical and applied**. 3. ed., London: J.& A. Churchill, 1968. v.1, 759p.
- PETERS, A.R. Reproductive activity of the cow in the post-partum period. I. Factors affecting the lenght of the post-partum acyclic period. **Br. Vet. J.**, v.140, p.76-84, 1984.
- PINHEIRO, O.L. **Intervalo estro-ovulação após tratamento com norgestomet e valerato de estradiol (NVE) ou prostaglandina F2a e dinâmica folicular durante o implante de NVE, em animais da raça Nelore**. Botucatu, 1996. 68p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- PORTO-FILHO, R.M. **Emprego da radiotelemetria na detecção do estro em fêmeas bubalinas: luteólise durante duas fases do ciclo estral, ultra-sonografia da ovulação e perfis hormonais**. São Paulo, 2000. 112p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

- PRASAD, G., ROY, M.K., SINGH, L.P. Histological and certain observations on the ovary of adult Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Indian J. Anim. Sci.**, v.49, p.184-90, 1979.
- PRIEDKALNS, J., LEISER, R. Female reproductive system. In: DELLMANN, H.T., EURELL, J.A.C. (Eds). **Textbook of veterinary histology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. p.247-69.
- RUMERY, R.E., GADDUM-ROSSE, P., BLANDAU, R. J. ODOR, D.L. Cyclic changes in ciliation of the oviductal epithelium in the pig-tailed macaque (*Macaca nemestrina*). **Am. J. Anat.**, v.153, p.345-66, 1978.
- SAMAD, H.A., HAMID, A., REHMAN, N.U. Plasma oestradiol 17β concentration during the oestrus cycle of Nili-Ravi buffaloes. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11, Dublin. **Anais**.....Dublin: Irlanda, 1988. p.68.
- SAS Institute Inc. **SAS/STAT User's guide**. 4 ed. Cary N.C: SAS Inst. Inc., v.2, version 8, 1998.1686p.
- SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogénèse. **Rec. Méd. Vét.**, v.157, p.29-38, 1981.
- SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. **Rec. Méd. Vét.**, v.167, p.205-18, 1991.
- SAWYER, H.R., OLSON, P.N., GORELL, T. A. Effects of progesterone on the oviductal epithelium in estrogen-primed prepubertal beagles: light and electron microscopic observations. **Am. J. Anat.**, v.169, p.75-87, 1984.
- SHUKLA, K.P., ZALA, P.M., SHUK DEO, SAROJINI, C. K., JANAKIRAMAN, K. Myometrial histology of Surti buffalo uterus during estrous cycle. **Indian Vet. J.**, v.50, p.234-8, 1973.

- SINGH, H., SHARMA, D. N. Histomorphology of buffalo endometrial glands during different phases of oestrus cycle. **Indian Vet. J.** , v.62, p.762-5,1985.
- SINGH, C., MADAN, M. L. Ovarian response to equine gonadotrophin (eCG) and GnRH in buffalo heifers (**Bubalus bubalis**). **Indian J. Anim. Sci.**, v.69, p.490-3,1999.
- SINGH, J ., NANDA, A.S., ADAMS, G.P. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-1, p.593-604, 2000.
- SINGH, C., MADAN, M.L. Hypophyseal and gonadal response to PGF2 α and GnRH at onset of puberty in Murrah buffalo heifers (**Bubalus bubalis**). **Indian J. Anim. Sci.**, v.72, p.431-33, 2002.
- SILVA, A.W.C. **Alterações morfológicas no ovário e cornos uterinos de búfalas procedentes da Ilha de Marajó-PA**. Belo Horizonte, 1995. 53p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- SILVA, G. Búfalos: bons companheiros. **Rev. Globo Rural**, n.126, p.37-45,1996.
- SRIVASTAVA, S.K., SAHNI, K.L. Progesterone concentration and its effect on pregnancy rate in bovines. **Indian Vet. J.**, v.76, p.845-6,1999.
- SRIVASTAVA, S.K., SAHNI, K.L., SHANKER, U., SANWAL, P.C., VARSHNEY, V.P. Seasonal variation in progesterone concentration during oestrus cycle in Murrah buffaloes. **Indian J. Anim. Sci.**, v.69, p.700-1, 1999.
- STINSON, A. W., WEBER, A.F., ZEMJANIS, R. The bovine endometrium-an electron microscopy study. **Am. J. Vet. Res.**, v.97,p.1164-82,1962.
- SUNDARAVADANAN,V.K., VENKATASWANY, V. Histology and histochemistry of bovine uterus. **Indian J. Anim. Sci.**, v.43, p.1050-3,1973a.

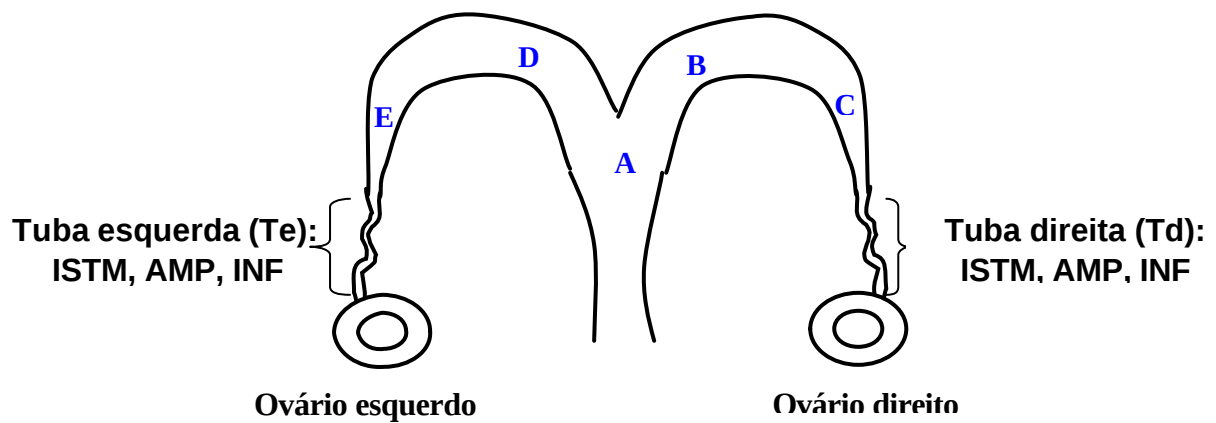
- SUNDARAVADANAN, V.K., VENKATASWANY , V. Histology and histochemistry of bovine oviduct . **Mysore J. Agric. Sci.**, v.7, p.650-6, 1973b.
- TY, L.V., CHUPIN, D., DRIANCOURT, M.A. Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.19, p.171-8,1989.
- VALE, W. G. Perspectivas da bubalinocultura no Brasil e na América Latina. In: **BUBALINOS: SANIDADE, REPRODUÇÃO E PRODUÇÃO**, 1999, Jaboticabal. **Proceedings**.....Jaboticabal,1999. p.1-26.
- VALE, W.G. **Bubalinos**: Fisiologia e patologia da reprodução. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 86p.
- VANDER WIELEN, A.L., KING, G.J. Intraepithelial lymphocytes in the bovine uterus during the oestrous cycle and early gestation. **J. Reprod. Fertil.**, v.70, p.457-62,1984.
- VARNER, D.D., FORREST, D.W., FUENTES, F. Distribution of glycosaminoglicans in especific regions of the reproductive tract of mares. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 1990, Deauville. **Proccedings**.....Deauville, 1990. p.100-1.
- VIDAL, B.C., MELLO, M.L.S. **Biologia celular**. Rio de Janeiro: Atheneu,1987. 347p.
- WORDINGER, R. J. , DICKY, J.F. Histological and histochemical changes in bovine endometrium following treatment with a progestin. **J. Dairy Sci.**, v.54, p.1872-5, 1971.

4- APÊNDICE

PROTOCOLO DE COLHEITA DE MATERIAL PARA HISTOLOGIA

Búfala nº:

data:



ÚTERO

TUBA UTERINA

OVÁRIO

ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO ÚTERO, TUBA UTERINA E OVÁRIO DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis*)

Este estudo foi realizado com o objetivo de se conhecer melhor os aspectos morfológicos do sistema reprodutor feminino de búfalas e as modificações que ocorrem nesse sistema durante o ciclo estral. Foram utilizados fragmentos do útero, tuba uterina, e ovário, além de sangue de 20 búfalas provenientes de um matadouro comercial da cidade de Lençóis Paulista-SP. Os fragmentos foram fixados em Karnovsky, incluídos em resina e parafina e corados com HE, AT (pHs 2,5, 4,5 e 6,0), PAS e tricrômio de Masson. Realizou-se uma avaliação histológica geral dos tecidos e análise morfométrica do útero e tuba uterina. Os animais que apresentaram, no endométrio, vascularização e mitose glandular de moderada a intensa, e edema de moderado a intenso foram classificados na fase folicular (38 %) e os que apresentaram secreção e vacuolização supranuclear glandular de moderada a intensa pertenciam a fase lútea (62 %). Dez animais apresentaram endometrite leve (60 %), moderada (30 %) e acentuada (10 %). O ovário possuía, no córtex, folículos pré-antrais e antrais normais e atresícos, corpos albicans, corpos lúteos e, na medular, vasos sangüíneos, *rete ovarii* e células do hilo. A média do diâmetro das glândulas basais e superficiais foi, respectivamente, de $36,53 \pm 8,86 \mu\text{m}$ e $62,31 \pm 10,40 \mu\text{m}$. Para as variáveis glândula basal, superficial e epitélio basal houve diferença entre as regiões do útero, enquanto para as variáveis glândulas basal e superficial, lúmen basal e superficial, epitélio basal e superficial e epitélio luminal verificou-se diferença entre os animais dentro

de uma ou ambas as fases. Observou-se correlação significativa entre a variável glândula basal e as variáveis lúmen e epitélio basal, entre a glândula superficial com o lúmen e o epitélio superficial, entre o lúmen basal e o epitélio basal, e entre o lúmen superficial e o epitélio superficial. Na tuba uterina, não houve diferença entre as fases e regiões estudadas para a altura das células ciliadas e secretoras, mas verificou-se diferença entre os animais da fase folicular para a altura das células secretoras. A concentração hormonal plasmática média de progesterona e estradiol dos animais da fase folicular foi de $0,37 \pm 0,07$ ng/mL e $47,19 \pm 13,35$ pg/mL e dos animais da fase lútea foi $5,21 \pm 2,19$ ng/mL e $18,72 \pm 16,34$ pg/mL para progesterona e estradiol, respectivamente.

HISTOLOGICAL ASPECTS OF THE UTERUS, UTERINE TUBE, AND OVARY OF THE BUFFALO COW (*Bubalus bubalis*)

This study was carried out with the aim of finding and adding more knowledge to the morphological aspects of the feminine reproductive system of buffalo cows, and the modifications that occur in this system during the estrous cycle. There were utilized fragments of uterus, uterine tube, and ovary, and blood from 20 buffalo cows from a commercial slaughterhouse in the city of Lençóis Paulista- SP- Brazil. The fragments were fixed in Karnovsky, then embedded in resin and paraffin, and stained with HE, AT, PAS, and Masson trichrom. A general histological evaluation of the tissues was made, and a morphometric analysis of the uterus and uterine tube as well. The animals that showed, in endometrium, vascularization and glandular mitoses of moderate to intensive degree, and stromal edema of moderate to intensive degree, were classified in the follicular (38%) phase, and those that presented glandular secretion and supranuclear vacuolation of the glandular epithelial cells belonged in the luteal phase (62%). Ten animals presented endometritis slight (60%), moderate (30%), and high (10%). The ovary possessed, on the cortex, normal and atretic preantral and antral follicles, corpus albicans, corpus luteum, and in the medullar, blood vessels, *rete ovarii*, and hilus cells. The average diameter of the basal and superficial glands was, respectively, $36.53 \mu\text{m} \pm 8.86$, and $62.31 \mu\text{m} \pm 10.40$. For the variables basal and superficial glands, and basal epithelial, there were differences among the regions of the uterus, whereas for the variable basal and superficial glands, basal and superficial lumen, basal and superficial epithelium, and lumen epithelium, there was observed differences among the animals within one or both the two phases. There was also observed significant correlation between variable basal gland and the variable basal lumen and basal epithelium, between the superficial gland with the superficial lumen and superficial epithelium, between basal lumen and basal epithelium,

and between superficial lumen and superficial epithelium. In the uterine tube, there was no difference between the phases and the regions studied for height of the ciliated cells and secretory cells, but there was a difference between those animals in the follicular phase, for the height of secretory cells. The plasmatic values were, in average, 0.37 ± 0.07 ng/mL and 47.19 ± 13.35 pg/mL for progesterone and estradiol, and for those in the luteal phase, $5.21 \pm$ ng/mL and 18.72 ± 16.34 pg/mL for progesterone and estradiol, respectively.