

MARIA DA CONCEIÇÃO

**ASPECTOS HISTOLÓGICOS E
MORFOMÉTRICOS DA PELE DE CÃES
DO NASCIMENTO AOS 70 DIAS,
CLINICAMENTE SAUDÁVEIS**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus
de Botucatu, como requisito para
obtenção do Título de Doutor em
Medicina Veterinária, Área de
Clínica Veterinária.

**BOTUCATU – SP
2003**

MARIA DA CONCEIÇÃO

**Aspectos histológicos e morfométricos
da pele de cães do nascimento aos 70 dias,
cl clinicamente saudáveis**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus
de Botucatu, como requisito para
obtenção do Título de Doutor em
Medicina Veterinária, Área de
Clínica Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Ass. Dr^a. Michiko Sakate

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: SELMA MARIA DE JESUS

Conceição, Maria da
Aspectos histológicos da pele de cães neonatos e pediátricos clinicamente
saudáveis / Maria da Conceição. – 2003.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual
Paulista, Botucatu, 2003.

Orientador: Michico Sakate
Assunto CAPES: 50501062

1. Cães - Filhotes 2. Histologia veterinária

CDD 636.089
CDD 636.0891018

Palavras-chave: Cão; Histologia; Neonato; Morfometria; Pele

O que sabemos é uma gota.
O que ignoramos é um oceano.

Isaac Newton
(1643-1727)

Ao meu companheiro Jorivê e ao meu filho Júnior, por acreditarem, compartilharem e contribuírem para a realização dos meus ideais.

Aos meus ex-sogros, cunhadas e cunhados, por darem-me condições de alcançar esta vitória.

A Deus, pela minha vida e tudo que faz parte dela.

Agradecimentos

À Prof^a. Ass. Dr^a. Michiko Sakate e à Prof^a. Dr^a. Helena Ferreira que acreditaram em mim sem mesmo me conhecerem e permitiram que eu caminhasse sozinha, embora estivessem presentes. E, sobretudo, pelo exemplo de dedicação e respeito à Instituição, traduzindo o ideal maior de uma carreira.

À Prof^a. Noemi Souza Rocha que me deu a oportunidade, de estagiar no Laboratório de Rotina Histológica, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP-Campus de Botucatu.

Aos docentes da FMVZ, Agnemi Kohayagawa, Raimundo Souza Lopes, Regina Kiomi Takahira, Simone Biagio Chiacchio, Roberto Calderon Gonçalves e Laura Maria Alvarez de Figueiredo, pela convivência, ensinamentos, incentivo e, especialmente, pela acolhida fraterna.

À amiga e colega Maria Clorinda Soares Fioravanti, pelo estímulo e permanente apoio técnico e, principalmente, por estar sempre presente nos momentos mais difíceis.

À colega e amiga Naida Cristina Borges, que na qualidade de diretora do Hospital Veterinário EV/UFG, facilitou e apoiou a execução deste trabalho.

Às amigas e colegas Neusa Margarida Paulo e Simone Moraes Pôrto, pelas valiosas sugestões e amparo na execução do experimento.

Aos colegas e amigos do Setor de Patologia da EV/UFG, Luiz Augusto Batista Brito, Eugênio Gonçalves de Araújo, Ana Paula Iglesias Santin, Moema Pacheco Chediak Matos e Regiane Nascimento Gagno, por permitirem que partilhasse dos laboratórios para o processamento das

lâminas, e especialmente, pela inestimável ajuda na leitura e interpretação dos resultados.

Aos amigos e colegas Clóvis Alves Pereira, Maria Auxiliadora Andrade, Dirson Vieira, Luiz Antônio Franco da Silva, Ary da Silva Rodrigues, pelo apoio incondicional, desde os momentos iniciais até a defesa.

Ao Prof. Roberto Augusto de Almeida Torres do ICB/UFG por realizar o delineamento experimental e auxiliar na execução e interpretação das provas estatísticas.

Aos amigos e funcionários da EV/UFG: Vilda Maria dos Reis, e Maria do Carmo Marques, por terem contribuído efetivamente na fase experimental do projeto, esterilizando todo material utilizado na colheita dos fragmentos de pele; Antônio Souza da Silva, pelas informações técnicas para o processamento do material, coloração das lâminas e por ter recortado, de modo criterioso, os incontáveis blocos de parafina, João Vilela Teixeira, pelos seus ensinamentos; Maria Amélia Vieira da Paixão e Cláudia Gomes Miranda, por serem sempre prestativas.

Aos acadêmicos e amigos Bruno Rodrigues Trindade e Liliana Borges de Menezes, que auxiliaram no processamento e coloração das lâminas.

Ao amigo Adilson Donizeti Damasceno e Cleber Cardoso Xavier pela atuação na inserção das fotos e elaboração computadorizada da apresentação deste trabalho.

A todos os funcionários da Divisão de Biblioteca e Documentação da UNESP/Botucatu, pela dedicação, eficiência e paciência em nos orientarem como requisitar trabalhos.

Aos funcionários da seção de pós-graduação FMVZ, Denise A. Fioravanti Garcia e Luiz Carlos Fernandes pela constante orientação e desvelo.

Aos colegas de Disciplina que assumiram minhas funções durante o meu afastamento.

Aos proprietários que permitiram a utilização de seus animais.

Às pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu reconhecimento.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento do projeto (nº 2000/02332-0).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do Programa Institucional de Capacitação de Docentes e Técnicos (PICDT), pela concessão de bolsa.

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás pelo afastamento que possibilitou a realização do curso.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, pela acolhida.

Sumário

Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xiv
Resumo	xvii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Revisão de literatura.....	4
4. Material e métodos.....	12
4.1. Local de realização.....	12
4.2. Escolha dos animais.....	12
4.3. Origem e manejo das fêmeas.....	12
4.4. Obtenção dos filhotes.....	13
4.5. Cuidados com os filhotes.....	13
4.6. Biópsia.....	15
4.7. Fixação e processamento das amostras.....	16
4.8. Protocolo experimental.....	17
4.9. Critérios para avaliação histológica da pele.....	21
4.9.1. Visualização das estruturas da epiderme.....	21
4.9.2. Corte dos folículos pilosos.....	21
4.9.3. Critérios de observação das fibras.....	22
4.9.4. Quantificação e localização dos mastócitos.....	22
4.9.5. Quantificação e localização dos eosinófilos.....	22
4.10. Critérios para avaliação histométrica da pele.....	23
4.10.1. Epiderme.....	23

4.10.2. Membrana basal.....	24
4.10.3. Análise morfométrica das fibras colágenas e elásticas.....	24
4.10.3.1. Fibras colágenas.....	24
4.10.3.2. Fibras elásticas.....	24
4.10.4. Fibras reticulares.....	25
4.11. Análise estatística.....	25
5. Resultados e Discussão.....	26
5.1. Manejo dos animais.....	26
5.2. Técnica de biópsia.....	27
5.3. Aspectos histológicos e histométricos.....	27
5.4. Análise dos parâmetros obtidos na histometria.....	43
6. Conclusões.....	55
7. Referências Bibliográficas.....	57
Anexos.....	63
Abstract.....	78

Lista de Figuras

Figura	Página
1 – Mãe e filhotes acomodados no interior da caixa maternidade.....	14
2 – Marcadores nos locais de realização das biópsias.....	16
3 – Identificação do filhote no membro posterior.....	18
4 – Depilação no local da biópsia de pele.....	19
5 – Filhote sendo anestesiado.....	19
6 – Punch cutâneo de 8 mm de diâmetro.....	20
7 – Biópsia de pele utilizando o <i>punch</i>	20
8 – Membrana basal entre a epiderme e a derme.....	31
Fotomicrografias:	
9 – dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e apócrinas da derme do cão neonato com um dia de vida.....	31
10 – de três complexos apopilossebáceos da derme do cão filhote com 70 dias de idade.....	32
11 - de dois folículos pilosos emergindo em uma abertura comum do cão neonato com 10 dias de vida.....	33
12 – de quatro folículos pilosos emergindo em uma abertura folicular comum do cão filhote com 60 dias de idade.....	33
13 – dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e apócrinas do cão neonato de um dia de vida. Derme superficial coloração pouco evidente e derme profunda com a coloração bem evidente.....	34

Figura	Página
14 – dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e apócrinas do cão filhote de 70 dias de idade. Derme superficial coloração pouco evidente e derme profunda coloração bem evidente.....	34
15 – das fibras colágenas da derme do cão neonato de um dia de vida.....	35
16 – das fibras colágenas da derme do cão filhote de 70 dias de idade.....	36
17 – das fibras elásticas da derme do cão neonato de um dia de vida.....	37
18 – das fibras elásticas da derme do cão filhote com 70 dias de idade.....	37
19 – das fibras reticulares da derme profunda do cão neonato de um dia de vida.....	38
20 – das fibras reticulares da derme profunda do cão filhote com 70 dias de idade.....	38
21 – dos mastócitos na derme do cão neonato de um dia de vida.....	40
22 – dos mastócitos em volta do vaso sangüíneo da derme do cão filhote com 30 dias de vida.....	41
23 – dos mastócitos na papila dérmica do folículo piloso na hipoderme do cão filhote com 30 dias de idade.....	41
24 – dos mastócitos (imersão) na papila dérmica do folículo piloso, do cão filhote com 30 dias de vida.....	42
Médias por sexo, expressas em micra da espessura:	
25 – da epiderme do dorso direito 1, dos animais de um, 20, 40 e 60 dias.....	45

Figura	Página
26 – da membrana basal da epiderme do dorso direito 1, dos animais de um, 20, 40 e 60 dias.....	46
27 – das fibras colágenas da derme superficial do dorso direito 1, dos animais de um, 20, 40 e 60 dias.....	47
28 – das fibras colágenas da derme profunda do dorso direito 1, dos animais de um, 20, 40 e 60 dias.....	48
29 – das fibras elásticas da derme do dorso direito 1, dos animais de um, 20, 40 e 60 dias.....	49
30 – das fibras reticulares da derme profunda do dorso direito 1, dos animais de um, 20, 40 e 60 dias.....	50

Lista de Tabelas

Tabela	Página
1 – Médias e desvio padrão obtidos pela histometria em micra da espessura da epiderme (camadas granulosa, espinhosa e germinativa), da membrana basal da epiderme, das fibras reticulares da derme profunda, das fibras elásticas da derme, das fibras colágenas das dermes superficial e profunda do dorso direito 1, dos machos e fêmeas de um, 20, 40, e 60 dias de idade.....	44
Valores em micra da espessura:	
2 – da epiderme do dorso direito 1, de machos e fêmeas de um, 20, 40 e 60 dias de idade.....	45
3 – da membrana basal da epiderme do dorso direito 1, de machos e fêmeas de um, 20, 40 e 60 dias de idade.....	46
4 – das fibras colágenas da derme superficial do dorso direito 1, de machos e fêmeas de um, 20, 40 e 60 dias de idade.....	47
5 – das fibras colágenas da derme profunda do dorso direito 1, de machos e fêmeas de um, 20, 40 e 60 dias de idade.....	48
6 – das fibras elásticas da derme do dorso direito 1, de machos e fêmeas de um, 20, 40 e 60 dias de idade.....	49
7 – das fibras reticulares da derme profunda do dorso direito 1, de machos e fêmeas de um, 20, 40 e 60 dias de idade.....	47

Tabela	Página
8 – Médias e desvio-padrão obtidos pela histometria em micra, da espessura da epiderme (camadas germinativa, espinhosa e granulosa), da membrana basal da epiderme, das fibras reticulares da derme profunda, das fibras elásticas da derme, das fibras colágenas da derme superficial e da derme profunda, do dorso direito 1 e ventre direito 1, de machos e fêmeas de 60 dias de idade.....	51
Valores em micra da espessura:	
9 – da epiderme (camadas germinativa, espinhosa e granulosa) do dorso direito 1 e ventre direito 1, de machos e fêmeas de 60 dias de idade.....	52
10 – da membrana basal da epiderme do dorso direito 1 e ventre direito 1, de machos e fêmeas de 60 dias de idade.....	52
11 – das fibras colágenas da derme superficial do dorso direito 1 e ventre direito 1, de machos e fêmeas de 60 dias de idade.....	53
12 – das fibras colágenas da derme profunda do dorso direito 1 e ventre direito 1, de machos e fêmeas de 60 dias de idade.....	53
13 – das fibras reticulares da derme do dorso direito 1 e ventre direito 1, de machos e fêmeas de 60 dias de idade.....	54
14 – das fibras elásticas da derme do dorso direito 1 e ventre direito 1, de machos e fêmeas de 60 dias de idade.....	54

1. INTRODUÇÃO

A pele tem várias funções importantes como a de impedir a perda corpórea de água, eletrólitos e macromoléculas. Fornece proteção contra as agressões do meio ambiente, principalmente em relação aos fatores químicos, físicos e microbiológicos. Essa dá conformação ao corpo, produz estruturas ceratinizadas como pêlos, unhas e camada córnea da epiderme. Regula a temperatura corpórea e armazena eletrólitos, água, vitaminas, gorduras, carboidratos, proteínas e outras substâncias. É uma boa indicadora do estado de higidez do animal, fornece pigmentação que protege contra irradiação solar excessiva, tem ações antimicrobiana e imunorreguladora, produz secreções glandulares, tem função excretora, elabora a vitamina D e além disso, auxilia no controle da pressão arterial (Scott et al., 1996).

Em decorrência dessas funções essenciais da pele, várias conseqüências deletérias poderão advir da perda da sua integridade ou, da sua imaturidade na vida neonatal.

Está descrito na literatura científica, quantidade considerável de dados em neonatologia de algumas espécies animais como bovinos, eqüinos, suínos e ovinos. A neonatologia humana conta com centenas de artigos em revistas especializadas e com dezenas de livros científicos. No entanto, quanto aos caninos e felinos as informações são escassas.

Em relação aos desenvolvimento e amadurecimento das estruturas da pele de caninos, no período neonatal, nada foi encontrado na literatura consultada. Se, por um lado, as comparações dos resultados de trabalhos realizados nesta área ficam prejudicadas pela ausência de referências bibliográficas, por outro, as neonatologias canina e felina

fornece um vasto campo para que novas pesquisas sejam desenvolvidas.

Considerando este aspecto, o presente trabalho, por meio do estudo histológico da pele de caninos neonatos (neonato – do nascimento até seis semanas de vida, pediátrico – de seis semanas até 12 semanas de vida, segundo Boothe & Tartington, 1997), pôde de alguma forma, trazer contribuição à Medicina Veterinária e às outras que utilizam estes animais como modelo experimental.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo avaliar:

- 1) a evolução da pele dos recém-nascidos em relação à sua morfologia e celularidade desde o primeiro até os 70 dias de idade;
- 2) verificar se os caninos recém-nascidos possuem na epiderme e derme os mesmos componentes observados na histologia da pele dos caninos adultos;
- 3) quantificar o número de mastócitos e eosinófilos presentes na derme;
- 4) determinar a espessura da epiderme, membrana basal, fibras colágenas da derme superficial e profunda, fibras elásticas, fibras reticulares, por meio da histomorfometria;
- 5) verificar o efeito do sexo, idade, local de colheita, e da interação idade e sexo, na espessura da epiderme (camadas granulosa, espinhosa e germinativa), membrana basal da epiderme, fibras colágenas das dermes superficial e profunda, fibras elásticas da derme e fibras reticulares da derme profunda da pele canina do recém-nascido até os 60 dias de idade.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A pele funciona como uma barreira anatômica e fisiológica entre o corpo do animal e o meio ambiente e oferece proteção contra as agressões física, química e microbiológica e seus componentes sensoriais permitem ao animal a percepção do calor, frio, dor, tato e pressão. A pele, os pêlos e tecidos subcutâneos de um cãozinho recém-nascido equivalem a 24% de seu peso vivo. Por ocasião da maturidade, essas estruturas representam apenas 12% do seu peso corpóreo (Fraser, 1988 e Scott et al., 1996).

A pele é bastante heterogênea, com uma variedade de componentes celulares e tissulares como a epiderme, a derme, os apêndices e os músculos eretores dos pêlos e, está intimamente relacionada com a hipoderme. Também desempenha várias funções tais como barreira de proteção contra perda de fluidos, proteção contra agressões do ambiente, regulação térmica, percepção sensorial, flexibilidade e conformação, ação antimicrobiana, controle da pressão sangüínea, secreção e excreção, produção de anexos, armazenamento, pigmentação, produção de vitamina D e indicadora de doença interna (Fraser, 1988; Scott et al., 1996).

A pele é um órgão extenso e complexo tendo porções hirsutas e glabras. A estrutura histológica varia muito entre as diferentes áreas e entre as diferentes espécies animais. A pele hirsuta é mais espessa no dorso do animal e nas faces laterais dos membros e mais delgada na face ventral do corpo e na face medial das coxas. O tecido subcutâneo conecta a epiderme e a derme às fascias e musculaturas subjacentes. A epiderme da pele hirsuta é mais delgada e é constituída de quatro camadas (Hargis, 1998).

A camada basal é monocelular e está localizada na zona da membrana basal que separa a derme da epiderme. As mitoses das células da camada basal ocorrem principalmente à noite e, como a maioria das amostras histológicas é obtida durante o dia, as figuras de mitose raramente são vistas nos cortes histológicos da pele (Gartner & Hiatt, 1999). A camada espinhosa é composta de células-filhas da camada basal e na pele hirsuta tem a espessura de uma a três lâminas celulares. A camada granulosa está inconstantemente presente na pele hirsuta, tendo a espessura de uma a duas lâminas celulares e no seu citoplasma há grânulos de querato-hialina. A camada córnea contém várias lâminas celulares cornificadas, é a camada mais externa da epiderme e está em constante descamação na porção periférica. Não há cristas interpapilares na pele hirsuta normal de cães (Muller et al., 1985; Banks, 1992; Scott et al., 1996; Gartner & Hiatt, 1999).

É interessante atentar para o fato de que na preparação histológica, do fragmento de pele, que envolve fixação, desidratação e inclusão em parafina, perde-se mais ou menos a metade da camada córnea (Scott et al., 1996).

As zonas da membrana basal são a interface físico-químicas entre a epiderme, derme e outras estruturas da pele tais como: apêndices epidérmicos, vasos e músculos eretores do pêlo. Esta zona é importante para fixar a epiderme à derme, garantir uma epiderme funcional e proliferativa, manter a arquitetura tecidual, cicatrizar feridas e funcionar como barreira. A zona da membrana basal cora-se muito bem pelo ácido periódico Schiff (PAS), sugerindo a presença de polissacarídeos neutros (Muller et al., 1985 e Scott et al., 1996). Cada fibra muscular lisa está envolvida por uma membrana basal na qual se inserem as fibras reticulares (Banks, 1992; Junqueira & Carneiro, 1999; Gartner & Hiatt, 1999 e Bacha Jr. & Bacha, 2000).

Segundo Ham (1967), as membranas basais representam um complexo de material, amorfo e permeável, derivado das células

epiteliais e de uma malha de sustentação de fibras reticulares. É provável que o componente amorfo das membranas basais contenha um tipo de carboidrato PAS positivo, e que seja responsável, pelo menos em parte, da reação PAS positiva que tem sido atribuída às fibras reticulares, presentes nestes locais.

Segundo Muller et al. (1985) e Scott et al. (1996), as unidades foliculares são caracterizadas da seguinte forma:

unidade folicular pilosa que consiste no folículo piloso e seus músculos eretores do pêlo, juntamente com as glândulas sebáceas e apócrinas;

unidade de folículos pilosos múltiplos, tem mais de um folículo piloso, glândulas sebáceas e apócrinas e músculos eretores do pêlo;

complexo apopilossebáceo, tem pêlos primários e secundários, glândulas sebáceas e apócrinas e músculos eretores do pêlo.

Nos caninos recém-nascidos, os folículos pilosos primários estão presentes em grupos de dois, três ou quatro, mas cada folículo possui apenas um único pêlo. São necessários cerca de seis meses para que ocorra o desenvolvimento dos folículos pilosos secundários e para que surjam pêlos acessórios no orifício folicular. O desenvolvimento do folículo piloso no período pós-natal ocorre da seguinte maneira: durante a primeira semana de vida, presença de folículo piloso simples; durante a 12^a semana de vida, folículo piloso composto e durante a 28^a semana de vida, folículo piloso mais complexo (Muller et al., 1985).

Praticamente não se formam novos folículos após o nascimento. A bainha da raiz externa do folículo piloso é mais grossa perto da epiderme e gradualmente diminui de espessura em direção ao bulbo do pêlo. Em sua porção inferior é recoberta pela bainha da raiz externa. Esta não sofre queratinização e suas células possuem citoplasma vacuolizado claro (glicogênio) e não se formam grânulos de querato-hialina. Na porção superior do folículo piloso, a bainha da raiz externa sofre queratinização, da mesma forma como ocorre na epiderme

superficial. A bainha da raiz externa é rodeada pela membrana basal e por uma bainha de raiz fibrosa. As células da medula do pêlo são compactas perto da raiz, e no restante da haste tem vacúolos de ar e glicogênio (Muller et al., 1985; Scott et al., 1996 e Gartner & Hiatt, 1999).

Gross et al. (1997) realizaram revisão histológica do folículo piloso, verificando sua divisão em três regiões: o segmento superficial que vai desde a abertura folicular até o nível dos ductos das glândulas sebáceas, denominado de infundíbulo; o istmo folicular que é o segmento médio do folículo, estendendo-se desde a entrada do ducto sebáceo até a fixação do músculo eretor na bainha do tecido conjuntivo sobre a depressão do folículo piloso; e o segmento inferior que se encontra abaixo do istmo até o bulbo do folículo piloso. A coloração pálida pela hematoxilina e eosina (HE), das células da bainha da raiz externa do folículo piloso, é consequência da abundância de glicogênio citoplasmático. A bainha da raiz interna tem três camadas: a interna representada pela cutícula; a intermediária que é a camada de Huxley que tem grânulos de trico-hialina e a monocamada de Henle que está em contato com a bainha da raiz externa.

Os músculos eretores dos pêlos originam-se na derme superficial, inserindo-se perpendicularmente na saliência dos folículos pilosos primários. Há ramificação destes músculos na derme superficial. Cada fibra muscular está envolvida pela membrana basal, na qual se inserem as fibras reticulares. O músculo, ao contrair-se, ergue o pêlo e comprime as glândulas sebáceas que estão localizadas entre a massa muscular e o folículo piloso (Banks, 1992 e Scott et al., 1996). O citoplasma das células do músculo liso contém glicogênio (Ham, 1967 e Gartner & Hiatt, 1999).

As glândulas sebáceas estão localizadas no ângulo obtuso (ângulo formado entre o pêlo e a superfície cutânea) e conectadas na parte superior do folículo piloso por um ducto curto. Cada folículo tem várias glândulas sebáceas que estão localizadas na derme superficial. Os

lóbulos sebáceos estão contornados pela membrana basal e as suas células têm glicogênio no citoplasma (Ham, 1967; Muller et al., 1985; Scott et al., 1996; Junqueira & Carneiro, 1999 e Gartner & Hiatt, 1999).

As glândulas apócrinas abrem-se no colo do folículo, acima da abertura das glândulas sebáceas, através do ducto excretor pouco enovelado ou reto e mergulham nas porções profundas da derme e hipoderme. Cada unidade folicular tem uma glândula apócrina, que é a glândula sudorípara predominante nos animais domésticos, mas nos canídeos aparentemente funcionam de forma mínima como glândula sudorípara. As células mioepiteliais que circundam a porção secretora das glândulas sudoríparas apócrinas são envolvidas pela lâmina basal das células secretoras (Muller et al., 1985; Banks, 1992; Scott et al., 1996 e Gartner & Hiatt, 1999).

A camada superficial da derme é composta de fibras colágenas delgadas frouxamente arranjadas e distribuídas de forma irregular. A camada profunda da derme é formada de fibras colágenas espessas densamente organizadas que tendem a ficar paralelas à superfície cutânea. As fibras musculares esqueléticas que são parcialmente responsáveis pelos movimentos voluntários da pele, estendem-se do músculo cutâneo à derme. Os fibroblastos, mastócitos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e raramente, eosinófilos e neutrófilos, podem ser encontrados na derme normal. As artérias cutâneas dão origem a três plexos vasculares que são responsáveis pela vascularização das regiões subcutâneas, cutâneas e subpapilar da pele. Os capilares linfáticos surgem na derme superficial e fazem conexão com o plexo subcutâneo e esses convergem para formar canais mais calibrosos que chegam aos linfonodos periféricos (Muller et al., 1985; Scott et al., 1996 e Hargis, 1998).

As fibras colágenas representam aproximadamente 90% de todas as fibras dérmicas e 80% da matriz extracelular dérmica. Na derme, as fibras são espessas, onduladas, sem orientação predominante

e sem ramificação. Coram-se diferencialmente pelo tricrômico de Masson (Banks, 1992; Scott et al., 1996; Junqueira & Carneiro 1999 e Bacha Jr. & Bacha, 2000).

As fibras elásticas são longas e finas e se romperem, terão aspecto ondulado ou de sacarrolha. Segundo Junqueira & Carneiro (1999), elas ramificam-se e ligam-se umas às outras, formando uma trama de malha muito irregular. Scott et al. (1996) afirmaram que, as fibras elásticas compõem-se de ramos finos únicos e de grande elasticidade e, são bem visualizadas pelas colorações de Verhoeff, Van Gieson, orceína ou fuccina resorcina Weigert's (Banks, 1992; Gartner & Hiatt, 1999 e Bacha Jr. & Bacha, 2000).

Frank et al. (1996) colheram amostras de pele de 19 cães adultos, machos e fêmeas clinicamente saudáveis. As fibras elásticas foram avaliadas em três regiões anatômicas da derme: a superficial (derme entre a epiderme e as glândulas sebáceas), a profunda (derme entre as glândulas sebáceas e tecido subcutâneo) e a perianexal. Verificaram, neste estudo, que na derme superficial, as fibras elásticas são finas como fibras simples ou raramente uma rede orientada perpendicularmente para a zona da membrana. Na derme profunda, as fibras elásticas são grossas e muitas vezes aparecem como fibras simples fragmentadas. As fibras elásticas estão sempre em grande número na região adjacente aos folículos pilosos, mais do que no resto da derme. Os autores concluíram que a derme de cães clinicamente normais não tem abundância de fibras elásticas.

As fibras reticulares são estruturas finas, ramificadas e freqüentemente estão associadas às membranas basais, sendo componentes da maioria dos órgãos e tecidos, e formam uma trama delicada em volta das células musculares lisas individuais. São fibras argirófilas (Banks, 1992; Scott et al., 1996 e Junqueira & Carneiro 1999) e coram-se pela técnica do PAS (Ham, 1967).

Tarpley et al. (1984) estabeleceram a técnica “vermelho

congo-azul toluidina acidificada”, para corar especificamente e simultaneamente os mastócitos e eosinófilos, presentes nas amostras de intestino de equino. Esta técnica permitiu excelente visualização destes dois tipos de células. Os mastócitos são corados de púrpura azul escuro e os grânulos são metacromáticos, enquanto que os eosinófilos aparecem amarelo-laranja e os grânulos de cor amarelo-laranja e laranja brilhante.

Os mastócitos são células histiocitárias, de forma oval a fusiforme, núcleo central arredondado ou oval. Possuem grande quantidade de granulações intracitoplasmáticas, basofílicas e metacromáticas. Os grânulos contêm heparina, histamina, proteases neutras, aril-sulfatase, fator quimiotático de eosinófilos (ECF) e fator quimiotático de neutrófilos (NCF). Sintetizam também leucotrienos a partir de precursores do ácido araquidônico. Estes grânulos são visíveis pelos corantes de Giemsa, azul de metileno, azul de toluidina ou Giemsa-orceína ácida. Essas células estão em todas as áreas de tecido conjuntivo, principalmente em volta dos vasos sanguíneos superficiais e apêndices (Muller et al., 1985; Scott et al., 1996; Gartner & Hiatt 1999 e Bacha Jr. & Bacha, 2000), em um número que varia de quatro a 12 células por campo de grande aumento, em cães (Muller et al., 1985). Os mastócitos são frágeis, rompem-se facilmente durante as técnicas de preparações histológicas e os grânulos são altamente hidrossolúveis, sendo raramente preservados pelas técnicas rotineiras (Banks, 1992). A pele, pulmões, trato gastrintestinal e útero tem grandes concentrações de mastócitos (Silveira, 1988).

Lavielle et al. (1985) realizaram 23 biópsias de pele, na região do dorso, de fêmeas da espécie bovina clinicamente saudáveis, de um ano e meio de idade. O objetivo desta pesquisa foi determinar a densidade dos mastócitos, melanócitos e eosinófilos na pele destes animais. Em cada amostra de pele, foram consideradas duas zonas, uma superficial (tecido conjuntivo subepidérmico compreendido entre a membrana basal do epitélio até as glândulas sebáceas) e outra profunda

(desde as glândulas sebáceas até o limite mais profundo do adenômero das glândulas sudoríparas). Foi contado, em cada uma das amostras, o número de mastócitos, eosinófilos e melanócitos, em 10 campos de cada zona. Foi observada maior concentração de mastócitos e eosinófilos na parede dos vasos sangüíneos e, essas células não foram visualizadas na membrana basal do epitélio e nos folículos pilosos.

Scott (1990) examinou 338 gatos e em 37 destes, livres de enfermidades neoplásicas, o autor descreveu a presença de mastócitos na epiderme superficial e na bainha folicular externa. Os mastócitos epidérmicos foram freqüentes nos animais com placas eosinofílicas e granulomas eosinofílicos. A maioria das dermatoses, onde detectam-se mastócitos epidérmicos, é decorrência de patogenia imunomediada e também apresenta eosinofilia tecidual.

Gartner & Hiatt (1999) e Bacha Jr. & Bacha (2000) afirmaram que os eosinófilos constituem menos de 4% da população total de glóbulos brancos e podem ser pleomórficos durante sua migração pelo tecido conjuntivo. O seu núcleo é bilobulado e pode ou não estar conectado por filamentos de substância nuclear e no citoplasma tem grandes granulações acidófilas. Fenômenos anafiláticos, alérgicos e hipersensibilidade têm sido descritos em conexão com os mastócitos (Han, 1967 e Banks, 1992). A eosinofilia é comum em doenças cujos tecidos têm alta concentração de mastócitos tais como pele, pulmões, trato gastrointestinal e útero (Silveira, 1988).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de realização

O trabalho foi desenvolvido no Setor de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus de Botucatu, SP e no Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO.

4.2. Escolha dos animais

Foram escolhidas sete fêmeas da espécie canina, SRD, adultas, gestantes (terço final da gestação), com idade superior a dois anos. As cadelas gestantes pesaram entre 20 e 30 kg.

4.3. Origem e manejo das fêmeas

As fêmeas gestantes (média de 54 dias de gestação), foram cedidas por proprietários residentes em Goiânia, Trindade, Aparecida e Bela Vista de Goiás. As cadelas gestantes foram examinadas segundo recomendações de McMcguinre & Seim (1991) e foram avaliados parâmetros como a temperatura corpórea, as frequências cardíaca e respiratória, estado de hidratação, linfonodos, tempo de preenchimento capilar (TPC), palpação abdominal, auscultação cardíaco-pulmonar, mucosas aparentes, pele e anexos, respiratório, cardíaco-vascular, gastro-intestinal, genito-urinário, neurológico e locomotor (Anexo

1). Foram incluídas no experimento as fêmeas que apresentaram parâmetros dentro da normalidade para a espécie.

As gestantes foram mantidas em caixa-maternidade, alocadas em jaulas individuais de alvenaria e providas de tablado de madeira removível. A acomodação dos animais era providenciada com bastante antecedência para minimizar o estresse. As jaulas garantiam livre acesso a solários individuais, nos quais os animais podiam movimentar-se, tomar sol e eliminar excretas. A alimentação diária constou de ração comercial¹ e água à vontade.

Após o parto, as cadelas com suas respectivas ninhadas, foram mantidas por mais 70 dias no mesmo local, recebendo outro tipo de ração comercial².

4.4. Obtenção dos filhotes

Foram utilizados 28 caninos recém-nascidos, 14 machos e 14 fêmeas, provenientes de ninhadas diferentes, sendo escolhidos dois machos e duas fêmeas por ninhada.

4.5. Cuidados com os filhotes

Todos os filhotes foram submetidos ao exame físico neonatal indicado por Greco & Tartington (1997), durante os nove primeiros dias e depois, uma vez por semana, até completarem 70 dias de idade (Anexo 2). Durante os primeiros 18 dias de vida, os filhotes foram mantidos em companhia de suas respectivas mães em caixa-maternidade conforme ilustrada na figura 1.

¹ Bomguy Premium. BASA -Brasília Alimentos S.A. Planaltina-DF.

² Bomguynho. Basa-Brasília Alimentos S.A. Planaltina-DF.

Estas caixas apresentavam as seguintes características:

- material: plástico.
- dimensões: 65 cm de largura por 1 m de comprimento, com laterais de 30 cm de altura que evitaram a queda dos neonatos, sem dificultar a entrada e saída da mãe.
- assoalho: a caixa-maternidade foi colocada sobre o tablado de madeira para evitar o resfriamento da mãe e dos filhotes, uma vez que o piso das jaulas era de cimento.
- forração: foram utilizados cobertores.

As caixas-maternidade foram colocadas no interior das jaulas e o acesso ao solário era livre para as cadelas, ficando os neonatos confinados nas caixas até 18 dias de idade (Figura 1).



Figura 1 – Mãe e filhotes acomodados no interior da caixa maternidade

A partir dos 14 dias de idade, os filhotes, além da alimentação materna, recebiam, dieta pastosa à base de leite desnatado¹ e ração para filhote em crescimento² (Anexo 3). Após este período de

¹ Leitbom. Leite UAT desnatado. Lat. Morrinhos Ind. e Com. Ltda. S. Luiz dos Montes Belos-GO.

² Bomguynho. BASA-Brasília Alimentos S.A. Planaltina-DF.

adaptação nutricional, à partir do 20º dia de idade, foi fornecida apenas a ração, também para filhote em crescimento¹ misturada com a ração úmida² (Anexo 3).

Todos os filhotes, aos 22 dias de idade, receberam o anti-helmíntico febendazole mais praziquantel³ na dose de 100 mg/kg e 5 mg/kg, dose única. As cadelas também receberam o mesmo anti-helmíntico e a mesma dose por kg. Após 12 dias desta desverminação, os animais receberam novamente outra dose do mesmo medicamento³ (Anexo 3).

O desmame gradativo dos filhotes foi iniciado aproximadamente aos 40 dias de idade pela própria mãe que, a partir de então, já começava a impedir que seus filhos mamassem.

Os filhotes foram imunizados com vacina contra parvovirose⁴ e polivivalente⁵ aos 45 e 66 dias de idade (Anexo 3).

Também foi registrado o peso corpóreo de cada filhote ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida (Anexos 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

4.6. biópsia

Foram colhidas amostras de pele das regiões dorsal e ventral dos neonatos com um, 10, 20, 30, 40 50, 60 e 70 dias de vida. No primeiro dia, no lado direito do animal, as biópsias foram realizada, nas regiões axilar (VD₁), dorso-caudal à escápula (DD₁), tóraco-ventral, entre o primeiro e segundo mamilo (VD₂) e, no dorso, sobre as últimas costelas

¹ Bomguynho. BASA-Brasília Alimentos S.A. Planaltina-DF.

² Bomguy carne. Dumilho S.A. Indústria e Comércio. Calabouço-DF.

³ Panacur^R Plus. Hoechst Roussel Vet. Cruzeiro-SP.

⁴ Parvovac. Lema BioLOGIC do Brasil Ltda. Contagem-MG.

⁵ Tri-Cino-Vacin. Laboratório Bio-Vet. Vargem Grande Paulista-SP.

(DD₂). No dia 10 repetiu-se o procedimento do dia um, porém do lado esquerdo (VE₁, DE₁, VE₂, DE₂). No dia 20 as colheitas foram realizadas nas mesmas regiões, novamente no lado direito e depois no dia 30 no lado esquerdo. No dia 40 repetiu-se o procedimento do dia um e no dia 50 o procedimento do dia 10. No dia 60 as colheitas foram realizadas das mesmas regiões, novamente do lado direito e depois no dia 70 do lado esquerdo (Figura 2). Utilizou-se um *punch* (saca-bocado) de 8 mm de diâmetro para obtenção das biópsias de pele segundo à técnica descrita por Peleteiro & Correia (1996), mas utilizando anestésico volátil¹ por sistema aberto de ventilação (máscara), em substituição ao anestésico local recomendado pelos autores.

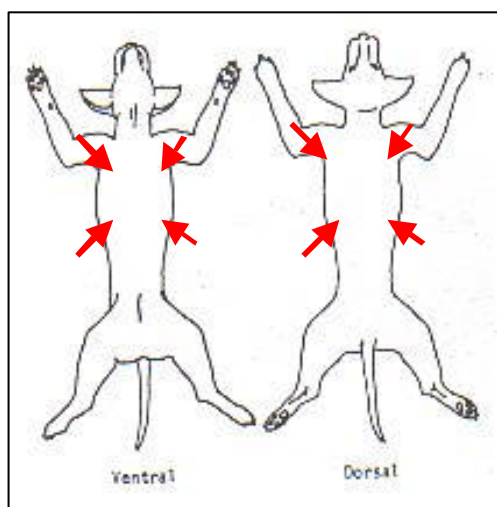


Figura 2 – Com marcadores nos locais de realização das biópsias

4.7. Fixação e processamento das amostras

As amostras de pele foram identificadas, fixadas e armazenadas em frascos contendo formol tamponado a 10%, que após o fechamento, foram deixados à temperatura ambiente durante 24 horas. As

¹ Halotano. Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira-Lindóia-SP.

amostras foram recortadas e deixadas no formol mais 24 horas (Banks, 1992), posteriormente transferidas para pequenas caixas plásticas individuais (unicassetes), lavadas com água de torneira durante uma hora, colocadas em álcool a 70% e permaneceram neste conservante até o final do período de colheita.

Os fragmentos de pele, obtidos por biópsia, foram processados de acordo com o método convencional de histopatologia descrito por Luna (1968). Estes materiais foram incluídos em blocos de parafina, e laminados para a posterior coloração das lâminas.

Alguns componentes da pele e hipoderme foram identificados pela coração da hematoxilina e eosina (HE), conforme descrição de Luna (1968).

Para evidenciação, na pele, de mastócitos e eosinófilos, foi usada a técnica de coloração vermelho congo-azul de toluidina acidificada, como descrita por Tarpley et al. (1984).

O método do ácido periódico Schiff (PAS) foi utilizado para a visualização do gel mucopolissacarídeo; a coloração de reticulina (11) para fibras reticulares; o método de calleja (12) sem permanganato de potássio para fibras elásticas; o tricrômico de Masson (13) para ceratinócitos, tecido conjuntivo, músculos eretores do pêlo e fibras colágenas. Estas colorações foram realizadas segundo técnicas modificadas pelo Laboratório de Rotina Histológica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP-Campus de Botucatu (Anexos 11, 12 e 13). Todas as amostras de pele obtidas por biópsia foram coradas pelas seis técnicas citadas.

4.8. Protocolo experimental

Os filhotes foram identificados com esparadrapo numerado e fixado no membro posterior (Figura 3).



Figura 3 – Identificação do filhote no membro posterior

A contenção dos filhotes foi realizada com o auxílio de um funcionário para depilar a pele no local da colheita do material com máquina de cortar cabelo¹ (Figura 4), para efetuar a anestesia e posteriormente realizar a biópsia de pele. Após a depilação não se realizou a assepsia do local para evitar irritação da pele que poderia comprometer a integridade do material em estudo. Foi colocada, no focinho do filhote, a máscara contendo o anestésico volátil² (algodão embebido com anestésico) (Figura 5), até o filhote entrar em plano superficial de anestesia. Em seguida, realizou-se a biópsia com um *punch* de 8 mm de diâmetro (Figura 6 e 7) com movimentos rotativos para o mesmo lado, colhendo-se quatro fragmentos de pele (dois dorsal e dois ventral) de cada filhote conforme metodologia apresentada. No local das biópsias, fez-se uma pequena sutura com U deitado para aproximar as extremidades da pele, utilizando fio de poliéster cardiovascular³. Estes pontos foram retirados da pele após três dias da biópsia.

¹ Homecut. Wahl Clipper Corporation. Illinois -EUA.

² Halotano. Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira-Lindóia-SP.

³ Ethibond extra 3.0. Johnson&Johnson. Rod. Pres. Dutra, Km 157. S. J. Dos Campos-SP.



Figura 4 – Depilação no local da biópsia de pele.



Figura 5 – Filhote sendo anestesiado



Figura 6 – Punch cutâneo de 8 mm de diâmetro



Figura 7 – Biópsia de pele utilizando o *punch*

As amostras foram desidratada, diafanizadas e emblocadas com parafina histológica¹, laminadas a cinco micrometros em micrótomo rotativo² utilizando navalhas descartáveis³. As lâminas foram coradas de acordo com as recomendações técnicas para cada coloração. Para a montagem das lâminas com lamínulas empregou-se solução de tolueno⁴. Procedeu-se a leitura histológica de 5.376 lâminas, em microscópio óptico⁵.

4.9. Critérios para avaliação histológica da pele

Para avaliação histológica dos fragmentos da pele, foram estabelecidos diversos critérios descritos a seguir.

4.9.1. Visualização das estruturas da epiderme

As camadas da epiderme, lâminas celulares por camada e grânulos de querato-hialina, foram observados nas camadas de pele coradas pela hematoxilina-eosina e pelo tricrômico de Masson, campo de 400x.

4.9.2. Corte dos folículos pilosos

Foram observados três tipos de cortes dos folículos pilosos. O corte longitudinal, o oblíquo e o transversal. Isto provavelmente

¹ Histocec pastilhas-Merck KgaA –Alemanha.

² Micrótomo Spencer 820-American Optical – EUA.

³ Navalhas descartáveis -Leica Instruments GmbH – Alemanha.

⁴ Permout. Fsher Scientific – EUA.

⁵ Modelo Jenaval. Carl zeiss – Alemanha.

⁶ Axio Vision 3.0. Carl Zeiss Vision GmbH - Alemanha.

ocorreu devido à implantação oblíqua (30 a 60 graus) dos folículos pilosos em relação à epiderme (Muller et al., 1985; Scott et al., 1996; Gartner & Hiatt, 1999). Neste trabalho, os relatos sobre os folículos pilosos foram baseados nos cortes transversais e longitudinais, corados pela hematoxilina-eosina e pelo PAS, visualizados no fragmento de pele, nas dermes superficial e profunda, campo único de 400x.

4.9.3. Critérios de observação das fibras

Todo fragmento de pele foi observado, no que diz respeito às fibras, em campo de 250x.

4.9.4. Quantificação e localização dos mastócitos

Os mastócitos foram pesquisados na derme superficial dos fragmentos de pele, e para quantificar, contaram-se todas as células encontradas na derme, em campo único de 400x.

4.9.5. Quantificação e localização dos eosinófilos

Os eosinófilos foram pesquisados na derme dos fragmentos de pele, e para quantificar contaram-se todas as células encontradas, em campo de 400x.

4.10. Critérios para avaliação histométrica da pele dos filhotes

Utilizou-se o software Axio Vision 3.0¹, procedendo a histometria em micra (μm), da espessura da epiderme (camadas granulosa, espinhosa e germinativa), membrana basal da epiderme, fibras reticulares, fibras elásticas e fibras colágenas da derme superficial e profunda, das amostras obtidas do lado direito e da região dorso-caudal à escápula (DD_1 = Dorso Direito 1) dos filhotes machos (M) e fêmeas (F) de um, 20, 40 e 60 dias de idade, e também, da região axilar (VD_1 = Ventre Direito 1) dos animais machos e fêmeas aos 60 dias de vida.

As imagens das lâminas foram digitalizadas do microscópio óptico² para o computador, por meio da câmera de vídeo analógica³ e a placa de captura⁴ e posteriormente, procedeu-se a histometria quantificada em micra (μm), da espessura da epiderme, membrana basal da epiderme, fibras reticulares, fibras elásticas, fibras colágenas da derme superficial e profunda, de 756 lâminas, no software Axio Vision 3.0¹.

4.10.1. Epiderme

Fizeram-se três medidas histométrica da epiderme de cada amostra, sempre iniciando do lado esquerdo ou na parte de cima do campo visualizado. Foram utilizados os fragmentos corados pelo tricrômico de Masson, onde procedeu-se a determinação da espessura conjunta da camada granulosa, espinhosa e germinativa. As imagens foram capturadas em campo único de 250x, fator de correção 0,8x e filtro três.

¹ Axio Vision 3.0. Carl Zeiss Vision GmbH – Alemanha.

² Modelo Jenaval. Carl Zeiss GmbH – Alemanha.

³ Câmera de Vídeo SAC-140 nd. Samsung – Coréia do Sul.

⁴ PCTV Captura. Pynacle Systems – EUA.

4.10.2. Membrana basal

Em cada amostra corada pelo PAS fizeram-se três medidas em micra (μm), da membrana basal da epiderme, iniciando do lado esquerdo para o lado direito, em campo único de 400x, fator de correção 1,0x e filtro zero.

4.10.3. Análise morfométrica das fibras colágenas e elásticas

Nas lâminas coradas pela técnica do tricrômico de Masson (fibras colágenas) e calleja sem permanganato de potássio (fibras elásticas), fez-se uma medida em micra (μm), na parte central de cada fibra presente dentro da sub-área de $6.288,66 \mu\text{m}^2$, proveniente da área total da imagem capturada $18.850,69 \mu\text{m}^2$. Cada sub-área foi localizada do lado esquerdo e na parte superior da imagem capturada (área total).

4.10.3.1. Fibras colágenas

Nos cortes corados pela técnica de tricrômico de Masson, as fibras colágenas foram visualizadas em campo único de 400x, fator de correção 1,0x e filtro zero.

4.10.3.2. Fibras elásticas

As fibras elásticas foram medidas em micra (μm), por campo único de 400x, na derme do fragmento de pele, fator de correção 1,0x e filtro zero.

4.10.4. Fibras reticulares

Foi medida a espessura em micra (μm) das fibras reticulares, por campo único de 250x, na derme profunda, fator de correção 1,0x e filtro zero.

4.11. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística, utilizando delineamento fatorial em parcelas subdivididas (*split-plot in time*), ao nível de significância de 5%, seguindo às recomendações de Cochran & Cox (1968), sendo adotado o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + L_j + S_iL_j + A_k(S_iL_j) + e_{ijk}$$

S_i = efeito sexo onde o índice $i = 1, 2$

L_j = efeito da idade onde o índice $j = 1, \dots, 4$

S_iL_j = efeito da interação sexo, idade, onde $i = 1, 2$ e $j = 1, \dots, 4$

$A_k(S_iL_j)$ = efeito animal dentro de sexo onde $k = 1, \dots, 14$; e $i = 1, 2$

E_{ijk} = erro experimental associado a observação dentro do sexo (i) e idade (j) onde $k = 1, \dots, 14$; $i = 1, 2$; $j = 1, \dots, 4$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Manejo dos animais

As dimensões da caixa-maternidade foram escolhidas levando-se em consideração ao porte das cadelas. Nestas condições houve espaço suficiente para que a parturiente aquecesse e amamentasse seus filhotes com comodidade, evitando-se a dispersão indesejável dos neonatos e traumas por pisoteio ou esmagamento destes por parte da cadela. Foram escolhidos e usados cobertores na forração da caixa-maternidade, e esta escolha deveu-se ao fato destes materiais serem confortáveis e promoverem o aquecimento da mãe e dos recém-nascidos, além de permitirem troca uma vez por dia. Após o uso, os cobertores eram lavados, facilitando o controle higiênico do local e evitando a proliferação de insetos, endo e ectoparasitas.

O manejo nutricional adotado foi para que se evitasse uma mudança muito brusca de uma alimentação láctea para uma sólida, o que poderia causar um impacto indesejável na microflora intestinal dos neonatos.

Os filhotes foram pesados no primeiro dia de vida e a cada dois dias, até completarem 70 dias de idade. Os pesos dos filhotes ao nascerem variaram de 290 a 430 gramas e, aos 70 dias de idade de 3.200 a 7.980 gramas, estes dados estão disponíveis em anexos. Os cães em geral dobram de peso de nascimento por volta de 10 a 12 dias de idade (Greco & Tartington, 1997).

De acordo com o projeto original seria utilizado o anestésico local, porém após realização do pré-experimento, observou-se que as perfurações das agulhas para infiltrar o anestésico local antes de realizar a biópsia, causavam muita dor e desconforto nos filhotes. Considerou-se ainda a possibilidade de provocar intoxicação e morte dos

neonatos pela aplicação excessiva do anestésico local (é difícil calcular a dose adequada para neonatos). Portanto, optou-se pelo anestésico volátil devido à facilidade e ao conforto na sua utilização e também por não traumatizar o filhote. A anestesia volátil mostrou-se adequada para realizar a biópsia de pele em animais neonatos e pediátricos caninos, sem nenhum inconveniente, no entanto, não tem citação deste procedimento anestésico na literatura consultada, referente às biópsias cutâneas. A eficácia da anestesia inalatória ficou demonstrada pelo fato dos filhotes despertarem rapidamente e com disposição física para se alimentarem e brincarem com os irmãos, logo após terem sido anestesiados e submetidos ao procedimento da biópsia.

5.2. Técnica de biópsia

As biópsias foram facilmente realizadas e o *punch* cutâneo (saca-bocado) de 8 mm de diâmetro, mostrou-se um instrumento adequado para o propósito de colheita dos fragmentos de pele dos filhotes. A utilização do *punch* cutâneo seguiu os procedimentos indicados por Peleteiro & Correia (1996). Este instrumento tem sido utilizado com frequência na biópsia de pele de cães e de gatos de filhotes e adultos (Sousa, 1990 e Gross et al., 1992) e de outras espécies animais (McGavin & Fadok, 1984 e Fioravanti, 1999).

5.3. Aspectos histológicos e histométricos

As colorações especiais das amostras foram de acordo com cada estrutura a ser evidenciada. Para trabalhar com a coloração tricrômico de Masson, foi necessário acertar o pH da água entre 6,5 a 7,0 e não usar o fixador Bouin e a estufa, pois estes, facilitam o

desprendimento do fragmento de pele durante a coloração da lâmina. A coloração pela prata também é trabalhosa e forma corpúsculo esférico escuro no fragmento durante o processamento da amostra.

Fez-se a opção da histometria para enriquecer o trabalho e precisão dos resultados. Não foram encontrados, na literatura consultada, trabalhos com software “Axio Vision 3.0” e nada sobre histologia da pele de neonatos caninos machos e fêmeas.

Mediram-se a espessura de cada fibra em micra (μm). Na derme superficial (derme entre a epiderme e as glândulas sebáceas), foram medidas a espessura de cinco a 23 fibras colágenas em cada sub-área, localizada do lado esquerdo e na parte superior da imagem capturada (área total). A sub-área das fibras colágenas da derme profunda (derme entre as glândulas sebáceas e a hipoderme), localizou-se do lado esquerdo na parte superior da imagem capturada, e sendo medida a espessura de cinco a 24 fibras colágenas por sub-área.

A coloração pela técnica da calleja sem permanganato de potássio foi utilizada para evidenciar as fibras elásticas. A espessura de cada fibra foi medida em micra (μm), sendo medidas de quatro a 19 fibras por campo, na derme do fragmento de pele.

Fez-se a histometria da espessura das fibras reticulares, evidenciadas pela técnica da reticulina, em micra (μm). Foram medidas de três a nove fibras reticulares, na derme profunda. Sendo medida uma fibra reticular de cada folículo piloso no campo especificado.

Na avaliação histológica, observou-se que a pele do neonato tem duas camadas, a epiderme e a derme. A epiderme é constituída da camada germinativa, espinhosa, granulosa e córnea. Estas estruturas também foram observadas por Webb & Calhoun (1954) e Schwarz et al. (1979) na epiderme de cães adultos SRD machos e fêmeas. Panic et al. (1992) evidenciaram as mesmas estruturas na epiderme da *Marmota monax* em neonatos e adultos, pela microscopia

óptica e Kimura & Doi (1994) constataram que a epiderme do neonato calvo (cão mexicano de zero a duas semanas de vida) é espessa.

A derme compõe-se de tecido conjuntivo fibroso, vasos sangüíneos e linfáticos, fibras, nervos, células, glândulas apócrinas e sebáceas, folículos pilosos e músculos piloerectores. Estes componentes foram evidenciados por Fraser (1988), Scott et al. (1996) e Radostits et al. (2002). No presente estudo, tais elementos foram observados nos recém-nascidos durante a leitura microscópica dos fragmentos de pele. Não foi observada na pele dos filhotes uma derme verdadeiramente papilar e reticular como é descrita nos humanos (Ham, 1967; Junqueira & Carneiro, 1999 e Gartner & Hiatt, 1999) e em outras espécies animais (Bhayani & Vyas, 1991 e Banks, 1992), assim se justifica a utilização dos termos dermes superficial e profunda. A pele (epiderme e derme) do neonato e do cão jovem também repousa sobre a camada subcutânea de tecido conjuntivo frouxo corroborando as afirmativas de Muller et al. (1985), Banks, (1992), Scott et al. (1996), Hargis, (1998) e Gartner & Hiatt (1999).

A espessura da epiderme (camada germinativa, espinhosa e granulosa) do dorso direito (DD), dos filhotes de um e 60 dias de idade, variou de 10,09 a 16,41 μm nos filhotes machos e de 9,91 a 23,22 μm nos filhotes fêmeas. Lloyd & Garthwaite (1982) registraram a espessura de 10,1 μm da epiderme viva (camadas germinativa, espinhosa e granulosa) em adultos machos e fêmeas, utilizando cortes criostatos, examinados ao microscópio eletrônico de varredura. Muller et al. (1985) descreveram a espessura de 10,1 μm na mensuração direta da espessura da epiderme viva (camadas germinativa, espinhosa e granulosa). Wilkie et al. (1990) realizaram a morfometria da epiderme de cães adultos, utilizando outro software (MOP II, Carl Zeiss Inc. NY).

A camada córnea da epiderme mostrou-se delgada e queratinizada. Parte desta camada foi perdida durante o processamento, o que, segundo Scott et al. (1996), é um acontecimento comum. A camada granulosa mostrou-se monocelular, e grânulos de querato-hialina

estavam presentes no citoplasma dessas células. Observaram-se ainda pontos escuros na matriz amorfa desta camada. Na camada espinhosa foi observada mais de uma lâmina celular, semelhantes às descrições de Muller et al. (1985), Banks (1992), Scott et al. (1996) e Gartner & Hiatt (1999). A camada germinativa monocelular estava apoiada na membrana basal exibindo algumas células em atividade mitótica. Estes resultados são análogos às observações de Gartner & Hiatt (1999). Estes autores afirmam que as mitoses das células da camada basal ocorrem principalmente à noite e, como a maioria das amostras histológicas é obtida durante o dia, as figuras de mitose raramente são vistas nos cortes histológicos da pele. A presença das figuras de mitose neste estudo foi verificada em 25,45% dos cortes estudados (228 amostras) de um pool de 896 amostras colhidas durante o dia.

A membrana basal que separa a epiderme da derme corou-se adequadamente pelo PAS (Figura 8), o que sugere a presença de polissacarídeos neutros, conforme afirmação de Muller et al. (1985) e Scott et al. (1996). Ham (1967) e Banks (1992) observaram que esta estrutura, além de corar pelo PAS, pode ser facilmente demonstrada pelo método de impregnação pela prata e, em 1954 Webb & Calhoun coraram, com a prata, a membrana basal de 13 cães SRD de machos e fêmeas. A espessura da membrana basal do dorso direito (DD), evidenciada pela morfometria, nos machos, foi de 0,92 a 1,03 μm , e nas fêmeas de 0,74 a 1,19 μm , ambos com um e 60 dias de idade. Banks (1992), utilizando o microscópio eletrônico, determinou a espessura da membrana basal entre 0,05 a 0,07 μm . Esta desigualdade de valores pode ser atribuída à diferença na metodologia de obtenção da medida.

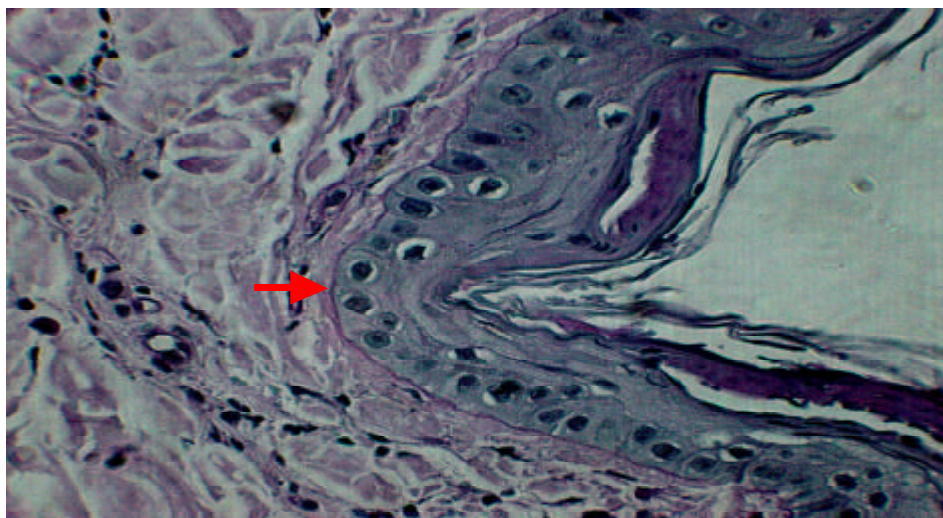


Figura 8 – Membrana basal (seta) entre a epiderme e a derme. PAS 400x

Os cortes transversais do folículo piloso observados na pele de 100% dos recém-nascidos mostraram várias unidades foliculares pilosas, algumas unidades múltiplas de folículos pilosos e complexos apopilossebáceos. Durante o processo de crescimento dos filhotes ocorreram diminuição gradativa destas unidades foliculares pilosas e aumento quantitativo das unidades múltiplas de folículos pilosos e complexo apopilossebáceos (Figura 9 e 10). Tais achados estão em concordância com as observações feitas por Muller et al. (1985) e Scott et al. (1996).

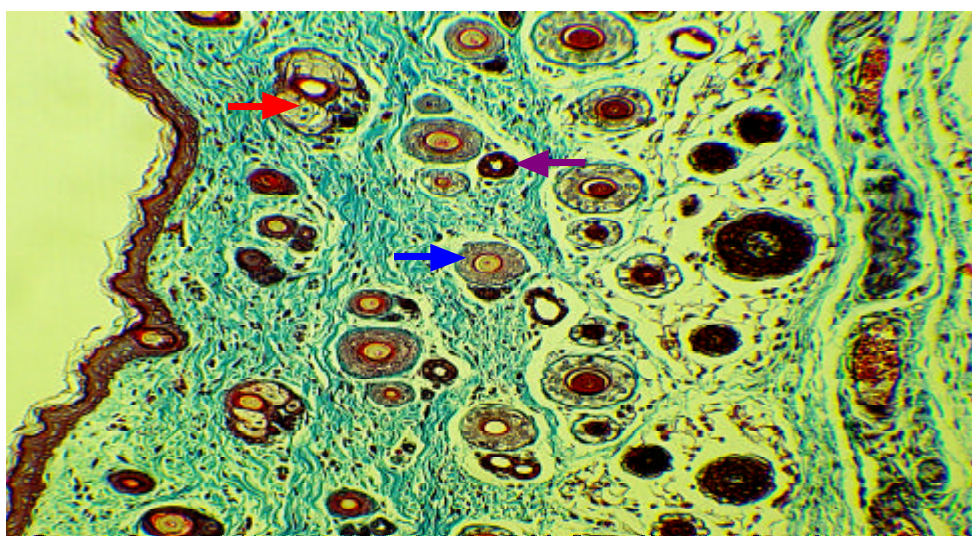


Figura 9 – Fotomicrografia dos folículos pilosos (seta azul), Glândulas sebáceas (seta vermelha) e apócrinas (seta lilás) da derme do cão neonato com um dia de vida. Tricrômico de Masson 125x

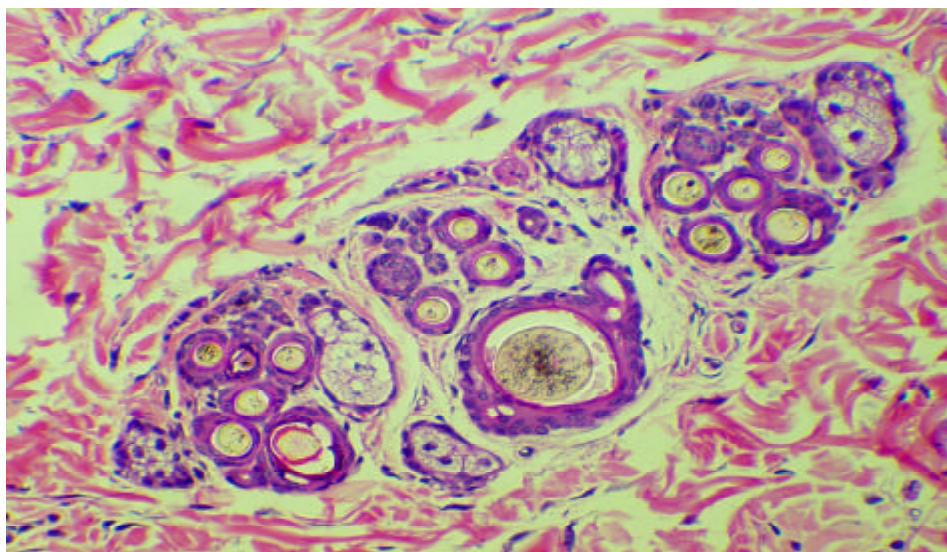


Figura 10 – Fotomicrografia de três complexos apopilossebáceos da derme superficial do cão filhote com 70 dias de idade. HE 250x

No corte longitudinal dos folículos pilosos dos recém-nascidos (antes de completarem 24 horas de vida), verificou-se a presença de um pêlo em cada folículo piloso. Aos 10 dias de vida, possuíam dois pêlos emergindo na abertura folicular comum. Com a maturidade dos animais, os pêlos foram arranjados em grupos de dois, três e quatro, havendo predominância dos dois últimos grupos aos 60 dias de vida (Figuras 11 e 12). Estas observações são semelhantes às citadas por Lovell & Getty (1957), mas diferentes das de Muller et al. (1985), que observaram mais de um pêlo em cada folículo somente em animais com dez semanas de vida.

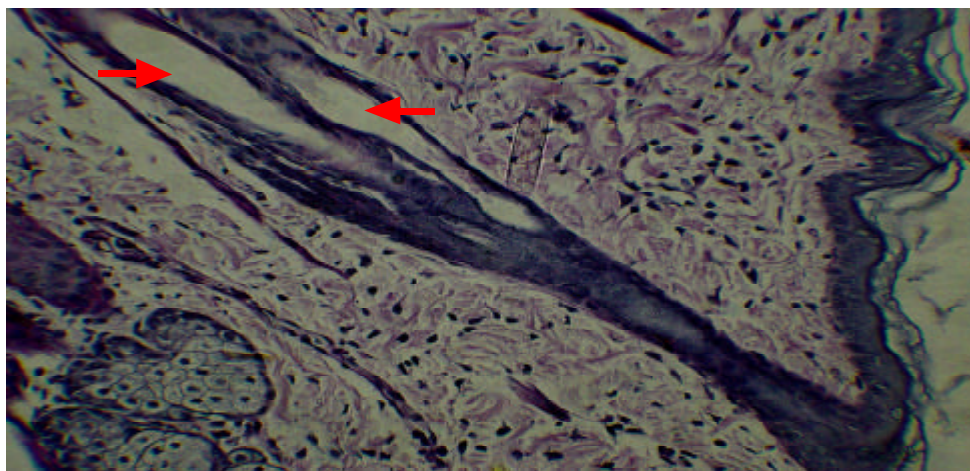


Figura 11 – Fotomicrografia de dois folículos pilosos (setas) emergindo em uma abertura comum do cão filhote com 10 dias de idade. PAS 400x

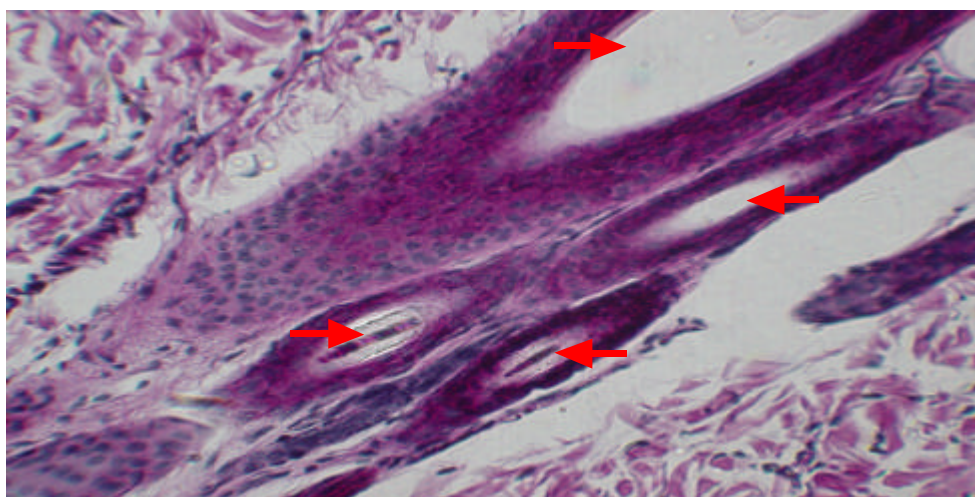


Figura 12 – Fotomicrografia de quatro folículos pilosos (setas) emergindo em uma abertura comum do cão filhote com 60 dias de idade. PAS 400x

Os folículos pilosos, seccionados na altura dos ductos das glândulas sebáceas ou acima destes, reagiram pouco ao PAS. Mas, os folículos pilosos seccionados abaixo dos ductos das glândulas sebáceas, as glândulas apócrinas, os músculos eretores dos pêlos, os vasos e a membrana basal, tiveram reação bem evidente ao PAS (Figura 13 e 14), o que também sugere a presença de glicogênio no citoplasma destas células. Esta coloração e a presença de polissacarídeos neutros nestas estruturas foram citadas por Ham (1967), Muller et al. (1985), Banks (1992), Scott et al. (1996), Gross et al. (1997), Junqueira & Carneiro (1999) e Gartner & Hiatt (1999).

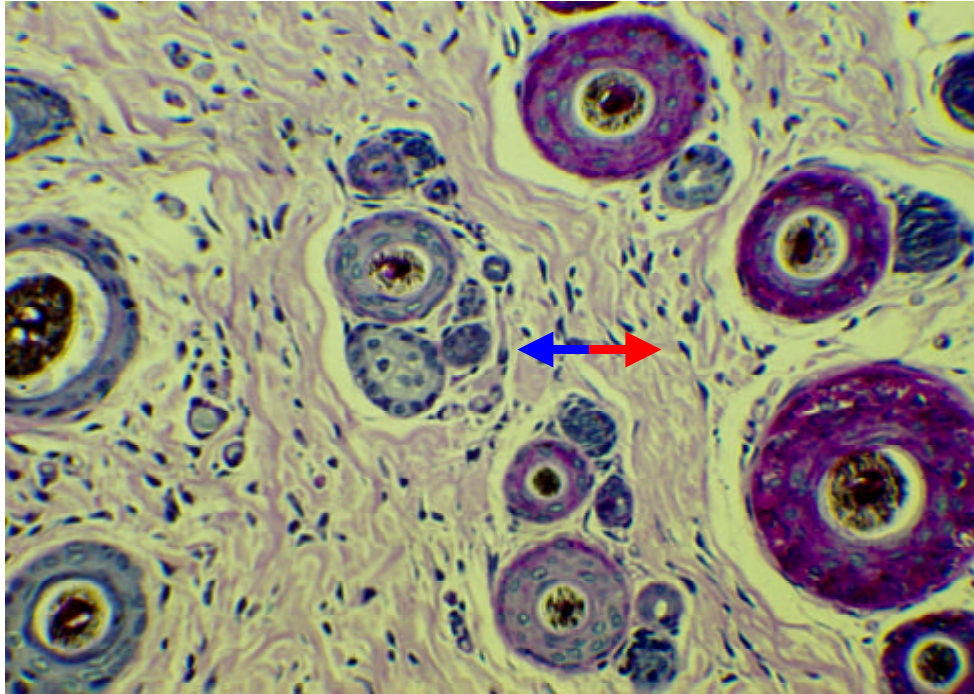


Figura 13 – Fotomicrografia dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e apócrinas do cão neonato de um dia de vida. Derme superficial (seta azul) coloração pouco evidente e derme profunda (seta vermelha) coloração bem evidente devido a presença de glicogênio nestas células. PAS 25Xlas

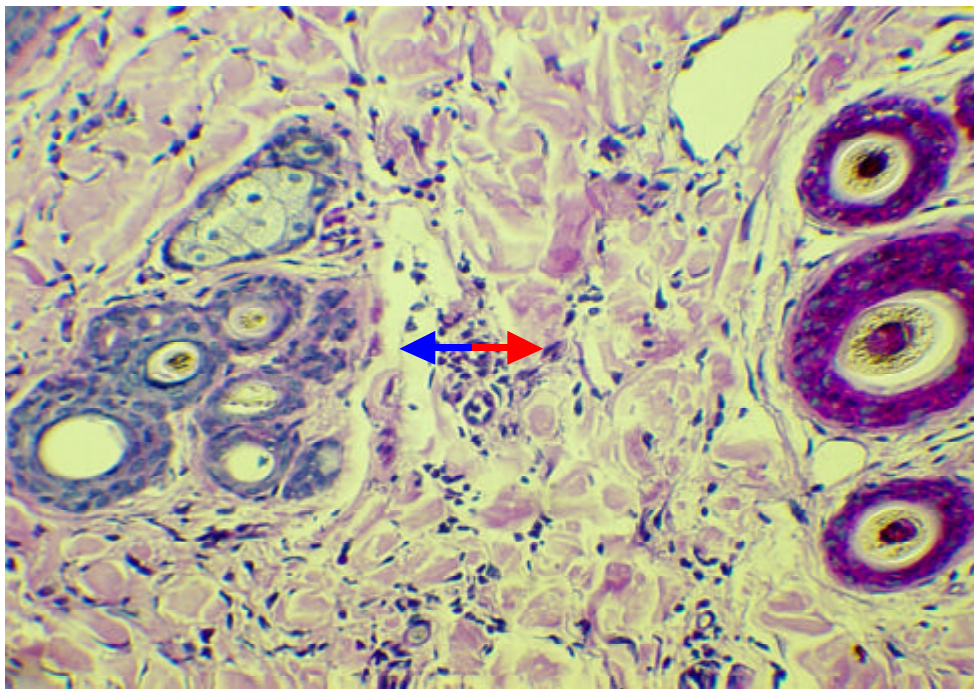


Figura 14 – Fotomicrografia dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e apócrinas do cão filhote de 70 dias de idade. Derme superficial (seta azul) coloração pouco evidente e derme profunda (seta vermelha) coloração bem evidente, devido a presença de glicogênio nestas células. PAS 250X

As fibras colágenas, nos recém-nascidos, são finas onduladas, sem ramificações, frouxamente arranjadas, distribuídas de forma irregular e em pouca quantidade. Nas biópsias dos animais, com idade avançada, observaram-se aumento gradativo da quantidade e espessamento das fibras (Figura 15 e 16), corroborando as observações de Banks (1992), Scott et al. (1996), Junqueira & Carneiro (1999), Bacha Jr. & Bacha (2000). Quando compararam-se os animais com 70 dias de idade com os neonatos, perceberam-se que nos últimos as fibras eram mais finas e esparsas. Estas afirmações são comprovadas pela morfometria da espessura das fibras colágenas da derme superficial (ds) e derme profunda (dp), do dorso direito, que variou de 1,95 a 9,64 μm para ds e 1,55 a 12,05 μm para dp dos filhotes machos e, 2,29 a 11,72 μm para ds e 2,18 a 10,15 μm para dp dos filhotes fêmeas, ambos com um e 60 dias de idade respectivamente. Banks (1992) afirmou que o diâmetro dos feixes desordenados das fibras colágenas é de 1 a 12 μm , valores muito próximos dos encontrados neste estudo. Entretanto, o autor não citou a idade nem o sexo dos animais.

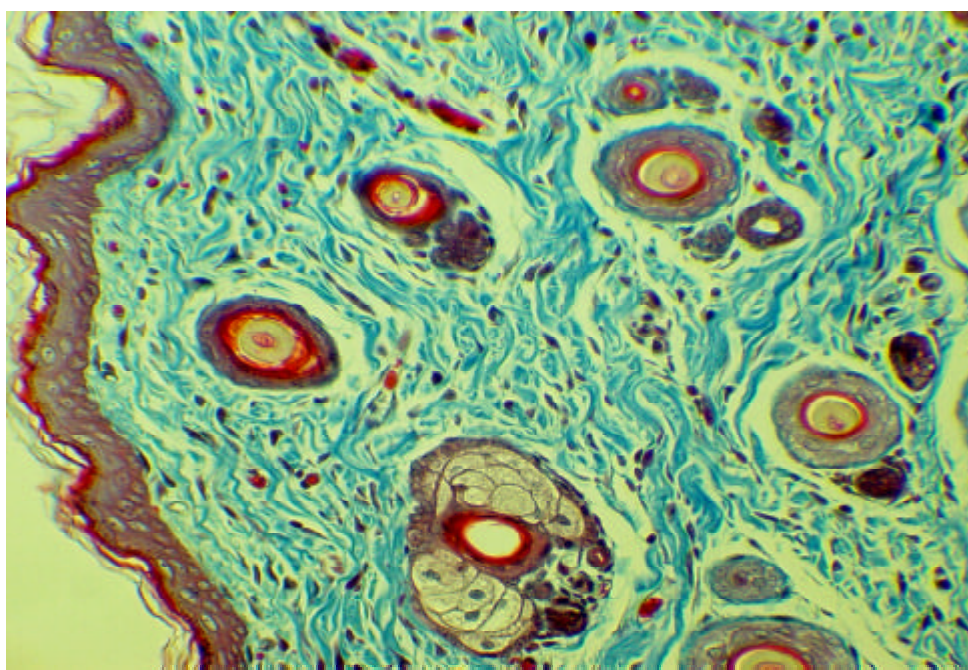


Figura 15 – Fotomicrografia das fibras colágenas (cor azul) do cão neonato de um dia de vida. Tricrômico de Masson 250x

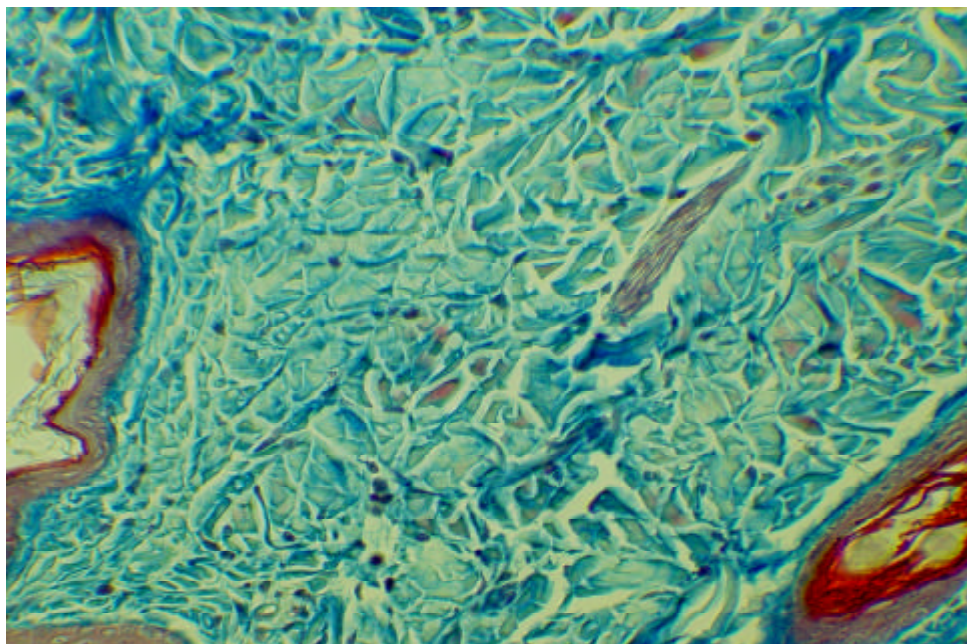


Figura 16 – Fotomicrografia das fibras colágenas (cor azul) do cão filhote de 70 dias de idade. Tricrômico de Masson 250x

As fibras elásticas, dos recém-nascidos, apresentaram-se finas, e foram se espessando com o envelhecimento dos animais. Em toda derme, foram observadas fibras ramificadas, fragmentadas como filamentos na vista longitudinal, com aspecto ondulado em formato de sacarrolhas ou pontos descontínuos na vista transversal. Estes achados foram semelhantes aos citados por Junqueira & Carneiro (1999) mas diferiram dos mencionados por Scott et al. (1996), que descreveram as fibras elásticas sem ramificações. As fibras elásticas estavam sempre envolvendo os folículos pilosos e foram observadas em maior número nestes locais do que em outras partes da derme. A coloração de calleja sem permanganato de potássio permitiu a visualização nítida destas fibras (Figura 17 e 18). Frank et al. (1996) observaram que as fibras elásticas de cão adulto, macho e fêmea, são finas na derme superficial e grossas na derme profunda, e estes achados foram semelhantes aos observados no presente estudo.

A morfometria das fibras elásticas do dorso direito, dos filhotes machos variou de 0,73 a 4,19 μm , e nos filhotes fêmeas de 0,72 a

4,33 μm , ambos com um e 60 dias de idade respectivamente, indicando um aumento progressivo da espessura destas fibras.

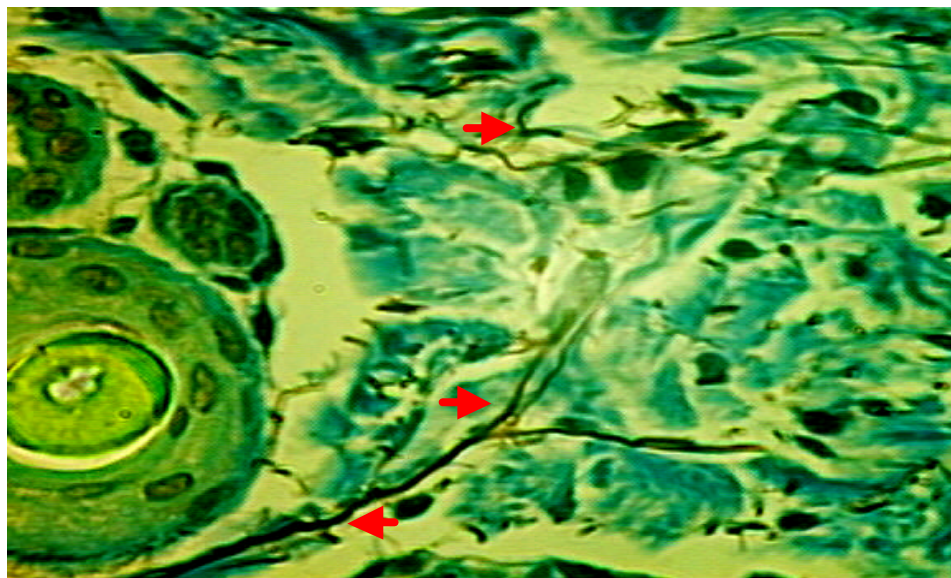


Figura 17 – Fotomicrografia das fibras elásticas (setas) da derme do cão neonato de um dia de vida. Calleja sem permanganato de potássio 400x

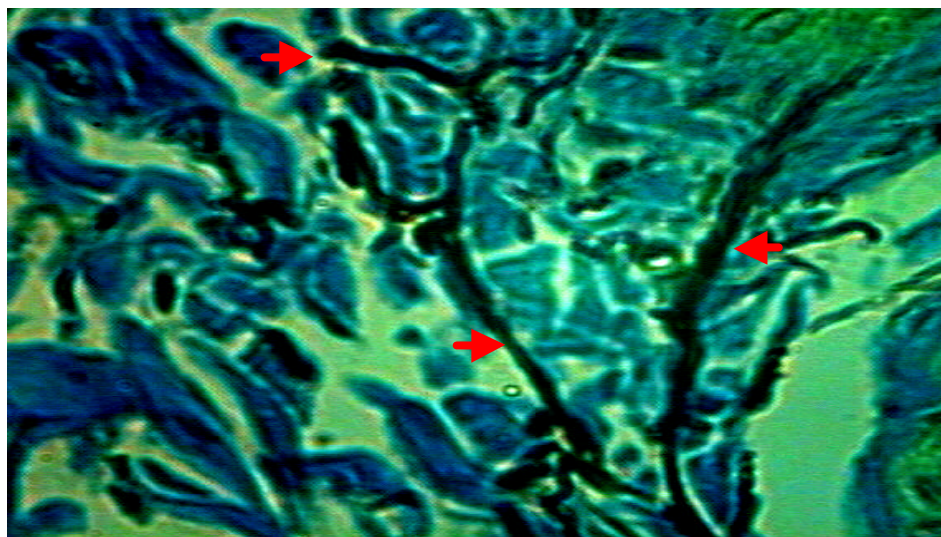


Figura 18 – Fotomicrografia das fibras elásticas (setas) da derme do cão filhote com 70 dias de idade. Calleja sem permanganato de potássio 400x

As fibras reticulares mostraram-se finas, ramificadas e estão associadas às membranas basais e adjacentes às glândulas sebáceas e apócrinas, e aos vasos e formam uma trama delicada em volta dos músculos eretores dos pêlos. A escolha da prata para coloração,

conforme sugerido por Banks (1992), Scott et al. (1996) e Junqueira & Carneiro (1999), fundamentou-se na afinidade deste corante pelas fibras reticulares. Tal propriedade produz uma imagem nítida da estrutura observada ao microscópio óptico (Figura 19 e 20), sendo também mencionada por Montes et al. (1980). A histometria evidenciou o espessamento das fibras reticulares do dorso direito à medida que a idade dos filhotes aumentava. A espessura nos machos foi de 1,45 a 1,98 μm , e nas fêmeas de 1,01 a 1,98 μm , ambos com um e 60 dias de idade.

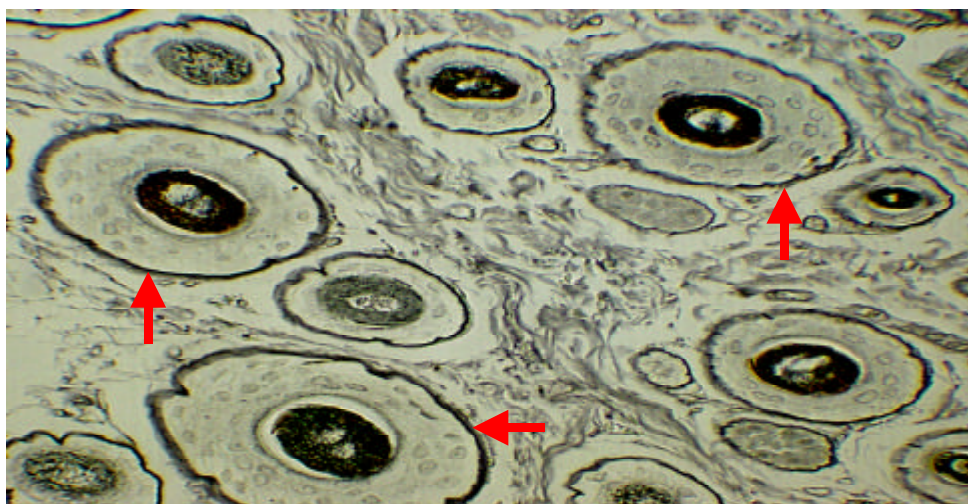


Figura 19 – Fotomicrografia das fibras reticulares (setas) da derme profunda do cão neonato com um dia de vida. Reticulina 250x

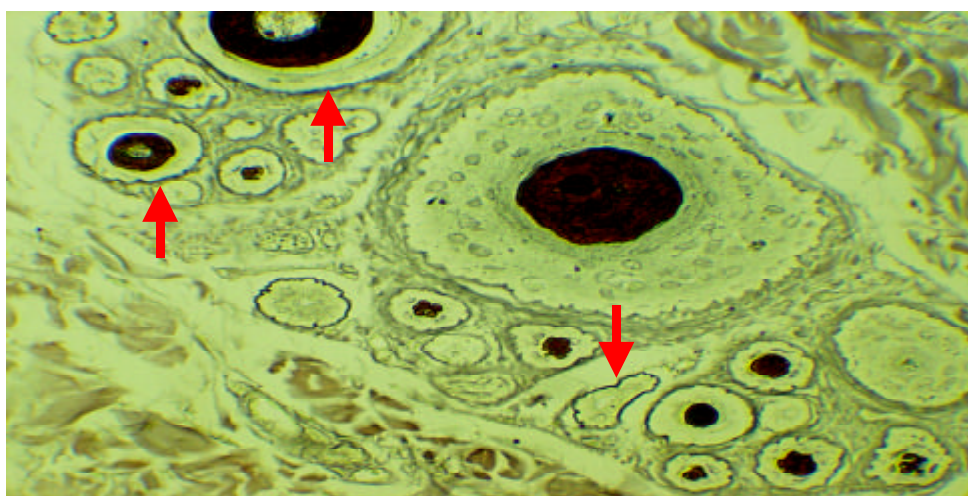


Figura 20 – Fotomicrografia das fibras reticulares (setas) da derme profunda do cão filhote com 70 dias de idade. Reticulina 250x

No presente trabalho, verificou-se a presença de mastócitos em toda derme, principalmente em volta dos vasos sangüíneos (Figura 21 e 22), conforme também observada por Emerson & Cross (1965), Figueiredo (1979), Jain (1993), Pinto (1993), Scott et al. (1996), Gartner & Hiatt (1999) e Bacha Jr. & Bacha (2000). Os mastócitos, corados pelo vermelho congo-azul de toluidina acidificada, apresentaram-se como células arredondadas ou ovais, com citoplasma de cor púrpura e grânulos grandes metacromáticos, núcleo central arredondado ou oval de cor escura. Estes achados também foram visualizados por Tarpley et al. (1984). Na primeira biópsia dos recém-nascidos (menos de um dia de vida), foram observados por campo, na derme do dorso direito, de um a 21 mastócitos nos filhotes machos e de um a 19 mastócitos nos filhotes fêmeas. Nas biópsias dos animais com 70 dias de vida, observaram-se de um a 15 mastócitos nos filhotes machos e de dois a 16 mastócitos nos filhotes fêmeas. Estes dados diferiram daqueles citados por Muller et al. (1985), que encontraram 4 a 12 mastócitos por campo, de grande aumento, em cães, embora os autores não tenham especificada a idade nem o sexo do animal. Resultados diferentes foram relatados por Welle et al. (1999) que detectaram densidade média de 31,2 mastócitos/mm² na derme de 13 cães saudáveis. Banks (1992) afirmou que os mastócitos são frágeis, rompem facilmente e os grânulos raramente são preservados. No presente trabalho não foram evidenciados, em todas as amostras, o rompimento da membrana dos mastócitos e a não preservação dos grânulos, durante a realização das técnicas de preparações histológicas. Constataram-se grandes concentrações de mastócitos nos fragmentos de pele, fato também observado por Silveira (1988). A localização dos mastócitos, no presente experimento, foi semelhante à registrada por Lavielle et al. (1985), apesar destes autores terem trabalhado com bovino. Scott (1990) descreveu a presença de mastócitos na epiderme e na bainha folicular externa de gatos. No presente trabalho, constatou-se a existência de mastócitos na papila dérmica do folículo piloso (Figura 23 e

24) em 1,79%, das lâminas (16 amostras) coradas pelo vermelho congo-azul de toluidina acidificada. Os mastócitos concentram-se no ápice da papila dérmica, e esta observação foi possível, pelo fato de trabalhar com 896 amostras nesta coloração. Não foi encontrado nenhum trabalho com esta citação na literatura consultada. Paus et al. (1994) e Maurer et al. (1995) sugerem que os produtos secretórios dos mastócitos estimulam o crescimento do pêlo em Murine, e afirmam que há necessidade de estudar e analisar o potencial dos mastócitos na regulação do crescimento do pêlo, porque pouco se sabe da sua função fisiológica. Estes autores constataram a presença dos mastócitos em volta dos folículos pilosos. Em decorrência destas afirmações, provavelmente os mastócitos na papila dérmica do folículo piloso estão envolvidos na regulação do crescimento do pêlo.

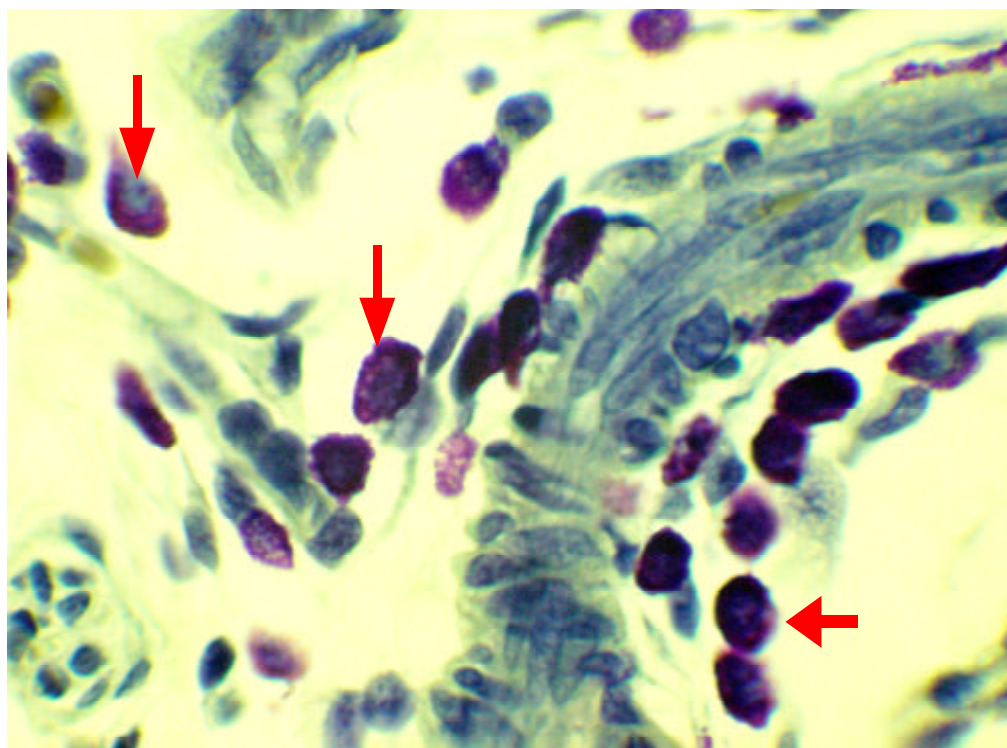


Figura 21 – Fotomicrografia dos mastócitos (setas) na derme do cão neonato de um dia de vida. Vermelho do congo-azul de toluidina acidificada 125x



Figura 22 – Fotomicrografia dos mastócitos (setas) em volta do vaso sangüíneo do cão filhote com 30 dias de idade. Vermelho congo-azul de toluidina acidificada 1000x

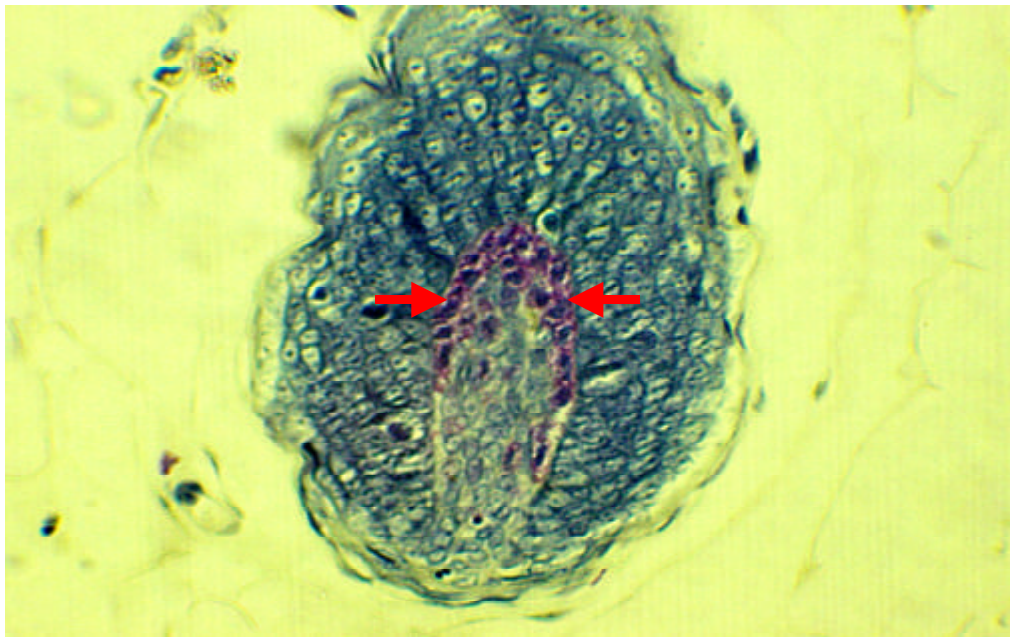


Figura 23 – Fotomicrografia dos mastócitos na papila dérmica do folículo piloso (setas) do cão neonato de 30 dias de vida. Vermelho congo-azul de toluidina acidificada 250x



Figura 24 – Fotomicrografia dos mastócitos na pila dérmica (setas) do folículo piloso do cão neonato de 30 dias de vida. Vermelho congo-azul de toluidina acidificada 1000x

Mesmo não havendo distribuição uniforme dos eosinófilos na derme, foi possível realizar sua quantificação. Os eosinófilos foram corados pelos HE e vermelho congo-azul de toluidina acidificada. Sendo encontrados 135 eosinófilos em 13,39% dos fragmentos (60 amostras de um pool de 448) dos filhotes machos e 98 eosinófilos em 10,49% dos fragmentos (47 amostras de um pool de 448) dos filhotes fêmeas, ambos corados pelo HE. Pela coloração especial, foram encontrados 13 eosinófilos em 2,68% dos fragmentos (12 amostras de um pool de 448) dos filhotes machos e 47 eosinófilos em 4,91% dos fragmentos (22 amostras de um pool de 448) dos filhotes fêmeas de um a 70 dias de idade. Os eosinófilos, corados pelo HE, mostraram-se como células pequenas, de citoplasma rosa, com grânulos escuros, núcleo preto e bilobulado, conforme também demonstrados por Gartner & Hiatt (1999) e Bacha Jr. & Bacha (2000). Os corados pelo vermelho congo-azul de toluidina acidifica apresentaram-se como células grandes, de citoplasma marron claro, com grânulos grandes de cor marron escuro e núcleo azul

escuro em forma de ferradura. Tais achados foram diferentes dos encontrados por Tarpley et al. (1984). Estes autores trabalharam com amostras de intestino de eqüino, e os eosinófilos foram corados de amarelo-laranja e os grânulos de cor amarelo-laranja e laranja brilhante. Ham (1967), Silveira (1988), Wilkie et al. (1990), Banks (1992), asseveram que a eosinofilia ocorre nos fenômenos alérgicos, anafiláticos e de hipersensibilidade. Esta afirmativa explica a pouca quantidade de eosinófilos encontrada na pele dos filhotes no presente estudo, e por que estes estavam clinicamente saudáveis e com parasitose controlada. Este controle foi realizado com vermífugo, carrapaticida e manejo adequado.

5.4. Análise dos parâmetros obtidos na histometria

Os valores da espessura da epiderme (camada granulosa, espinhosa e germinativa), da membrana basal da epiderme, das fibras colágenas da derme superficial (ds) e derme profunda (dp), das fibras elásticas da derme, das fibras reticulares da derme profunda do dorso direito 1 (DD₁), dos machos (M) e fêmeas (F) de um, 20, 40 e 60 dias de idade, observados na histometria, estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Médias e desvio-padrão (D. padrão) obtidos pela histometria em micra (μm) da espessura da epiderme (camada granulosa, espinhosa e germinativa), da membrana basal da epiderme, das fibras reticulares da derme profunda, das fibras elásticas da derme, das fibras colágenas da derme superficial (ds) e derme profunda (dp) do dorso direito 1 (DD₁), dos machos (M) e fêmeas (F) de um, 20, 40 e 60 dias de idade

Componentes Histológicos da pele	Estatística	Dia 1		Dia 20		Dia 40		Dia 60	
		M	F	M	F	M	F	M	F
Epiderme	Média	15,04	14,24	13,61	14,32	14,93	14,10	14,13	14,59
	D. padrão	2,85	2,22	2,38	5,21	2,50	2,44	1,39	3,45
Membrana basal	Média	0,98	0,95	0,97	0,96	1,00	0,97	0,99	0,99
	D. padrão	0,05	0,07	0,04	0,05	0,03	0,03	0,05	0,07
Fibras reticulares dp	Média	1,64	1,67	1,73	1,59	1,75	1,64	1,86	1,65
	D. padrão	0,15	0,25	0,14	0,25	0,10	0,23	0,11	0,30
Fibras elásticas da derme	Média	0,97	1,08	1,33	1,34	2,25	1,98	3,03	2,58
	D. padrão	0,19	0,35	0,23	0,33	0,52	0,60	0,54	0,69
Fibras colágenas ds	Média	2,75	3,11	4,18	4,51	6,39	2,54	7,22	7,76
	D. padrão	0,55	0,48	0,77	1,24	1,89	0,67	1,16	1,59
Fibras colágenas dp	Média	3,73	3,31	6,38	4,91	8,33	6,83	9,17	7,95
	D. padrão	1,22	0,76	1,67	0,99	2,14	1,91	1,62	1,17

As médias mostradas na tabela 1 foram utilizadas para a confecção das figuras de número 25 até 30 e tabelas 2 até 7.

Os dados da tabela 2 mostraram que, idade, sexo e a interação entre estes, assim como, a influência de animais dentro do mesmo sexo não apresentaram significância ($p > 0,05$), para a espessura da epiderme (camada granulosa, espinhosa e germinativa) do dorso direito 1 (DD₁) dos animais machos (M) e fêmeas (F) de um, 20, 40 e 60 dias de idade. Embora não tenha significância estatística, observou-se que, os machos apresentaram maior variação no período analisado, conforme mostra a figura 25.

Tabela 2 – Valores em micra, da espessura da epiderme do dorso direito 1 (DD₁) de machos (M) e fêmeas (F) de um, 20, 40 e 60 dias de idade

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr < F
Sexo	1	0,368	0,368	0,03	0,8601
Idade	3	7,232	2,411	0,30	0,8272
Linear de idade	1	0,114	0,114	0,01	0,9060
Quadrat. de idade	1	1,919	1,919	0,24	0,6279
Idade * sexo	3	13,964	4,655	0,57	0,6336
Animal / sexo	26	301,799	11,608	1,43	0,1150
Erro	78	632,238	8,106		
Correção total	111	955,602			

$p > 0,05$ não significativo

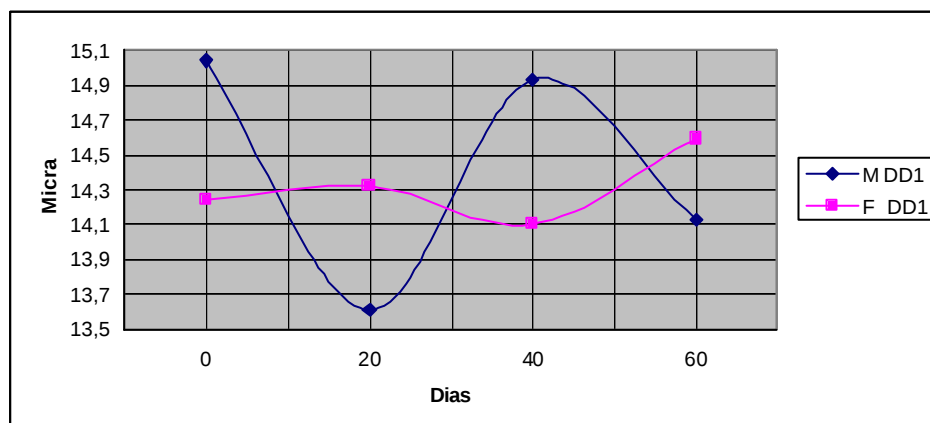


Figura 25 – Médias por sexo, expressas em micra, da espessura da epiderme do dorso direito 1 (DD₁) dos animais de um, 20, 40 e 60 dias

Quanto a espessura da epiderme, os machos apresentaram maior variação no período analisado, e as fêmeas espessamento linear até os 60 dias de idade.

Analisando a Tabela 3, verificou-se diferença significativa somente para o efeito linear de idade ($p < 0,05$), referente à espessura da membrana basal da epiderme do dorso direito 1 (DD₁). Embora os machos tenham apresentado uma maior variabilidade, verificou-se que nos machos e fêmeas houve o espessamento da membrana basal do nascimento até os 60 dias de idade, o que pode ser visualizado na figura 26.

Tabela 3 – Valores em micra, da espessura da membrana basal da epiderme do dorso direito 1 (DD₁), de machos (M) e fêmeas (F) de um, 20, 40 e 60 dias de idade

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Sexo	1	0,007	0,007	3,13	0,0885
Idade	3	0,012	0,004	1,44	0,2381
Linear de idade	1	0,012	0,012	4,24	0,0428*
Quadrat de idade	1	0,000	0,000	0,02	0,8859
Idade * sexo	3	0,006	0,002	0,70	0,5557
Animal / sexo	26	0,055	0,002	0,76	0,7770
Erro	78	0,215	0,003		
Correção total	111	0,294			

*p < 0,05 diferença significativa

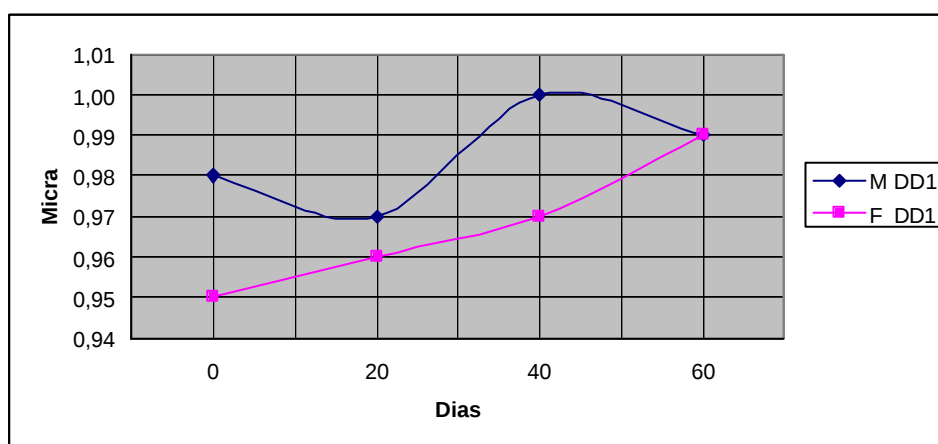


Figura 26 – Médias por sexo, expressas em micra, da espessura da membrana basal da epiderme do dorso direito 1 (DD₁) dos animais de um, 20, 40 e 60 dias

Houve espessamento da membrana basal da epiderme nos machos e fêmeas desde o nascimento até os 60 dias de idade, mas, os machos apresentaram maior variabilidade na espessura.

A espessura das fibras colágenas da derme superficial, em função da idade, linear de idade e a interação sexo-idade, mostrou diferença significativa. Também houve diferença significativa entre sexo, quadrático de idade e animais dentro do mesmo sexo (Tabela 4). Nos animais machos, as fibras têm espessamento linear com relação ao tempo e espessura. Nas fêmeas, no início há espessamento das fibras, seguido de declínio e posterior espessamento acelerado, conforme mostra a figura 27.

Tabela 4 – Valores em micra, da espessura das fibras colágenas da derme superficial do dorso direito 1 (DD₁) de machos (M) e fêmeas (F) de um, 20, 40 e 60 dias de idade

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Sexo	1	12,072	12,072	6,45	0,0174*
Idade	3	309,912	103,304	90,72	< 0,0001**
Linear de idade	1	267,210	267,210	234,66	< 0,0001**
Quadrat. de idade	1	17,960	17,960	15,77	0,0002*
Idade * sexo	3	95,516	31,839	27,96	< 0,0001**
Animal / sexo	26	48,689	1,873	1,64	0,0486*
Erro	78	88,819	1,139		
Correção total	111	555,008			

*p < 0,05 diferença significativa

**p < 0,01 diferença altamente significativa

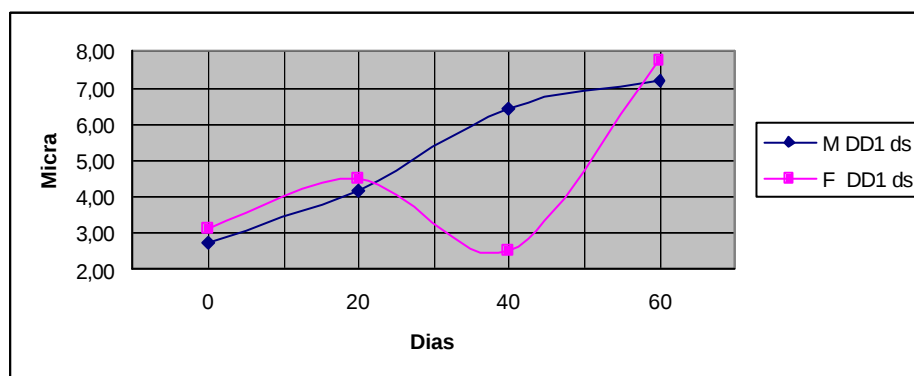


Figura 27 – Médias por sexo, expressas em micra, da espessura das fibras colágenas da derme superficial (ds) do dorso direito 1 (DD₁) dos animais de um, 20, 40 e 60 dias

Nas fêmeas, no início, houve espessamento das fibras, seguido de declínio e posterior espessamento acelerado. Nos animais machos, as fibras têm espessamento linear com relação ao tempo e espessura.

O efeito da idade, linear de idade, sexo, quadrático de idade, interação sexo-idade e animal dentro do mesmo sexo, foi significativo, para a espessura das fibras colágenas da derme profunda (Tabela 5). Observa-se na figura 28, que a espessura das fibras, tanto nos machos como nas fêmeas possuem crescimento semelhante, com os valores médios nos machos, um pouco maior do que nas fêmeas. Há tendência de espessamento destas fibras com o amadurecimento dos animais.

Tabela 5 –Valores em micra, da espessura das fibras colágenas da derme profunda (dp) do dorso direito 1 (DD₁), de machos (M) e fêmeas (F) de um, 20, 40 e 60 dias de idade

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Sexo	1	36,996	36,996	10,17	0,0037*
Idade	3	417,841	139,280	77,55	< 0,0001**
Linear de idade	1	407,854	407,854	227,10	< 0,0001**
Quadrat. de idade	1	9,183	9,183	5,11	0,0265*
Idade * sexo	3	5,365	1,788	1,00	0,3994
Animal / sexo	26	94,537	3,636	2,02	0,0091*
Erro	78	140,081	1,796		
Correção total	111	694,820			

*p < 0,05 diferença significativa

**p < 0,01 diferença altamente significativa

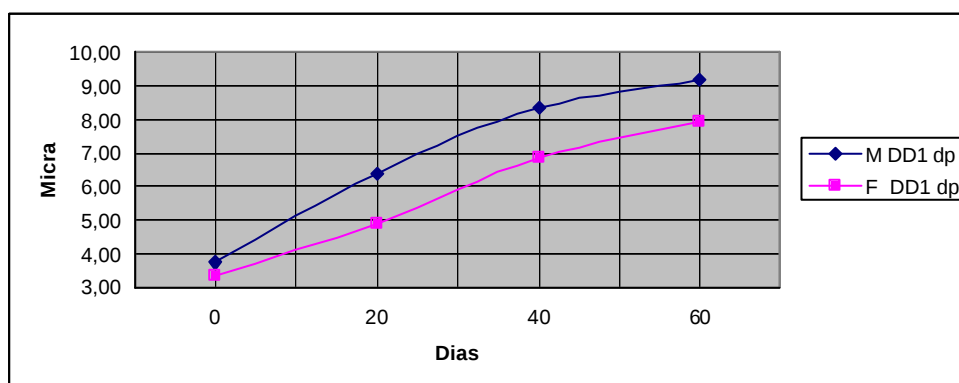


Figura 28 – Médias por sexo, expressas em micra, da espessura das fibras colágenas da derme profunda (dp) do dorso direito 1 (DD₁) dos animais de um, 20, 40 e 60 dias

Tanto nos machos quanto nas fêmeas as fibras possuem crescimento semelhante, e tem tendência de espessar-se com a maturidade dos animais.

Os dados obtidos pela análise de variância (Tabela 6), permitiram verificar a diferença significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) dos efeitos de idade, linear de idade, quadrático de idade, interação sexo-idade e animal dentro do mesmo sexo, para a espessura das fibras elásticas da derme. Ficaram comprovados, que as fibras tanto de macho quanto de fêmea, no decorrer do tempo, apresentaram o mesmo comportamento. Neste caso, até aos 20 dias de vida, a espessura das fibras, nas fêmeas, foi ligeiramente maior que a dos machos. Após aos 20 dias de vida, a espessura das fibras elásticas da derme dos animais machos, foi maior que a das fêmeas (Figura 29).

Tabela 6 –Valores em micra, da espessura das fibras elásticas da derme do dorso direito 1 (DD₁), de machos (M) e fêmeas (F) de um, 20, 40 e 60 dias de idade

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Sexo	1	0,633	0,633	1,80	0,1912
Idade	3	53,823	17,941	106,20	<0,0001**
Linear de idade	1	52,363	52,363	309,95	<0,0001**
Quadrat. de idade	1	1,041	1,041	6,16	0,0152*
Idade * sexo	3	1,403	0,468	2,77	0,0472*
Animal / sexo	26	9,139	0,352	2,08	0,0071*
Erro	78	13,177	0,169		
Correção total	111	78,176			

*p < 0,05 diferença significativa

**p < 0,01 diferença altamente significativa

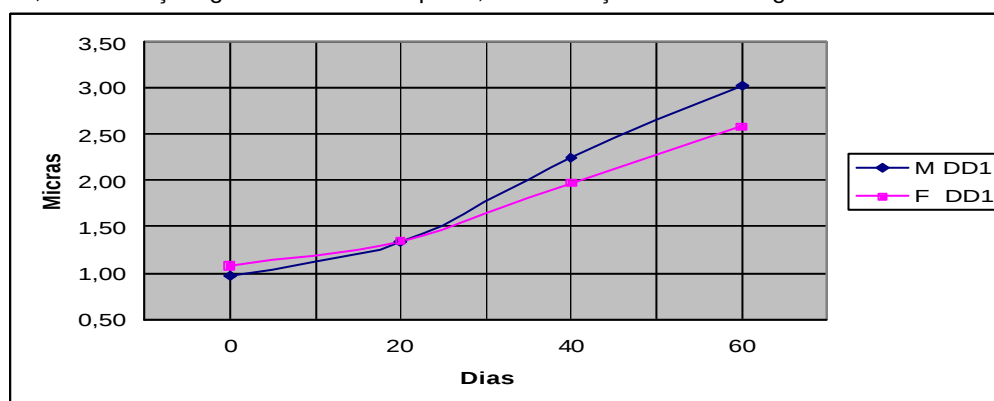


Figura 29 – Médias por sexo, expressas em micra, da espessura das fibras elásticas da derme do dorso direito 1 (DD₁) dos animais de um, 20, 40 e 60 dias

Houve espessamento linear das fibras, tanto nos machos quanto nas fêmeas, no decorrer do tempo.

No estudo da espessura das fibras reticulares da derme profunda, verificaram-se que somente os efeitos linear de idade e a interação idade e sexo e animal dentro do mesmo sexo foram significativos (Tabela 7). Observou-se que os machos apresentaram um espessamento maior das fibras ao longo do período de avaliação, enquanto que as fêmeas apresentaram uma evidência de constância quanto à espessura das mesmas (Figura 30).

Tabela 7 – Valores em micra, da espessura das fibras reticulares da derme profunda do dorso direito 1 (DD₁), de machos (M) e fêmeas (F) de um, 20, 40 e 60 dias de idade

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Sexo	1	0,311	0,311	3,32	0,0802
Idade	3	0,170	0,057	2,52	0,0644
Linear de idade	1	0,153	0,153	6,79	0,0110*
Quadrat de idade	1	0,017	0,017	0,75	0,3878
Idade *sexo	3	0,229	0,076	3,39	0,0221*
Animal / sexo	26	2,437	0,094	4,16	< 0,0001**
Erro	78	1,759	0,023		
Correção total	111	4,906			

*p < 0,05 diferença significativa

**p < 0,01 altamente significativo

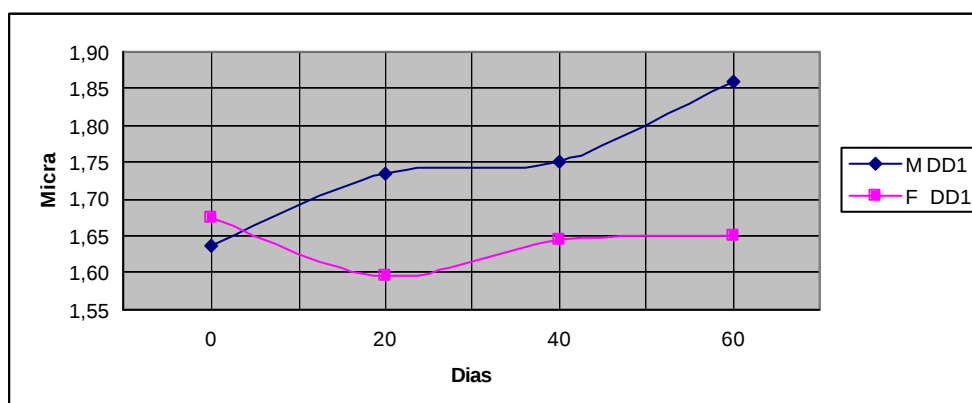


Figura 30 – Médias por sexo, expressas em micra, da espessura das fibras reticulares da derme profunda do dorso direito 1 (DD₁) dos animais de um, 20, 40 e 60 dias

Os machos apresentaram um espessamento maior das fibras do nascimento até os 60 dias, e as fêmeas mostraram evidência de constância quanto à espessura das mesmas.

Os valores obtidos na avaliação histométrica da espessura da epiderme (camadas granulosa, espinhosa e germinativa), da membrana basal, das fibras reticulares da derme profunda, das fibras elásticas da derme, das fibras colágenas da derme superficial (ds) e derme profunda (dp), na pele do dorso e do ventre dos cães aos 60 dias de idade, estão detalhados na tabela 8.

Tabela 8 – Médias e desvio-padrão obtidos pela histometria em micra (μm), da espessura da epiderme (camadas granulosa, espinhosa e germinativa), da membrana basal da epiderme, das fibras reticulares da derme profunda, das fibras elásticas da derme, das fibras colágenas da derme superficial (ds) e da derme profunda (dp), do dorso direito 1 (DD₁) e ventre direito 1 (VD₁), de machos (M) e fêmeas (F) de 60 dias de idade

Componentes histológicos da pele	Estatística	Dias 60			
		Macho		Fêmea	
		DD ₁	VD ₁	DD ₁	VD ₁
Epiderme	Média	14,13	14,29	14,59	13,39
	Desvio-padrão	1,39	2,13	3,45	1,54
Membrana basal	Média	0,99	1,04	0,99	1,00
	Desvio-padrão	0,05	0,05	0,07	0,12
Fibras reticulares da dp	Média	1,86	1,92	1,65	1,86
	Desvio-padrão	0,11	0,27	0,30	0,16
Fibras elásticas da derme	Média	3,03	1,96	2,58	2,18
	Desvio-padrão	0,54	0,22	0,69	0,41
Fibras colágenas da ds	Média	7,22	9,33	7,76	8,26
	Desvio-padrão	1,16	1,72	1,59	2,03
Fibras colágenas da dp	Média	9,17	9,18	7,95	9,54
	Desvio-padrão	1,62	1,43	1,17	1,66

Observando a espessura da epiderme (camadas granulosa, espinhosa e germinativa), da membrana basal das fibras colágenas da derme superficial e derme profunda, dos fragmentos provenientes do dorso direito 1 (DD₁) e do ventre direito 1 (VD₁), dos animais machos e fêmeas de 60 dias de idade, verificou-se que não houve diferença significativa para os dados obtidos na análise de variância. (Tabelas 9,10,11 e 12).

Tabela 9 – Valores em micra, da espessura da epiderme (camadas granulosa, espinhosa e germinativa) do dorso direito 1 (DD₁) e ventre direito 1 (VD₁), de machos (M) e fêmeas (F) de 60 dias de idade

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Sexo	1	0,667	0,667	0,11	0,7408
Local	1	3,770	3,770	0,82	0,3744
Local * sexo	1	6,480	6,480	1,40	0,2468
Animal / sexo	26	155,083	5,965	1,29	0,2590
Erro	26	120,011	4,616		
Correção total	55	286,011			

p > 0,05 não significativo

Tabela 10 – Valores em micra, da espessura da membrana basal da epiderme do dorso direito 1 (DD₁) e ventre direito 1 (VD₁), de machos (M) e fêmeas (F) de 60 dias de idade

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Sexo	1	0,004	0,004	0,57	0,4562
Local	1	0,009	0,009	2,04	0,1652
Local * sexo	1	0,008	0,008	1,71	0,2026
Animal / sexo	26	0,195	0,007	1,70	0,0920
Erro	26	0,115	0,004		
Correção total	55	0,330			

p > 0,05 não significativo

Não houve diferença no espessamento da epiderme nem da membrana basal do dorso direito e ventre direito dos animais machos e fêmeas.

Tabela 11 – Resultado da avaliação dos valores em micra, da espessura das fibras colágenas da derme superficial (ds) do dorso direito 1 (DD₁) e ventre direito 1 (VD₁), de machos (M) e fêmeas (F) de 60 dias de idade

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Sexo	1	0,988	0,988	0,45	0,5077
Local	1	23,842	23,842	7,24	0,1223
Local * sexo	1	8,944	8,944	2,72	0,1113
Animal / sexo	26	56,952	2,190	0,67	0,8474
Erro	26	85,595	3,292		
Correção total	55	176,322			

p > 0,05 não significativo

Tabela 12 – Resultado da avaliação dos valores em micra, da espessura das fibras colágenas da derme profunda (dp) do dorso direito 1 (DD₁) e ventre direito 1 (VD₁), de machos (M) e fêmeas (F) de 60 dias de idade

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Sexo	1	2,602	2,602	1,69	0,2050
Local	1	8,840	8,840	3,11	0,0898
Local * sexo	1	8,730	8,730	3,07	0,0917
Animal / sexo	26	40,016	1,539	0,54	0,9383
Erro	26	74,015	2,847		
Correção total	55	134,203			

p > 0,05 não significativo

Quanto a espessura das fibras colágenas das dermes superficial e profunda do dorso direito e ventre direito dos animais machos e fêmeas, não houve diferença de espessamento entre as fibras.

No estudo comparativo, das amostras de pele dos filhotes aos 60 dias de idade, o local de colheita, dorso direito e ventre direito, apresentou diferença significativa para as variáveis espessura das fibras reticulares da derme profunda e fibras elásticas da derme (Tabela 13 e 14). Ou seja, a espessura destes componentes foi maior na região dorsal.

Tabela 13 – Resultado da avaliação dos valores em micra, da espessura das fibras reticulares da derme profunda do dorso direito 1 (DD₁) e ventre direito 1 (VD₁), de machos (M) e fêmeas (F) de 60 dias de idade

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Sexo	1	0,242	0,242	4,07	0,0541
Local	1	0,252	0,252	6,45	0,0174*
Local * sexo	1	0,090	0,090	2,29	0,1422
Animal / sexo	26	1,545	0,059	1,52	0,1463
Erro	26	1,017	0,039		
Correção total	55	3,146			

*p > 0,05 diferença significativa

As fibras reticulares da derme profunda do ventre direito das fêmeas são mais espessas do que as fibras do dorso direito dos machos.

Tabela 14 – Resultado da avaliação dos valores em micra, da espessura das fibras elásticas da derme do dorso direito 1 (DD₁) e ventre direito 1 (VD₁), de machos (M) e fêmeas (F) de 60 dias de idade

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Sexo	1	0,191	0,191	0,65	0,4278
Local	1	7,659	7,659	39,32	< 0,0001**
Local * sexo	1	1,588	1,588	8,15	0,0083*
Animal / sexo	26	7,651	0,294	1,51	0,1495
Erro	26	5,064	0,195		
Correção total	55	22,153			

*p > 0,05 diferença significativa

**p > 0,01 diferença altamente significativa

As fibras elásticas da derme do dorso direito dos animais machos são mais espessas do que as fibras do ventre direito dos animais fêmeas.

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que este experimento foi realizado, conclui-se que:

- 1) a pele hirsuta (derme e epiderme) dos neonatos possui os mesmos componentes observados na histologia da pele dos caninos adultos; folículos pilosos, glândulas sebáceas e apócrinas, músculo eretor do pêlo, vasos sangüíneos, linfáticos e nervos.
- 2) a camada germinativa exhibe poucas células em atividade mitótica por que a colheita da amostra de pele foi realizada durante o dia.
- 3) os filhotes nascem com folículo simples e com o amadurecimento do animal, este folículo torna-se composto, arranjado em grupos de dois, três e quatro, sendo o grupo de quatro mais comum aos 60 dias de idade.
- 4) neonatos com 10 dias de vida possuem dois pêlos emergindo na abertura folicular comum de alguns folículos pilosos.
- 5) os mastócitos estão presentes na derme, principalmente adjacentes aos vasos sangüíneos e também na papila dérmica do folículo piloso.
- 6) os eosinófilos estão presentes em pequena quantidade na derme.
- 7) a epiderme viva, a membrana basal, as fibras colágenas das dermes superficial e profunda e as fibras elásticas do dorso direito, dos filhotes machos e fêmeas, desde o nascimento até aos 60 dias de idade, espessam-se com o amadurecimento dos animais.
- 8) as fibras colágenas da derme profunda são mais espessas do que as da derme superficial, desde o 1º até 60º dia de idade.
- 9) os machos apresentam um espessamento maior das fibras reticulares do dorso direito, quando comparado com as fêmeas.

10) a membrana basal do ventre direito dos filhotes machos de 60 dias de idade é mais espessa do que a do dorso direito.

11) as fibras colágenas, da derme superficial do ventre direito, são mais espessas do que as fibras do dorso direito, e as fibras da derme profunda do dorso direito são mais espessas do que as da derme superficial dos filhotes machos de 60 dias de idade.

12) as fibras colágenas, da derme profunda do ventre direito, são mais espessas do que as do dorso direito, dos filhotes fêmeas de 60 dias de idade.

13) as fibras colágenas da derme profunda do ventre direito são mais espessas do que as da derme superficial das fêmeas de 60 dias de idade.

14) as fibras reticulares da derme profunda do ventre direito, dos filhotes fêmeas de 60 dias de idade, são mais espessas do que as do dorso direito.

15) as fibras elásticas da derme do dorso direito, dos filhotes machos de 60 dias de idade, são mais espessas do que as do ventre direito e também mais espessas do que as das fêmeas da mesma idade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

BACHA JR.; W.J., BACHA, L.M. **Color atlas de veterinary histology**. 2.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 318p.

BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1992. 629p.

BHAYANI, D.M.; VYAS, K.N. The age and regional differences of several skin characters in gir cattle (*BOS INDICUS*). **India Vet. J.**, Madras, v.68, n.1, p.66-70, 1991.

COCHRAN, W.G.; COX, G.M. **Experimental designs**. New York: John Wiley & Sons, 1968. 466p.

EMERSON, J.L.; CROSS, R.F. The distribution of mast cells in normal canine skin. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v.26, n.115, p.1379-82, 1965.

FIGUEIREDO, C. **Distribuição de mastócitos na pele sem alterações, em dermatoses e tumores cutâneos de cães. Variações histológicas da pele clinicamente normal**. 1979. 51p. Tese (Livre-docência) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, universidade Estadual Paulista, Botucatu.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

FIORAVANTI, M.C.S. **Incidência, avaliações clínica, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporidesmina em bovinos.** 1999. 210p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FRANK, L.A.; CALDERWOOD-MAYS, M.B.; KUNKLE, G.A. Distribution and appearance of elastic fibers in the dermis of clinically normal dogs and dogs with solar dermatitis and other dermatoses. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v.57, n.2, p.178-81, 1996.

FRASER, C.M. (Ed). **El manual Merck de veterinária.** 3.ed. Madrid: Gráficas Guada, 1988. 1918p.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 426p.

GRECO, D.S., TARTINGTON, B.P. Exame físico e técnicas de obtenção de imagens diagnósticas. In: HOSKINS, J.D. **Pediatria veterinária: cães e gatos do nascimento aos seis meses.** 2.ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997. cap.1, p.1-21.

GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J. **Veterinary dermatopathology:** a macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease. St. Louis: Mosby Year Book, 1992. 520p.

GROSS, T.L.; STANNARD, .A.A.; YAGER, J.A. Review article. An anatomical classification of folliculitis. **Vet. dermatol.**, Oxford, v.8, p147-56, 1997.

HAM, A.W. **Histologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1967. 965p.

HARGIS, A.M. Sistema tegumentar. In: CARLTON, W.W.; McGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2.ed. São Paulo: Artmed, 1998. p.486-540.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.

KIMURA, T.; DOI, K. Age-related changes in skin color and histologic features of hairless descendents of Mexican hairless dogs. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v.55, n.4, p.480-6, 1994.

LAVIELLE, R.E.; GODOY, A.M.F.; SÁNCHEZ, J.T. Comparación del número de mastocitos, eosinófilos y melanocitos en la piel de bovinos Indobrasil y F₁ (Cebú x Holstein). **Vet. México**, México, v.16, p.143-9, 1985.

LLOYD, D.H.; GARTHWAITE, G. Epidermal structure and surface topography of canine skin. **Res. Vet. Sci.**, Oxford, v.33, p.99-104, 1982.

LOVELL, J.E.; GETTY, R. The hair follicle, epidermis, dermis, and skin glands of the dog. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v.18, p.873-85, 1957.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.

McGAVIN, M.D.; FADOK, V.A. Factors limiting the usefulness of histopathologic examination of skin biopsies in the diagnosis of large animal dermatoses. **Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.**, Philadelphia, v.6, n.1, p.203-13, 1984.

McMCGUINRE, B.H.; SEIM, B.H. **Small animal bhysy physical diagnosis and clinical procedure**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991. 222p.

MONTES, G.S., KRISZTAN, R.M., SHIGIHARA, K.M., TOKORO, R., MOURÃO, P.A., JUNQUEIRA, L.C. Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. **Histochemistry**, Berlin, v.65, n.2, p.131-41, 1980.

MULLER, G.H.; KIRK, R.W.; SCOTT, D.W. **Dermatologia dos pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1985. 935p.

PANIC, R.; SCOTT, D.W.; ANDERSON, W.I.; TENANT, B.C. Microscopic anatomy of the skin of the woodchucck (*Marmota monax*): comparison of woodchuck hepatitis virus-infected and non-infected animals. **Cornell Vet.**, Ythaca, v.82, p.387-404, 1992.

PELETEIRO, M.C., CORREIA, J.J. Técnicas de biopsia de pele por excisão com bisturí ou com "Punch". **Vet. Téc.**, Lisboa, v.6, n. 1, p.24-7, 1996.

PINTO, F.G. **Densidade populacional e distribuição de mastócitos, eosinófilos e vasos sangüíneos na pele normal e em algumas**

afecções cutâneas do cão. 1993. 56p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RADOSTITS, O.M.; MAYHEW, I.G.; HOUSTON, D.M. Exame clínico do sistema tegumentar. In____. **Exame clínico e diagnóstico em veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.166-90.

SCHWARZ, R.; LE ROUX, J.M.W.; SCHALLER, R.; NEURAND, K. Micromorphologia of the skin (epidermis, dermis, subcutis) of the dog. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v.46, p.105-9, 1979.

SCOTT, W.D. Epidermal mast cells in the cat. **Veterinary dermatol.**, Oxford, v.1, p.65-9, 1990.

SCOTT, D.W., MILLER JR., W.H., GRIFFIN, C.E. **Muller & Kirk dermatologia de pequenos animais.** 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. 1130p.

SILVEIRA, J.M. **Patologia clínica veterinária.** Teoria e interpretação. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 196p.

SOUSA, C.A. Diagnostic techniques in veterinary dermatology. **Vet. Technician**, Philadelphia, v.11, n.9, p.574-9, 1990.

TARPLEY, J.E.; MESCHTER, C.L.; TYLLER, D.E. Modified congo red-acidified toluidine blue stain: a new technique for the simultaneous specific staining of eosinophils and mast cells in paraffin tissue sections. **J. Histotechnol.**, Downersgrove, v.7, n. 3, p.141-2. 1984.

WEBB, A.J.; CALHOUN, M.L. The microscopic anatomy of the skin of mongrel dogs. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v.15, p.274-81, 1954.

WELLE, M.M.; OLIVRY, T.; GRIMM, S.; SUTER, M. Mast cell density and subtypes in the skin of dogs with atopic dermatitis. **J. Comp. Pathol.**, London, v.120, n.2, p.187-97, 1999.

WILKIE, J.S.N.; YAGER, J.A.; EYRE, P.; PARKER, W.M. Morphometric analyses of the skin of dogs with atopic dermatitis and correlations with cutaneous and plasma histamine and total serum IgE. **Vet. Pathol.**, Washington, v.27, n.3, p.179-86, 1990.

Anexo 1 - Acompanhamento individual - MÃE nº _____

Data: _____
Nome do animal: _____
Espécie: _____ Raça: _____ Idade: _____
Sexo: _____ Pelagem: _____ Peso: _____
Proprietário _____
Endereço: _____ Fone: _____
Município: _____ Local do exame: _____

EXAME FÍSICO

Temperatura _____ °C	Pulso _____
Freq. Cardíaca: _____ bpm	Freq. Respiratória _____ mpm
Estado de hidratação: _____	
Linfonodos: _____	TPC: _____
Palpação abdominal: _____	
Auscultação cardio-pulmonar: _____	
Outros achados: _____	

Alimentação _____
Vermifugação: 1ª _____
2ª após 12 dias _____

EXAME CLÍNICO

1. Aparência geral _____
2. Mucosas aparentes _____
3. Pele e anexos _____
4. Respiratório _____
5. Córdio-vascular _____
6. Gastro-intestinal _____
7. Genito-urinário _____
8. Neurológico _____
9. Locomotor _____
10. Outros _____

Anexo 2 - Acompanhamento individual - Filhote macho nº _____ mãe nº _____
fêmea nº _____ mãe nº _____

Data: _____
 Nome do animal: _____
 Espécie: _____ Raça: _____ Idade: _____
 Sexo: _____ Pelagem: _____ Peso: _____
 Proprietário _____
 Endereço: _____ Fone: _____
 Município: _____ Local do exame: _____

EXAME FÍSICO

Temperatura _____ °C Pulso _____
 Freq. Cardíaca: _____ bpm Freq. Respiratória _____ mpm
 Estado de hidratação: _____
 Linfonodos: _____ TPC: _____
 Palpação abdominal: _____
 Auscultação cardio-pulmonar: _____
 Outros achados: _____

Alimentação _____
 Vermifugação: 1ª _____
 2ª após 12 dias _____

EXAME CLÍNICO

1. Aparência geral _____
 2. Mucosas aparentes _____
 3. Pele e anexos _____
 4. Respiratório _____
 5. Córdio-vascular _____
 6. Gastro-intestinal _____
 7. Genito-urinário _____
 8. Neurológico _____
 9. Locomotor _____
 10. Outros _____
 Clínico _____
 assinatura _____

Anexo 3 - POR NINHADA**DATA:** _____**Nº da mãe** _____**Nº dos filhotes** _____

Alimentação, vermífugos e vacinas dos filhotes		Idade dos filhotes
Alimentação pastosa	Data _____	14 dias de vida
Bomguynho mais ração úmida	Data _____	20 dias de vida
Vermífugo ?	Data _____	22 dias de vida
? após 12 dias	Data _____	34 dias de vida
Vacina ? Parvovac	Data _____	45 dias de vida
? Polivalente	Data _____	66 dias de vida

OBS: as mães antes de parir recebiam ração granulada. Após o parto ração granulada mais ração úmida. Foram vermifugadas na mesma época dos seus filhotes.

Anexo 4 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-1 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida.

Identificação dos Filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	1º dia/g	3º dia/g	5º dia/g	7º dia/g	9º dia/g	11º dia/g	13º dia/g	15º dia/g	17º dia/g	19º dia/g	21º dia/g	23º dia/g	25º dia/g
1 - 1F	320	420	500	550	620	750	850	925	1100	1125	1150	1350	1475
1- 2M	360	400	480	520	600	685	775	825	900	1000	1100	1225	1275
1 - 3M	400	500	550	700	800	900	975	1075	1075	1275	1325	1625	1700
1 - 4F	400	500	550	700	800	850	925	1025	1125	1175	1300	1475	1550

Anexo 4 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-1 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(continuação)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	27º dia/g	29º dia/g	31º dia/g	33º dia/g	35º dia/g	37º dia/g	39º dia/g	41º dia/g	43º dia/g	45º dia/g	47º dia/g	49º dia/g	51º dia/g
1 - 1F	1675	1850	2000	2250	2350	2500	2700	3025	3250	3700	3820	3940	4060
1 - 2M	1500	1700	1800	1925	2200	2400	2500	3050	3400	3800	4000	4200	4400
1 - 3M	2000	2200	2475	2600	2800	3100	3500	4050	4300	4700	5100	5400	5500
1 - 4F	1800	2100	2200	2450	2750	2925	3250	3625	4100	4250	4900	5200	5300

Anexo 4 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-1 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(conclusão)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	53º dia/g	55º dia/g	57º dia/g	59º dia/g	61º dia/g	63º dia/g	65º dia/g	67º dia/g	69º dia/g	70º dia/g			
1 - 1F	4200	4350	4580	4800	5100	5250	5300	5650	5750	5800			
1 - 2M	4510	4620	4730	4850	4850	4900	5100	5400	5720	5770			
1 - 3M	5600	5700	5920	6200	6500	6900	6820	7200	7450	7570			
1 - 4F	5410	5520	5630	5740	5850	5950	6100	6570	7000	7210			

Legenda: 1 = mãe 1

1F = filhote 1 Fêmea

2M = filhote 2 Macho

3M = filhote 3 Macho

4F = filhote 4 Fêmea

Anexo 5 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-2 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida.

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	1º dia/g	3º dia/g	5º dia/g	7º dia/g	9º dia/g	11º dia/g	13º dia/g	15º dia/g	17º dia/g	19º dia/g	21º dia/g	23º dia/g	25º dia/g
2 - 1F	300	400	400	500	525	550	575	725	800	975	1125	1250	1280
2 - 2M	350	375	450	500	650	700	750	670	750	900	1075	1150	1260
2 - 3M	325	350	400	575	650	710	775	850	900	1075	1175	1160	1300
2 - 4F	350	350	425	525	550	600	700	700	700	800	975	1050	1050

Anexo 5 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-2 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(continuação)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	27º dia/g	29º dia/g	31º dia/g	33º dia/g	35º dia/g	37º dia/g	39º dia/g	41º dia/g	43º dia/g	45º dia/g	47º dia/g	49º dia/g	51º dia/g
2 - 1F	1450	1550	1730	2000	2060	2210	2410	2630	2850	3150	3350	3590	4030
2 - 2M	1460	1500	1600	1900	1950	2100	2250	2380	2570	2820	3000	3200	3430
2 - 3M	1470	1550	1680	2000	2040	2160	2270	2400	2590	2900	3000	3220	3450
2 - 4F	1200	1340	1500	1930	1980	2220	2400	2630	2860	3210	3450	3670	4240

Anexo 5 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-2 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(conclusão)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	53º dia/g	55º dia/g	57º dia/g	59º dia/g	61º dia/g	63º dia/g	65º dia/g	67º dia/g	69º dia/g	70º dia/g			
2 - 1F	4050	4220	4400	4500	4700	4900	5100	5350	5480	5840			
2 - 2M	3630	3810	3900	4010	4190	4370	4570	4800	4930	5290			
2 - 3M	3700	3830	4000	4030	4200	4390	4600	4850	4980	5350			
2 - 4F	4280	4550	4650	4760	5010	5260	5510	5700	6070	6440			

Legenda: 2 = mãe2

1F = filhote 1 Fêmea

2M = filhote 2 Macho

3M = filhote 3 Macho

4F = filhote 4 Fêmea

Anexo 6 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-3 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	1º dia/g	3º dia/g	5º dia/g	7º dia/g	9º dia/g	11º dia/g	13º dia/g	15º dia/g	17º dia/g	19º dia/g	21º dia/g	23º dia/g	25º dia/g
3 - 1F	320	350	370	450	470	520	550	620	690	760	810	830	850
3 - 2M	320	350	380	470	540	570	650	730	810	890	910	960	1070
3 - 3M	290	330	360	430	500	520	560	620	680	760	840	880	1020
3 - 4F	300	360	410	500	580	620	700	780	860	940	1000	1050	1070

Anexo 6 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-3 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(continuação)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	27º dia/g	29º dia/g	31º dia/g	33º dia/g	35º dia/g	37º dia/g	39º dia/g	41º dia/g	43º dia/g	45º dia/g	47º dia/g	49º dia/g	51º dia/g
3 - 1F	960	1050	1210	1370	1530	1680	1810	1830	2220	2260	2540	2730	2810
3 - 2M	1200	1400	1570	1730	2000	2200	2420	2550	2740	2840	3170	3400	3600
3 - 3M	1140	1300	1480	1650	1830	2000	2190	2320	2810	2840	3200	3330	3550
3 - 4F	1250	1450	1590	1720	1970	2220	2400	2590	3100	3100	3460	3670	3740

Anexo 6 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-3 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(conclusão)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	53º dia/g	55º dia/g	57º dia/g	59º dia/g	61º dia/g	63º dia/g	65º dia/g	67º dia/g	69º dia/g	70º dia/g			
3 - 1F	2950	3080	3200	3450	3800	4000	4200	4410	4550	4690			
3 - 2M	3750	3900	4150	4450	4800	5030	5230	5580	5720	5870			
3 - 3M	3670	3790	4100	4280	4660	4940	5220	5510	5700	5900			
3 - 4F	3850	3960	4300	4520	4900	4900	4900	4900	5040	5430			

Legenda: 3 = mãe 4

1F = filhote 1 Fêmea

2M = filhote 2 Macho

3M = filhote 3 Macho

4F = filhote 4 Fêmea

Anexo 7 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-4 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida.

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	1º dia/g	3º dia/g	5º dia/g	7º dia/g	9º dia/g	11º dia/g	13º dia/g	15º dia/g	17º dia/g	19º dia/g	21º dia/g	23º dia/g	25º dia/g
4 - 1F	410	420	440	510	590	670	810	890	960	1050	1150	1270	1410
4 - 2M	420	440	470	500	600	690	840	900	950	1160	1200	1300	1420
4 - 3M	430	440	450	490	580	710	840	980	1030	1140	1220	1300	1480
4 - 4F	400	410	420	500	540	640	810	900	950	1060	1150	1220	1290

Anexo 7 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote de mãe-4 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(continuação)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	27º dia/g	29º dia/g	31º dia/g	33º dia/g	35º dia/g	37º dia/g	39º dia/g	41º dia/g	43º dia/g	45º dia/g	47º dia/g	49º dia/g	51º dia/g
4 - 1F	1550	1800	1950	2200	2500	2800	3100	3370	3640	3770	3970	4180	4390
4 - 2M	1530	1750	1860	2130	2360	2690	2880	3100	3320	3550	3770	4000	4250
4 - 3M	1660	1940	2020	2350	2630	2910	3190	3440	3690	3950	4200	4460	4800
4 - 4F	1360	1590	1700	2000	2220	2440	2650	2910	3180	3450	3670	3900	4180

Anexo 7 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-4 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(conclusão)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	53º dia/g	55º dia/g	57º dia/g	59º dia/g	61º dia/g	63º dia/g	65º dia/g	67º dia/g	69º dia/g	70º dia/g			
4 - 1F	4600	4900	5200	5200	5200	5240	5600	5620	6000	6380			
4 - 2M	4500	4500	4550	4600	4650	4700	4750	4850	5280	5550			
4 - 3M	5150	5270	5400	5410	5420	5710	6000	6200	6550	6850			
4 - 4F	4450	4520	4600	4600	4640	4690	4710	4920	5300	5670			

Legenda: 4 = mãe 4

1F = filhote 1 Fêmea

2M = filhote 2 Macho

3M = filhote 3 Macho

4F = filhote 4 Fêmea

Anexo 8 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-5 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	1º dia/g	3º dia/g	5º dia/g	7º dia/g	9º dia/g	11º dia/g	13º dia/g	15º dia/g	17º dia/g	19º dia/g	21º dia/g	23º dia/g	25º dia/g
5 - 1F	380	400	450	520	590	620	670	830	880	940	970	1000	1090
5 - 2M	380	410	430	490	550	590	630	740	790	900	980	1060	1140
5 - 3M	350	350	390	450	500	550	610	740	810	930	990	1050	1130
5 - 4F	330	350	370	420	480	530	580	690	750	840	900	960	1030

Anexo 8 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-5 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(continuação)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	27º dia/g	29º dia/g	31º dia/g	33º dia/g	35º dia/g	37º dia/g	39º dia/g	41º dia/g	43º dia/g	45º dia/g	47º dia/g	49º dia/g	51º dia/g
5 - 1F	1210	1340	1480	1620	1760	1950	2140	2320	2500	2615	2730	2935	3140
5 - 2M	1290	1450	1600	1840	2080	2320	2560	2795	3030	3270	3510	3745	3980
5 - 3M	1290	1450	1580	1790	2000	2150	2300	2535	2770	2810	2850	2995	3140
5 - 4F	1190	1360	1500	1690	1880	2080	2290	2580	2870	3165	3460	3730	4000

Anexo 8 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-5 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(conclusão)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	53º dia/g	55º dia/g	57º dia/g	59º dia/g	61º dia/g	63º dia/g	65º dia/g	67º dia/g	69º dia/g	70º dia/g			
5 - 1F	3440	3740	3980	4300	4550	4600	4750	2375	5500	5565			
5 - 2M	4420	4880	5180	5450	5640	6020	6140	6585	7030	7250			
5 - 3M	3540	3840	4180	4490	4790	5000	5120	5460	5800	6050			
5 - 4F	4350	4670	4880	5230	5260	5670	5840	6080	6320	6685			

Legenda: 5 = mãe 5

1F = filhote 1 Fêmea

2M = filhote 2 Macho

3M = filhote 3 Macho

4F = filhote Fêmea

Anexo 9 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-6 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida.

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	1º dia/g	3º dia/g	5º dia/g	7º dia/g	9º dia/g	11º dia/g	13º dia/g	15º dia/g	17º dia/g	19º dia/g	21º dia/g	23º dia/g	25º dia/g
6 - 1F	330	420	510	580	650	710	780	810	870	1000	1080	1200	1330
6 - 2M	350	430	480	520	580	660	710	750	800	900	1000	1160	1320
6 - 3M	390	460	540	580	650	740	800	850	910	1030	1210	1370	1530
6 - 4F	340	400	490	530	590	640	660	700	750	890	950	990	1040

Anexo 9 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-6 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida)

(continuação)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 /48 horas em gramas												
	27º dia/g	29º dia/g	31º dia/g	33º dia/g	35º dia/g	37º dia/g	39º dia/g	41º dia/g	43º dia/g	45º dia/g	47º dia/g	49º dia/g	51º dia/g
6 - 1F	1400	1570	1620	1680	1840	1930	2140	2330	2360	2590	2800	2870	3050
6 - 2M	1440	1470	1610	1750	1850	2070	2180	2400	2460	2660	2800	2980	3110
6 - 3M	1700	1850	2050	2250	2400	2550	2750	2890	3200	3360	3600	3760	4000
6 - 4F	1150	1240	1320	1400	1490	1550	1660	1800	1880	2000	2090	2270	2300

Anexo 9 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-6 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(conclusão)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	53º dia/g	55º dia/g	57º dia/g	59º dia/g	61º dia/g	63º dia/g	65º dia/g	67º dia/g	69º dia/g	70º dia/g			
6 - 1F	3190	3280	3460	3660	3840	4030	4250	4440	4510	4580			
6 - 2M	3200	3420	3680	3760	3920	4080	4180	4400	4500	4600			
6 - 3M	4100	4320	4540	4680	4790	4900	5150	5440	5600	5750			
6 - 4F	2320	2420	2530	2680	2790	2900	3000	3100	3150	3200			

Legenda: 6 = mãe 6

1F = filhote 1 Fêmea

2M = filhote 2 Macho

3M = filhote 3 Macho

4M = filhote 4 Fêmea

Anexo 10 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-7 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida.

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	1º dia/g	3º dia/g	5º dia/g	7º dia/g	9º dia/g	11º dia/g	13º dia/g	15º dia/g	17º dia/g	19º dia/g	21º dia/g	23º dia/g	25º dia/g
7 -1F	310	410	490	540	610	740	840	910	1090	1110	1140	1340	1460
7 -2M	410	470	540	610	630	690	720	740	760	810	910	1000	1200
7 -3M	300	420	520	610	620	630	630	630	680	770	910	1060	1210
7 -4F	350	410	470	510	570	600	680	740	790	810	890	975	1050

Anexo 10 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-7 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(continuação)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	27º dia/g	29º dia/g	31º dia/g	33º dia/g	35º dia/g	37º dia/g	39º dia/g	41º dia/g	43º dia/g	45º dia/g	47º dia/g	49º dia/g	51º dia/g
7 - 1F	1660	1840	1990	2240	2340	2490	2680	3010	3240	3690	3810	3930	4050
7 -2M	1490	1630	1760	2160	2450	2730	3040	3240	3480	3790	4100	4410	4730
7 -3M	1490	1730	1890	2260	2620	2950	3240	3520	3800	4150	4510	4860	5210
7 -4F	1200	1340	1500	1930	1980	2220	2400	2630	2860	3210	3450	3670	4240

Anexo 10 - Peso corpóreo em gramas de cada filhote da mãe-7 ao nascer e a cada dois dias durante os primeiros 70 dias de vida

(conclusão)

Identificação dos filhotes	Ganho de peso do filhote em 48 / 48 horas em gramas												
	53º dia/g	55º dia/g	57º dia/g	59º dia/g	61º dia/g	63º dia/g	65º dia/g	67º dia/g	69º dia/g	70º dia/g			
7 -1F	4190	4340	4570	4800	5100	5250	5300	5650	5750	5800			
7 -2M	5050	1090	5260	5540	5860	6190	6490	6790	7090	7400			
7 -3M	5550	5760	6000	6200	6480	6770	7070	7370	7670	7980			
7 -4F	4280	4550	4650	4770	5010	5260	5510	5700	6070	6450			

Legenda: 1 = mãe 7

1F = filhote 1 Fêmea

2M = filhote 2 Macho

3M = filhote 3 Macho

4M = filhote 4 Fêmea

Anexo 11**RETÍCULO (RETICULINA)**

1. Xilol, álcool, água de torneira – 30", água destilada 30"
2. Permanganato de potássio 0,25% ou 0,30% - 5'
(colocar no frasco e reutilizar)
3. Água de torneira, água destilada
4. Ácido Oxálico 5% - 1' (até clarear)
(colocar no frasco e reutilizar)
5. Água torneira 30", água destilada 30 "
6. Sulfato férrico amoniacal 3% - 3'
(colocar no frasco e reutilizar)
7. Água torneira 2', água destilada 30"
8. Solução de nitrato de prata 5% (guardado na geladeira)
preparar na hora de usar
5 ml de nitrato de prata 5% (geladeira)
+
5 gotas de hidróxido de sódio 10% (mexer bem para misturar)
5 gotas de amoníaco (colocar gota a gota) até que o precipitado fique no fundo da solução (e mexer bem até quase desaparecer o resíduo).
Filtrar em cima da lâmina sem deixar cair o precipitado no filtro – 1'
9. Água destilada (3 mudas)
10. Formol 1% - 3' a 5' (dar mexidinha na lâmina)
desprezar
11. Água destilada – 30"
12. Cloreto de ouro 0,1% - 15" a 1'
(colocar no frasco e reutilizar)
13. Água destilada – 30"
14. Tiosulfato de sódio 3% - 1' a 3'
(colocar no frasco e reutilizar)
15. Água torneira 30", água destilada 30"
16. Desidratar rapidamente e montar

SOLUÇÕES**Permanganato de potássio 0,25%**

Permanganato de potássio.....0,25 g
 Água destilada.....100 ml

Ácido oxálico 5%

Ácido oxálico.....5 g
 Água destilada.....100 ml

Sulfato férrico amoniacal 3%

Sulfato férrico amoniacal.....3 g
 Água destilada.....100 ml

Nitrato de prata 5%

Nitrato de prata.....5 g - (1 g)
Água destilada.....100 ml – (20 ml)

Nota: conservar na geladeira

todo material que entrar em contato com nitrato de prata deve ser lavado na
solução SULFOCRÔMICA

Hidróxido de sódio 10%

Hidróxido de sódio.....1 g
Água destilada.....10 ml
Colocar em frasco conta gota

Amônia – solução pronta para uso
colocar em frasco conta gota

Cloreto de ouro 0,1%

Cloreto de ouro 1%.....10 ml
Água destilada.....100 ml

OBS: Cloreto de ouro 1%

Quebrar a ampola de cloreto de ouro (1 g) dentro do frasco e colocar 100 ml
de água destilada

Tiosulfato de sódio 3%

Tiosulfato de sódio..... 3 g
Água destilada..... 100 ml

Anexo 12**CALLEJA SEM PERMANGANATO DE POTÁSSIO**

1. Desparafinizar, hidratar, água torneira, água destilada 5'
2. Orceína ácida – 8' a 10'
colocar no frasco e reutilizar
3. Lavar bem em água de torneira e água destilada
4. Diferenciar rapidamente em solução de ácido clorídrico
5. Lavar em água torneira - 5', água destilada
6. Hematoxilina de Weigerth (solução A e B partes iguais) – 3'
7. Lavar em água torneira – 5', água destilada
8. Picro-indigocarmin – 15'
colocar a solução no frasco e reutilizar
9. SEM lavar em água, desidratar e montar

SOLUÇÕES**Hematoxilina de Weigerth****Solução A**

Hematoxilina.....1 g
 Álcool 95%.....100 ml

Solução B

Cloreto férrico 30%.....4 ml
 Ácido clorídrico puro.....1 ml
 Água destilada.....95 ml

Orceína ácida → 3 MESES de MATURAÇÃO

Orceína.....1 g
 Álcool 95%.....100 ml
 Ácido clorídrico.....0,5 ml
 Água destilada.....25 ml

Usar o agitador – 24 horas em repouso

Colocar a solução em frasco âmbar e o envolver com papel de alumínio

Deixar o frasco com a solução sempre envolvido no papel alumínio “precisa ficar sempre no escuro”.

Picro-indigocarmin - Deixar maturar 1 mês

Indigocarmin.....5 g
 Ácido pícrico saturado 1,5%.....1000 ml

Diferenciador – solução 1%

Álcool 70%.....990 ml
 Ácido clorídrico (puro).....10 ml

Anexo 13**TRICRÔMICO DE MASSON**

Inclusões em parafina e Corte – 6 micra

1. Desparafinizar e hidratar até água destilada (só passagem)
2. Corar pela Hematoxilina Weigerth (solução A e B partes iguais) – 5'
3. Lavar em água corrente – 3 a 4'
4. Lavar em água destilada (só passagem, uma água)
5. Corar as lâminas em solução Ponceau – 5'
6. Lavar em água destilada (só passagem, uma água)
7. Diferenciar na sol. ac. Fosfomolibdico 5% + ac. Fosfotungstico 5% – 2 a 8'
(esta solução retira o excesso do corante vermelho)
8. ESCORRER a solução e SEM LAVAR cobrir a lâmina com Azul de Anilina 2%
– 3 a 5'
9. Lavar em água destilada
10. Mergulhar a lâmina na solução ácido acético 1% – 15 a 30"
11. Mergulhar na água destilada
12. Desidratar (só passagem), diafanizar e montar a lâmina

OBS: Esta técnica não precisa fixar no Bouin e nem usar a estufa

É necessário acertar o pH da água destilada entre 6,5 a 7,0 para fazer as soluções

SOLUÇÕES**Ponceau 2R 2%**

Ponceau 2R.....2 g
 Ácido acético glacial.....0,6 ml
 Água destilada.....100 ml

Ácido Fosfomolibdico 5% + ácido Fosfotungstico 5%

Ácido fosfomolibdico.....5 g
 Ácido fosfotungstico.....5 g
 Água destilada.....200 ml

Azul de Anilina 2%

Azul de anilina.....2 g
 Água destilada (Quente).....100 ml
 Esfriar a solução e acrescentar
 Ácido acético glacial.....1 ml
 Filtrar a solução para uso

Ácido acético 1%

Ácido acético glacial.....1 ml
 Água destilada.....100 ml

ABSTRACT

The skin exerts several important functions; therefore many deleterious consequences may occur due to its immaturity or loss of integrity. The scope of this study was to evaluate the evolution of skin from newborn dogs in its morphology and cellular content from birth until 70 days of age on 28 puppies. The skin samples were collected from the dorsal area at one, 20, 40 and 60 days of life; and from the ventral area at 10, 30, 50, 70 days of life. The samples were obtained through skin biopsy and stained by hematoxylin-eosin, Schiff periodic acid, calcein without potassium permanganate, trichrome of Masson, and modified congo red-acidified toluidine blue stain. Comparing the obtained results to literature data for adult dogs, it was verified that newborns possess the same skin components of adult dogs. The thickness of the basal membrane is linear for both males and females. Regarding sex, there was a significant difference of thickness on collagen fibers from superficial and deep dermis, as well as on elastic and reticular fibers from the right dorsum among males and females of one, 20, 40 and 60 days of life. On male puppies the fibers presented linear thickening. Concerning the age, there also was significant difference of thickness on collagen fibers from superficial and deep dermis and elastic fibers. On male puppies there is a tendency of thickening for those fibers, as the animals grow mature. The anatomic site for collecting – right dorsum and right ventral area of 60 day-old animals – had an influence on the thickness of elastic fibers. The fibers from the right dorsum of male puppies are thicker when comparing to those from the right ventral area of female puppies.

Key words: histology; morphometry; skin; newborn; dog