

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DO APARELHO
REPRODUTOR DE FÊMEAS SUBMETIDAS À
OVARIOSALPINGO-HISTERECTOMIA (*Canis Familiaris*,
LINNAEUS, 1758)**

Karen Vicente Diagone

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2005

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DO APARELHO
REPRODUTOR DE FÊMEAS SUBMETIDAS À
OVARIOSALPINGO-HISTERECTOMIA (*Canis familiaris*,
LINNAEUS, 1758)**

Karen Vicente Diagone

Orientador: **Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Maria Rita Pacheco**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Cirurgia Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2005

Diagone, Karen Vicente
D536h Histologia e morfometria do aparelho reprodutor de fêmeas submetidas à ovariosalpingo-histerectomia (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) / Karen Vicente Diagone. -- Jaboticabal, 2005
xiii, 58 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2005
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente
Banca examinadora: Ivo Walter dos Santos, Marion Burkhardt de Koivisto
Bibliografia

1. Aparelho Reprodutor. 2. Cadela 3. Morfometria. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.62:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KAREN VICENTE DIAGONE – Natural de São Paulo – SP, nascida em 07 de junho de 1977; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina em fevereiro de 1997, concluindo-o em dezembro de 2001. Em agosto de 2003 iniciou o curso de mestrado em Cirurgia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Campus de Jaboticabal, concluindo-o em 2005.

**Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma
pessoa de sucesso. O sucesso é consequência.**

(Albert Einstein)

**Dedico esta dissertação aos
meus pais Olavo e Ingrid,
minha irmã Priscila
e meu marido Junior**

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu grande agradecimento por me proporcionar A VIDA e poder desfrutá-la em paz e feliz ao lado das pessoas que amo.

Ao Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho que, certamente, auxiliará no meu futuro profissional.

À equipe obstetrícia pelo incentivo inicial para o ingresso no mestrado e pela constante colaboração.

À FAPESP pela bolsa de mestrado, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

À secretária Isabel do Departamento de Reprodução e Obstetrícia Animal Unesp/Jaboticabal pela colaboração em vários momentos de nosso trabalho.

Ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, em especial a Profa. Dra. Maria Rita Pacheco, que me atendeu com atenção e sempre foi prestativa na elaboração da dissertação e nas “caronas”. Ao Sr. Orandi, que além de competente em seu trabalho, é um companheiro nas horas do aperto e alegria. Às colegas Verônica e Lílian, sempre prontas para ajudar e a me “localizar” no laboratório com carinho e muitas brincadeiras.

Ao Departamento de Patologia Animal, Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó pela gentileza em sanar minhas dúvidas e em permitir o uso do aparelho analisador de imagens. Agradeço à paciência da pós-graduanda Viviane ao me tirar de apuros com os ajustes da “medusa”, ao técnico Ronaldo por me esperar algumas vezes pelo término da leitura das lâminas no final do expediente. Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi e o pós-graduando Guilherme Godoy que foram prestativos ensinando a utilização da “régua” para as imagens. À atenção da pós-graduanda Ana Sílvia em sempre estar colaborando com seus conterrâneos.

À Profa. Dr. Silvana Martinez B. Artoni pelas sugestões oferecidas ao nosso trabalho e gentileza na participação na banca no meu exame de Qualificação. Ao coleguismo das pós-graduandas Lizandra e Cristina em ensinar o manuseio dos equipamentos no Departamento de Anatomia.

Ao Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana pela importante colaboração em nosso trabalho e por ter participado na banca examinadora do meu exame de Qualificação.

À Profa. Dra. Marion Burkhardt de Koivisto e ao Prof. Dr. Ivo Walter dos Santos pela atenção, capricho e acréscimo dados à dissertação.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, que teve muita paciência e sempre foi muito prestativo na elaboração da estatística e compilação dos nossos resultados.

Ao pós-graduando Eduardo Pimentel, muito generosamente colaborou na interpretação estatística dos nossos resultados.

Aos meus pais Olavo e Ingrid, irmã Priscila e vó Hilde pela dedicação e cuidado em todos os momentos de minha vida, em que aceitaram e apoiaram minhas decisões mesmo quando não lhe pareciam corretas. Peço desculpas pelos momentos nos quais me ausentei, mas sempre os tive em pensamentos e no meu coração.

Ao meu querido esposo agradeço a compreensão nos momentos difíceis e de ansiedade e, principalmente, pela minha ausência. Acredito que estes fatos fortalecerão ainda mais a nossa relação e certificarão que construiremos nosso futuro com companheirismo, muito respeito e amor.

À Bá e Tirador, meus “pais adotivos”, sempre presentes em importantes ocasiões de minha vida, agradeço o constante apoio à minha família e a mim.

Aos sempre muito queridos e praticamente de minha família: Kleber e Márcia que desde a graduação me acompanham sempre com lealdade, companheirismo nas alegrias e tristezas, o meu muito obrigada por tudo de todo coração.

Às inesquecíveis Viviane Gomes Portela, Ana Paula de Sousa e Ângela Akamatsu, que louca e inteligentemente foram fundamentais para minha estada em Jaboticabal. Muito obrigada pelos conselhos, companhia, ensinamentos, broncas, caronas, enfim, todos os ingredientes que uma verdadeira amizade pode e deve ter.

Aos pós-graduandos Ricardo, Naida, Ana Paula Coelho Ribeiro e Aracéle pela amizade e sugestões para ajudar nosso trabalho.

Agradeço pelas horas deliciosas de conversas (incluindo as hospedagens) com Paulinha e Ângela e seus respectivos filhos, às vezes não tão receptivos, não é Wishbone?!

Às companheiras de república muito importantes em todos os momentos, aliás, devo me considerar abençoada por estas ótimas pessoas: Márcia, Andréa de Oliveira Andrade, Andréia Vieira, Beth e Erli. Devo agradecer de coração as imensas colaborações profissionais e no dia a dia.

Às minhas eternas amigas de graduação Jú Dias, Jú Angerami, Pri e Jú Miyazaki, e todas as companheiras de São Carlos a minha gratidão é imensa, pois mesmo longe em quilometragem, sempre estiveram muito presentes e perto em pensamentos!

À Simone Meo, que me orientou diversas vezes quando tinha dúvidas do caminho a percorrer, é uma pessoa querida e tem maneira especial de lidar com as pessoas. Muito Obrigada.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Ovários.....	5
2.2. Tubas uterinas.....	8
2.3. Útero.....	9
III. OBJETIVOS	11
IV. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Animais.....	12
4.2. Grupos experimentais.....	12
4.3. Citologia vaginal.....	12
4.4. Procedimentos pré-anestésico, anestésico, cirúrgico e pós-cirúrgico.....	13
4.5. Procedimentos histológicos e morfométricos	14
4.6. Procedimentos estatísticos.....	16
V. RESULTADOS	17
VI. DISCUSSÃO	33
VII. CONCLUSÕES	37
VIII. REFERÊNCIAS	38
IX. APÊNDICE	42

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 Médias e erros padrões dos diâmetros máximo e mínimo (μm), perímetro (μm), área (μm^2) e fator de forma do núcleo e citoplasma de oócitos de folículos primordiais e primários com uma camada de células foliculares e respectivas médias, de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7), Jaboticabal, SP, 2005.....	21
Tabela 2 Médias e erros padrões dos diâmetros máximo e mínimo (μm), perímetro (μm), área (μm^2), e fator de forma do núcleo e citoplasma dos oócitos dos folículos primários com células foliculares estratificadas e secundários e respectivas médias, de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7). Jaboticabal, SP, 2005.....	22
Tabela 3 Médias e erros padrões dos diâmetros máximo e mínimo (μm), perímetro (μm), área (μm^2), e fator de forma do núcleo e citoplasma dos oócitos dos folículos terciários e respectivas médias, de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7), Jaboticabal, SP, 2005.....	23
Tabela 4 Médias e erros padrões da morfometria das camadas da tuba uterina mucosa (M), muscular (MU) e serosa (S) da região do infundíbulo da tuba uterina e suas respectivas médias; de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7). Jaboticabal, SP, 2005.....	23
Tabela 5 Médias e erros padrões da morfometria das camadas da tuba uterina mucosa (M), muscular (MU) e serosa (S) da região da ampola da tuba uterina e suas respectivas médias de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7). Jaboticabal, SP, 2005.....	24
Tabela 6 Médias e erros padrões da morfometria das camadas da tuba uterina mucosa (M), muscular (MU) e serosa (S) da região do istmo da tuba uterina e suas respectivas médias de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7). Jaboticabal, SP, 2005.....	24

- Tabela 7** Médias e erros padrões da morfometria (μm) do endométrio (E), miométrio (M) e perimétrio (P) do segmento 1 (proximal, médio e distal em relação ao ovário) dos cornos uterinos de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupos 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7), Jaboticabal, SP, 2005..... 24
- Tabela 8** Médias e erros padrões da morfometria (μm) do endométrio (E), miométrio (M) e perimétrio (P) do segmento 2 (proximal, médio e distal em relação ao ovário) dos cornos uterinos de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7), Jaboticabal, SP, 2005..... 25
- Tabela 9** Médias e erros padrões da morfometria (μm) do endométrio (E), miométrio (M) e perimétrio (P) do segmento 3 (proximal, médio e distal em relação ao ovário) dos cornos uterinos de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7), Jaboticabal, SP, 2005..... 25

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fotografia das gônadas de fêmea canina. Observa-se corte longitudinal do ovário.....	16
Figura 2. Fotografia das tubas uterinas de fêmea canina. Notam-se as regiões infundíbulo, ampola e istmo.....	16
Figura 3. Fotografia dos cornos uterinos de fêmea canina. Verificam-se os segmentos 1, 2 e 3 (regiões proximal, média e distal respectivamente em relação aos ovários).....	16
Figura 4. Fotomicrografias de ovário, tuba uterina e útero de fêmeas caninas. (a) Oócito de folículo primário com uma camada de células foliculares e oócito de folículo primordial (40X), (b) oócito de folículo primário com células foliculares estratificadas (20X), (c) oócito de folículo secundário (20X), (d) oócito de folículo terciário (20X), (e) Camadas mucosa (M) e muscular (Mu) da tuba uterina (20X), (f) Camada serosa da tuba uterina (40X), (g) Miométrio (Mi) e endométrio (E) (20X), (h) Perimétrio (P) (40X). Núcleo (N) e citoplasma (C). Coloração Hematoxilina–eosina.....	20
Figura 5. Representação gráfica dos valores médios dos diâmetros máximo e mínimo (μm) do citoplasma dos oócitos de folículos primordiais de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).....	26
Figura 6. Representação gráfica das médias do perímetro (μm) do citoplasma de oócitos de folículos primordiais de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).....	26
Figura 7. Representação gráfica das médias da área (μm^2) do citoplasma de oócitos de folículos primordiais de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).....	27
Figura 8. Representação gráfica das médias do fator de forma do citoplasma de oócitos de folículos primários com uma camada de células foliculares de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (de 1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7).....	27

Figura 9. Representação gráfica dos valores médios dos diâmetros máximo e mínimo (μm) do núcleo dos oócitos de folículos secundários de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).....	28
Figura 10. Representação gráfica das médias do perímetro (μm) do núcleo de oócitos de folículos secundários de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).....	28
Figura 11. Representação gráfica das médias da área (μm^2) do núcleo de oócitos de folículos secundários de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).....	29
Figura 12. Representação gráfica dos valores médios do diâmetro mínimo (μm) do núcleo dos oócitos de folículos terciários de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).....	29
Figura 13. Representação gráfica das médias do perímetro (μm) do núcleo de oócitos de folículos terciários de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).....	30
Figura 14. Representação gráfica das médias da área (μm^2) do núcleo de oócitos de folículos terciários de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).....	30
Figura 15. Morfometria das camadas da tuba uterina mucosa e serosa (μm) do segmento infundíbulo de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).....	31
Figura 16. Morfometria das camadas da tuba uterina mucosa e serosa (μm) do segmento ampola de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7)....	31
Figura 17. Morfometria da camada da tuba uterina serosa (μm) do segmento istmo de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).....	32

Figura 18. Representação gráfica dos valores médios da morfometria da camada miométrio (μm) dos segmentos 1 e 2 (regiões proximal e média em relação ao ovário) dos cornos uterinos de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).....

32

**HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DO APARELHO REPRODUTOR DE FÊMEAS
SUBMETIDAS À OVARIOSALPINGO-HISTERECTOMIA (*Canis familiaris*,
LINNAEUS, 1758)**

RESUMO – Nesta pesquisa foram realizadas a histologia e morfometria de ovários, ovidutos e úteros de cadelas. Foram utilizados 15 animais distribuídos em grupos (G) de acordo com as idades em anos, G1 (1 até 3), G2 (maiores de 3 até 5) e G3 (maiores de 5 até 7). Após a realização da ovariosalpingo-histerectomia, ovários, fragmentos de tubas uterinas e útero foram fixados e processados rotineiramente para a inclusão em parafina. As amostras foram coradas pela técnica da Hematoxilina-eosina. Os parâmetros morfométricos analisados foram: diâmetros máximo e mínimo (μm), perímetro (μm), área (μm^2), fator de forma do citoplasma e núcleo dos oócitos dos diferentes tipos de folículos e espessura das camadas salpíngicas e uterinas. Os procedimentos estatísticos utilizados foram ANOVA e o teste Tukey (5%). Houve diferenças significativas entre os grupos experimentais para os parâmetros do citoplasma e núcleo de oócitos foliculares e para a espessura das camadas salpíngicas e uterinas. Concluiu-se que, de acordo com os resultados desta pesquisa: a maturação *in vitro* obtém melhores desempenhos na utilização de oócitos de folículos primordiais nas fêmeas correspondentes ao G3 e para oócitos inclusos em folículos secundários e terciários, as do G2; as diferenças nas espessuras das camadas uterinas podem ser uma das explicações para o desenvolvimento diferenciado dos fetos em fêmeas caninas e os valores obtidos neste estudo servirão como subsídios para a biotecnologia da reprodução, diagnóstico e prognóstico de enfermidades que acometem esta espécie.

Palavras-chave: cadela, histologia, morfometria, ovário, oviduto, útero

**HISTOLOGY AND MORPHOMETRY OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF
FEMALES SUBMITTED TO OVARIEHISTERECTOMY (*Canis familiaris*, LINNAEUS,
1758)**

ABSTRACT – It was carried out in this research the histologic and morphometric study of ovaries, oviducts and uterus of canine females. There were 15 animals involved and distributed in groups (G) according to their age in years, G1 (1 to 3), G2 (3 to 5) and G3 (5 to 7). After the performance of the ovariehisterectomy, the ovaries, fragments of oviducts and uterus were fixed and processed routinely for inclusion in paraffin. The samples were stained through haematoxylin-eosin technique. The morphometric parameters studied were: maximum and minimum diameters (μm), perimeter (μm), area (μm^2), roundness factor of nucleus and cytoplasm of oocytes of different kinds of follicles and thickness of oviduct and uterine layers. The statistical procedures used were ANOVA and Tukey's test (5%). There was a significant difference among the experimental groups on the parameters of cytoplasm and nucleus of oocytes follicles and thickness of oviduct and uterine layers. It was concluded that: the maturation *in vitro* gives better performance in the utilization of oocytes of primordial follicles in females correspond to G3 and for oocytes of secondary and tertiary, the ones in G2; the differences in the thickness of the uterine layers may be one of the explanations for the differing development of the fetus in canine females, and the values obtained from this study will serve as subsidy to the biotechnology of reproduction, the diagnosis and prognostic of diseases that impair this species.

Key words: bitches, histology, morphometric, ovaries, oviduct, uterus

I - INTRODUÇÃO

O conhecimento minucioso do sistema reprodutor é importante, pois trata-se de sistema orgânico freqüentemente acometido por enfermidades detectadas na rotina da clínica obstétrica veterinária.

A biotecnologia da reprodução animal está em expressivo desenvolvimento, visando aumentar a eficiência da produção de animais domésticos, bem como aprimorar o conhecimento sobre a pesquisa fundamental da reprodução. Dentre as biotécnicas de maior relevância, podem-se destacar a inseminação artificial, a transferência e a produção *in vitro* de embriões, a transgênese e a clonagem (MAX et al, 2004).

Cães têm sido empregados nos estudos da fisiologia e genética comparadas, além disso, o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida usando oócitos caninos é eficaz para permitir sua recuperação em cadelas com alto valor genético portadoras de doenças reprodutivas e servem de base para a preservação dos gametas de canídeos selvagens e das espécies ameaçadas de extinção (HISHINUMA et al, 2004).

Em vista disso, estudos dos folículos e seus respectivos oócitos, tubas uterinas e útero devem ser aperfeiçoados, pois estes, participam intimamente do fenômeno reprodutivo e, por conseguinte, da manutenção e perpetuação da espécie. Portanto, esta pesquisa tem o intuito de ampliar a literatura para cooperar com profissionais da área de reprodução animal e, sobretudo, colaborar de maneira benéfica no incremento da biotecnologia da reprodução.

II - REVISÃO DA LITERATURA

Os órgãos genitais femininos são constituídos por dois ovários que são glândulas reprodutivas essenciais, pois produzem os óvulos; por duas tubas uterinas, local onde ocorre a fertilização; pelo útero, onde o conceito se desenvolve; pela vagina, um canal dilatável no qual o feto é expelido do útero; pelo vestíbulo da vagina, considerado o segmento terminal do aparelho reprodutor onde a uretra se abre; pela vulva, o limite caudal; e pelo clitóris, o homólogo ao pênis. As glândulas mamárias, embora consideradas glândulas da cútis, estão diretamente associadas aos órgãos relacionados à reprodução (ELLENPORT, 1986).

Por isso, o sistema reprodutor feminino tem as funções de produção dos gametas pelo processo de oogênese; é responsável pela recepção dos gametas masculinos; fornece ambiente ideal para a fertilização dos oócitos; oferece local adequado para o desenvolvimento do feto até o nascimento, além de nutrir o recém-nascido. Ademais, é o sistema que responde pela perpetuação da espécie (YOUNG e HEATH, 2001).

O ciclo reprodutivo (estral) relaciona-se com vários fenômenos como a puberdade, a maturidade sexual, e senescência. Estes são regulados por fatores ambientais, genéticos, fisiológicos, hormonais e comportamentais. O nível de fertilidade se mantém durante alguns anos, para posterior declínio gradual em virtude do envelhecimento. Além disso, o ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente pelos hormônios hipotalâmicos, esteróides secretados pelos ovários e pelas gonadotrofinas. A regulação da secreção de gonadotrofinas durante o ciclo estral, requer um balanceamento entre complexas interações hormonais, como por exemplo, modificações nas taxas de síntese, liberação e degradação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O estrógeno estimula o crescimento uterino por mecanismos que envolvem a interação do hormônio com receptores, o aumento dos processos de síntese dentro das células e o estímulo da produção de prostaglandinas pelo útero (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

No final do estro, ocorre a ovulação seguida pela formação do corpo lúteo, resultando na secreção de progesterona. A prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PG $F_{2\alpha}$) é o hormônio luteolítico uterino e controla a vida útil do corpo lúteo, que em contrapartida, regula a extensão do ciclo. Ocorrendo a gestação, a influência luteolítica uterina é anulada, pois a progesterona secretada pelo corpo lúteo é necessária para a manutenção da gestação (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Em geral, as cadelas entram na puberdade dois a três meses após ter atingido tamanho corporal adulto, o que costuma ocorrer entre seis a 12 meses de idade. As raças menores chegam à puberdade mais precocemente que aquelas de raças grandes porque atingem o tamanho adulto mais cedo. O intervalo do ciclo estral das cadelas é excepcional por causa de sua duração, com média aproximada de sete meses e meio. Este ciclo é caracterizado por várias etapas, o proestro, o estro, o diestro e o anestro (STABENFELDT e EDQVIST 1996).

O pró-estro apresenta elevação do estrogênio que é responsável pelas mudanças físicas e comportamentais da fêmea. Seu período é em média nove a 21 dias e podem ser observados edema vulvar e secreção vaginal sanguinolenta. Nesta fase, a fêmea atrai o macho por liberação de ferormônios, porém não aceita o acasalamento (CONCANNON, 1986).

No estro, há diminuição da concentração do estrogênio e elevação da progesterona; tem período de duração de seis a 12 dias e é nesta fase que ocorre a cópula. A ovulação ocorre 24 a 48 horas após o pico do hormônio luteinizante (LH). O aumento dos níveis da progesterona é responsável pela mudança comportamental da fêmea. O edema vulvar persiste, porém a secreção vaginal sanguinolenta torna-se transparente (CHRISTIANSEN, 1988).

O diestro é caracterizado por valores máximos de progesterona 20 a 30 dias após o pico de LH, diminuindo em seguida, num período de 60 dias. Em fêmeas gestantes, este período é de 56 a 68 dias e 60 a 100 dias em fêmeas não prenhes (CONCANNON, 1986).

O anestro é o período de transição dos ciclos estrais caracterizado pelo baixo nível de progesterona e pode variar de um a seis meses (MIALOT, 1988). Embora seja

considerada uma fase de quiescência reprodutiva, ao final da reparação endometrial, sabe-se que há atividade ovariana (RODRIGUES e RODRIGUES, 2002).

Utilizando-se da técnica de citologia esfoliativa e, sobretudo apoiando-se em recursos infra-estruturais adequados e competência em análise de preparações citoscópicas, pode-se estimar a fase do ciclo estral por meio da análise citológica de “swabs” vaginais, com base nas características quantitativas e morfológicas das células da mucosa vaginal. Este epitélio é estimulado pelo estrogênio a entrar em mitose. A divisão celular ocorre na lâmina basal e as células se afastam em direção ao lume vaginal para então, iniciar o processo de degeneração, pois o suprimento nutritivo torna-se escasso. As células epiteliais são classificadas basicamente em parabasais, intermediárias, superficiais nucleadas e anucleadas. Os leucócitos desaparecem do esfregaço vaginal poucos dias após o proestro. Isto ocorre porque a principal via para seu aparecimento é a espessura da parede vaginal que aumenta, bloqueando desta forma a entrada das células de defesa. Os eritrócitos presentes durante o proestro originam-se do sistema sangüíneo vascular do endométrio em desenvolvimento sob ação do estrógeno (STABENFELDT e EDQVIST 1996).

No monitoramento do ciclo estral, por meio da citologia vaginal, pode ser verificada que a fase inicial do proestro é marcada pela presença de eritrócitos, neutrófilos, células parabasais, intermediárias e superficiais. Em seguida, as células parabasais e intermediárias são substituídas pelas superficiais nucleadas e anucleadas, correspondendo 80% do total de células da preparação. A presença de eritrócitos é variável e o número de neutrófilos diminui. No estro, não se observam neutrófilos, as células superficiais representam 90% do esfregaço e podem ser encontrados eritrócitos e bactérias. No diestro, há decréscimo das células superficiais (menos de 20%) e predomínio nas parabasais e intermediárias. Os neutrófilos reaparecem e podem ser identificados eritrócitos. Durante o anestro, as células predominantes são as parabasais e intermediárias. Ocasionalmente há neutrófilos e bactérias; as hemácias estão ausentes (VANNUCCHI et al, 1997; BACHA JR. e BACHA, 2000).

2.1. Ovários

São estruturas pares e considerados a contraparte feminina dos testículos. Têm funções endócrinas (produção de estrógenos e de progesterona) e exócrinas (produção de gametas, os oócitos). Os ovários são envoltos pelo epitélio superficial, que é contínuo com o mesovário. Este epitélio é uma modificação do revestimento peritoneal visceral ovariano. São formados por duas zonas diferentes, o córtex e a medula (DI FIORI, 2000).

A medula é caracterizada pela presença dos grandes vasos sangüíneos, linfáticos e algumas estruturas embrionárias remanescentes (partes da ~~reovãii~~ – cordões sólidos e curtos de células epiteliais). É constituída por tecido conectivo frouxo rico em fibras elásticas e reticulares. Os elementos medulares são contínuos com o ligamento mesovárico (BANKS, 1992; BACHA Jr. e BACHA, 2000).

No córtex estão os folículos em vários estádios de desenvolvimento, os corpos lúteos, células intersticiais e elementos do estroma. Várias células típicas do tecido conectivo frouxo estão presentes. Contudo, este tecido é hiperplásico e contém densos agregados de fibroblastos que são adaptáveis, pleomórficos e podem assumir características epitelíoides, que posteriormente formam a teca folicular e as células glandulares intersticiais associadas aos folículos (PRIEDKALNS, 1982; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Durante o início do desenvolvimento fetal, células germinativas chamadas oogônias, migram para o córtex, onde se multiplicam por mitose. Algumas aumentam o tamanho neste período e são conhecidas como oócitos primários que iniciam a divisão meiótica (YOUNG e HEATH, 2001).

Gartner e Hiatt (2002) afirmaram que cada oócito é circundado por uma camada de células epiteliais e, juntas, estas duas estruturas constituem o folículo ovariano. Sob a influência do hormônio folículo-estimulante (FSH), ele cresce, é modificado, torna-se encapsulado pelo estroma ovariano e se desenvolve passando pelas fases primordial, primário, secundário e terciário (Graaf), da maturação.

Os primordiais caracterizam-se por apresentar o oócito envolto por única camada de células granulosas de epitélio pavimentoso simples. O crescimento das células foliculares passa de epitélio pavimentoso para cúbico, ambos simples, nos primários com uma camada de células foliculares e há início da formação da zona pelúcida. Nos primários com células foliculares estratificadas, ocorre o desenvolvimento das tecas interna e externa e possuem várias camadas de células granulosas envolvendo o oócito. Quando há várias camadas de células da granulosa e o aparecimento de cavidades denominadas antro entre as células foliculares, o folículo é dito secundário. O desenvolvimento completo das tecas, presença de grande cavidade, as formações de células que envolvem o oócito, a *oronaída* e do *anoprs* (local da junção do oócito à parede pelas células foliculares) são características correspondentes ao folículo terciário (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A ovulação é a ruptura do folículo, que se projeta na superfície do ovário na região do estigma, pois seus componentes corticais se adelgaçam. O líquido liberado neste fenômeno provavelmente auxilia o transporte do oócito da superfície ovariana para o infundíbulo. Após a ovulação, o gameta permanece envolvido pela zona pelúcida e *oronaída* (BANKS, 1992).

Nem todos os folículos em desenvolvimento chegam à ovulação, muitos se tornam atrésicos (degeneração). Este processo pode ocorrer em qualquer estágio e inclui o oócito e as células associadas (YOUNG e HEATH, 2001).

Ariyaratna e Gunawardana (1997) ao estudarem folículos ovarianos de cabras quali e quantitativamente, ao microscópio de luz, observaram que o par de ovários apresentou média de 35.092 primordiais. Verificaram que a formação do antro começou quando a granulosa obteve aproximadamente seis camadas celulares, e a zona pelúcida tornou-se visível. O diâmetro do oócito e a espessura da zona pelúcida aumentaram significativamente durante o desenvolvimento folicular alcançando médias de 119 μm e 3.2 μm , respectivamente nos gametas maiores que dois milímetros. Isto indica que o crescimento do oócito continua depois da formação do antro. O número médio de folículos normais foi 10,67 e, o de atrésicos duas vezes mais.

De Bruin et al (2001) pesquisaram folículos e oogônias de fetos humanos e observaram volumes, porcentagens, diâmetros máximos e conformações. O volume do ovário ampliou significativamente de 0,10 a 0,36 centímetros cúbicos (cm³) na segunda metade da vida intra-uterina. As médias do volume e do diâmetro folicular, aumentaram de modo significativo de 0,48% e 0,52 µm por semana, respectivamente. Folículos com oócitos circundados por uma camada de células pavimentosas foram predominantes (72%). Os primordiais diminuíram mais de 20% e os primários aumentaram de 06% para 19%. As oogônias apareceram freqüentemente antes de 30 semanas de gestação, mas depois foram raras.

Simões et al (2005) pesquisaram a morfometria de estruturas ovarianas em cabras por meio de ultra-sonografia transretal, e afirmaram que o tamanho dos folículos pré-ovulatórios em média era de 6,3 milímetros (mm). Concluíram que esta técnica é confiável porque permitiu a identificação e avaliação do desenvolvimento das várias categorias foliculares (maiores que 03 mm).

Hishinuma et al (2004) examinaram cortes histológicos ovarianos de cadelas portadoras de piometra e hiperplasia endometrial. Encontraram folículos atrésicos ou não, e células foliculares com diâmetros de 500 µm a 1000 µm. Relataram que em cadelas de grande interesse reprodutivo, a recuperação de oócitos viáveis é possível e pode ser realizada quando há exérese do ovário, ou quando há óbito do animal.

Codón et al (2001) avaliaram alterações morfométricas e ultraestruturais no oócito e nas células da granulosa do tatu (*Edax viba*) durante o crescimento folicular. Foram encontrados folículos primordiais, primários iniciais e tardios, secundários e terciários. As células da granulosa aumentaram de espessura desde o primordial ao de Graaf.

Yin e Gu (2002) atestaram o uso da morfometria celular em gônadas femininas em pacientes com tumores epiteliais ovarianos. Foram calculados: fator de forma, área e perímetro nucleares; e concluiu-se que estes parâmetros são confiáveis para os diagnósticos e prognósticos para diferentes tipos de tumores epiteliais.

2.2. Tubas Uterinas

São estruturas tortuosas que conectam os ovários aos cornos uterinos, constituindo o local de transporte dos gametas masculinos e femininos. Estes órgãos estão subdivididos em infundíbulo, ampola e istmo (PRIEDKALNS, 1982; BANKS, 1992).

O epitélio é prismático pseudoestratificado, com cílios móveis na maioria das células. Há atividade secretora nas células ciliadas situadas somente na porção cranial dos ovidutos. A camada submucosa é formada por tecido conectivo frouxo e é desprovida de glândulas (PRIEDKALNS, 1982).

A túnica mucosa é pregueada e constituída por epitélio colunar simples ciliado, e por células secretoras de muco não ciliadas. Estas se tornam maiores sob influência da progesterona, nutrem os oócitos, assim como capacitam os espermatozóides para a fertilização (BANKS, 1992).

A túnica muscular possui fibras musculares lisas em dois planos, interno circular e externo longitudinal, além disso, há também a camada serosa representada pelo peritônio (GEORGE et al, 1998).

Numerosos vasos sangüíneos estão no interior da camada serosa e formam uma área vascular bem diferenciada (BANKS, 1992).

Steinhauer et al (2004) investigaram mudanças morfológicas e a atividade proliferativa no epitélio do oviduto de cadelas em vários estádios do ciclo estral. Como principal achado, encontraram que no epitélio basal do istmo não houve variações cíclicas distintas na morfologia celular e diferenciações como as detectadas no segmento cranial do órgão.

Luvoni et al (2003) sugeriram que há uma interação positiva entre os oócitos caninos e a tuba uterina, interferindo nos processos de maturação e meiose do oócito. Atestaram que estes processos são afetados pela composição do fluido do oviduto e do contato físico entre ambos.

2.3. Útero

O útero é o local de implantação do feto e seus envoltórios. Passa por diversas modificações durante o estro e é constituído por cornos bilaterais conectados aos ovidutos, corpo, colo e vagina (PRIEDKALNS, 1982).

O endométrio é a camada mucosa e seu epitélio é prismático simples. Os produtos da secreção dos epitélios de revestimento e glandular incluem o muco, lipídios, glicogênio e proteínas. As glândulas se estendem para a lâmina própria submucosa, que é formada por tecido conectivo frouxo hiperplásico composto por numerosas células de defesa, as mononucleares e polimorfonucleares (BANKS, 1992).

Blackwell et al (2003), afirmaram que o endométrio do suíno é composto por epitélios luminal e glandular e células do estroma, que secretam a luteolisina e prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) durante o final do diestro. Em tal pesquisa os supra citados autores quantificaram por análises morfológica e morfométrica a composição celular do endométrio nos dias 12 e 16 pós-estro. Os resultados indicaram que o endométrio do suíno é constituído predominantemente de células epiteliais glandulares e pelo estroma, que parecem contribuir substancialmente na secreção endometrial de $PGF_{2\alpha}$ durante a luteólise. A contribuição do epitélio glandular nesta secreção eleva-se durante o diestro, além disso, há hiperplasia deste epitélio.

Van Cruchten et al (2004) acompanharam o padrão proliferativo fisiológico do endométrio canino durante o ciclo estral, pois afirmaram que este conhecimento colabora para a melhor compreensão das alterações tissulares durante a gestação e em condições patológicas como, por exemplo, a hiperplasia endometrial cística. Concluíram em seus estudos que há dois picos proliferativos sendo o primeiro durante o proestro na superfície epitelial, estroma, vasos e criptas; e o segundo, durante o estro nas glândulas basais.

Galabova et al (2003) pesquisaram as mudanças morfológicas do epitélio endometrial durante o diestro e anestro em cadelas. Verificaram que sobre a influência de elevados níveis de progesterona em estádios iniciais e intermediários do diestro, as criptas são formadas por protruções no lume uterino e revestidas por epitélio colunar

simples. No final desta fase do ciclo estral, estas criptas que ocupavam grande parte do endométrio, têm parte do seu estroma reduzido. No início e fase intermediária do anestro, o endométrio foi caracterizado por intensa formação de criptas na superfície que estava composta somente por células epiteliais basais, mas em sua fase final, estas desaparecem. Além disso, a proliferação foi detectada não somente na superfície do endométrio, mas também, na parte basal das glândulas, confirmando o início da primeira fase proliferativa do próximo ciclo.

O miométrio é composto por espessa camada interna circular e outra externa longitudinal. São constituídas por células musculares lisas que aumentam em número e em tamanho durante a gestação. Entre as camadas, há uma zona vascular composta de artérias, veias e vasos linfáticos que se comunicam com o endométrio (PRIEDKALNS, 1982).

O perimétrio é composto por tecido conectivo frouxo recoberto com mesotélio peritoneal. Há células musculares lisas, fibras nervosas e numerosos vasos linfáticos e sangüíneos nesta camada (PRIEDKALNS, 1982).

Augsburger e Kurzi (2004) compararam macroscopicamente e histomorfologicamente tecidos uterinos obtidos de cadelas nulíparas e múltiparas. Documentaram que, em contraste a outras espécies, o útero não aumentou em tamanho e volume mesmo após passar por pelo menos sete gestações; e concluíram que o estudo poderá ser útil na avaliação de desordens uterinas.

Freitas et al (2002), concluíram em seus estudos a respeito do comportamento das artérias extramurais do útero de cadelas sem raça definida que a artéria ovárica aparece na maioria dos casos emitindo um ramo uterino que supre apenas os cornos uterinos; a artéria uterina emite ramos diretos para os cornos e corpo uterinos e cervix e, além disso, representa o principal vaso arterial destinado ao útero, sendo que a face ventral recebe maior número de ramos arteriais.

III - OBJETIVOS

3.1. Gerais:

- Estudar histológica e morfometricamente ovários, tubas uterinas e úteros de fêmeas caninas.

3.2. Específicos:

- Analisar o citoplasma e o núcleo de oócitos foliculares:
 - Primordiais
 - Primários
 - com única camada de células foliculares (ou unilaminares)
 - com células foliculares estratificadas (ou multilaminares)
 - Secundários
 - Terciários
- Avaliar as camadas das tubas uterinas:
 - Mucosa
 - Muscular
 - Serosa
- Verificar as camadas uterinas:
 - Endométrio
 - Miométrio
 - Perimétrio

IV - MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram estudadas 15 fêmeas da espécie canina, sem raça definida, consideradas híginas após serem submetidas aos exames físico, clínico e laboratoriais (hemograma, bioquímicos e urinálise), não prenhes, sem histórico de problemas reprodutivos e em diferentes fases do ciclo estral. Os animais inclusos no experimento, foram os provenientes do Setor de Obstetrícia do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *campus* de Jaboticabal – Unesp.

4.2. Grupos experimentais

De acordo com o agendamento das cirurgias, gradativamente, as fêmeas foram classificadas em grupos de acordo com as idades em anos: Grupo (1), jovens de 1 até 3; Grupo (2), adultos jovens maiores de 3 até 5 e Grupo (3), adultos maiores de 5 até 7. Cada grupo foi constituído por cinco animais.

4.3. Citologia Vaginal

Para caracterizar a fase do ciclo estral foram realizadas citologias vaginais. Primeiramente, foi feita a higiene da genitália externa com água e sabão neutro, em seguida, com os lábios vulvares afastados, a colheita do material foi efetuada com o uso do "swab" (Kolpswab[®]) na porção cranial da vagina por movimentos de rotação em toda a circunferência vaginal, sempre mantendo contato com a mucosa. Ato contínuo, o "swab" foi rolado sobre lâminas de vidro devidamente limpas e identificadas. Após a secagem em temperatura ambiente o esfregaço foi corado pelo método de Harris-Shorr, como mencionado por Mialot (1984). A leitura foi em microscópio óptico de luz (aumento de 400X) para observações da porcentagem e morfologia das células do epitélio vaginal (THRALL e OLSON, 1999).

4.4. Procedimentos pré-anestésico, anestésico, cirúrgico e pós-cirúrgico

As gônadas, tubas uterinas e útero foram obtidos mediante ovariosalpingo-histerectomia (OSH). Os animais foram submetidos aos jejuns alimentar de 12 e hídrico de 08 horas no dia anterior a cirurgia.

A medicação pré-anestésica foi a Levomepromazina¹ (1mg/kg de peso corpóreo; via intravenosa) e analgesia com Buprenorfina² (0,01mg/Kg de peso corpóreo via subcutânea). Após 10 minutos, foram realizados os procedimentos de indução com Propofol³ (5mg/kg de peso corpóreo, via intravenosa) e manutenção anestésica com o agente inalatório isoflurano⁴ (1 a 2 V%, Isothane[®]) (FANTONI, 2002).

No trans-operatório, os animais receberam fluidoterapia intravenosa para a manutenção da volemia, e, para que em eventuais emergências, estivessem com uma veia canulada para a administração de fármacos, se necessários. A técnica cirúrgica adotada foi a descrita por FOSSUM (2002).

Enquanto as equipes de anestesiologia e cirurgia iniciavam a sedação e os procedimentos prévios à OSH, as lâminas para a citologia vaginal eram coradas pelo método Harris-Shorr. No trans-operatório, o cirurgião identificava o sistema reprodutor para que após cautelosa remoção, pudesse ser iniciada dissecação dos ovários, tubas e cornos uterinos.

¹Neozine[®] - Laboratório Aventis Farma Ltda

²Temgesic[®] - Schering Plough

³Propofol[®] – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda

⁴Isothane[®] – Laboratório Baxter HealthCare Corporation

No pós-operatório foram prescritos curativos com Rifamicina Sódica⁵ a cada 12 horas na ferida cirúrgica durante 10 dias consecutivos, Penicilina Benzatina⁶ (40.000 U.I./Kg de peso) em dias alternados totalizando três aplicações intramusculares e, finalmente, a analgesia a base de Cetoprofeno⁷ durante três dias (01mg/Kg de peso corpóreo; via oral). Os pontos da cútis foram removidos após 10 dias.

4.5. Procedimentos histológicos e morfométricos

Os ovários, tubas uterinas e útero foram lavados em água corrente para a retirada do excesso de sangue, estendidos sobre mesa limpa para a remoção do tecido adiposo e posterior dissecação das estruturas. Para excluir efetivamente problemas reprodutivos, avaliou-se macroscopicamente o sistema reprodutor, e após identificação e individualização destas estruturas, foram realizados cortes longitudinais em ambos os ovários (Figura 1) e a individualização de três fragmentos com 0,5 cm de comprimento (em média) das tubas (Figura 2) e cornos uterinos (proximal, médio e distal em relação ao ovário) (Figura 3).

Todas as amostras foram imersas em solução de Bouin durante 24 horas, e em seguida, processadas para as técnicas histológicas de rotina (desidratação, diafanização, inclusão em parafina e os blocos de todas as amostras submetidos a cortes de 05 µm de espessura). Para os ovários procederam-se cinco cortes semi-seriados (70 µm) e para cada fragmento das tubas e cornos uterinos, um corte. Ato contínuo os tecidos foram distendidos em lâminas de vidro, colocados em estufa para posterior procedimento de coloração com Hematoxilina-eosina e, finalmente, as lamínulas fixadas com Bálsamo do Canadá.

Para o estudo morfológico, os cortes histológicos foram observados e fotomicrografados em fotomicroscópio Olympus BX50.

⁵Rifocina spray[®] – Laboratório Hoeschet Marion Roussel S/A

⁶Bactopen[®] – Laboratório SEM

⁷Ketofen[®] – Rhodia-Mériex

Para a morfometria do núcleo e citoplasma dos oócitos, foram utilizadas 10 células de cada tipo (folículos primordial, primário com uma camada de células foliculares, primário com células foliculares estratificadas, secundário e terciário), perfazendo 50 folículos obtidos dos dois ovários.

Os parâmetros celulares analisados foram: área (μm^2), perímetro (μm), diâmetros máximo e mínimo (μm) e fator de forma do citoplasma e núcleo dos oócitos, mediante o sistema de imagens Image Pró-plus, acoplado a um microscópio binocular, ambos da Olympus.

O fator de forma é expresso matematicamente pela relação (perímetro)² .

$$4 \cdot \pi \cdot \text{área}$$

O menor valor deste fator é igual a um e isto significa que a forma do citoplasma ou do núcleo é semelhante à de um círculo cuja equação é $\pi \cdot R^2$, como também a partir do perímetro do círculo, cuja equação é $2 \cdot \pi \cdot R$. Pela substituição da área e do perímetro tem-se:

Fator de Forma:

$$\frac{(2 \cdot \pi \cdot R)^2}{4 \cdot \pi \cdot (\pi \cdot R^2)} = \frac{(4 \cdot \pi^2 \cdot R^2)}{(4 \pi \cdot \pi \cdot R^2)} = \frac{(4 \cdot \pi^2 \cdot R^2)}{(4 \cdot \pi^2 \cdot R^2)} = 1$$

Quando este fator for maior que a unidade, entende-se que a forma do citoplasma ou do núcleo é irregular.

Para a análise morfométrica das camadas dos cornos (endométrio, miométrio e perimétrio) e tubas uterinas (mucosa, muscular e serosa) direita e esquerda, estas estruturas foram divididas em três segmentos (proximal, médio e distal em relação ao ovário) (Figuras 2 e 3), as medidas da espessura foram em micrômetros com o uso do sistema analisador supramencionado.

As médias apresentadas nos resultados das camadas dos segmentos do útero e das tubas foram obtidas a partir dos cortes transversais das amostras. Os valores médios foram provenientes de três medições em pontos eqüidistantes, para cada fragmento.



Figura 1. Fotografia das gônadas de fêmea canina. Observa-se corte longitudinal do ovário.

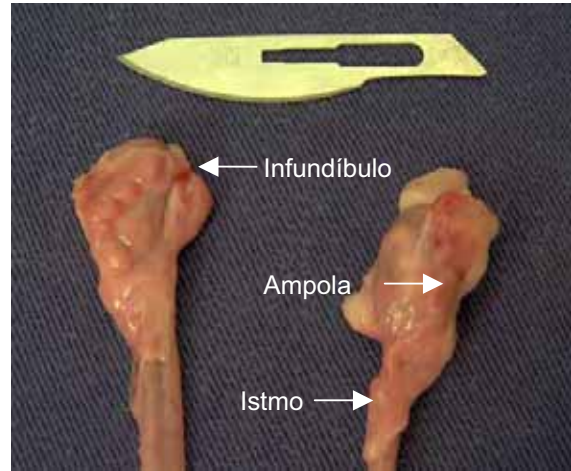


Figura 2. Fotografia das tubas uterinas de fêmea canina. Nota-se as regiões infundíbulo, ampola e istmo.

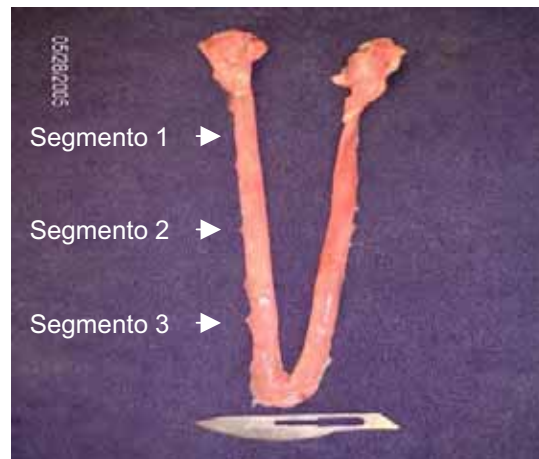


Figura 3. Fotografia dos cornos uterinos de fêmea canina. Verificam-se os segmentos 1, 2 e 3 (regiões proximal, média e distal respectivamente em relação aos ovários).

4.6. Procedimentos Estatísticos

Para os parâmetros celulares dos oócitos foi realizada análise de variância com um fator, três grupos e cinco repetições dentro de um delineamento inteiramente casualizado e o Teste Tukey (5%). Para as camadas das tubas uterinas e útero, procedeu-se a análise de variância e para complementá-la, utilizou-se o teste Tukey (5%).

V- RESULTADOS

Na Figura 4 (a) verifica-se o núcleo, que em todas as fases de desenvolvimento folicular apresenta nucléolo e cromatina frouxa bem evidentes, e o citoplasma dos folículos primordial e primário unilaminar. Nota-se que o citoplasma de ambos os folículos são envoltos por epitélio simples, porém no primordial é pavimentoso e no primário unilaminar, cúbico. Os valores médios obtidos da morfometria dos oócitos destes folículos estão expressos na tabela 1 onde detectou-se para o citoplasma que: nos primordiais houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos diâmetros máximo e mínimo, perímetro e área entre os G1 e G3 e nas figuras 5, 6 e 7, observa-se que o G3 obteve nos primordiais, respectivamente para estes parâmetros, os maiores valores médios ($34,70\mu\text{m}$, $29,05\mu\text{m}$, $107,86\mu\text{m}$ e $779,17\mu\text{m}^2$) quando comparado ao G1 ($31,71\mu\text{m}$, $26,30\mu\text{m}$, $97,65\mu\text{m}$ e $653,74\mu\text{m}^2$). Nos folículos com uma camada de células foliculares, os valores do fator de forma foram significativos ($p < 0,05$) entre os G1 e G2 em que os dados são visualizados na tabela 1, e na figura 8, nota-se que o G2 obteve o maior valor médio (1,27), quando comparado ao G1 (1,15).

Na Figura 4 (b) observa-se o folículo primário multilaminar, cujo citoplasma é revestido por epitélio estratificado cúbico (constitui a camada granulosa) e a zona pelúcida. A tabela 2 contém os valores médios da morfometria do núcleo e citoplasma dos oócitos destes folículos e verifica-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) em nenhum parâmetro entre os grupos.

Na Figura 4 (c) há um folículo secundário com várias camadas de células foliculares, em que estas células granulosas começam a se espaçar devido ao acúmulo de líquido folicular, formando cavidade denominada antro. Na tabela 2 estão indicados os valores referentes ao núcleo destes oócitos que, por sua vez, variou significativamente ($p < 0,05$) nos diâmetros máximo e mínimo, perímetro e área entre o G2 e os demais; e para complementar estas informações, nas figuras 9, 10 e 11 verifica-se, respectivamente, para estes parâmetros que o G2 obteve os maiores valores médios ($61,45\mu\text{m}$, $53,42\mu\text{m}$, $193,16\mu\text{m}$ e $3.330,40\mu\text{m}^2$) quando comparado ao

G1 (30,49 μm , 26,07 μm , 95,19 μm e 631,30 μm^2) e ao G3 (31,10 μm , 26,11 μm , 96,98 μm e 650,20 μm^2).

Na Figura 4 (d) nota-se o folículo terciário com grande antro, tecas interna e externa delimitando o folículo e o *cumulus oophorus*, que prende o oócito à parede folicular. Os valores médios da morfometria dos oócitos inclusos nestes folículos estão na tabela 3 onde verifica-se a diferença significativa ($p < 0,05$) no núcleo das variáveis diâmetro mínimo, perímetro e área entre o G2 e os demais; e nas figuras 12, 13 e 14 nota-se, respectivamente para estes parâmetros que o G2 obteve os maiores valores médios (50,48, 180,72 e 2989,30 μm^2), quando comparado ao G1 (25,66 μm , 94,55 μm e 604,20 μm^2) e em relação ao G3 (26,53 μm , 100,91 μm e 698,30 μm^2).

Na Figura 4 (e) verifica-se o infundíbulo da tuba uterina com o pregueamento da camada mucosa constituída por epitélio simples cilíndrico ciliado e secretor apoiado em tecido conectivo frouxo, formando a lâmina própria desta região. A camada muscular compõe-se de um estrato circular interno e longitudinal externo. Os valores médios das espessuras destas camadas estão descritos na tabela 4, onde houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na camada mucosa entre os G2 e G3 e na figura 15 detecta-se que o G3 teve os maiores valores médios (214,31 μm) quando comparado ao G2 (169,67 μm).

Na Figura 4 (f) nota-se a camada serosa da tuba uterina composta pela associação de epitélio simples pavimentoso (mesotélio) e tecido conectivo frouxo e as camadas muscular e mucosa em seqüência. Ao se observar os valores médios das espessuras destas camadas nas diferentes regiões da tuba uterina na tabela 4, percebe-se que na serosa do infundíbulo houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos G1 e G2 e nas tabelas 5 e 6, respectivamente, estão descritas as diferenças significativas ($p < 0,05$) na ampola e istmo, entre o G1 e os demais. No infundíbulo, G1 obteve os maiores valores (80,27 μm) quando comparado ao G3 (53,52 μm), como pode ser visualizado na figura 15; na ampola, o G1 teve os maiores valores (81,92 μm) em relação ao G2 (57,62 μm) e G3 (49,78 μm), o que pode ser evidenciado na figura 16. Na figura 17, observa-se que a camada serosa no istmo do G1 obteve valores médios maiores quando comparado aos G2 e G3, respectivamente: 85,31; 61,96 e 55,95 μm .

Na figura 4 (g) observam-se, da luz para a periferia, o endométrio com glândulas endometriais e o miométrio, com fibras musculares lisas dispostas circular e longitudinalmente. Os valores médios das espessuras destas camadas estão expressas nas tabelas 7, 8 e 9 onde denota-se que para o miométrio do segmento 1 houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o G3 e os demais (tabela 7), e no segmento 2, esta camada no G1 diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre os grupos (tabela 8). Na figura 18 verifica-se que a camada muscular no segmento 1 do G3 obteve valores médios maiores quando comparado aos G1 e G2, respectivamente, (1180,76; 648,91; 889,83 μm) e, na mesma camada, porém no segmento 2 o G1 obteve os maiores valores (1118,77 μm) quando comparado ao G2 (741,00 μm) e G3 (1029,99 μm). No segmento 3 dos cornos uterinos não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) em nenhuma camada como pode ser comprovado observando-se a tabela 9.

Na Figura 4 (h) percebe-se o perimétrio formado por tecido conectivo frouxo revestido por epitélio simples pavimentoso, o mesotélio. Os valores médios da espessura desta camada estão relacionados nas tabelas 7, 8 e 9, onde não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$).

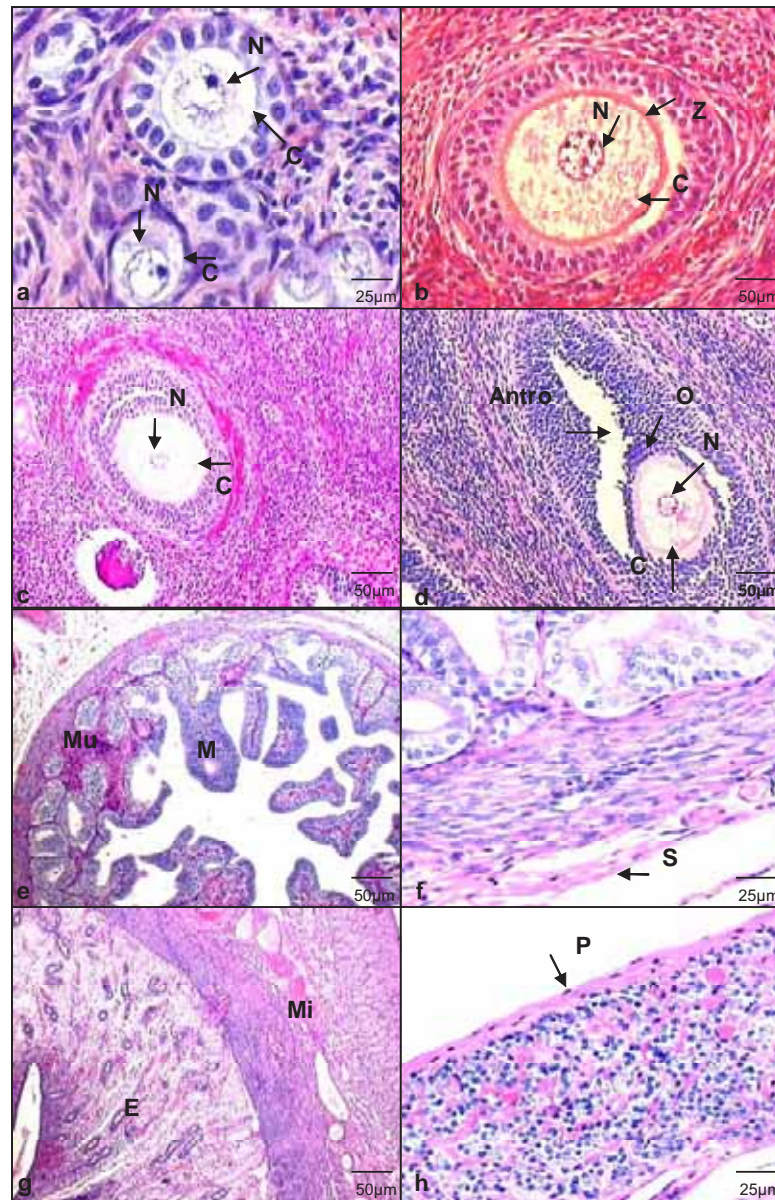


Figura 4. Fotomicrografias de ovário, tuba uterina e útero de fêmeas caninas. **(a)** Oócito de folículos primordial e primário com uma camada de células foliculares, (40X); **(b)** zona pelúcida (Z) do oócito de folículo primário com células foliculares estratificadas (20X); **(c)** oócito de folículo secundário (20X); **(d)** *cumulus oophorus* (O) do oócito de folículo terciário (20X); **(e)** Camadas mucosa (M) e muscular (Mu) da tuba uterina (20X); **(f)** Camada serosa da tuba uterina (40X); **(g)** Miométrio (Mi) e endométrio (E) (20X); **(h)** Perimétrio (P) (40X). Núcleo (N) e citoplasma (C). Coloração Hematoxilina-eosina.

Tabela 1 - Médias e erros padrões dos diâmetros máximo e mínimo (μm), perímetro (μm), área (μm^2) e fator de forma do núcleo e citoplasma de oócitos de folículos primordiais e primários com uma camada de células foliculares e respectivas médias, de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7), Jaboticabal, SP, 2005.

Folículos	PRIMORDIAIS		PRIMÁRIOS COM UMA CAMADA DE CÉLULAS FOLICULARES		
	Grupos	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
Diâmetro máximo	1	19,68 ^a ±0,51	31,71 ^b ±0,61	22,52 ^a ±0,77	45,04 ^a ±2,43
	2	19,16 ^a ±0,54	33,63 ^{ab} ±0,80	21,14 ^a ±0,73	43,67 ^a ±2,54
	3	20,45 ^a ±0,41	34,70 ^a ±0,57	21,55 ^a ±0,74	38,79 ^a ±1,32
	Médias	19,76	33,37	21,74	42,50
Diâmetro mínimo	1	16,22 ^a ±0,34	26,30 ^b ±0,52	19,23 ^a ±0,86	36,48 ^a ±2,43
	2	15,86 ^a ±0,70	27,15 ^{ab} ±0,88	17,39 ^a ±0,62	36,14 ^a ±2,34
	3	17,08 ^a ±0,38	29,05 ^a ±0,82	17,20 ^a ±0,48	32,12 ^a ±1,41
	Médias	16,39	27,50	17,94	34,91
Perímetro	1	60,90 ^a ±1,32	97,65 ^b ±2,47	68,90 ^a ±2,69	135,84 ^a ±7,10
	2	59,95 ^a ±1,72	105,05 ^{ab} ±3,59	65,71 ^a ±7,76	136,38 ^a ±7,76
	3	64,09 ^a ±0,95	107,86 ^a ±1,98	65,72 ^a ±2,02	119,40 ^a ±3,98
	Médias	61,65	103,52	66,78	130,54
Área	1	248,67 ^a ±11,50	653,74 ^b ±31,65	337,90 ^a ±29,75	1397,20 ^a ±154,06
	2	232,30 ^a ±16,05	704,79 ^{ab} ±33,49	295,57 ^a ±23,68	1338,50 ^a ±211,81
	3	262,71 ^a ±8,32	779,17 ^a ±25,70	287,65 ^a ±18,07	995,50 ^a ±74,64
	Médias	247,89	712,57	307,04	1243,73
Fator de forma	1	1,22 ^a ±0,32	1,18 ^a ±0,02	1,18 ^a ±0,03	1,15 ^b ±0,02
	2	1,27 ^a ±0,04	1,27 ^a ±0,05	1,26 ^a ±0,06	1,27 ^a ±0,05
	3	1,27 ^a ±0,03	1,20 ^a ±0,02	1,25 ^a ±0,03	1,18 ^{ab} ±0,01
	Médias	1,25	1,22	1,23	1,20

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Médias e erros padrões dos diâmetros máximo e mínimo (μm), perímetro (μm), área (μm^2), e fator de forma do núcleo e citoplasma dos oócitos dos folículos primários com células foliculares estratificadas e secundários e respectivas médias, de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7). Jaboticabal, SP, 2005.

Folículos	PRIMÁRIOS COM CÉLULAS FOLICULARES ESTRATIFICADAS			SECUNDÁRIOS	
	Grupos	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
Diâmetro máximo	1	31,88 ^a ±1,70	94,16 ^a ±3,78	30,49 ^b ±1,01	108,78 ^a ±3,25
	2	35,00 ^a ±5,14	84,15 ^a ±5,17	61,45 ^a ±6,35	115,48 ^a ±5,09
	3	31,09 ^a ±1,17	88,08 ^a ±3,80	31,10 ^b ±1,28	109,89 ^a ±6,36
	Médias	32,72	88,80	41,01	111,38
Diâmetro mínimo	1	27,16 ^a ±1,50	80,28 ^a ±3,56	26,07 ^b ±1,04	92,89 ^a ±2,35
	2	30,51 ^a ±5,07	71,37 ^a ±4,34	53,42 ^a ±5,76	95,71 ^a ±3,86
	3	25,36 ^a ±0,94	74,14 ^a ±3,16	26,11 ^b ±1,16	93,91 ^a ±5,83
	Médias	27,68	75,26	35,20	94,17
Perímetro	1	102,67 ^a ±3,79	290,97 ^a ±14,08	95,19 ^b ±4,38	340,09 ^a ±10,41
	2	109,85 ^a ±16,48	259,42 ^a ±15,17	193,16 ^a ±21,17	344,26 ^a ±12,70
	3	96,01 ^a ±4,38	270,45 ^a ±11,19	96,98 ^b ±3,92	333,73 ^a ±22,01
	Médias	102,84	273,61	128,44	339,36
Área	1	694,20 ^a ±50,03	6214,30 ^a ±581,88	631,30 ^b ±39,01	7747,00 ^a ±454,78
	2	1067,50 ^a ±477,50	4668,00 ^a ±445,08	3330,40 ^a ±602,48	8525,00 ^a ±641,38
	3	634,90 ^a ±51,85	5381,70 ^a ±414,99	650,20 ^b ±54,79	8296,00 ^a ±986,39
	Médias	798,87	5421,33	1537,30	8189,33
Fator de forma	1	1,25 ^a ±0,04	1,19 ^a ±0,07	1,21 ^a ±0,03	1,23 ^a ±0,05
	2	1,24 ^a ±0,03	1,24 ^a ±0,04	1,15 ^a ±0,03	1,19 ^a ±0,05
	3	1,22 ^a ±0,02	1,16 ^a ±0,01	1,23 ^a ±0,02	1,12 ^a ±0,02
	Médias	1,24	1,20	1,20	1,18

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Médias e erros padrões dos diâmetros máximo e mínimo (μm), perímetro (μm), área (μm^2), e fator de forma do núcleo e citoplasma dos oócitos dos folículos terciários e respectivas médias, de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7), Jaboticabal, SP, 2005.

Folículos	TERCIÁRIOS		
	Grupo	Núcleo	Citoplasma
Diâmetro máximo	1	29,61 ^a ±0,97	112,93 ^a ±3,44
	2	68,65 ^a ±73,34	112,49 ^a ±6,15
	3	32,86 ^a ±1,61	109,68 ^a ±4,79
	Médias	43,71	117,70
Diâmetro mínimo	1	25,66 ^b ±0,82	93,34 ^a ±2,94
	2	50,48 ^a ±8,35	95,31 ^a ±6,15
	3	26,53 ^b ±1,84	90,14 ^a ±5,35
	Médias	34,22	92,93
Perímetro	1	94,55 ^b ±2,84	353,00 ^a ±8,48
	2	180,72 ^a ±28,65	347,47 ^a ±19,45
	3	100,91 ^b ±6,36	338,35 ^a ±16,32
	Médias	125,39	346,27
Área	1	604,20 ^b ±38,78	8689,00 ^a ±389,56
	2	2989,30 ^a ±806,47	8627,00 ^a ±949,80
	3	698,30 ^b ±101,27	7727,00 ^a ±661,39
	Médias	1430,60	8347,67
Fator de forma	1	1,22 ^a ±0,01	1,16 ^a ±0,02
	2	1,20 ^a ±0,02	1,18 ^a ±0,03
	3	1,25 ^a ±0,03	1,22 ^a ±0,02
	Médias	1,22	1,19

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Médias e erros padrões da morfometria das camadas da tuba uterina mucosa (M), muscular (MU) e serosa (S) da região do infundíbulo da tuba uterina e suas respectivas médias; de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7). Jaboticabal, SP, 2005.

Grupos	INFUNDÍBULO		
	M	MU	S
1	210,19 ^{ab} ±13,99	96,77 ^a ±12,88	80,27 ^a ±9,56
2	169,67 ^b ±30,14	99,12 ^a ±9,26	63,69 ^{ab} ±5,0
3	214,31 ^a ±5,76	94,33 ^a ±8,67	53,52 ^b ±3,22
Médias	198,05	96,74	65,83

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Médias e erros padrões da morfometria das camadas da tuba uterina mucosa (M), muscular (MU) e serosa (S) da região da ampola da tuba uterina e suas respectivas médias de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7). Jaboticabal, SP, 2005.

AMPOLA			
Grupos	M	MU	S
1	222,26 ^a ±15,12	93,00 ^a ±11,13	81,92 ^a ±2,79
2	148,25 ^b ±22,73	105,57 ^a ±7,22	57,62 ^b ±1,36
3	189,08 ^{ab} ±15,30	99,50 ^a ±5,28	49,78 ^b ±4,58
Médias	186,53	99,36	63,11

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Médias e erros padrões da morfometria das camadas da tuba uterina mucosa (M), muscular (MU) e serosa (S) da região do istmo da tuba uterina e suas respectivas médias de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7). Jaboticabal, SP, 2005.

ISTMO			
Grupos	M	MU	S
1	218,91 ^a ±13,43	94,08 ^a ±6,38	85,31 ^a ±6,71
2	199,63 ^a ±19,26	101,38 ^a ±19,26	61,96 ^b ±1,62
3	164,79 ^a ±17,60	79,92 ^a ±3,00	55,95 ^b ±13,16
Médias	194,44	91,79	67,74

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Médias e erros padrões da morfometria (μm) do endométrio (E), miométrio (M) e perimétrio (P) do segmento 1 (proximal, médio e distal em relação ao ovário) dos cornos uterinos de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7), Jaboticabal, SP, 2005.

SEGMENTO 1			
Grupos	E	M	P
1	935,40 ^a ±23,08	648,91 ^b ±64,51	14,44 ^a ±4,39
2	1277,80 ^a ±22,80	889,83 ^b ±33,11	16,93 ^a ±4,28
3	1191,80 ^a ±163,98	1180,76 ^a ±7,25	19,91 ^a ±4,67
Médias	1135,00	906,50	17,09

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Médias e erros padrões da morfometria (μm) do endométrio (E), miométrio (M) e perimétrio (P) do segmento 2 (proximal, médio e distal em relação ao ovário) dos cornos uterinos de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7), Jaboticabal, SP, 2005.

SEGMENTO 2			
Grupos	E	M	P
1	$856,70^a \pm 135,21$	$741,00^b \pm 2,63$	$12,08^a \pm 0,40$
2	$1306,10^a \pm 36,43$	$1029,99^a \pm 27,19$	$13,78^a \pm 4,57$
3	$1047,60^a \pm 38,90$	$1118,77^a \pm 53,94$	$15,58^a \pm 0,28$
Médias	1070,13	963,25	13,81

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 9 – Médias e erros padrões da morfometria (μm) do endométrio (E), miométrio (M) e perimétrio (P) do segmento 3 (proximal, médio e distal em relação ao ovário) dos cornos uterinos de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7), Jaboticabal, SP, 2005.

SEGMENTO 3			
Grupos	E	M	P
1	$943,00^a \pm 38,63$	$824,40^a \pm 113,21$	$16,00^a \pm 1,09$
2	$1355,10^a \pm 51,59$	$961,50^a \pm 21,80$	$15,31^a \pm 1,68$
3	$1021,70^a \pm 216,53$	$1081,40^a \pm 94,58$	$18,63^a \pm 2,47$
Médias	1106,60	955,77	16,65

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

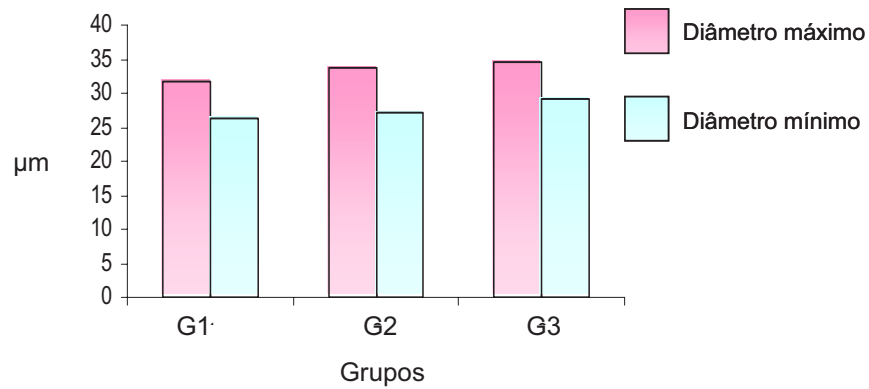


Figura 5. Representação gráfica dos valores médios dos diâmetros máximo e mínimo (μm) do citoplasma dos oócitos de folículos primordiais de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

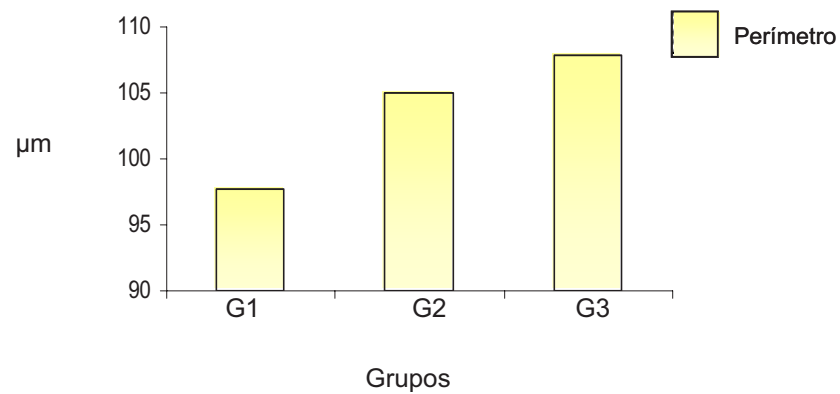


Figura 6. Representação gráfica das médias do perímetro (μm) do citoplasma de oócitos de folículos primordiais de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

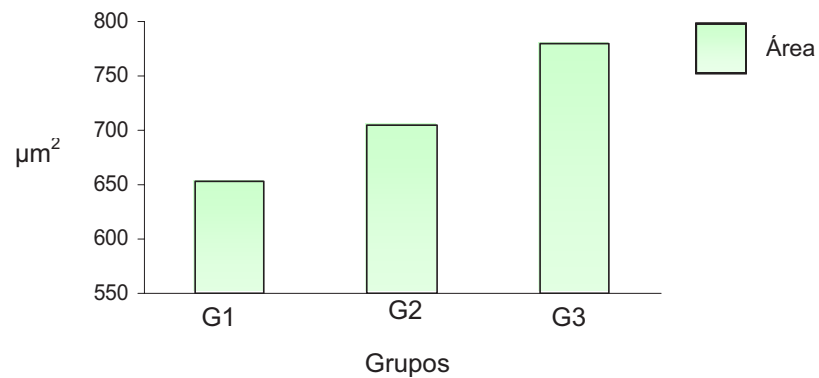


Figura 7. Representação gráfica das médias da área (μm^2) do citoplasma de oócitos de folículos primordiais de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

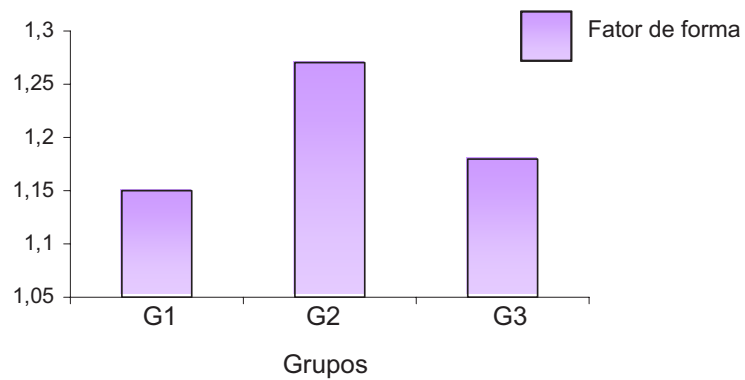


Figura 8. Representação gráfica das médias do fator de forma do citoplasma de oócitos de folículos primários com uma camada de células foliculares de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (de 1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 até 7).

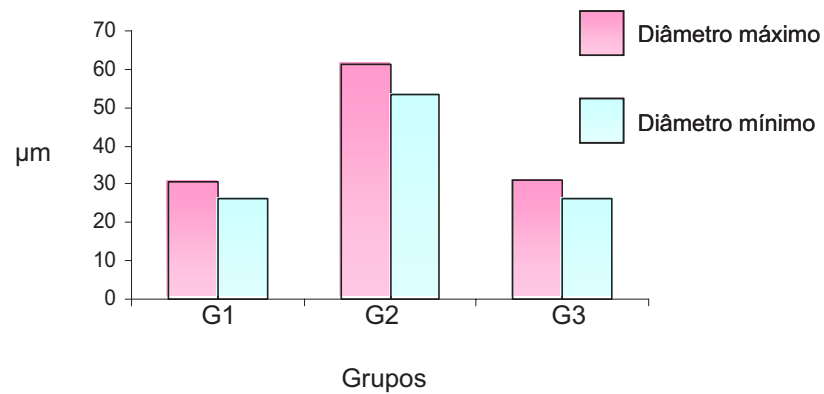


Figura 9. Representação gráfica dos valores médios dos diâmetros máximo e mínimo (μm) do núcleo dos oócitos de folículos secundários de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

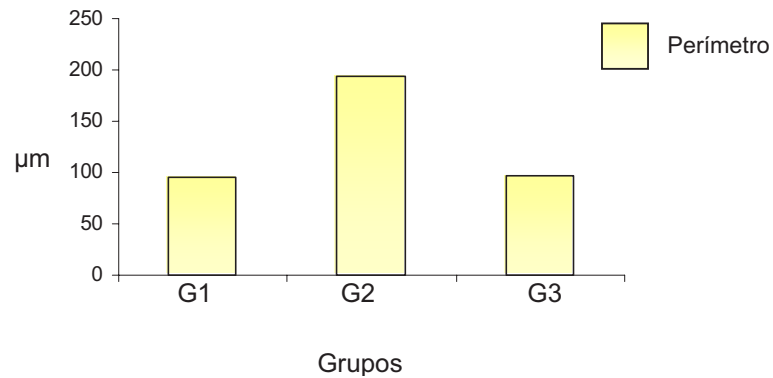


Figura 10. Representação gráfica das médias do perímetro (μm) do núcleo de oócitos de folículos secundários de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

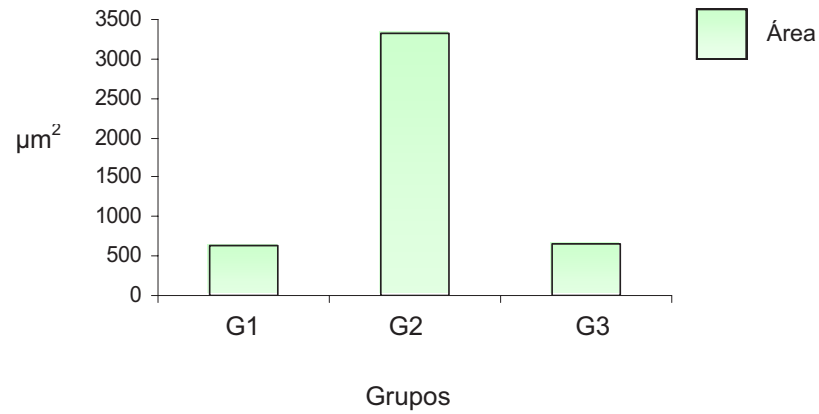


Figura 11. Representação gráfica das médias da área (μm^2) do núcleo de oócitos de folículos secundários de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

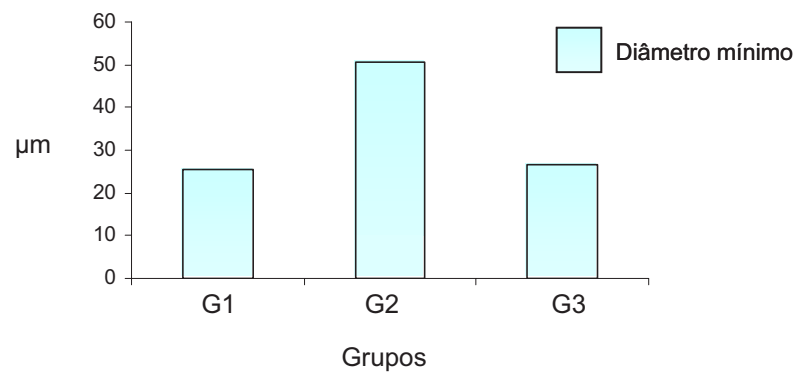


Figura 12. Representação gráfica dos valores médios do diâmetro mínimo (μm) do núcleo dos oócitos de folículos terciários de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

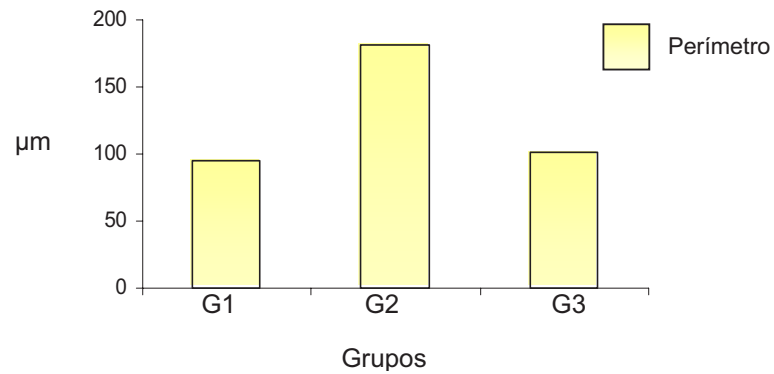


Figura 13. Representação gráfica das médias do perímetro (μm) do núcleo de oócitos de folículos terciários de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

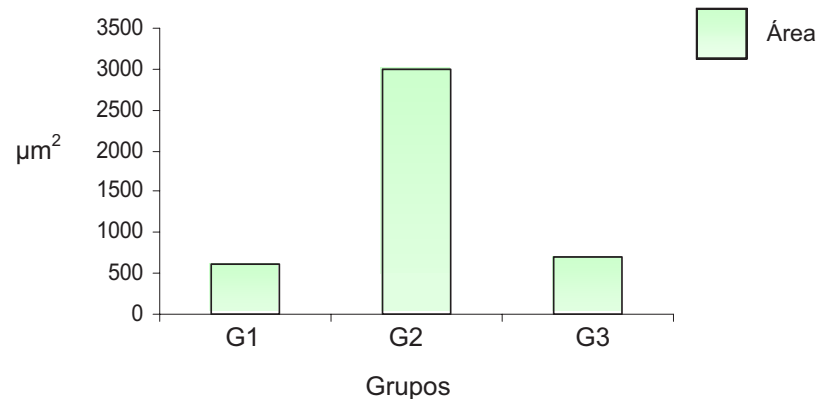


Figura 14. Representação gráfica das médias da área (μm^2) do núcleo de oócitos de folículos terciários de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

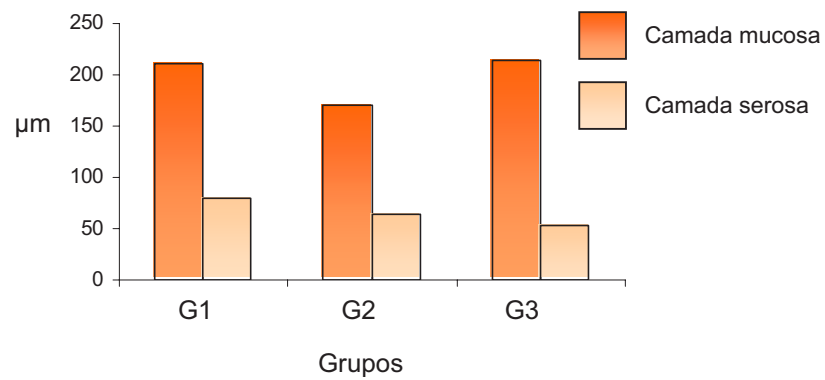


Figura 15. Morfometria das camadas da tuba uterina mucosa e serosa (μm) do segmento infundíbulo de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

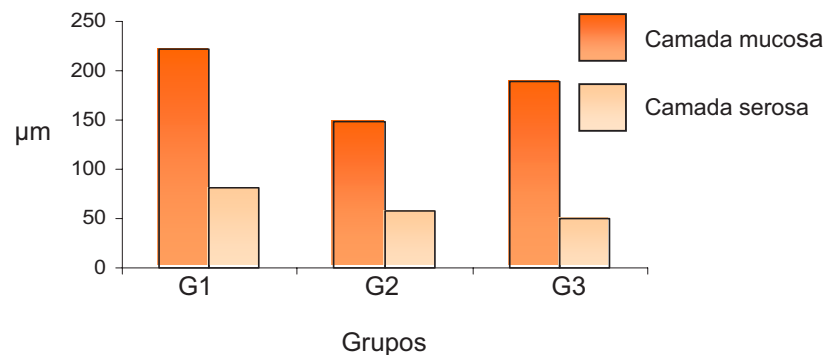


Figura 16. Morfometria das camadas da tuba uterina mucosa e serosa (μm) do segmento ampola de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

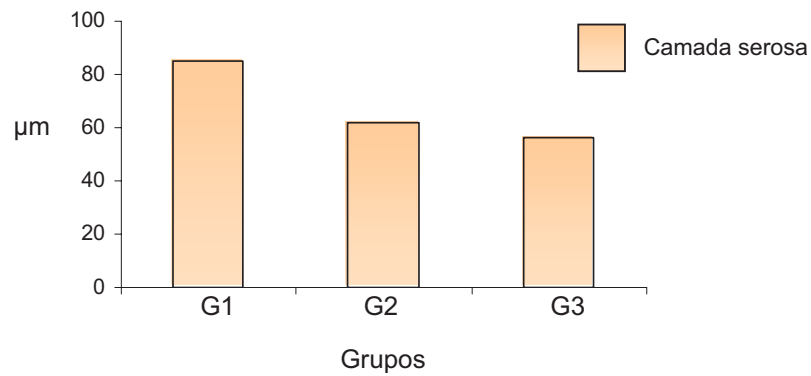


Figura 17. Morfometria da camada da tuba uterina serosa (μm) do segmento istmo de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

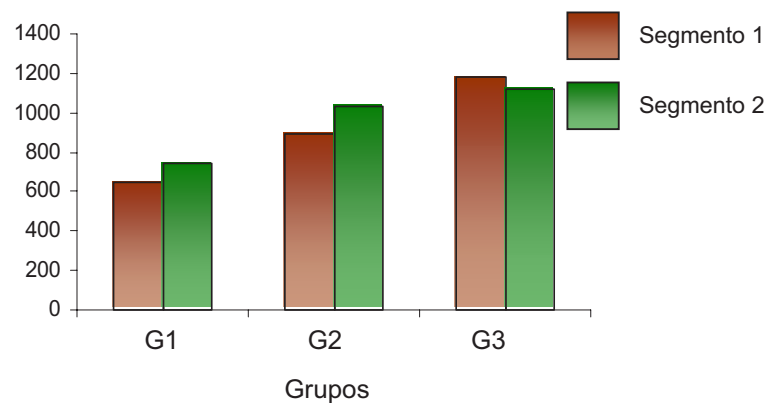


Figura 18. Representação gráfica dos valores médios da morfometria da camada miométrio (μm) dos segmentos 1 e 2 (regiões proximal e média em relação ao ovário) dos cornos uterinos de cadelas classificadas em grupos de acordo com a idade em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maior de 3 até 5) e Grupo 3 (maior de 5 até 7).

IV – DISCUSSÃO

Evidenciamos em nosso estudo o aumento no valor médio do diâmetro citoplasmático dos oócitos durante o desenvolvimento folicular, que foi maior nos folículos primordiais e secundários, e menores nos terciários quando comparados às mesmas células analisadas em cabras por Ariyaratna e Gunawardana (1997), cujos valores descritos foram, respectivamente, 29,60, 80,10 e 119,00 μm . Estes dados são interessantes, pois não são explicados tendo como base o tamanho dos ovários dos animais, evidentemente maior nas cabras. Acredita-se ser oportuno informar que a maioria dos valores médios evidenciados para o diâmetro mínimo, também aumentou seqüencialmente conforme o amadurecimento folicular.

Em relação aos diâmetros máximo e mínimo do núcleo de oócitos detectou-se, em comparação a estes mesmos parâmetros citoplasmáticos, comportamentos semelhantes. Justifica-se que não ocorreu aumento nestes valores para o citoplasma e núcleo de folículos secundários para terciários, talvez pelo término do período de crescimento destes parâmetros para o posterior evento da ovulação.

Nesta pesquisa, o valor médio do diâmetro máximo do citoplasma dos oócitos de folículos primordiais foi 33,37 μm nos grupos analisados, entretanto Bailey et al (1973) e Priedkalns (1982) descreveram que – para o mesmo parâmetro - em mulheres têm aproximadamente 20,00 μm de diâmetro e Junqueira e Carneiro (2004) referiram que o oócito em todos os tipos de folículos em humanos é uma célula volumosa e que nos primordiais, mede cerca de 25,00 μm de diâmetro. Percebe-se novamente mesmo se tratando de espécies diferentes e com ovários provavelmente maiores, que os valores nas cadelas foram superiores.

Para os oócitos de folículos primários multilaminares observamos em nossas análises o diâmetro máximo de 88,80 μm em média e Priedkalns (1982) encontrou oócitos com 80,00 μm em vacas, corroborando com nossos resultados. Para os terciários, a morfometria dos oócitos descrita foi de 150,00 a 300,00 μm dependendo da espécie (carnívoros, porcas e ovelhas) citados por esta mesma autora, e, em nossos relatos, as médias foram menores, 111,70 μm . Junqueira e Carneiro (2004) observaram

que o crescimento do oócito em humanos é muito rápido durante a primeira parte do crescimento folicular e alcançam um diâmetro máximo de cerca de 120,00 μm em folículos primários unilaminares. Os resultados obtidos neste estudo foram distintos da descrição destes autores, ao evidenciarem diâmetro médio de 42,50 μm , o que nos permite sugerir proporção adequada à anatomia das distintas espécies.

Hewitt e England (1998) avaliaram os efeitos da idade das cadelas e o tamanho dos oócitos submetidos à maturação *in vitro*. Verificaram que estas estruturas com diâmetros inferiores a 100 μm possuem menos material nuclear, e, portanto, menor competência meiótica. As fêmeas com idade superior a sete anos obtiveram bons resultados, porém, as mais jovens tiveram maior sucesso na maturação. Neste estudo, os oócitos com as médias dos diâmetros acima de 100 μm foram os provenientes de folículos secundários e as fêmeas do G2 apresentaram os maiores valores, sugerindo que esta faixa etária é a ideal para a manipulação dos oócitos e conseqüentemente, maiores são as chances de sucesso no fenômeno da meiose.

Em relação aos valores médios encontrados para o perímetro e área do núcleo de oócitos, constatou-se, em comparação ao diâmetro mínimo nuclear, comportamentos foliculares semelhantes. Sugere-se que a não ocorrência do aumento nos valores médios do perímetro e área do núcleo de folículos secundários para terciários tenha sido em conseqüência do término do crescimento daqueles e a iminente ovulação destes. Espera-se que em estudos futuros na área da oncologia na reprodução em cadelas os valores obtidos nesta pesquisa sirvam como subsídios no diagnóstico e prognóstico de neoplasias do aparelho reprodutor desta espécie, assim como os autores Watanabe et al (1997) avaliaram o adenocarcinoma ovariano em mulheres e observaram que as pacientes sobreviventes tinham valores médios da área nuclear de 59,9 μm^2 , as que possuíam linfonodos positivos 79,6 μm^2 , e as que vieram a óbito, 78,5 μm^2 . Brugghe et al (1998) citaram que a morfometria nuclear é um procedimento prático, barato, rápido e seletivo. Além disso, confirmaram que os valores médios da área nuclear elevados justificaram estágio avançado e baixa expectativa de vida em mulheres portadoras de neoplasias ovarianas.

Fazendo-se alusão ao perímetro e à área do citoplasma dos oócitos, os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram aumento seqüencial nos valores médios obtidos nos folículos. Imagina-se que por conseqüência da elevação dos valores médios do diâmetro máximo do citoplasma, representado matematicamente por $2.r$, durante todas as fases do desenvolvimento folicular, o perímetro e a área do citoplasma também manifestaram o mesmo comportamento. Sugere-se esta idéia pelo fato do citoplasma dos oócitos possuírem um contorno citoplasmático que lembra o contorno de um círculo, cuja equação para o perímetro é $2.\pi.r$ e para a área $\pi.r^2$. Estes achados são semelhantes aos dos autores Ariyaratna e Gunawardana (1997), observadores do aumento significativo do diâmetro do oócito, durante o desenvolvimento folicular.

Em relação à tuba uterina, nesta pesquisa evidenciou-se que o somatório das camadas salpíngicas foi 354,52 μm , excluindo-se o lume, o que permite estimar valor maior e aproximado para o raio, que foi extremamente menor nesta espécie, quando comparado ao mesmo parâmetro em mulheres descritos por Bailey et al (1973) cujos valores observados foram 6000,00 a 8000,00 μm de diâmetro para este segmento, subentendendo-se um raio de 3000,00 a 4000,00 μm . Supõe-se que a morfometria foi efetuada em corte histológico transversal e incluiu o lume do órgão. Steinhauer et al (2004) realizaram a imuno-histoquímica em várias regiões das tubas uterinas e observaram que o epitélio basal do istmo não exibiu variações cíclicas morfológicas como no infundíbulo e ampola de fêmeas caninas. A explicação para este fenômeno não é clara em cadelas, porém em outras espécies, há hipótese de resistência aos efeitos da progesterona.

A morfometria neste estudo revelou valores médios de: 856,70 a 1355,10 μm para o endométrio, 648,91 a 1180,76 μm para o miométrio e 1598,75 a 2392,47 μm para a espessura uterina total. Bailey et al (1973) afirmaram que a espessura uterina na mulher é de 2500,00 μm , já De Bosschere et al (2003) ao pesquisarem a morfometria da parede uterina em cadelas, obtiveram os seguintes resultados para a espessura do: endométrio, 1320,00 a 1600,00 μm ; miométrio, 1680,00 a 2030,00 μm e parede uterina, 3000,00 a 3630,00 μm . Estas diferenças, possivelmente, ocorreram em função deste estudo ter sido realizado somente na raça Beagle (três animais) em diestro, enquanto

que nesta pesquisa efetuou-se o estudo morfométrico independentemente da raça do animal (15 cadelas) em diferentes fases do ciclo estral.

Junqueira e Carneiro (2004) relataram que em humanos, a espessura do endométrio na fase folicular é 500,00 μm , e na fase luteal, Bailey et al (1973) e Junqueira e Carneiro (2004) descreveram 5000,00 μm de espessura endometrial. Neste estudo, o valor máximo encontrado para esta camada foi de 1355,10 μm .

Blackwell et al (2003) pesquisaram as camadas uterinas em suínos em três segmentos (proximal, médio e distal em relação aos ovários) e relataram que o endométrio é sempre mais espesso que o miométrio e que o primeiro diminui do sentido proximal para o distal ocorrendo o contrário para o miométrio. Estes dados podem ser importantes para observações como a de que fetos suínos apresentaram maior peso ao nascimento e melhor desenvolvimento quando posicionados nas regiões proximal e distal quando comparados às leitegadas dispostas na região medial dos cornos uterinos. Possível explicação para este fenômeno seja a distribuição glandular e do estroma nestas regiões. Além disso, constataram que não houve diferença significativa no peso e volume uterino durante o período luteolítico. Neste estudo também foram observados os mesmos efeitos destas camadas nos três segmentos, sendo que o G3 apresentou a maior espessura para o endométrio e o G2 para o miométrio.

No que diz respeito ao fator de forma do citoplasma e do núcleo de oócitos foliculares constatou-se que estes parâmetros obtiveram valores médios maiores, porém, próximos da unidade. Isto sugere que o citoplasma e o núcleo de oócitos revelaram um contorno semelhante ao de um círculo, porém mais irregular.

Watanabe et al (1997) afirmaram que a heterogeneidade nuclear caracterizada por altos valores do fator de forma e núcleos gigantes pode significar recorrência do adenocarcinoma ovariano em mulheres. Yin e Gu (2002) ao estudarem tumores epiteliais ovarianos em mulheres calcularam fator de forma, área e perímetro nucleares e afirmaram que estes valores colaboram na triagem das pacientes, no diagnóstico e prognóstico destas neoplasias.

VII -CONCLUSÕES

Em relação à biotecnologia da reprodução, sobretudo a maturação *in vitro*, pode-se sugerir que a manipulação de oócitos de folículos primordiais nas cadelas com idades entre cinco até sete anos (Grupo 3) e dos oócitos de folículos secundários e terciários nas fêmeas de três até cinco anos (Grupo 2), têm tendência a elevados índices na capacitação meiótica pois obtiveram os maiores diâmetros.

Os parâmetros área, perímetro e fator de forma poderão colaborar na triagem de pacientes com neoplasias no aparelho reprodutor de cadelas, pois a partir dos valores apresentados pode-se ter idéia da morfometria fisiológica das células estudadas, e assim, detectar possíveis alterações.

As diferentes espessuras das camadas uterinas podem ser um dos fatores que interferem no desenvolvimento diferenciado dos fetos em fêmeas caninas, porém mais estudos devem ser realizados para melhores esclarecimentos.

Os valores obtidos nesta pesquisa poderão servir como subsídios para a biotecnologia da reprodução, diagnóstico e prognóstico de enfermidades que acometem fêmeas caninas.

VIII - REFERÊNCIAS*

ARIYARATNA, H.B.S.; GUNAWARDANA, V. K. Morphology and morphometry of ovarian follicles in the goat. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 26, p.123-129, 1997.

AUGSBURGER, H.R.; KURZI, M. Histomorphologic and morphometric evaluation of the uterine horns in nulliparous and multiparous beagles. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 65, n.5, p. 552-558, 2004.

BACHA JR., W. J.; BACHA, L. M. Female reproductive system. In: _____. **Color Atlas of veterinary histology**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 221-223.

BAILEY, F. R., et al O aparelho reprodutor feminino. **Histologia**, São Paulo: Edgard Blucher, 1973. p. 491-500.

BANKS, W.J. Sistema reprodutor feminino. In: _____. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 565-574.

BLACKWELL, D. M. et al Morphometric analysis of the uterine endometrium of swine on days 12 and 16 postestrus. **The Anatomical Record Part A**, New York, v. 270A, p. 59-66, 2003.

BRUGGHE, J. et al Quantitative Prognostic Features in FIGO I Ovarian Cancer Patients without Postoperative Treatment. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 68, p. 47-53, 1998.

CHRISTIANSEN, I. J. Ginecologia da fêmea normal. In: _____. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1988, p. 30-45.

CODON, S.M. et al Ultrastructure and morphometry of ovarian follicles in the armadillo *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 61, p. 485-496, 2001.

*Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT/agosto de 2002

- CONCANNON, P. W. Canine physiology of reproduction. In: BURKE, T. J. **Small animal reproduction and infertility : a clinical approach to diagnosis and treatment**. Philadelphia: Lea& Febiger, 1986. p. 23-77.
- DE BOSSCHERE et al The use of Epostane in an Attempt to Reproduce Cystic Endometrial Hyperplasia in the Bitch. **Veterinary Research Communications**, Belgium, v. 27, p. 527-538, 2003.
- DE BRUIN, J. P. et al Morphometry of human ovaries in normal and growth-restricted fetuses. **Early Human Development**, Amsterdam, v. 60, p. 179-192, 2001.
- DI FIORI, M. S. H. Ovário. In: _____. **Atlas de histologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 166-181.
- ELLENPORT, C. R. Aparelho urogenital geral. In: GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p.139.
- FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. Protocolos anestésicos In: _____. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. p. 209-210.
- FOSSUM, T. W. et al Surgery of the reproductive and genital systems. In: _____. **Small animal surgery**. 2. ed. St. Louis: Mosby, 2002. p. 523-524.
- FREITAS, P. M. C. Comportamento das artérias extramurais do útero de cães sem raça definida (*Canis familiaris*- Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal Veterinary Research American Science**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 81-86, 2002.
- GALABOVA, G. et al Morphological changes of the endometrial epithelium in the bitch during metoestrus and anoestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 38, p. 415-420, 2003.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J.L. Sistema reprodutor feminino. In: _____. **Atlas colorido de histologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 336-352.
- GEORGE, L. L.; et al. Sistema reprodutor feminino. In: _____. **Histologia comparada**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998. p. 236-246.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Ciclos reprodutivos. In: _____. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 55-67.
- HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 957-966,

1998.

HISHINUMA, M., et al Recovery, morphological quality, and in vitro maturation of follicular oocytes from bitches with pyometra. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, p. 1652-1662, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: _____. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 432-444.

LUVONI, G. C. et al Meiosis Resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 38, p. 410-414, 2003.

MAX, M. C. et al Principais aspectos da manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. **Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 7, n. 1/3, p. 66-72, 2004.

MIALOT, J. P. Noções básicas de fisiologia sexual. In: _____. **Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos**. Porto Alegre: Metrópole, 1988. p. 17-27.

MIALOT, J. P. Exame do aparelho genital feminino. In: _____. **Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos**, Porto Alegre: Metrópole, 1988. p. 34-40.

PRIEDKALNS, J. Sistema reprodutor femenino In: DELLMAN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Zaragoza: Acribia, 1982. p. 343-369.

RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, J. L. Endocrinologia reprodutiva da cadela. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 40, p. 50-58, 2002.

SIMÕES, J. et al Morphometry of ovarian structures by transrectal ultrasonography in Serrana goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 85, p. 263-272, 2005.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L.E. Processos reprodutivos na fêmea In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 615-632.

STEINHAEUER, N. et al Morphological changes and proliferative activity in the oviductal epithelium during hormonally defined stages of the oestrus cycle in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 39, p. 110-119, 2004.

THRALL, M. A.; OLSON, P. N. The Vagina. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 2. ed. St. Louis: Mosby, 1999. p. 240-246.

VAN CRUCHTEN, S. Proliferation patterns in the canine endometrium during the estrous cycle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, p. 631-641, 2004.

VANNUCCHI, C. I. et al Técnica de citologia vaginal como método diagnóstico da fase do ciclo estral em cadelas. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 2, n. 9, p.14-19, 1997.

WATANABE, A et al Prognostic significance of nuclear morphometry in patients with stage I clear cell adenocarcinoma of the ovary P83.60. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, Stockholm, v.76, p. 46, 1997.

YIN, T. J.; GU, M. J. Diagnosis and prognosis of ovarian epithelial tumor with morphometry. **Aizheng**, v. 21, n. 7, p. 781-784, 2002.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. Sistema reprodutor feminino. In: _____. **Histologia funcional**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 341-351.

Apêndice 1 - Fase do ciclo estral de cadelas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária em anos, Grupo 1 (1 até 3), Grupo 2 (maiores de 3 até 5) e Grupo 3 (maiores de 5 a 7), Jaboticabal, SP, 2005.

Fase do ciclo estral	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Proestro	2	2	1
Estro	1	1	-
Diestro	1	1	1
Anestro	1	1	3

Apêndice 2 - Técnica de Harris-Shorr para coloração de esfregaços vaginais.

Ordem	Reativos	Tempo
1	Álcool-éter 1:2	05 minutos
2	Álcool 70%	Imergir 10X
3	Álcool 50%	Imergir 10X
4	Água destilada	Imergir 10X
5	Hematoxilina de Harris	02 minutos
6	Água destilada	Imergir 1X
7	Água destilada	Imergir 1X
8	Álcool amoniacal	01 minuto
9	Água destilada	Imergir 1X
10	Álcool 70%	Imergir 1X
11	Álcool 95%	Imergir 1X
12	Corante Shorr	02 minutos
13	Álcool 95%	Imergir 1X
14	Álcool absoluto	Imergir 1X