



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**Caracterização anatômica e histológica da cérvix de  
ovelhas da raça Santa Inês**

**CARLOS ALBERTO DA CRUZ JÚNIOR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**BRASÍLIA/DF  
SETEMBRO/ 2006**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**Caracterização anatômica e histológica da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês**

**CARLOS ALBERTO DA CRUZ JÚNIOR**

**ORIENTADORA: Dra. CAROLINA MADEIRA LUCCI**

**CO-ORIENTADORA: Dra. CONCEPTA MARGARET MCMANUS PIMENTEL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PUBLICAÇÃO: 238/ 2006**

**BRASÍLIA/DF  
SETEMBRO/ 2006**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**Caracterização anatômica e histológica da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês**

**CARLOS ALBERTO DA CRUZ JÚNIOR**

**PROJETO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO À FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO ANIMAL.**

---

**CONCEPTA McM. PIMENTEL, PhD (UnB/ FAV)**

**CO-ORIENTADORA CPF: 688 272 881 04 E-mail: [concepta@unb.br](mailto:concepta@unb.br)**

**APROVADO POR:**

---

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, PhD (UnB/ FAV)**

**ORIENTADORA CPF: 490 390 241 20 E-mail: [cmlucci@unb.br](mailto:cmlucci@unb.br)**

---

**CHRISTIANI ANDRADE AMORIM, PhD (UnB/IB)**

**EXAMINADORA INTERNA CPF: 478 699 503 78 E-mail: [amorimchris@yahoo.com](mailto:amorimchris@yahoo.com)**

---

**JOSÉ ROBSON BEZERRA SERENO, PhD (EMBRAPA/CPAC)**

**EXAMINADOR EXTERNO CPF: 224 518 114 04 E-mail: [sereno@cpac.embrapa.br](mailto:sereno@cpac.embrapa.br)**

**BRASÍLIA, 22 DE SETEMBRO DE 2006**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Da Cruz Júnior, Carlos Alberto  
Caracterização anatômica e histológica da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês. / Carlos Alberto da Cruz Júnior; orientação de Carolina Madeira Lucci. – Brasília, 2006.  
45p.: il.  
Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2006

1. Ovino 2. Santa Inês 3. Inseminação Artificial  
4. Cérvix I. LUCCI, C.M. II. PhD.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

**DA CRUZ JÚNIOR, C. A.** Caracterização anatômica e histológica da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006, 45p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Carlos Alberto da Cruz Júnior

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Caracterização anatômica e histológica da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês.

GRAU: MESTRE ANO: 2006

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se os direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Carlos Alberto da Cruz Júnior  
CPF: 884.887.641-20  
HIGS 709 BL I CASA 13  
70. 360-709 – Brasília/ DF – Brasil  
(61) 3244-4440 carlos61090@uniceub.br

Aos produtores rurais que possuem a ovinocultura como uma rotina nas atividades diárias de trabalho

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo dom da vida, por ter me fortalecido e me permitido conforme sua vontade realizar este trabalho.

Aos Meus pais Carlos Alberto da Cruz e Neila Rincon Cintra da Cruz por me incentivarem e estarem sempre ao meu lado me dando amor e carinho.

Ao meu irmão Pedro Rincon Cintra da Cruz que demonstrou alegria na minha decisão por realizar o mestrado.

À minha noiva Isabela Lopes por ter me compreendido e incentivado nos desafios diários.

Aos meus familiares e amigos que oraram por mim e estão satisfeitos pela conclusão de mais uma etapa da minha vida acadêmica.

À minha coordenadora e amiga Magda Verçosa Carvalho Branco e Silva pelo constante incentivo e compreensão.

Ao irmão e amigo Jair Ferreira Lima por ter me auxiliado em minha vida espiritual e por ser um grande parceiro nos momentos mais difíceis dessa dissertação.

Aos amigos Ricardo Oliveira, Ailton Silva e Valmir Rocha pelo importante auxílio durante a condução do preparo das lâminas histológicas.

Ao amigo e diretor de arte Carlos Magno do Amaral pela disposição em me atender com sua atividade profissional através da empresa de comunicação Magno 9, bem como pela amizade e parceria em vários momentos.

A todos os funcionários do LABOCIEN/ UniCEUB que sempre valorizaram o meu trabalho e em especial aos companheiros do BioCIEN por terem me escutado nas longas leituras de partes desse trabalho bem como pelos comentários realizados.

Ao Dr. Jairo Pereira Neves pelo despertar do tema abordado e fornecimento de importantes artigos e livros.

À Dra. Concepta Margaret McManus Pimentel por ter me orientado nos momentos iniciais, pelas aulas ministradas em suas disciplinas e principalmente por ter me concedido a oportunidade de realizar o mestrado nessa renomada instituição de ensino.

À minha orientadora Dra. Carolina Madeira Lucci pelo auxílio, confiança e disposição durante todo o processo.

Ao Sr. Francisco Nilton de Menezes Cavalcanti em nome da Associação dos Criadores de Caprinos e Ovinos de Petrolina e Região por intermediar a possibilidade de coleta de materiais para este mestrado bem como pelas visitas à campo realizadas na região.

Ao Sr. José Batista da Gama, Secretário de Desenvolvimento Rural, Reforma Agrária e Abastecimento da Prefeitura Municipal de Petrolina pelo incentivo dado à atividade realizada no matadouro e oportunidade de entrevista junto a TV Grande Rio, afiliada da Globo e Rádio Grande Rio AM 680, momentos que ressaltai a importância da Ovinocultura para a comunidade Nordestina e os aspectos sanitários do abate de ovinos no município de Petrolina, PE.

Ao Dr. Paulo Nogueira, médico veterinário, por ter mediado os contatos junto à associação dos criadores de caprinos e ovinos de Petrolina e região e junto ao abatedouro municipal de Petrolina. Sou muito grato pelo exposto bem como por ter acreditado e incentivado a realização deste trabalho científico.

Aos funcionários do Abatedouro Municipal de Petrolina por terem me concedido a oportunidade de realizar coletas imprescindíveis a este trabalho e auxílio prestado nas atividades realizadas no período noturno durante as coletas.

À UnB que me permitiu concretizar o mestrado em Ciências Agrárias.

A todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

## ÍNDICE

RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL ( I.A.) .....	3
2.2 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVELHAS .....	4
2.3 ASPECTOS MORFO-FISIOLÓGICOS DA CÉRVIX OVINA .....	7
3. JUSTIFICATIVA .....	11
4. OBJETIVOS .....	12
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	13
5.1 ETAPA 1 .....	13
5.1.1 Seleção de fêmeas.....	13
5.1.2 Avaliação morfológica/ morfométrica da cérvix.....	15
5.2 ETAPA 2 .....	17
5.2.1 Processamento histológico.....	17
5.2.2 Análise histológica.....	21
5.3 ETAPA 3.....	23
5.3.1 Análise estatística .....	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6.1 COMPRIMENTO E NÚMERO DE ANÉIS DA CÉRVIX.....	24
6.2 CLASSIFICAÇÃO DO ORIFÍCIO CERVICAL EXTERNO .....	26
6.3 DIÂMETRO MÉDIO DOS ANÉIS DA CÉRVIX .....	28
6.4 FUNDO DE SACO NO ANEL DA CÉRVIX.....	29
6.5 EPITÉLIO DE REVESTIMENTO .....	30
6.6 TIPOS DE TECIDO CONJUNTIVO .....	33
7. CONCLUSÕES .....	39
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....	40
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados dos valores médios do comprimento e número de anéis da cérnix de ovelhas da raça Santa Inês.....	26
Tabela 2 - Valores percentuais de ocorrências das formas de orifício cervical externo em ovelhas da raça Santa Inês. ....	28
Tabela 3 – Diâmetro médio ( $\pm$ DP) dos anéis da cérnix de ovelhas da raça Santa Inês.....	29
Tabela 4 – Quantidade de ovelhas da raça Santa Inês que apresentaram fundo de saco em cada anel da cérnix.....	31
Tabela 5 – Resultados percentuais de ocorrências dos tipos de epitélios de revestimento nos grupos e nas porções da cérnix de ovelhas da raça Santa Inês.....	33
Tabela 6 – Resultados percentuais de ocorrências dos tipos de tecido conjuntivo nos grupos e nas porções da cérnix de ovelhas da raça Santa Inês.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de orifício cervical externo da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês. Flap(A), bico-de-pato (B), roseta(C), espiral (D) óstio (E).....	16
Figura 2 - Esquema demonstrativo (demarcação) da mensuração do comprimento da cérvix de ovelha da raça Santa Inês.....	16
Figura 3 - Esquema demonstrativo (demarcação com números) da quantificação de anéis da cérvix de ovelha da raça Santa Inês.....	17
Figura 4 - Esquema demonstrativo da verificação de fundo de saco do anel cervical de ovelhas da raça Santa Inês. Demarcações apontam para as estruturas.....	17
Figura 5 – Esquema demonstrativo (demarcação) da verificação do perímetro interno do anel cervical de ovelha da raça Santa Inês.....	18
Figura 6 – Bloco de parafina contendo amostra da cérvix de ovelha da raça Santa Inês (A) e corte histológico transversal corado com H.E (B), observado em microscópio óptico com aumento de 100X. ....	19
Figura 7 – Cérvix de ovelhas da raça Santa Inês seccionada longitudinalmente apresentando anéis em disposição centrípeta (A, B) e centrífuga (C, D).....	25
Figura 8 – Moldes de silicone obtidos de ovelhas adulta (A) e cordeira (B). Retirado de <i>Naqvi et al. (2005)</i> .....	27
Figura 9 – Representação esquemática de uma cérvix de ovelha da raça Santa Inês. Ilustração realizada por Carlos Magno do Amaral e cedida ao autor do presente trabalho.....	30

Figura 10 – Vilosidades do epitélio de revestimento da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 100X(A) e 100X(B) (as vilosidades estão apontadas com seta).....	32
Figura 11 – Epitélio de revestimento simples cilíndrico e ciliado da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 400X (célula cilíndrica entre a demarcação).....	32
Figura 12 – Epitélio de revestimento estratificado pavimentoso da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 100X (A - entre a demarcação) e 1000X (B – demarcação de 1 célula cúbica).....	33
Figura 13 – Cílios presentes no epitélio de revestimento simples cilíndrico e ciliado da cérvix de ovelha da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 1000X (cílios apontados por setas).....	34
Figura 15 – Tecido conjuntivo denso não modelado da cérvix de ovelha da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 200X (A), 400X (B) e 1000X (C).....	35
Figura 16 –Vaso sanguíneo da cérvix de ovelha da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 100X (A) e 1000X (B).....	36
Figura 17 – Tecido conjuntivo frouxo da cérvix de ovelha da raça Santa Inês obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 1000X.....	36

Figura 18 – Células nervosa (apontada com uma seta) rodeada por tecido conjuntivo frouxo visualizada em corte histológico transversal da cérvix de ovelha da raça Santa Inês, corado com H.E e obtido por microscópio óptico com aumento de 1000X  
.....37

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - valor percentual  
Kg – quilogramas  
I.A. – inseminação Artificial  
IATC - inseminação artificial transcervical  
CIDR - Controlled Internal Drug Releasing Device  
g – grama  
mg - miligrama  
mm – milímetro  
 $\mu\text{m}$  - micrômetro  
cm – centímetro  
ml – mililitros  
h - hora  
UI – Unidade Internacional  
eCG- gonadotrofina coriônica equina  
> - maior  
< - menor  
n – número de amostras  
H.E. hematoxilina & eosina  
P – perímetro  
 $\pi$  - pi = 3,14  
r - raio  
D - diâmetro  
°C – grau Celsius  
® - marca registrada

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1– Tabela de correlação entre as variáveis morfométricas da cérnix de ovelhas da raça Santa Inês. : idade (Id), comprimento (comp) da cérnix, número de anéis (na) da cérnix, perímetro (P)- 1 a 8 (indica o número do anel), total de fundos de sacos dos anéis da cérnix (FT), fundo de saco (F) - 3 a 8 (indica o número do fundo de saco), flap (FI), bico de pato (Bp), roseta (Rs), espiral (Esp), óstio (Ost), * $p < 0,05$ , * $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ .....	46
---	----

## **Caracterização anatômica e histológica da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês**

### **RESUMO GERAL**

Visando descrever morfológicamente a cérvix de ovelhas da raça Santa Inês foram coletados 100 cérvix no abatedouro municipal de Petrolina - PE. Anatomicamente, a cérvix de ovelhas da raças Santa Inês possui comprimento médio de 4,68 cm e valores mínimo e máximo, respectivamente, de 3,00 e 7,00 cm. Possui cinco tipos de orifício externo (situados na porção caudal), denominados de flap, bico de pato, roseta, espiral e óstio, sendo que a maior ocorrência é do tipo bico de pato (51%). Apresenta em média 5,68 anéis com o formato de funil e valores mínimo e máximo de 3 e 8 respectivamente. O diâmetro interno médio dos anéis é de  $2,98 \pm 1,21$  cm, sendo o diâmetro médio do quarto anel, o menor. A formação de fundos de saco nos anéis da cérvix de ovelhas é um relato inédito, e em 100% das velha da raça Santa Inês ocorre nos 2 primeiros anéis, podendo estar presente em todos. Histologicamente, a cérvix possui em sua luz, predominantemente, epitélio de revestimento simples cilíndrico ciliado, exceto na porção caudal, que também poderá ser revestida por epitélio estratificado pavimentoso sem queratinização. Independente do tipo, o epitélio de revestimento apresenta vilosidades por toda sua extensão. Abaixo do epitélio de revestimento, encontra-se uma faixa de tecido conjuntivo denso modelado, o qual pode variar quanto à largura da área ocupada desde uma larga faixa nos animais mais jovens até uma faixa estreita nos mais velhos. Uma faixa de tecido conjuntivo denso não modelado aparece logo abaixo do tecido conjuntivo denso modelado, podendo estar ausente em alguns animais. O tecido conjuntivo frouxo está localizado abaixo do tecido conjuntivo denso não modelado, quando o mesmo estiver presente, ou abaixo do tecido conjuntivo denso modelado. Vasos e nervos são estruturas presentes. Os resultados obtidos no presente estudo podem contribuir para o desenvolvimento de programas e equipamentos comerciais de IA para a técnica transcervical e devem ser considerados em conjunto.

**Palavras-chave: anéis cervicais, inseminação artificial, morfometria, tecido.**

## **Anatomical and Morphological characterization of Santa Inês ewe cervices**

### **Abstract**

The aim of the present study was to describe the morphology of the cervix of Santa Inês ewes. One hundred cervix were collected in a slaughter house (Petrolina – PE) and used in this study. Anatomically, the cervices presented an average length of 4.68 cm, with minimum and maximum values of 3 and 7 cm respectively. The cervix presented five types of external orifices: flap, duckbill, spiral, rosette and hole. The duckbill (51%) was the most frequently observed type of external orifice. The mean number of cervical rings was 5.68, with a minimum of 3 and a maximum of 8 and they presented a funnel shape, being wider at both ends and narrower in the middle. The mean internal diameter of the rings was  $2.98 \pm 1.21$  cm, and the smallest diameter was observed in the fourth ring. The finding of “cul-de-sac” in some of the rings was a new information, and appeared in 100% on the first 2 rings. Histologically, the cervix showed a simple ciliated columnar epithelium, although at the caudal region the epithelium sometimes was showed stratified squamous cells. Villi were observed all along the cervix. Just below the epithelium, the connective tissue was divided in 3 layers: the first, closest to the epithelium, was dense and regular, the second was dense and irregular, and the third was loose. Veins, capillaries and nerves were present. In conclusion, the results obtained in this present study may contribute to the development of commercial devices and programs to artificial insemination technique (transcervical method) and they must be considered altogether.

**Key-words: Artificial Insemination, cervical rings, morphometry, tissue.**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A garantia de mercado é uma das variáveis mais desejadas por qualquer produtor agropecuário. No Brasil, o mercado de carne ovina é um dos segmentos de produção onde a demanda é infinitamente maior que a oferta, sendo necessário importar do Uruguai, da Argentina e da Nova Zelândia em torno de 50% da carne ovina consumida no Brasil (CAPRITEC, 2004).

Os três maiores rebanhos de ovinos da América Latina estão formados por Argentina, Brasil e Peru, os quais representam 68,9% da população total (DEVENDRA, 2002). No Brasil, 55% do rebanho nacional situa-se na região Nordeste, o que propicia aos seus estados, posição de destaque na pesquisa e desenvolvimento da ovinocultura. Além das tradicionais regiões produtoras, a ovinocultura expande-se para outros estados, sobretudo Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Distrito Federal (SIQUEIRA, 1996). O alto valor adaptativo desses animais, representado por sua taxa reprodutiva e sobrevivência das crias, os coloca em posição estratégica (SOUSA, 2002). Diante deste cenário, o sistema nacional de produção de ovinos tem pela frente o desafio de produzir carne de cordeiro, sob condição de pasto, com qualidade, em grande escala e com preços competitivos para o mercado consumidor.

A escolha da raça é um dos fatores de produção que determina o sucesso de um determinado sistema de criação, influenciando na quantidade e qualidade do produto final, sendo fundamental para uma exploração comercial bem sucedida, de alta produtividade e ecologicamente sustentável. Dentre os ovinos deslanados, a raça Santa Inês tem se destacado por apresentar uma excelente adaptabilidade, rusticidade, elevada prolificidade, além de uma menor susceptibilidade a endo e ectoparasitas (BUENO et al., 2000). Por isso, esta raça vem apresentando considerável aumento nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.

O desempenho reprodutivo de um rebanho está relacionado com todos os outros componentes responsáveis pelo sucesso da exploração, exercendo, desta forma, um papel estratégico no incremento da produtividade. A utilização das diversas biotécnicas da reprodução disponíveis associadas a programas de evolução genética tem permitido

avanços significativos no aumento da produtividade animal. O desenvolvimento tecnológico da inseminação artificial (IA) permite potencializar o uso de reprodutores geneticamente superiores na propriedade, elevar a relação macho:fêmea e tornar possível de forma rápida e massiva a difusão de características desejáveis dos reprodutores, e tem papel fundamental no controle de enfermidades de transmissão sexual (PARAGUEZ et al., 2000). Entretanto, os baixos índices de fertilidade obtidos com a aplicação do sêmen congelado utilizando as técnicas de inseminação vaginal e cervical dificultam uma maior difusão desta técnica entre os criadores (NAQVI et al., 1998). A principal limitação na aplicação das tecnologias da reprodução em ovinos tem sido a inabilidade em se transpor à longa e estreita cérvix, inviabilizando a deposição intra-uterina do sêmen congelado (CROY et al., 1999). O grau de dificuldade em transpor a cérvix pode variar de acordo com vários fatores tais como: efeito individual, estágio reprodutivo, intervalo pós-parto, estação reprodutiva, experiência do técnico entre outros (HUSEIN et al., 1998). Uma vez que as características anatômicas da cérvix ovina são pouco conhecidas, acredita-se que o estudo da estrutura cervical pode contribuir para o desenvolvimento de programas comerciais de IA usando a técnica transcervical (HALBERT et al., 1990).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (I.A.)**

O melhoramento genético animal visando à eficiência da produção de carne ovina fundamenta-se em seleção e sistemas de acasalamento de animais superiores, produzindo câmbios genéticos pequenos, porém cumulativos, na produção de sucessivas progênes (MARTINS et al., 2003). Um dos objetivos mais cobijados pelos produtores e técnicos tem sido o de potencializar o uso de reprodutores na propriedade. Com a monta controlada foi possível elevar a relação macho:fêmea, mas, somente com a IA é que se conseguiu extrapolar o objetivo. A IA é a biotécnica reprodutiva mais importante e utilizada, pois acelera o melhoramento genético das espécies, devido à utilização de poucos machos de elevado valor genético produzirem espermatozóides para a inseminação de centenas de fêmeas por ano (AX et al., 2000). Além disso, ela viabiliza a obtenção de produtos de reprodutores alojados em outros países ou até mesmo que já morreram, evita a transmissão de doenças venéreas e facilita a realização de testes de progênie. Entretanto, para que se obtenha sucesso em programas de IA, são necessários alguns cuidados, como a utilização de machos de boa qualidade, um bom controle sanitário e mão-de-obra especializada (MIES FILHO, 1987).

O primeiro cientista a investigar e realizar uma IA em mamíferos foi Lazzaro Spallanzani, em 1780, que inseminou uma cadela, da qual nasceram três filhotes vivos e normais. Alguns anos depois, cientistas russos demonstraram que a fecundação era possível mesmo quando o plasma seminal era substituído por um meio artificial antes da inseminação (MIES FILHO, 1987). Em bovinos e eqüinos a IA é amplamente utilizada e a aplicação desta biotécnica também vem crescendo em diversas espécies como suínos, ovinos, caprinos, bubalinos e até mesmo caninos, apresentando resultados satisfatórios. Quando utilizada em animais de produção, a IA tem como objetivo o aumento da produtividade por conseqüência do melhoramento genético. Nas espécies que se tem o domínio da técnica de inseminação artificial, como nos bovinos, ela é amplamente utilizada e apresenta bons resultados. Entretanto, na maioria das

outras espécies muito ainda tem que ser estudado para se conseguir melhores resultados, viabilizando assim a implantação de programas de IA.

Diferente das fêmeas, que liberam poucos ou apenas um oócito a cada ciclo estral, os machos liberam milhões de espermatozóides a cada ejaculação. O tempo de sobrevivência, tanto do oócito quanto dos espermatozóides, é relativamente curto e a fertilização depende primariamente de um transporte sincronizado de gametas no trato reprodutivo feminino (AX et al., 2000). Entre as espécies existe uma diferença no local de deposição do sêmen no trato reprodutivo feminino durante a monta natural. Em ovelhas e vacas, o pequeno volume de sêmen é ejaculado na porção cranial da vagina e em eqüinos e suínos, que o ejaculado possui um grande volume, a ejaculação é intra-uterina (AX et al., 2000). O local de deposição do sêmen no momento da IA é um fator bastante estudado em todas as espécies, pois é de suma importância para obtenção de bons resultados de fertilidade. Algumas técnicas de inseminação ultrapassam etapas do transporte espermático pelo útero (GINTHER, 1992).

## **2.2 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVELHAS**

Em ovinos, há uma crescente utilização da técnica de IA. Entretanto, existem algumas limitações que dificultam uma maior difusão desta técnica entre os produtores, como, por exemplo, os baixos índices de fertilidade obtidos com a aplicação do sêmen congelado, utilizando as técnicas de inseminação vaginal e cervical (NAQVI et al., 1998).

A via natural de acesso ao útero, ou seja, a via transcervical é difícil, uma vez que a cérvix constitui um dos maiores obstáculos à passagem de instrumentos, por ser de difícil dilatação, ter estrutura rígida, ser longa e possuir lúmen bastante estreito (CROY et al., 1999).

Para detecção do estro em ovelhas, é necessária a utilização de rufiões. A observação do estro deve ser realizada duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas, sendo que a inseminação somente terá sucesso, se for realizada na metade final do estro (AX et al., 2000). A inseminação deve ser realizada 12 horas após a detecção do estro. As ovelhas que forem observadas em cio pela manhã serão inseminadas à tarde

e os animais observados em cio à tarde serão inseminados na manhã seguinte (MIES FILHO, 1987). Podem ser realizadas duas inseminações no mesmo animal, sendo a primeira no momento da detecção do estro e a segunda 12 horas mais tarde, mas, de acordo com Mies Filho (1987), os resultados desta metodologia não são superiores ao da inseminação única. Entretanto, Ax et al. (2000) relatam que a realização de duas inseminações resulta em uma melhora de 5 a 10% na taxa de concepção.

A sincronização do estro em ovelhas permite um maior aproveitamento destes animais, reduzindo o intervalo entre partos (SOUSA, 2002). Existem dois protocolos de sincronização mais utilizados, sendo um a utilização de progesterona seguido de uma aplicação de eCG e o outro, a aplicação de prostaglandina. O tratamento com progesterona é realizado com implantes intravaginais por 12 a 14 dias, seguido de uma aplicação de eCG para uma maior sincronização e aumento da taxa de ovulação. Hill et al. (1998) obtiveram uma maior taxa de gestação com o uso de esponjas intravaginais contendo fluorogesterona (74,7%) do que medroxiprogesterona (64,6%). O protocolo de sincronização com prostaglandina depende da presença de um corpo lúteo funcional, podendo ser utilizada somente na estação reprodutiva (AX et al., 2000). Godfrey et al. (1999) realizaram três diferentes tipos de sincronização em ovelhas e observaram que todas as ovelhas tratadas com CIDR por 12 dias e 94,4% das ovelhas tratadas com esponja contendo 500 mg de progesterona, apresentaram estro 36 horas após o término do tratamento e 72,2% das ovelhas tratadas com prostaglandina apresentaram estro neste mesmo intervalo de tempo. Com a utilização de rufiões consegue-se realizar uma sincronização natural do estro, pois ferormônios produzidos pelo macho estimulam o início da estação reprodutiva e sincronizam as ovelhas (AX, et al. 2000).

Em ovinos existem diferentes técnicas de inseminação, a mais simples delas é a vaginal, na qual o sêmen é depositado na vagina por uma pipeta. Embora seja uma técnica de fácil aplicação, somente apresenta bons resultados com a utilização de 200 a  $400 \times 10^6$  espermatozoides oriundos de sêmen fresco, ficando a taxa de concepção entre 40 e 65% (AX et al, 2000). Na inseminação cervical as fêmeas são contidas com o posterior elevado e o sêmen é depositado na porção inicial da cérvix, com auxílio de um espécuro e uma fonte de luz. A taxa de concepção é de 60 a 70% utilizando sêmen

fresco ou refrigerado com uma dose inseminante de 100 a 200x10<sup>6</sup> células espermáticas. A aplicação de 450x10<sup>6</sup> espermatozóides oriundos de sêmen congelado, por sua vez pode resultar de 30 a 35 % de taxa de concepção (AX et al, 2000).

Souza (1993) realizando inseminação cervical com tempo fixo em ovelhas sincronizadas, com aproximadamente 200x10<sup>6</sup> espermatozóides, obteve uma taxa de gestação de 41,9% utilizando sêmen fresco e 21,5% utilizando sêmen refrigerado em Equitainer por 24 horas. Neste mesmo trabalho, quando as inseminações foram realizadas em ovelhas com estro natural, a taxa de concepção com sêmen fresco foi de 78,6% e com sêmen refrigerado de 71,4%, não sendo observada diferença estatística.

Devido à presença de pregas dispostas em diferentes planos e posições (NAQVI et al., 1998), a cérvix da ovelha é de complicada transposição, dificultando a realização da inseminação transcervical, a qual tenta-se transpor a cérvix com uma pipeta, para deposição do sêmen no corpo do útero. Esta técnica permite que um menor número de espermatozóides seja utilizado. Com a utilização de sêmen fresco e refrigerado a taxa de concepção é satisfatória, contudo quando se utiliza sêmen congelado esta taxa é de 22 a 51% (AX et al, 2000). Campbell et al. (1996) observaram lesões na cérvix de ovelhas, após a tentativa de passagem de pipeta pela mesma, o que pode prejudicar o sucesso da técnica. Wulster-Radcliffe & Lewis (2002) desenvolveram uma pipeta para inseminação transcervical, mas não observaram diferença nos resultados obtidos com a pipeta desenvolvida e a tradicionalmente utilizada. Ainda na tentativa de transpor a cérvix, alguns compostos químicos têm sido utilizados com o objetivo de provocar o seu relaxamento e assim favorecer a realização de IA transcervical. Dentre eles pode-se citar: relaxina, cocaína, ocitocina, prostaglandinas e interleucinas (SAYRE & LEWIS, 1997). Uma vez que a ocitocina promove o relaxamento cervical Sayre & Lewis (1997) compararam a eficiência da inseminação laparoscópica com a transcervical associada com a aplicação de ocitocina e concluíram que a ocitocina exógena não reduz a taxa de fertilização, mas também não melhora os resultados de fertilidade da inseminação transcervical. Uma alternativa para IA é a inseminação laparoscópica, um procedimento invasivo e caro, pois exige a utilização de um laparoscópio e um veterinário habilitado. Nesta técnica, o sêmen é depositado no lúmen dos dois cornos uterinos, permitindo, assim, a utilização de um menor número de espermatozóides. A laparoscopia viabiliza

a aplicação do sêmen congelado, apresentando uma taxa de concepção de 65 a 80% (AX et al, 2000). Ghalsasi & Nimbkar (1996) obtiveram uma taxa de concepção de 72% utilizando sêmen fresco e inseminação laparoscópica em ovelhas com estro sincronizado, 69% utilizando sêmen fresco e inseminação cervical em estro natural e 83% com monta natural em estro natural. Moses et al. (1997) concluíram que a inseminação laparoscópica pode ser empregada em larga escala com sucesso, sem a necessidade de detecção do estro, realizando as inseminações 60 horas após a remoção da esponja contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona, a qual foi mantida por 14 dias e aplicação de 200 UI de eCG.

### **2.3 ASPECTOS MORFO-FISIOLÓGICOS DA CÉRVIX OVINA**

A cérvix tem diversas funções no processo reprodutivo: facilita o transporte espermático para o interior do útero através de alterações do muco cervical no período fértil, atua como reservatório de espermatozóides e pode tomar parte na seleção de células espermáticas viáveis, impedindo, assim, a passagem das inviáveis e defeituosas (HAFEZ, 1995). Anatomicamente, a cérvix ovina é um órgão fibroso que conecta o útero com a vagina e mede de 4-7 cm, (EVANS & MAXWELL, 1990). Ela é composta predominantemente de tecido conjuntivo e muito pouco tecido muscular (EVANS & MAXWELL, 1990; HAFEZ, 1995). Desde que as propriedades do tecido conjuntivo dependem do tipo, concentração e interações das moléculas que compõem a matriz extracelular, as características funcionais da cérvix são alteradas dramaticamente pelas modificações nestes parâmetros (HAFEZ, 1995).

A cérvix caracteriza-se por uma espessa parede e uma luz constrita, sendo que o canal cervical é formado por várias proeminências. Nos ruminantes, estas têm a forma transversa ou espiralada com saliências fixas conhecidas por anéis anulares. Na ovelha, os anéis adaptam-se um ao outro, ocluindo a cérvix com segurança (HAFEZ, 1995). Esta oclusão tem como objetivo obstruir a comunicação entre o útero e a vagina para evitar infecções (EVANS & MAXWELL, 1990). A cérvix permanece firmemente fechada, exceto durante o cio, quando se relaxa levemente, permitindo a entrada dos espermatozóides no útero (EVANS & MAXWELL, 1990; HAFEZ, 1995) e durante o trabalho de parto para permitir a passagem da cria (HAFEZ, 1995). É importante

lembrar que a vagina da ovelha contém pregas que podem produzir espaços cegos ao redor da entrada da cérvix. O reconhecimento destas pregas é fundamental para que se possa introduzir a pipeta de IA no interior do anel externo da cérvix (HALBERT et al., 1990).

O tecido conjuntivo do estroma cervical é composto de substância básica, de constituintes fibrosos e de elementos celulares. A substância básica contém proteoglicanas e ácido hialurônico, sulfato de codroitina-4-6, sulfato dermatânico, sulfato de heparina e sulfato de queratina associados com proteínas. Os constituintes fibrosos incluem colágeno, elastina e reticulina, que é uma proteína resistente que se organiza em fibras e feixes. Os elementos celulares compreendem, fibroblastos, mastócitos e células errantes. O colágeno é feito de cadeias de vários aminoácidos como a glicina, prolina, hidroxiprolina, lisina e hidrolisina. Os padrões de reticulina, elastina, e substâncias interfibras básicas facilitam a dilatação da cérvix no momento do parto. A dissociação das fibras colágenas, que se separam acentuadamente umas das outras, provoca o afrouxamento dos tecidos cervicais e aumenta de maneira muito clara os espaços entre os feixes de colágenos (HAFEZ, 1995).

Durante a gestação, a cérvix pode apresentar até oito vezes o seu tamanho em massa. O crescimento aumentado e a concentração diminuída dos componentes das matrizes podem ser consequência de vários fatores, incluindo vascularização aumentada associada a um influxo de células inflamatórias (HAFEZ, 1995). Em gestações normais, o amolecimento cervical antecede a dilatação cervical e o nascimento. Um influxo de neutrófilos para o interior da cérvix parece ser um importante componente para o amolecimento cervical (OWINY et al., 1995). É postulado que colagenases, liberadas por neutrófilos recrutados, sejam importantes para a destruição das fibras de colágenos (WESTERHAUSEN-LARSON et al., 1996).

Na tentativa de se desenvolver a técnica de IA transcervical torna-se crucial o exame total da anatomia da cérvix e do canal cervical. Estudos de anatomia conduzidos por Halbert et al. (1990) em ovelhas da raça Suffolk, Cheviot, Dorset, entre outras, e por Souza (1993) em ovelhas das raças Ideal e Corriedale, reportaram que o canal cervical apresentou-se com as seguintes características gerais: uma porção caudal de entrada pelo orifício cervical externo, uma porção média em que as dobras

foram maiores e mais excêntricas e uma porção cranial, próxima ao corpo uterino, onde já não se observou uma estrutura tão evidente das dobras cervicais. Segundo os autores, a distribuição irregular e excêntrica das dobras dentro do canal cervical resulta em uma luz cervical reduzida, dificultando a passagem de instrumentos inseminantes.

Segundo Halbert et al. (1990), a prévia classificação do canal cervical poderia ser usada para prever o desempenho na transposição da cérvix durante a IA transcervical. Neste sentido, os autores citados classificaram anatomicamente o orifício cervical externo das ovelhas em quatro tipos básicos: “flap” ou aba, bico de pato, espiral e roseta. Foi verificado, de um modo geral, e para todas as raças estudadas (Suffolk, Cheviot, Dorset entre outras), uma maior frequência do tipo roseta (35%) e flap (35%). As classificações dos tipos bico de pato e espiral juntas foram atribuídas a 30% das cérvices examinadas. Entretanto, estes resultados não indicaram uma clara relação entre os tipos e o comprimento, número de anéis presentes ou a largura do ponto mais estreito e do mais largo da

cérvix, sendo assim, um inseminador não poderia usar a classificação dos orifícios externos das cérvix para prever diferenças do canal de ovelhas inseminadas.

Souza (1993) também pesquisou a incidência dos mesmos tipos de aberturas do orifício cervical externo, segundo a classificação de Halbert et al. (1990), em ovelhas Corriedale inseminadas por via cervical, verificando uma frequência acentuada para o tipo flap (69,12%). Avaliando ainda formas de aberturas cervicais de 272 genitais provenientes de ovelhas das raças Ideal e Corriedale, a autora observou novamente uma predominância do tipo flap (52,21%) em relação aos demais tipos, sendo que não foi verificada diferença na forma e frequência dos colos entre as raças. A predominância do tipo flap observada foi bem acima daquela descrita por Halbert et al. (1990).

Souza (1993) ainda observou diferença estatística no comprimento cervical médio entre as duas raças ( $5,91 \pm 0,91$  cm e  $5,65 \pm 0,81$  cm para as raças Ideal e Corriedale, respectivamente). Os diâmetros cervicais das duas raças estudadas alcançaram uma média de  $0,80 \pm 0,12$  cm e  $0,79 \pm 0,12$  cm, respectivamente, para as raças Ideal e Corriedale, sendo que a diferença entre as raças não foi significativa. Houve correlação entre o comprimento e o diâmetro cervicais para as duas

raças indicando crescimento das duas variáveis no mesmo sentido. As cérvix examinadas apresentaram um número de dobras variável com um mínimo de 3 e máximo de 9. As médias e seus respectivos desvios padrão foram  $4,89 \pm 1,07$  cm e  $4,56 \pm 0,72$  cm para as raças Ideal e Corriedale, havendo diferença significativa entre as raças. Houve correlação também entre o comprimento e o número de dobras indicando um relacionamento proporcional. O diâmetro e o número de dobras aumentaram ou diminuíram, de acordo com as variações do comprimento, como já era esperado. Uma vez que as características anatômicas da cérvix ovina apresentam diferenças entre as raças, o conhecimento da estrutura cervical dos diversos genótipos poderá permitir maior ou menor facilidade de transposição da cérvix, com efeitos diretos na prenhez (HALBERT et al., 1990; SOUZA, 1993) o que pode contribuir para o desenvolvimento de programas comerciais de IA usando a técnica transcervical (HALBERT et al., 1990).

O desenho dos instrumentos assim como as técnicas de passagem transcervical precisam se adequar a essas características anatômicas. As pregas que circundam a entrada da cérvix têm diferentes padrões e, reconhecer estes padrões, pode fazer com que a introdução de instrumentos se torne mais fácil. O ponto mais estreito do canal limitará o diâmetro dos instrumentos que podem ser utilizados. Os anéis excêntricos são os mais difíceis de serem transpostos e a distância do mais excêntrico anel deve influenciar no desenho da ponta do instrumento de IA. A localização no canal do anel mais excêntrico e a média de comprimento e número de anéis, são importantes para o desenvolvimento do método de manipulação dos instrumentos através do canal cervical (HALBERT et al., 1990).

### 3. JUSTIFICATIVA

A principal limitação que dificulta uma maior difusão comercial entre os produtores das técnicas de inseminação vaginal e cervical em ovelhas, são os baixos índices de fertilidade obtidos com sêmen fresco, refrigerado e principalmente congelado (NAQVI et al., 1998). Em contrapartida, a inseminação laparoscópica oferece os melhores resultados, porém exige a utilização de um aparelho caro (laparoscópico) e médico veterinário qualificado, sendo uma técnica de alto custo (AX et al., 2000).

Para que a IA seja comercialmente viável para ovinos, torna-se necessário o desenvolvimento de uma técnica transcervical eficiente, que oferece as vantagens de baixo custo operacional, causando pouco estresse para os animais e obter de altas taxas de concepção com sêmen fresco, resfriado ou congelado. Para tanto, o conhecimento das características cervicais torna-se imprescindível.

As caracterizações anatômicas da cérvix ovina foram obtidas das raças Ideal e Corriedale por Souza (1993) e das raças Suffolk, Cheviot e Dorset por Halbert et al. (1990). Até o momento, não há publicações científicas que descrevam as características morfológicas da cérvix de ovelhas deslanadas. Vale ressaltar que tais raças são as mais utilizadas nos trópicos como matrizes, em especial no Brasil, a raça Santa Inês .

Com base no exposto, o presente estudo tem por objetivo descrever detalhadamente as características morfológicas da cérvix, bem como do canal cervical, de ovelhas da raça Santa Inês. Acredita-se que as informações obtidas serão de fundamental importância para o desenvolvimento de instrumento e método de manipulação do canal cervical para serem utilizados de forma comercial em inseminação artificial transcervical (IATC).

## **4. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Descrever as características morfológicas da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês variando as faixas etárias entre erupção completa das pinças e início de nivelamento das pinças e aparecimento da "cauda de andorinha" nos cantos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Proceder estudo morfométrico macroscópico da cérvix ovina;
- Realizar estudo histológico da cérvix ovina.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

O experimento foi realizado em três etapas, sendo a primeira no Abatedouro Municipal de Petrolina – PE, onde se procedeu a coleta de aparelhos reprodutores femininos de ovelhas da raça Santa Inês para retirada e análise macroscópica/morfometria da cérvix, bem como coleta de peças para análise histológica. A segunda etapa foi realizada nos Laboratórios Multidisciplinares de Experimentação, Ensino e Pesquisa – LABOCIEN / UniCEUB – Brasília/DF, através do preparo e análise microscópica/histológica das peças de cérvix obtidas na primeira etapa. Na terceira etapa foi realizada análise estatística dos dados, utilizando-se o pacote estatístico SAS ( SAS, 2001).

### **5.1 ETAPA 1**

#### **5.1.1 Seleção de fêmeas**

Foram utilizadas 100 fêmeas ovinas abatidas no período entre 20/12/ 05 e 02/01/06, selecionadas de acordo com as características da arcada dentária, padrão fenotípico racial e ausência de gestação.

Arcada dentária (mudas e desgaste – faixa etária). As fêmeas foram divididas em cinco grupos de vinte animais.

Grupo 1 - erupção completa das pinças (1ª muda ) – 12 a 18 meses

Grupo 2 - erupção completa dos primeiros médios (2ª muda) – 18 a 24 meses

Grupo 3 – erupção completa dos segundos médios (3ª muda) – 24 a 30 meses

Grupo 4 – erupção completa dos cantos (4ª muda) – 30 a 38 meses

Grupo 5 – início de nivelamento das pinças e aparecimento da "cauda de andorinha" nos cantos (nivelamento das pinças) – 38 meses 48 meses

### Padrão fenotípico da raça Santa Inês (ARCO, 2006)

- Cabeça - tamanho médio, ausência de chifres, focinho alongado, perfil semi convexo, narinas proeminentes com mucosas pigmentadas (com exceção da variedade branca), boa separação entre os olhos.
- Orelhas - tamanho médio, guardando uma inserção firme, um pouco inclinada, em forma de lança, carnuda e coberta de pelos acompanhando a cara e chanfro do animal.
- Pescoço - bem inserido no corpo de tamanho regular algo alongado sem brincos.
- Dorso - reto podendo apresentar uma pequena depressão após a cernelha.
- Garupa - levemente inclinada, erguida por quartos fortes e bem postados.
- Cauda - média (não passando dos jarretes).
- Patas - de ossos vigorosos, acompanhadas de cascos escuros ou brancos, correlatados com as mucosas nasais e órbitas oculares.
- Pelagem - quatro pelagens:
  - 1) Brancas - com pelagem totalmente branca, mucosa e cascos brancos.
  - 2) Chitada - pelagem branca com manchas pretas e marrom esparsas por todo corpo.
  - 3) Vermelha - pelagem totalmente vermelha
  - 4) Preta - pelagem totalmente preta.

### Ausência de gestação

Esta etapa foi realizada através da avaliação dos caracteres macroscópico do útero, cérvix e ovários coletados a frescos após o abate.

### 5.1.2 Avaliação morfológica/morfométrica da cérvix

Após a limpeza e individualização da cérvix, realizou-se a avaliação morfológica macroscópica e morfometria considerando os seguintes aspectos:

- 1) **Forma da abertura cervical:** o orifício cervical externo foi classificado em: flap, bico-de-pato, roseta, espiral ou óstio conforme apresentado na figura 1.

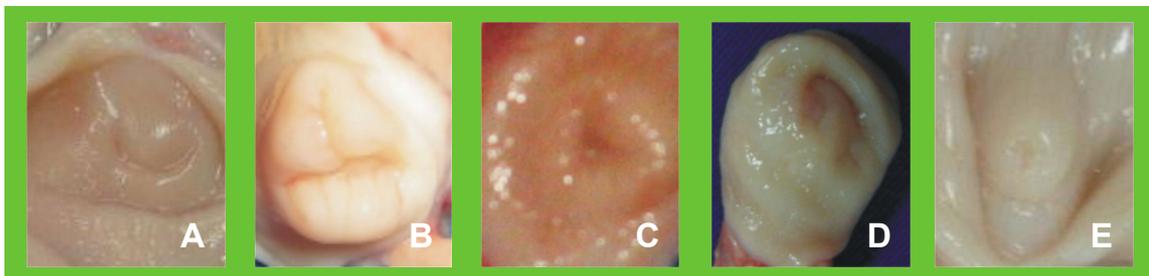


Figura 1 – Tipos de orifício cervical externo da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês. Flap (A), bico-de-pato (B), roseta(C), espiral (D) óstio (E)

- 2) **Comprimento:** tomado do orifício cervical externo até a união com o corpo uterino, através da utilização de uma régua expressa em cm (figura 2).



Figura 2 - Esquema demonstrativo (demarcação) da mensuração do comprimento da cérvix de ovelha da raça Santa Inês.

- 3) **Número de anéis:** a quantificação foi realizada após a abertura longitudinal da cérvix (figura 3).

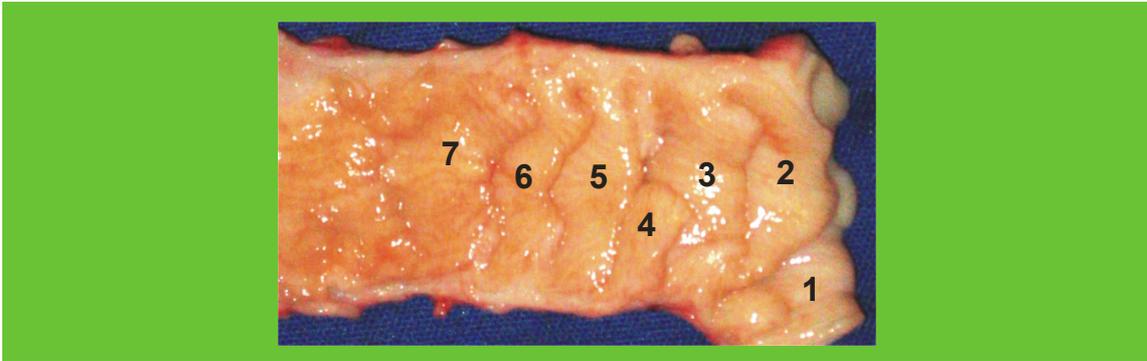


Figura 3 - Esquema demonstrativo (demarcação com números) da quantificação de anéis da cérvix de ovelha da raça Santa Inês.

- 4) **Presença de fundo de saco:** após análise quantitativa dos anéis verificou-se em cada anel a presença de fundo de saco (figura 4).

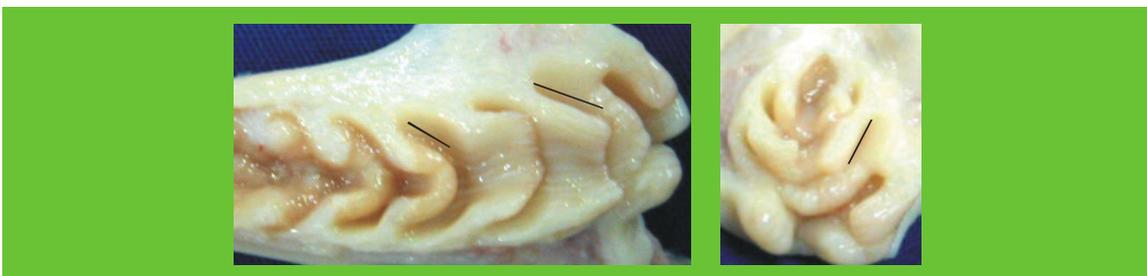


Figura 4 - Esquema demonstrativo da verificação de fundo de saco do anel cervical de ovelhas da raça Santa Inês. Demarcações apontam para as estruturas.

- 5) **Perímetro do anel:** com o auxílio de um paquímetro expresso em milímetros, foi verificado em cada um dos anéis o perímetro interno (figura 5). O diâmetro (maior reta secante passando pela circunferência = duas vezes o raio do anel) foi calculado utilizando as seguintes fórmulas:

$$P = 2\pi r \quad 2r = D$$

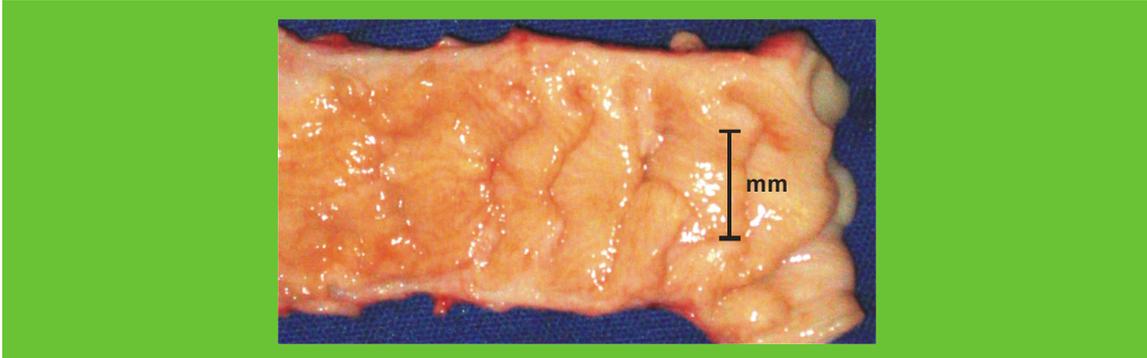


Figura 5 – Esquema demonstrativo (demarcação) da verificação do perímetro interno do anel cervical de ovelha da raça Santa Inês.

## **ANÁLISE HISTOLÓGICA/ FIXAÇÃO POR IMERSÃO**

Foram selecionadas 5 cérvix de cada grupo etário de forma aleatória totalizando 25 cérvix. De cada cérvix foram coletadas três porções de aproximadamente 2 cm de comprimento das seguintes áreas anatômicas: porção caudal (entrada pelo orifício cervical externo), porção média e porção cranial (próxima ao corpo uterino). Cada porção de tecido cervical foi acondicionada em frasco de boca larga com tampa (utilizados para coleta de urina) contendo solução tampão de aldeído fórmico neutro a 10 % (volume 40 vezes maior que o fragmento) por 24 horas. Para o tecido não boiar foi colocado sobre o mesmo um chumaço de algodão. Após este período a solução foi trocada por solução alcoólica à 70% e mantidas nesse meio líquido até o processamento histológico. Procedeu-se novamente colocação de chumaço de algodão para total imersão do material na solução.

### **5.2 ETAPA 2**

#### **5.2.1 Processamento histológico**

Após fixação em solução tampão de aldeído fórmico neutro a 10 % (formol a 40% - 100 ml, fosfato de sódio monobásico - 4g, fosfato de sódio dibásico anidro - 6,5g e água destilada -900ml) por 24 h e acondicionado em álcool 70%, o material foi

destinado à rotina histológica para inclusão em parafina (figura 6 A) e coloração por Hematoxilina de Harris & Eosina – H.E. ( figura 6 B).

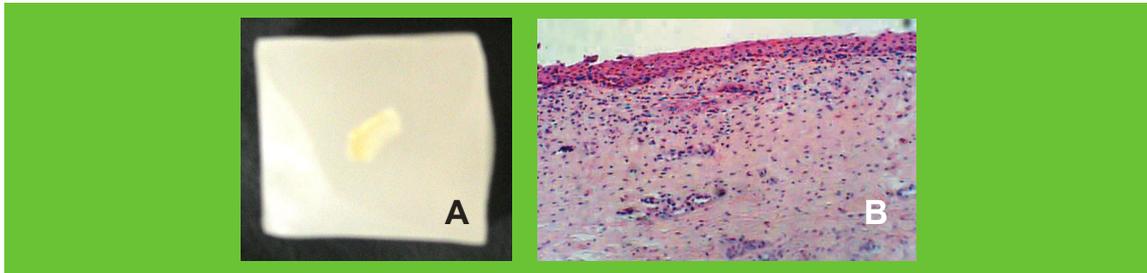


Figura 6 – Bloco de parafina contendo amostra da cérvix de ovelha da raça Santa Inês (A) e corte histológico transversal corado com H.E (B), observado em microscópio óptico com aumento de 100X.

#### Desidratação

A desidratação foi realizada através de imersão em bateria de soluções alcoólicas (1 hora em cada solução) em concentrações graduais e crescentes (80 %, 90% e 3 x 100%), visando à desidratação tecidual homogênea, pois a água não é miscível em substâncias apolares como a parafina de inclusão.

#### Diafanização

Com o objetivo de retirar o álcool da peça (a parafina dissolve-se mal no álcool) e torná-la transparente, foram realizados 3 banhos de 1 hora em xilol.

#### Inclusão

Após a remoção do álcool, o tecido foi infiltrado através de três banhos consecutivos de 1 hora cada, em parafina purificada líquida (PROQUÍMIOS®), mantida em estufa a 56 - 58°C (ponto de fusão). Posteriormente, o mesmo foi transferido para o molde contendo parafina líquida. Em poucos minutos à temperatura ambiente a

parafina endureceu formando o "bloco" de parafina contendo o fragmento de tecido em seu interior.

### Microtomia

Para visualização do material incluso em microscópios de luz, realizou-se cortes de 4 µm em micrótomo semi-automático (LEICA RM 2145®). Para cada bloco foram realizados 3 cortes viáveis para montagem de lâminas histológicas.

### Extensão

Os cortes provenientes da microtomia (enrugados/com dobras) foram colocados em banho histológico (água a 50°C) até completa visualização da extensão. Em seguida, eles foram recolhidos ("pescados") com uma lâmina de vidro previamente limpa com solução sulfocrômica, dispendo-o centralizado e paralelo ao maior eixo da lâmina. Posteriormente, foram colocados em suporte horizontal com fenda inclinada para secagem.

### Secagem do corte e escurimento da parafina excedente

As lâminas, de pé no suporte de madeira, foram colocadas em estufa com temperatura regulada em 58°C por 12 horas.

### Coloração

Os cortes dos tecidos apresentaram-se incolores após a microtomia. Para contrastar as estruturas teciduais, utilizou-se a técnica *HE (hematoxilina-eosina)*. Através da visualização a olho nu foi observada uma cor rósea-azulada, indicando ocorrência da associação comum dos corantes utilizados. O processo pelo qual os corantes hematoxilina e eosina (H.E) se ligam aos tecidos ocorre devido à presença de radicais aniônicos ou catiônicos na molécula do corante, os quais reagem através de interações eletrostáticas aos radicais de carga oposta presentes nos componentes tissulares. Assim, o corante básico interage com os componentes tissulares ácidos, que

são os radicais fosfato dos ácidos nucleicos (DNA e RNA); os radicais fosfato e carboxila dos proteoglicanos e as carboxilas presentes nos polissacarídeos ácidos (ácido hialurônico) e proteínas ácidas. Quaisquer dos componentes do tecido que reaja com um corante básico são chamados basófilos, que significa ter afinidade por bases (demonstra basofilia). Embora a hematoxilina não seja exatamente um corante básico, mas por possuir propriedades semelhantes à desses corantes, o termo basofilia é também usado quando da sua coloração. Deste modo, a coloração dos cortes por esta substância evidenciou com uma cor azul as estruturas celulares como o núcleo devido aos radicais fosfatos do DNA, o ergastoplasma devido a estes mesmos radicais presentes no RNA, as proteínas ácidas do citoplasma e algumas substâncias extracelulares como os proteoglicanos que contêm na sua estrutura glicosaminoglicanos ácidos e/ou sulfatados. O corante ácido, por sua vez, reagiu com os radicais catiônicos tissulares encontrados principalmente nas proteínas ricas em aminoácidos básicos. A coloração pela eosina, um corante ácido, evidenciou com uma cor rósea as estruturas celulares, a maioria dos filamentos protéicos do citoesqueleto, fibras colágenas, determinados tipos de grânulos dos leucócitos e as proteínas mitocondriais. As estruturas que reagem com o corante ácido são chamadas acidófilas que significa ter afinidade por ácidos (demonstra acidofilia). Quanto ao corante ácido eosina, as substâncias coradas são referidas como eosinófilas em alternância com o termo acidófilo.

### Bateria de coloração

Para desparafinar o tecido foram realizados três banhos consecutivos de 5 minutos em xilol P.A. Em cada banho foram realizadas 5 agitações. Após o xilol, realizou-se bateria de re-hidratação em álcool (100%, 100%, 95%, 80%, 70%) por 1 minuto em cada solução. O tecido foi colocado por 5 minutos em água corrente e posteriormente 2 minutos em solução de hematoxilina filtrada. Em seguida procedeu-se imersão em água corrente por 5 minutos, álcool 70% por 1 minuto e Eosina por 5 minutos. Após coloração com hematoxilina e eosina o tecido foi imerso em bateria seqüencial de 1 minuto em cada cuba de álcool (95%, 100%, 100%, 100%) e 3 de xilol.

## Montagem

Esta é a etapa final da técnica histológica, onde realizou-se a colagem da lamínula sobre o corte, com Entelan<sup>®</sup>. A lamínula impede que haja hidratação do corte pela umidade do ar ambiente, permitindo então que estas lâminas se mantenham estáveis por tempo indefinido. Após a montagem, as lâminas foram levadas à estufa (37° C) em bandejas horizontais, para secagem do adesivo.

### **5.2.2 Análise histológica**

De cada animal foram analisadas 3 lâminas das seguintes áreas anatômicas: porção caudal (entrada pelo orifício cervical externo), porção média e uma porção cranial (próxima ao corpo uterino), totalizando 75 lâminas (25 de cada área). Realizou-se a caracterização dos tecidos presentes em cada porção utilizando as seguintes classificações:

#### **Tecido Epitelial de Revestimento**

##### Classificação:

- **Quanto ao número de camadas de células: simples** (uma só camada de células), **estratificado** (várias camadas de células), e **pseudoestratificado** (uma única camada de células que tocam a lâmina basal mas que possuem núcleos em alturas diferentes).
- **Quanto à forma das células: cúbicas** (de núcleo arredondado e central), **cilíndricas** ou **prismáticas** (com núcleo elipsóide e geralmente central) e **pavimentosas** (achatadas).
- **Quanto à presença de vilosidades, cílios, e queratinização quando observadas.**

## **Tecido Conjuntivo**

### **Classificação dos tecidos conjuntivos**

Realizou-se a classificação da seguinte maneira:

**Tecido Conjuntivo Frouxo** – Caracteriza-se pela presença abundante de substância intercelular amorfa e alta celularidade, porém é relativamente pobre em fibras, que se encontram frouxamente distribuídas.

**Tecido Conjuntivo Denso** - É pobre em substância intercelular amorfa, porém relativamente rico em fibras, principalmente colágenas. Quando as fibras colágenas se distribuem de maneira difusa, não-ordenada, o tecido conjuntivo denso é chamado de não-modelado. Quando as fibras colágenas se acham dispostas de forma ordenada, formando feixes compactos e paralelos, o tecido conjuntivo denso é chamado de modelado.

O tecido conjuntivo frouxo, denso não modelado e denso modelado, foram classificados de acordo com a área ocupada com suas respectivas características nos cortes observados, sendo classificados de forma semi-quantitativa de 1 a 5 onde o valor 1 é a menor faixa (área) e o valor 5 a maior. Verificou-se também a presença ou ausência de glândulas, vasos sanguíneos e nervos no tecido conjuntivo.

A análise histológica do material foi realizada em microscópio óptico Olympus® BH-2 e a fotodocumentação em microscópio ZEISS AXIOSKOP com uma câmera digital DCM35 para microscópio acoplada. As lentes oculares grande campo utilizadas foram de 10X, onde X representa o número de vezes que a ocular ampliou o objeto observado. O aumento do objeto foi determinado pela multiplicação do aumento da ocular pelo aumento correspondente da objetiva. Foram utilizadas as lentes objetivas de 4X, 10X, 40X e 100X. Para a objetiva de 100X utilizou-se o óleo de imersão. Uma gota foi colocada em cima da lâmina e a objetiva foi abaixada até que tocasse a gota. Uma vez em foco, o óleo agiu como uma ponte entre o vidro da lâmina e o vidro da objetiva. Isto concentrou o trajeto da luz e o aumento da definição da imagem.

## **5.3 ETAPA 3**

### **5.3.1 Análise Estatística**

Os dados foram analisados através da análise de variância, usando o procedimento GLM (General Linear Model) com o grupo e anel como fatores fixos. Diferenças entre as médias significativas foram comparadas usando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As correlações entre as características foram estimadas usando o procedimento CORR do software Statistical Analysis System ( SAS, 2001 - SAS<sup>®</sup> ). As características incluíram idade do animal (grupo), comprimento e número de anéis da cervix de ovelhas da raça Santa Inês, perímetro de cada anel e total de fundos de saco nos anéis.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 COMPRIMENTO E NÚMERO DE ANÉIS DA CÉRVIX

Os resultados demonstraram que o comprimento médio da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês é de 4,68 cm, apresentando comprimento mínimo de 3,00 cm e máximo de 7,00 cm. Obteve-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey para o comprimento da cérvix entre os grupos. Os anéis possuíam formato de funil e se dispunham de forma centrípeta (figura 7 A, B), ocorrendo casos de anéis centrífugos (figura 7 C, D). Existe correlação positiva entre o comprimento da cérvix e o grupo ( $r = 0,22$   $p < 0,05$ ) e entre o comprimento e o número de anéis ( $r = 0,21$   $p < 0,05$ ).

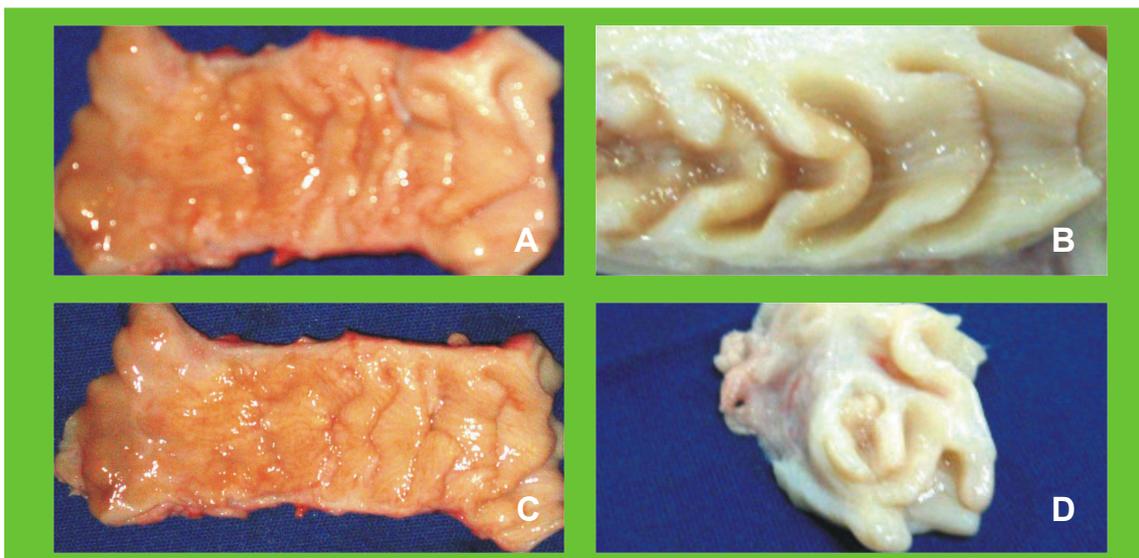


Figura 7 – Cérvix de ovelhas da raça Santa Inês seccionada longitudinalmente apresentando anéis em disposição centrípeta (A, B) e centrífuga (C, D).

Os número de anéis não apresentou diferença significativa entre os grupos, obtendo-se média de 5,68 anéis, mínimo de 3 e máximo de 8. Os valores de comprimento e número de anéis obtidos nos diferentes grupos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios do comprimento e número de anéis da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês.

GRUPO (faixa etária/meses)	n	COMPRIMENTO (cm)	No de Anéis
1 (1ª muda – 12 a 18)	20	4,12 <sup>c</sup>	5,80
2 (2ª muda – 18 a 24)	20	5,05 <sup>a</sup>	5,55
3 (3ª muda – 24 a 30)	20	4,50 <sup>b</sup>	5,75
4 (4ª muda – 30 a 38)	20	4,52 <sup>b</sup>	5,75
5 (nivelamento de pinça – 38 a 48)	20	5,20 <sup>a</sup>	5,55
TOTAL	100	4,68 (3,00-7,00)	5,68 (3 – 8)

a, b, c Diferentes subscritos na coluna diferem significativamente  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey. Os valores entre parênteses representam respectivamente os valores mínimo e máximo.

Evans e Maxwell (1990) observaram que a cérvix ovina é um órgão fibroso que tem comprimento de quatro (4) a sete (7) centímetros e conecta o útero com a vagina. Souza (1993) observou diferença estatística no comprimento cervical médio entre duas raças ( $5,91 \pm 0,91$  cm e  $5,65 \pm 0,81$  cm Ideal e Corriedale, respectivamente). Naqvi et al. (2005) observaram em ovelhas adultas das raças Malpura e Kheri comprimento cervical médio entre as duas raças de  $5,3 \pm 0,15$  cm. Os resultados obtidos no presente estudo foram comprimento médio de 4,68 cm, com valor máximo de 7,00 cm, corroborando com os resultados de Evans e Maxwell (1990), sendo o valor médio do comprimento menor que os dados de Souza (1993) e Naqvi et al. (2005). O valor mínimo encontrado para o comprimento foi de 3 cm, distinguindo do resultado obtido por Evans e Maxwell (1990).

Hafez (1995) descreveu que as ovelhas apresentam anéis que se adaptam um ao outro, ocluindo a cérvix com segurança. Esta oclusão tem como objetivo obstruir a comunicação entre o útero e a vagina para evitar infecções (EVANS E MAXWELL, 1990). Fazendo moldes de silicone Naqvi et al. (2005) descreveram que os anéis da cérvix apresentam formato de cone (figura 8), corroborando com o formato encontrado no presente trabalho.

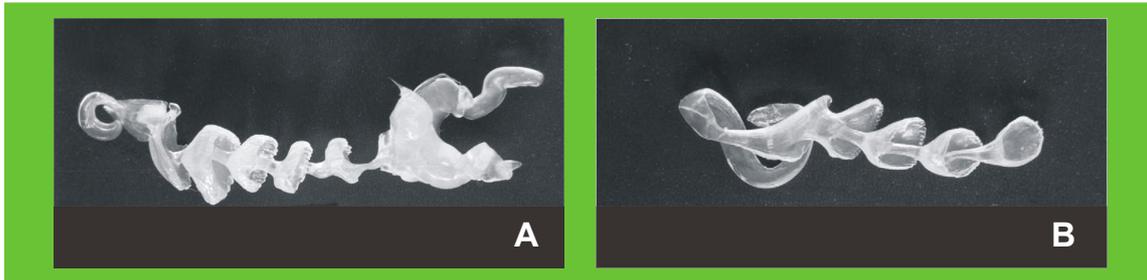


Figura 8 – Moldes de silicone obtidos de ovelha adulta (A) e cordeira (B). Retirado de Naqvi *et al.* (2005).

Estudando as raças Ideal e Corriedale Souza (1993) obteve um número de dobras variável, com um mínimo de 3 e um máximo de 9. As médias obtidas foram  $4,89 \pm 1,07$  cm e  $4,56 \pm 0,72$  cm para as raças Ideal e Corriedale respectivamente, havendo diferença significativa entre as raças. Naqvi *et al.* (2005) observaram em ovelhas adultas das raças Malpura e Kheri um número médio de  $3,44 \pm 0,22$  anéis. No presente trabalho, conforme apresentado na tabela 1, a quantidade média de anéis cervicais é de 5,68, média maior que as obtidas pelos autores citados acima. O valor mínimo de anéis foi de 3, corroborando com os dados de Souza (1993) e a quantidade máxima de 8, menor que do resultado obtido por este autor.

## 6.2 CLASSIFICAÇÃO DO ORIFÍCIO CERVICAL EXTERNO

A avaliação do orifício cervical externo de ovelhas da raça Santa Inês permitiu sua classificação em 5 tipos. Pelo que se observa na tabela 2, houve uma frequência acentuada da forma bico de pato (51%) em relação às demais. Não foi observada diferença significativa no tipo de orifício externo cervical entre os grupos. Houve correlação positiva e negativa entre o tipo de orifício externo da cérvix e o comprimento da cérvix respectivamente. Os valores obtidos para a correlação de cada orifício, tipo flap, bico de pato, roseta e espiral com o comprimento são respectivamente, 0,10 ( $p < 0,01$ ), 0,03 ( $p < 0,05$ ), - 0,10 ( $p < 0,01$ ), - 0,07 ( $p < 0,05$ ). Não houve correlação significativa entre o orifício externo do tipo óstio e o comprimento da cérvix. Os resultados do presente estudo possuem significância alta e baixa correlação.

Tabela 2 - Valores percentuais de ocorrências das formas de orifício cervical externo em ovelhas da raça Santa Inês.

GRUPO (faixa etária/meses)	n	TIPO DE ORIFÍCIO CERVICAL EXTERNO %				
		FL	BP	RS	ES	OST
1 (1ª muda – 12 a 18)	20	10	45	15	20	10
2 (2ª muda – 18 a 24)	20	0	55	15	15	15
3 (3ª muda – 24 a 30)	20	5	55	25	10	5
4 (4ª muda – 30 a 38)	20	15	55	10	15	5
5 (nivelamento de pinça – 38 a 48)	20	20	45	5	15	15
TOTAL	100	10	51	14	15	10

n = número de amostras; FL= flap; BP = bico-de-pato; RS = roseta; ES = espiral; OST = óstio

De um modo geral Halbert et al. (1990) verificaram, para todas as raças estudadas (Sufolk, Cheviot, Dorset entre outras), uma maior freqüência do tipo roseta (35%) e flap (35%). As classificações dos tipos bico de pato e espiral juntas foram atribuídas a 30% das cérvices examinadas. Souza (1993) também pesquisou a incidência dos mesmos tipos de aberturas do orifício cervical externo, segundo a classificação de Halbert et al. (1990), em ovelhas Corriedale inseminadas por via cervical, verificando uma freqüência acentuada para o tipo flap (69,12%). Avaliando ainda formas de aberturas cervicais de 272 genitais provenientes de ovelhas das raças Ideal e Corriedale, Souza (1993) observou novamente uma predominância do tipo flap (52,21%) em relação aos demais tipos, sendo que não foi verificada diferença na forma e freqüência dos colos entre as raças. A predominância do tipo flap observada foi bem acima daquela descrita por Halbert et al. (1990). Naqvi et al. (2005) observaram em ovelhas adultas das raças Malpura e Kheri predominância de orifício do tipo espiral (40%), divergindo dos resultados encontrados por Halbert et al. (1990) e Souza (1993). No presente estudo, ocorreu contradição aos relatos de Halbert et al. (1990), Souza (1993) e Naqvi et al. (2005), pois a maior freqüência de abertura cervical externa obtida foi do tipo bico de pato (51%), em relação aos demais tipos, conforme apresentado na tabela 2. Halbert et al. (1990) não encontraram correlação entre os tipos de orifício externo e o comprimento da cérvix, divergindo dos resultados obtidos no presente trabalho.

### 6.3 DIÂMETRO MÉDIO DOS ANEIS DA CÉRVIX

Na tabela 3 são apresentados os valores encontrados para os diâmetros cervicais de ovelhas da raça Santa Inês, que alcançaram uma média de  $2,98 \pm 1,21$  mm, com uma amplitude média mínima no quarto anel ( $2,72 \pm 1,02$  mm) e máxima no oitavo anel ( $3,78 \pm 1,08$  mm). Embora exista uma tendência à diminuição do diâmetro, no sentido do quarto anel, seguido de um aumento, as diferenças entre os valores não foram significativas. Existe correlação positiva entre o comprimento e o perímetro no primeiro anel ( $r = 0,35$   $p < 0,001$ ). Os resultados do presente estudo possuem alta significância e baixa correlação.

Tabela 3 –Diâmetro médio ( $\pm$ DP) dos anéis da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês.

Anel.	Diâmetro (mm)
1º	$3,54 \pm 1,62$
2º	$2,84 \pm 1,26$
3º	$2,78 \pm 1,01$
4º	$2,72 \pm 1,02$
5º	$2,90 \pm 1,02$
6º	$2,90 \pm 1,00$
7º	$3,20 \pm 0,84$
8º	$3,78 \pm 1,08$
Total de anéis	$2,98 \pm 1,21$

Souza (1993) observou os diâmetros cervicais das raças Ideal e Corriedale, sendo que as mesmas alcançaram respectivamente uma média de  $0,80 \pm 0,12$  cm e  $0,79 \pm 0,12$  cm. No entanto, a diferença entre as raças não foi significativa. Os estudos conduzidos por Halbert et al. (1990) e por Souza (1993), reportaram que o canal cervical apresentou-se com as seguintes características gerais: uma porção caudal de entrada pelo orifício cervical externo, uma porção média em que as dobras foram maiores e mais excêntricas, e uma porção cranial, próxima ao corpo uterino, onde já não se observou uma estrutura tão evidente das dobras cervicais. No presente trabalho, o diâmetro médio dos anéis foi de  $0,298$  cm (tabela 3), diferindo dos resultados encontrados por Souza (1993). Os resultados obtidos no presente estudo quanto às estruturas do canal cervical diferem dos obtidos por Halbert et al. (1990) e

Souza (1993), pois os diâmetros médio foram maiores nas porções caudal e cranial (0,354 cm e 0,378 cm respectivamente), sofrendo estreitamento na porção medial (0,272 cm), tal como dois troncos de cones com suas bases menores voltadas uma para outra (figura 9).

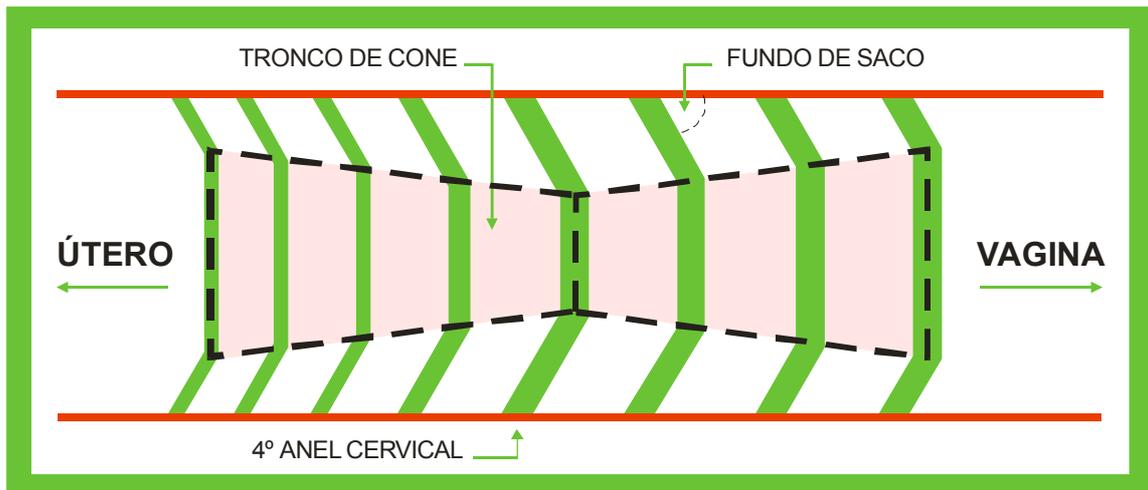


Figura 9 – Representação esquemática de uma cérvis de ovelha da raça Santa Inês. Ilustração realizada por Carlos Magno do Amaral e cedida ao autor do presente trabalho.

#### 6.4 FUNDO DE SACO NO ANEL DA CÉRVIX

A formação de fundos de saco nos anéis da cérvis de ovelhas da raça Santa Inês é um relato inédito, e ocorre devido à angulação formada a partir do encontro da estrutura anatômica funilar do anel e a parede interna da cérvis. Dos 100 animais avaliados, o número médio de anéis com fundo de saco foi de 5,17, sendo que ocorreu a presença de animais com fundo de saco até no oitavo anel. A presença de fundos de saco nos dois primeiro anéis foi de 100% e de 99% no terceiro anel (tabela 4).

Tabela 4 – Quantidade de ovelhas da raça Santa Inês que apresentaram fundo de saco em cada anel da cérvix.

Anel	Número de animais (%)	Presença de fundo de Saco (%)
1º	100	100 (100)
2º	100	100 (100)
3º	100	99 (99)
4º	98	89 (91)
5º	83	72 (87)
6º	54	36 (66)
7º	25	16 (64)
8º	7	6 (85)

## 6.5 EPITÉLIO DE REVESTIMENTO

Com base na análise dos cortes transversais da cérvix das ovelhas da raça Santa Inês, pode-se considerar e regiões diferentes de tecidos. Superficialmente encontrou-se o epitélio de revestimento (voltado para o lume da cérvix - mucosa), em posição intermediária obteve-se tecido conjuntivo denso (modelado e não modelado) e em plano mais profundo tecido conjuntivo frouxo. No epitélio observou-se em 100% da amostras presença de vilosidades (figura 10).

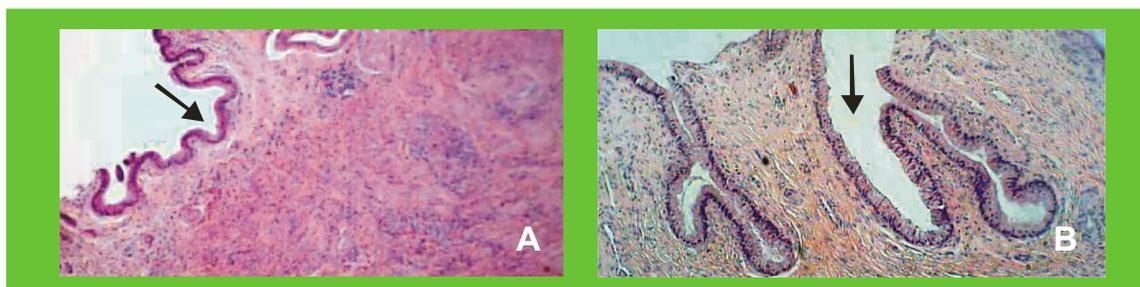


Figura 10 – Vilosidades do epitélio de revestimento da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 100X(A) e 100X(B) (as vilosidades estão apontadas com seta).

Na porção proximal (próximo ao útero) e média da cérvix 100% dos animais apresentaram epitélio simples cilíndrico e ciliado (figura 11).

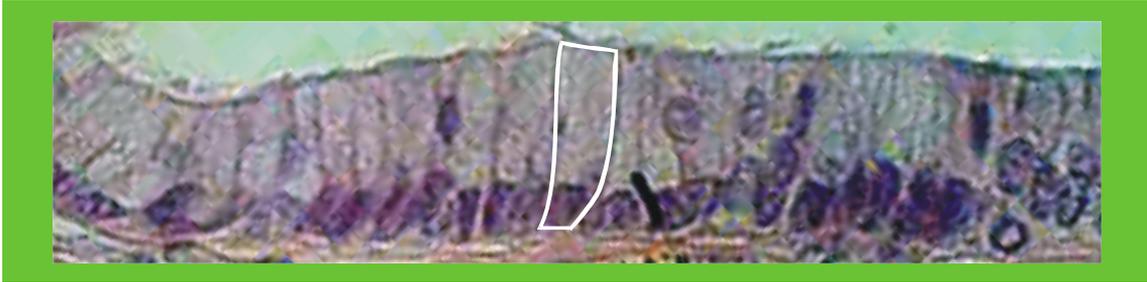


Figura 11 – Epitélio de revestimento simples cilíndrico e ciliado da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 400X (célula cilíndrica entre a demarcação).

No terço caudal (próximo à vagina) todos os animais do grupo 5 possuem epitélio simples cilíndrico e ciliado (tabela 5), entretanto nos animais dos grupos 1, 2, 3 e 4 há presença de animais com epitélio simples cilíndrico e ciliado e animais com epitélio estratificado pavimentoso (figura 12).

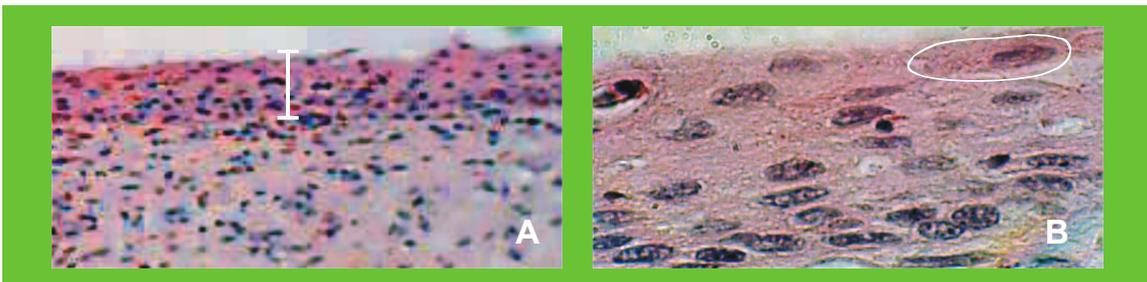


Figura 12 – Epitélio de revestimento estratificado pavimentoso da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 100X (A - entre a demarcação) e 1000X (B - demarcação de 1 célula cúbica).

Tabela 5 – Resultados percentuais de ocorrências dos tipos de epitélios de revestimento nos grupos e nas porções da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês.

GRUPO	PORÇÃO	TECIDO EPITELIAL DE REVESTIMENTO	
		SIMPLES/CILÍNDRICO/ CILIADO (%)	ESTRATIFICADO / PAVIMENTOSO (%)
1	CRANIAL	100	0
	MÉDIA	100	0
	CAUDAL	20	80
2	CRANIAL	100	0
	MÉDIA	100	0
	CAUDAL	60	40
3	CRANIAL	100	0
	MÉDIA	100	0
	CAUDAL	40	60
4	CRANIAL	100	0
	MÉDIA	100	0
	CAUDAL	80	20
5	CRANIAL	100	0
	MÉDIA	100	0
	CAUDAL	100	0

Segundo Moré e Nedjar (1984) o epitélio de revestimento da cérvix de ovelhas Lacaune é simples cilíndrico com células ciliadas, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho (figura 13). Este epitélio possui transformações cíclicas em toda extensão, possuindo volume máximo durante o estro, quando sua atividade secretória também aparece. Moré e Nedjar (1984) não encontraram diferença significativa de células ciliadas durante o estro ovino como foi observado por Wobel (1971) em vacas. Em virtude dos animais deste estudo não estarem em estro, não foram observadas estruturas glandulares no presente trabalho.

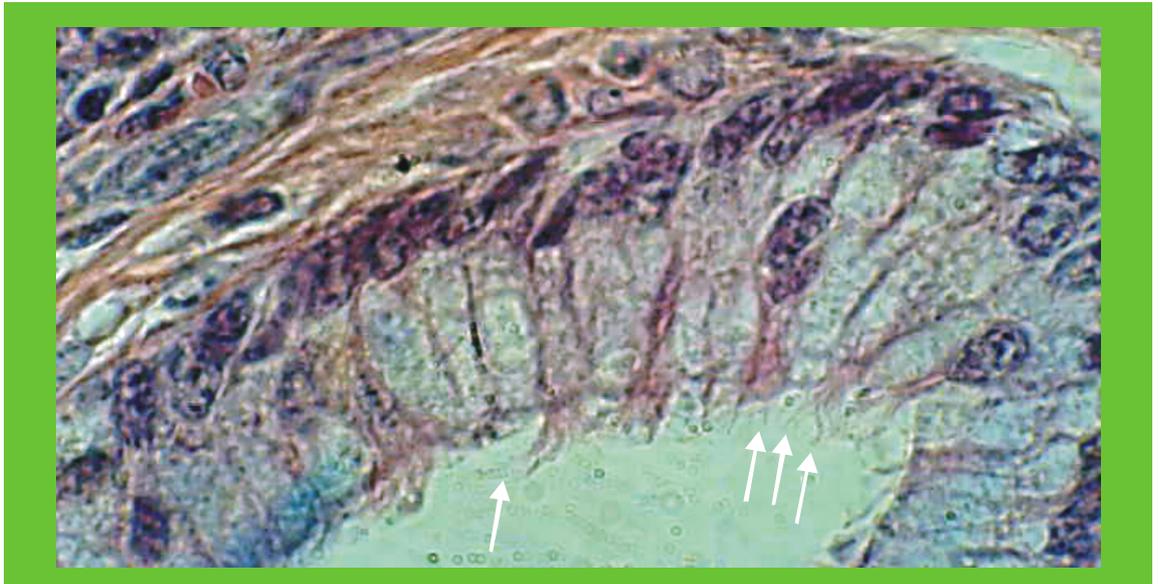


Figura 13 – Cílios presentes no epitélio de revestimento simples cilíndrico e ciliado da cérvix de ovelha da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 1000X (cílios apontados por setas).

Segundo Moré e Nedjar (1984), próximo ao orifício cervical externo (porção caudal da cérvix), por ser uma área de transição, o epitélio pode ser estratificado pavimentoso, como ocorre na vagina, ou pode apresentar-se em alguns animais como simples cilíndrico ciliado, como na maior parte do epitélio da cérvix, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho. Em virtude do epitélio simples cilíndrico ciliado estar presente nas porções onde obteve-se menores diâmetros dos anéis, tais porções podem estar mais susceptíveis à lesões contundentes e perfuro cortantes quando comparadas às áreas revestidas por tecido epitelial estratificado pavimentoso.

## 6.6 TIPOS DE TECIDO CONJUNTIVO

Na tabela 6 são apresentados os dados da ocorrência dos tipos de tecido conjuntivo nas porções da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês divididas por grupo. O tecido conjuntivo denso modelado (figura 14) foi observado em 100% das amostras, logo abaixo do tecido epitelial de revestimento.

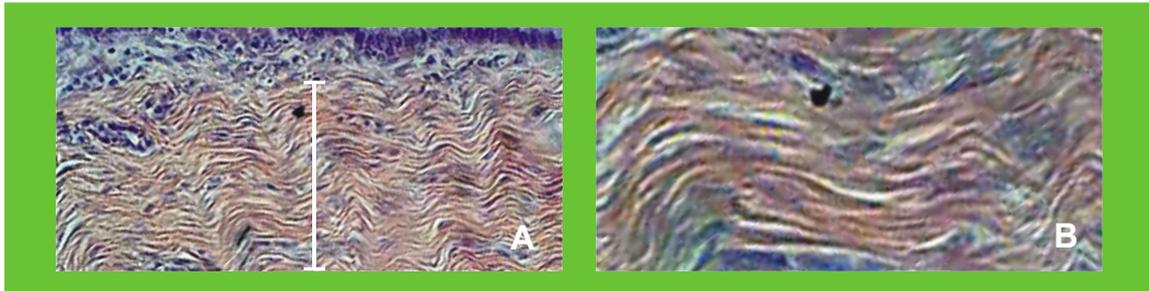


Figura 14 – Tecido conjuntivo denso modelado da cérvix de ovelha da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 200X (A - entre a demarcação) e 400X (B).

O tecido conjuntivo denso modelado foi classificado quanto à área ocupada como 5 em 100% das amostras do grupo 1 e como 1 em 100% das amostras do grupo 5 (tabela 6). Nos grupos 2, 3 e 4 os animais apresentaram variações na quantidade de área ocupada sendo classificados entre 1 e 4. Não foram observados nem vasos sanguíneos nem nervos no tecido conjuntivo denso modelado. O tecido conjuntivo denso não modelado (figura 15) não foi classificado como 1 e 2 em nenhuma amostra.

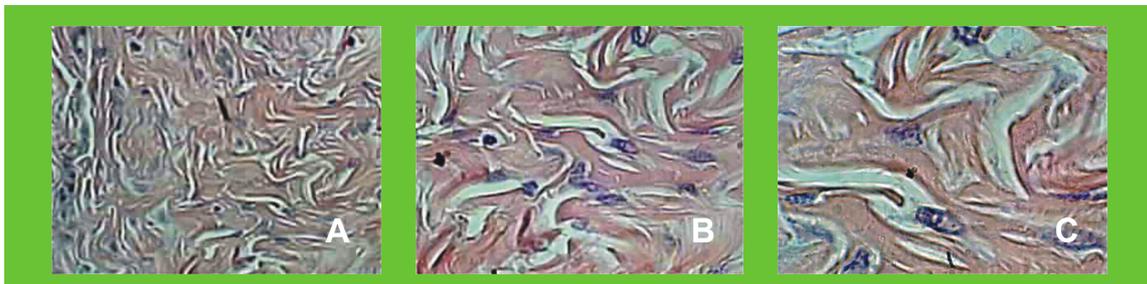


Figura 15 – Tecido conjuntivo denso não modelado da cérvix de ovelha da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 200X (A), 400X (B) e 1000X (C).

Nos grupos 2 e 3 foram observados 40% dos animais não possuindo tecido conjuntivo denso não modelado nas porções média e caudal da cérvix (tabela 6). No grupo 1, 100% dos animais apresentaram tecido conjuntivo denso não modelado classificados como 3 e 100% dos animais do grupo 5 foram classificados como 5. Foram observados vasos (figura 16) e nervos no tecido conjuntivo denso não modelado.

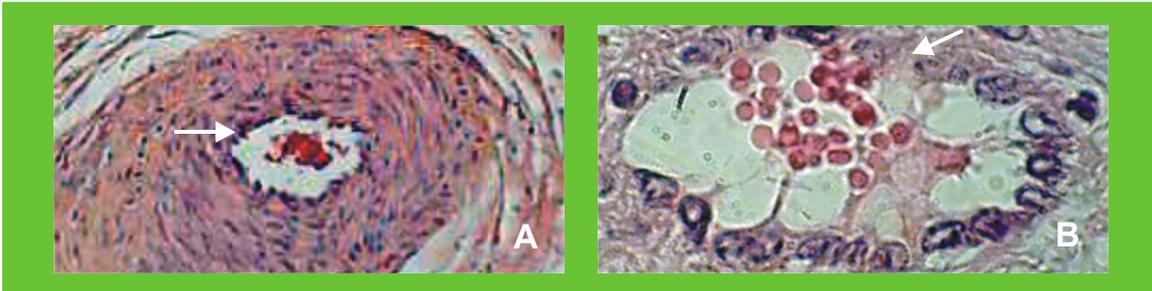


Figura 16 –Vaso sanguíneo da cérvix de ovelha da raça Santa Inês, obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 100X (A) e 1000X (B).

O tecido conjuntivo frouxo (figura 17) não foi classificado como 1 e 2 em nenhuma amostra.

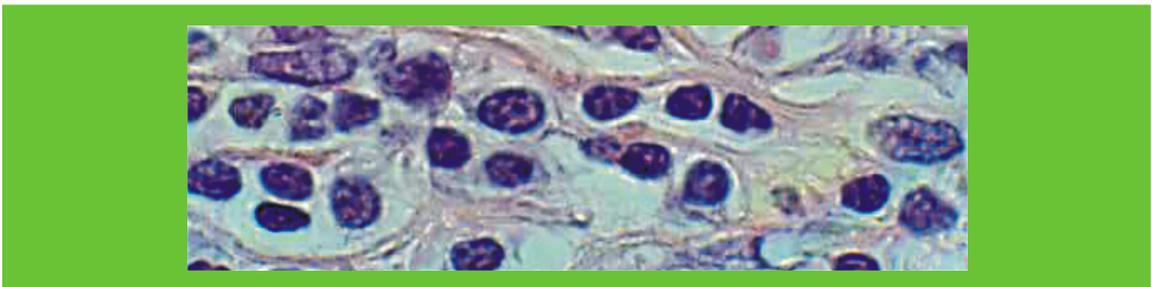


Figura 17 – Tecido conjuntivo frouxo da cérvix de ovelha da raça Santa Inês obtido em corte transversal, corado com H.E e visualizado em microscópio óptico com aumento de 1000X.

No grupo 3 foram observados 20% dos animais não possuindo tecido conjuntivo frouxo nas porções proximal e caudal da cérvix (tabela 6). No grupo 1, 100% dos animais apresentaram tecido conjuntivo frouxo classificado como 5 e 100% dos animais do grupo 5 foram classificados como 3. Foram observados vasos e nervos (figura 18) no tecido conjuntivo frouxo. Na porção cranial da cérvix os nervos foram observados em menor quantidade quando comparada às porções média e caudal.

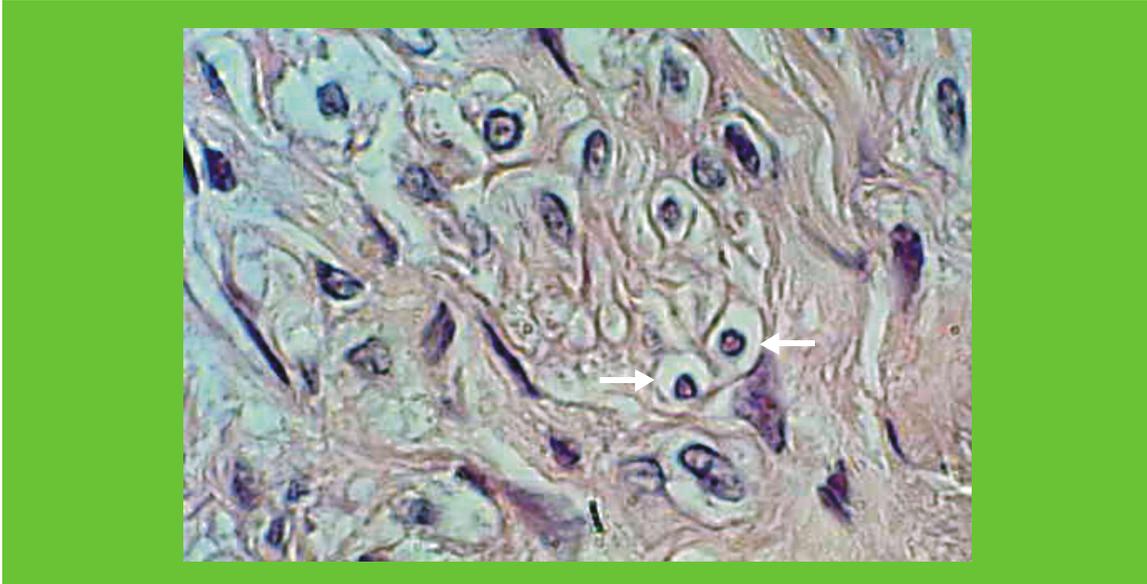


Figura 18 – Células nervosa (apontada com uma seta) rodeada por tecido conjuntivo frouxo visualizada em corte histológico transversal da cérvix de ovelha da raça Santa Inês, corado com H.E e obtido por microscópio óptico com aumento de 1000X .

Tabela 6 – Resultados percentuais de ocorrências dos tipos de tecido conjuntivo nos grupos e nas porções da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês.

GRUPO	PORÇÃO	TECIDO CONJUNTIVO											
		DENSO									FROUXO (%)		
		MODELADO (%)					NÃO MODELADO (%)						
		1	2	3	4	5	3	4	5	3	4	5	
1	PROXIMAL	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100	
	MEDIAL	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100	
	CAUDAL	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100	
2	PROXIMAL	0	100	0	0	0	100	0	0	0	80	20	
	MEDIAL	0	0	60	40	0	60	0	0	0	0	100	
	CAUDAL	0	20	0	80	0	60	0	0	0	0	100	
3	PROXIMAL	0	100	0	0	0	80	0	20	0	80	0	
	MEDIAL	0	0	60	40	0	60	0	0	0	0	100	
	CAUDAL	0	20	0	80	0	40	0	20	0	0	80	
4	PROXIMAL	80	20	0	0	0	60	40	0	60	40	0	
	MEDIAL	80	20	0	0	0	80	0	20	80	0	20	
	CAUDAL	60	20	0	0	0	40	0	60	40	0	60	
5	PROXIMAL	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	
	MEDIAL	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	
	CAUDAL	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	

Observou-se no presente estudo que ocorre uma modelagem tecidual pelas fibras colágenas em grande quantidade (tecido conjuntivo denso modelado) nos animais do grupo 1 havendo decréscimo na faixa de tecido conjuntivo denso modelado

nos animais do grupo 5. Dessa forma, no grupo 1, o tecido conjuntivo denso não modelado ocupa uma pequena faixa (classe 3) havendo um acréscimo no grupo 5, onde ocorreu 100% dos animais com classificação 5. A dissociação das fibras colágenas, que se separam acentuadamente umas das outras, provoca o afrouxamento dos tecidos cervicais e aumenta de maneira muito clara os espaços entre os feixes de colágenos (HAFEZ, 1995). Segundo Westerhausen-Larson et al. (1996) este afrouxamento pode ocorrer devido à ação de colagenases liberadas por neutrófilos recrutados, que possuem função de destruir as fibras de colágenos. Devido os animais do grupo 5 serem mais velhos que os animais do grupo um, provavelmente no grupo 5 os animais podem ter passado por gestações normais, que segundo Owiny et al. (1995), apresenta como característica o amolecimento cervical antecedendo a dilatação cervical e nascimento, características essas mediadas por um influxo de neutrófilos no tecido da cérvix. Observou-se que a baixa quantidade de tecido conjuntivo denso não modelado presente nos animais do grupo 1 foi sobreposta a uma faixa larga (classificação 5) de tecido conjuntivo frouxo. O inverso foi observado nos animais do grupo 5, onde uma alta quantidade de tecido conjuntivo denso não modelado foi sobreposta a uma faixa estreita (classificação 3) de tecido conjuntivo frouxo.

Segundo Moré e Nedjar (1984), os vasos sanguíneos que suprirão as necessidades teciduais cervicais estão presentes no tecido conjuntivo. Os dados obtidos no presente trabalho elucidam o posicionamento tecidual dessas estruturas uma vez que as mesmas não foram observadas no tecido conjuntivo denso modelado, ficando restritas ao tecido conjuntivo denso não modelado e em maior quantidade no tecido conjuntivo frouxo, em todos os grupos e porções.

A inervação intrínseca da cérvix foi demonstrada em diversas espécies de pequenos animais como camundongo (MOSCARINI et al., 1982), rato (ADHAM & SHENK, 1969), porquinho da índia (BELL & MALCOLM, 1978), coelho (SCHOFIELD, 1952) e gato (ROSENGREN & SJOBORG, 1967), corroborando com os dados do presente trabalho uma vez que as espécies citadas são todas mamíferas. Moré e Nedjar (1984) conduzindo investigação nervosa específica da cérvix de ovelhas

Lacaune, obtiveram como resultados a presença da inervação colinérgica e adrenérgica, resultado este que corrobora com o presente estudo.

## **7. CONCLUSÕES**

Este trabalho foi o primeiro a descrever as características morfológicas da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês. Por apresentar cinco tipos de orifício externo, com maior ocorrência do tipo bico de pato, anéis com pequeno diâmetro em formato de funil e formação de fundos de saco nos anéis, suas características diferem das demais raças relatadas na literatura científica. Neste contexto, fica evidente a necessidade de se tratar cada raça de forma individualizada quando do desenvolvimento tecnológico dos procedimentos de IATC. Os dados aqui apresentados podem subsidiar o desenvolvimento nesta área da reprodução animal assistida.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente estudo para a média do comprimento da cérvix, número e diâmetro médio dos anéis, presença dos fundos de saco, tipos de tecidos e estruturas histológicas da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês, podem contribuir para o rol de informações necessárias ao desenvolvimento de programas e equipamentos comerciais de IATC e devem ser considerados em conjunto.

Com os resultados obtidos no presente trabalho sugere-se que o médico veterinário não considere o tipo de orifício externo da cérvix ao selecionar animais para programas de IA, uma vez que ao se fixar o tipo de orifício externo como variável independente, obteve-se baixa correlação entre as características, apesar da alta significância.

Para o desenvolvimento de uma pipeta de IATC para ovinos, visando beneficiar todos os grupos, o comprimento da ponta da pipeta de IA para ovelhas da raça Santa Inês deve possuir no mínimo 7 cm (valor máximo obtido) e o ponto mais estreito do canal, diâmetro do quarto anel, deverá ser considerado, pois limitará o diâmetro da pipeta. Desta forma, os custos serão reduzidos, não havendo necessidade de tipos específicos de pipeta para cada grupo em relação ao comprimento e diâmetro da cérvix. Para a escolha do material, deverão ser observadas as barreiras anatômicas bem como as limitações teciduais.

Sugere-se ao recurso humano que estiver realizando a I.A., que o mesmo busque transpor todos os anéis, visando à deposição intra-uterina do sêmen, atendo-se ao comprimento da pipeta, que já foi introduzido na cérvix, bem como possíveis crepitações no equipamento (poderá indicar o número de anéis que foi transposto). Devido aos maiores diâmetros médios estarem na porção caudal e cranial da cérvix, a entrada e saída de equipamento de IA podem não ser pontos de maiores preocupações para o inseminador, porém a redução no diâmetro médio dos anéis em sentido ao 4º anel (ponto de estreitamento máximo) torna-se um fator dificultador da transposição cervical. Os fundos de saco são estruturas passíveis de introdução da sonda de I.A., impedindo que a mesma progrida em direção ao útero, devendo o inseminador, saber da existência desta característica anatômica para melhor direcionar

o instrumento de IA quando estiver realizando a técnica transcervical, bem como realizar a transposição dos três primeiros anéis com muita cautela e destreza.

A despeito das limitações ainda existentes, tornam-se necessários programas de desenvolvimento científicos e tecnológicos para fomentar iniciativas de estudos continuadas da morfofisiologia cervical ovina e desenvolvimento de equipamento e técnicas de IATC nesta espécie.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHAM, N.; SCHENK, E. A. Autonomic innervation of the rat vagina, cervix and uterus and its cyclic variation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 104, p. 508-516, 1969.

ARCO. Disponível em: [http://arcoovinos.com.br/racas\\_links/santa\\_ines.html](http://arcoovinos.com.br/racas_links/santa_ines.html) Acesso realizado em : 15/09/2006

AX, R.L., et al. **Artificial insemination**. In: HAFEZ, E.S.E. & HAFEZ, B. Reproduction in Farm Animals. Seventh edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Chapter 26, 376-389.

BELL, C.; MALCOLM, S. J. Observations on the loss of catecholamine fluorescence from intrauterine adrenergic nerves during pregnancy in the guinea pig. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 53, p. 51-58, 1978.

BUENO, M. S.; CUNHA, E. A.; SANTOS, L. E. 2000. Santa Inês Sheep Breed In The Intensive Lamb Meat Production in The Southeast Region of Brazil. In: **Global Conference on Conservation of Domestic Animal Resources**, 5., EMBRAPA. Brasília. CD-ROM.

CAMPBELL, J.W.; et al. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. **Theriogenology**, v.45, p.1535-1544, 1996.

CAPRITEC. Disponível em: <http://www.capritec.com.br/artigos> Acesso realizado em:18/08/2004.

CROY, B.A., et al. A preliminary study on the usefulness of hull-8 in cervical relation of the ewe for artificial insemination and embryo transfer. **Theriogenology**. v.52, p.271-87, 1999.

DEVENDRA, C. Potencial productivity from small ruminants and contribution to improved livelihoods and rural growth in developing countries. 39<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 21 de julho a 24 de julho de 2002. **Anais**. Recife – PE. 2002. CD-ROM

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. España: Zaragoza, 1990. 192 p.

GHALSASI, P.M., NIMBKAR, C. Evaluation of laparoscopic intrauterine insemination in ewes. **Small Ruminant Research**., v.23, p.69-73, 1996.

GINTHER, O.J. Reproductive Biology of the Mare. Cross Plains WI: Equiservices, 1992. 470p.

- GODFREY, R.W.; et al. Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep ewes in the tropics. **Theriogenology**, v.51, p.985-997, 1999.
- HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animal**. 7ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1995. p. 573.
- HALBERT, G.W.; et al. The structure of cervical canal of the ewe. **Theriogenology**, v.33, p.977-992, 1990.
- HILL, J.R., THOMPSON, J.A., PESKINS, N.R. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28.447 merino ewes under commercial conditions: a survey. **Theriogenology**, v.49, p.697-709, 1998.
- HUSEIN, et al. Effect of eCG on the pregnancy rate of ewes transcervically inseminated with frozen-thawed semen outside the breeding season. **Theriogenology**, v.49, p.997-1005, 1998.
- MARTINS, R. D.; *et al.* **Evaluation of the reproductive seasonality of Santa Inês rams raised in Distrito Federal. R. Bras. Zootec.** [online]. Nov./Dec. 2003, vol.32, no.6, suppl.1 [cited 23 May 2006], p.1594-1603.
- MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 750p.
- MORÉ, J.; NEDJAR. K. Anatomy and Histology of the Cervix uteri of Ewe: New Insights. **Acta Anatomica.**, v.120, p. 156-159, 1984.
- MOSCARINI, M., et al. Cholinergic nerves in mouse uterus. **Journal of Neural Transmission**, v. 55, p. 139-148, 1892.
- MOSES, D., et al. A large-scale program in laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed semen in australian merino sheep in argentine patagonia. **Theriogenology.**, v.48, p.651-57, 1997.
- NAQVI, S.M.K., et al. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. Technical note. **Small Ruminant Research.**, v.29, p. 329-33, 1998.
- NAQVI, S.M.K., et al. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. **Animal Reproduction Science.**, v.85, p. 337-344, 2005.
- OWINY, J.R.; et al. Leukocytic invasion of ovine cervix at parturition. **Journal of the Society of Gynecological Investigation**, v.2, n.4, p.593-596, 1995.
- PARAGUEZ, V. H.; et al. Inseminación artificial en ovinos. **Mon. Vet.**, p. 20, 60-77, 2000.

ROSENGREN, E.; SJOBERG, N. O. The adrenergic nerve supply to the female reproductive tract of the cat. **American Journal of Anatomy**, v. 121, p. 271-284, 1967.

SAYRE, B.L.; LEWIS, G.S. Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. **Theriogenology**, v.48, p.267-275, 1997.

SIQUEIRA, E. R. Cria e recria de cordeiros em confinamento. In.: **Nutrição de Ovinos**. Jaboticabal: FUNEP - FCAJ - UNESP, 1996. p. 175-212.

SCHOFIELD, M. The innervation of the cervix and cornu uteri in the rabbit. **Journal of Physiology (London)**, v. 117, p. 317-328, 1952.

SOUSA, W. H. Ovinos deslanados brasileiros. I Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária. IV Encontro de Medicina de Pequenos Ruminantes do Cone Sul e VIII Encontro Paranaense de Medicina de Pequenos Ruminantes-AVEPER. **Anais**. Curitiba-Pr, 2002. CD-ROM

SOUZA, M.I.L. **A via cervical na inseminação artificial ovina com sêmen congelado**. 1993. 47p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM –SAS. **SAS/SAT 2001**: user's guide: statistics version 8.2, CD-ROM. Cary, 2001

WESTERHAUSEN-LARSON, A.; et al. Type XIV collagen in the pregnant ovine cervix is removed during labor in a leucocytemediated process. **Journal of the Society of Gynecological Investigation**, v.3, n.2 (Supplement), p.333, 1996.

WOBEL, K. H. Histologische, histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Cervix uteri de Rides. **Fortsch. VetMed.**, v. 15, p. 1-117, 1971.

WULSTER-RADCLIFFE, M.C., LEWIS, G.S. Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. **Theriogenology**, v.58, p.1361-71, 2002.

ANEXO 1 – Tabela de correlação entre as variáveis morfométricas da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês. : idade (Id), comprimento (comp) da cérvix, número de anéis (na) da cérvix, perímetro (P)- 1 a 8 (indica o número do anel), total de fundos de sacos dos anéis da cérvix (FT), fundo de saco (F) - 3 a 8 (indica o número do fundo d saco), flap (Fl), bico de pato (Bp), roseta (Rs), espiral (Esp), óstio (Ost), \* p<0,05, \* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

Id	Comp	na	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	FT	F3	F4	F5	F6	F7	F8	Fl	Bp	Rs	Esp	
Comp	0,22*																					
na	-0,03	0,21*																				
P1	-0,05	0,35***	-0,07																			
P2	0,06	0,41***	0,08	0,61***																		
P3	-0,10	0,29**	0,14	0,46***	0,54***																	
P4	-0,02	0,05	-0,03	0,33***	0,45***	0,54***																
P5	0,13	0,25*	-0,04	0,34**	0,52***	0,40***	0,42***															
P6	0,11	0,15	-0,08	0,29*	0,38**	0,29*	0,25	0,67***														
P7	0,09	0,53**	0,33	0,23	0,56**	0,37	0,55*	0,48*	0,49*													
P8	0,76*	0,75*	0,28	0,73	0,23	0,23	0,04	0,49	0,48	0,89**												
FT	-0,05	0,25*	0,84***	0,10	0,12	0,17	0,03	-0,03	-0,02	0,19	0,76											
F3	0,14	0,16	0,06	0,08	0,12	0,15	0,18	0,14			0,09											
F4	-0,02	0,16	0,26**	-0,06	0,08	0,04	-0,00	-0,05	0,05		0,55***	-0,03										
F5	0,03	0,20	0,35***	0,03	0,14	0,06	0,15	-0,07	-0,24		0,64***	-0,04	0,71***									
F6	-0,04	0,13	0,39**	-0,03	-0,17	0,06	-0,08	-0,10	0,00	-0,08	0,76***		0,19	0,28*								
F7	-0,39	-0,08	0,47*	0,34	0,25	0,33	0,18	0,20	0,12	0,07	0,87***				0,58*							
F8	0,54	0,46	0,31	0,47	0,31	0,47	-0,15	0,34	0,28	0,49	1,00***											
Fl	0,16	0,10	0,09	-0,00	-0,10	-0,03	-0,00	-0,04	-0,05	0,20	-0,01	0,03	-0,13	-0,09	0,12	-0,35	0,17					
Bp	0,00	0,07	-0,13	-0,02	0,12	0,17	0,04	0,08	0,09	0,05	-0,04	-0,05	0,10	0,03	0,07	-0,05	0,22	-0,35	-0,34***			
Rs	-0,10	-0,10	-0,01	-0,00	0,06	-0,03	0,06	0,02	0,12	0,16	-0,11	-0,03	-0,25*	0,03	0,06	-0,15	-0,09	0,17	-0,13	-0,41***		
Es	-0,04	-0,07	0,20*	-0,11	-0,13	-0,15	-0,12	-0,19	-0,16	-0,37	-0,11	0,16	0,04	0,04	-0,00	0,03	0,17	-0,14	-0,43***	-0,17		
Ost	0,00	-0,02	-0,10	0,17	0,01	-0,04	0,01	0,13	-0,01	0,07	-0,04	0,03	-0,01	-0,09	0,17	0,15		-0,11	-0,34***	-0,13	-0,14	