

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALTERAÇÕES CÍCLICAS DO EPITÉLIO VAGINAL DURANTE
O CICLO ESTRAL EM *Calomys callosus*

JEAN FÁBIO TORRES RODRIGUES

Monografia apresentada à coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

UBERLÂNDIA - MG
DEZEMBRO / 1996

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ALTERAÇÕES CÍCLICAS DO EPITÉLIO VAGINAL DURANTE O CICLO ESTRAL
EM *Calomys callosus*.**

JEAN FÁBIO TORRES RODRIGUES

PROF. MS. ELOISA AMÁLIA VIEIRA FERRO
Professora Orientadora

**Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.**

**UBERLÂNDIA - MG.
DEZEMBRO/1996**

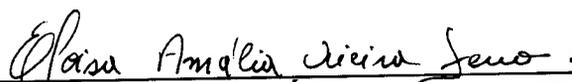
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALTERAÇÕES CÍCLICAS DO EPITÉLIO VAGINAL DURANTE O CICLO
ESTRAL EM *Calomys callosus*

JEAN FÁBIO TORRES RODRIGUES

Aprovada pela comissão examinadora. Em 06/12/96.

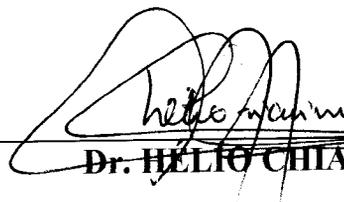
Conceito 100,0



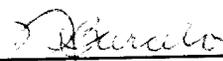
MS. ELOISA AMÁLIA VIEIRA FERRO
Orientadora



Dr.^a ANA ALICE DINIZ DOS SANTOS
Conselheira



Dr. HÉLIO CHIARINI GARCIA
Conselheiro



Prof.^a MS. NORA-NEY DOS SANTOS BARCELOS
Coordenadora do Curso

UBERLÂNDIA - MG.

DEZEMBRO/1996

“Pode-se viver no mundo uma vida magnífica, quando se sabe trabalhar e amar,
trabalhar pelo que se ama e amar aquilo em que se trabalha”.

(Leon Tolstoi).

À minha mãe,

Maria Claudete ,

pela lição de amor, carinho, compreensão, paciência
e dedicação que agradeço do fundo do meu coração.

A meu pai,

Luiz Antônio,

por saber compreender e estar sempre presente

nas horas de necessidade, muito obrigado. .

A meus irmãos,

Luciana e

Dean,

por terem sido tão importantes neste período de
minha vida.

À minha grande paixão,

Cristina,

pelo fato de existir e mesmo à distancia se tornar
tão importante, te amo muito.

Agradecimento especial

À professora Eloisa Amália Vieira Ferro, pelo exemplo de competência e paixão em seu trabalho, o qual significou muito para mim.

Agradecimentos

- À Deus, por sua constante presença;

- À Eloisa, por se mostrar amiga nas horas certas;

-Ao Dr. Hélio Chiarini Garcia por ter-se mostrado tão prestativo me auxiliando na análise do material de varredura;

-À Dr.^a Ana Alice Diniz dos Santos, por estar sempre disposta a sanar minhas dúvidas no momento de confecção da monografia;

-Aos demais professores e funcionários do Setor de Histologia e Embriologia por me ajudarem de um ou outro modo;

- Aos grandes Adriano, Alonso, Claudio, Daniel, Eddie, Rodrigo, pelo tempo em que convivemos onde se mostraram meus irmãos;

- Aos não menores Alessandro, Sylvio, Érica, Ana Flavia, Carla, Regildo, Renato, Fernandos (Gonçalves e Marino), Carlão, Anselmo, Fabiana, e todos os amigos e colegas que fiz durante a graduação, valeu galera!

-À Edna pela sua amizade e por ser prestativa qualquer hora;

- Ao senhor e velhinho Hégio H. Werneck, pela amizade, pelas fofocas, pela instrução, pelo processamento do material de microscopia eletrônica de transmissão e documentação fotográfica;

ÍNDICE

RESUMO

1 -	INTRODUÇÃO	1
1.1 -	O sistema reprodutor feminino.....	2
1.1.1 -	O ovário.....	2
1.1.1.1 -	Células foliculares.....	3
1.1.2 -	Tuba uterina.....	5
1.1.3 -	Útero.....	6
1.1.3.1 -	Cérvix uterina.....	8
1.1.4 -	A vagina.....	8
1.2 -	Alterações morfológicas de alguns órgãos do sistema reprodutor feminino nos períodos:.....	9
1.2.1 -	Pré-natal.....	9
1.2.2 -	Pós-natal.....	9
1.2.3 -	Puberdade.....	10
1.2.4 -	Maturidade sexual.....	10
1.2.4.1 -	O ciclo ovariano.....	10
1.2.4.2 -	O ciclo estral.....	14
1.3 -	<i>Calomys callosus</i>	18
2 -	OBJETIVOS	20
3 -	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 -	Espécimes.....	21
3.2 -	Diagnóstico da fase e coleta do material.....	21
3.3 -	Processamento para microscopia de luz.....	21
3.4 -	Processamento para microscopia eletrônica de transmissão.....	22
3.5 -	Processamento para microscopia eletrônica de varredura.....	22
4 -	RESULTADOS	24
4.1 -	Proestro.....	24
4.2 -	Estro.....	26
4.3 -	Metaestro.....	28
4.4 -	Diestro.....	29
5 -	DISCUSSÃO	32
6 -	CONCLUSÕES	37
7 -	DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	39
8 -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

RESUMO

O ciclo estral ocorre na maioria dos mamíferos e caracteriza-se por ser um período de variações morfológicas e comportamentais. Neste ciclo estão definidos 4 momentos distintos: proestro, estro, metaestro e diestro, sendo o estro, o período no qual a fêmea aceita a cópula. Do ponto de vista fisiológico, este ciclo é resultado da ação de hormônios hipofisários e ovarianos, acarretando várias modificações morfológicas detectáveis macro ou microscopicamente, particularmente no epitélio vaginal. Em *Calomys callosus*, as células superficiais do epitélio vaginal podem apresentar-se queratinizadas ou adquirir atividade secretória. O número de células em mitose no estrato germinativo do epitélio, também varia durante o ciclo estral; outra característica marcante é a migração leucocitária em direção à luz do órgão. No proestro, na superfície epitelial, as células apresentam-se prismáticas secretoras e em processo de degeneração, enquanto que as camadas imediatamente abaixo se encontram queratinizadas. No estro, as células secretoras superficiais já se descamaram e é grande a espessura do epitélio. No metaestro, as camadas queratinizadas também sofrem um processo de descamação, deixando a superfície somente com células pavimentosas não queratinizadas. Estas células, no final do metaestro, começam a apresentar regiões PAS - positivas e infiltrado leucocitário. No diestro, as células superficiais se tornam prismáticas, altamente secretoras e repletas com grânulos de secreção PAS - positivos. A espessura do epitélio é pequena e o infiltrado leucocitário se mostra muito maior que na fase anterior.

1- INTRODUÇÃO

O organismo deve ser capaz de responder, de forma coordenada e apropriada, às diversas modificações físicas e químicas interna e externa do corpo. Tais alterações podem agir diretamente sobre uma única célula de resposta ou sobre uma célula sensorial que, então, transmite a informação às células efetoras ou alvo. Alternativamente, esta informação pode ser transmitida diretamente às efetoras por meio de mensageiros químicos veiculados nos líquidos corporais. Em geral, esse tipo de regulação ajusta e correlaciona várias funções metabólicas do corpo, por meio da manutenção da homeostasia, do controle das velocidades das reações químicas e do transporte de substâncias através das membranas celulares. O mecanismo reprodutivo é um deles.

O controle exercido pelo sistema nervoso está basicamente ligado às atividades rápidas e ao comportamento, enquanto o controle humoral é dominante para a homeostasia e adaptações lentas e mais duradouras, tais como a reprodução.

Classicamente, os hormônios são definidos como substâncias produzidas por glândulas endócrinas em uma parte do organismo e que são, subseqüentemente, levados pela corrente sanguínea ou linfática para outra parte do corpo, onde modificam a atividade de células alvo específicas (Kaltenbach e Dunn, 1988).

Os hormônios que controlam os processos reprodutivos são, principalmente, procedentes do hipotálamo, hipófise, gônadas e placenta, sendo responsáveis por muitas variações nos órgãos envolvidos nos mecanismos de reprodução (Kaltenbach e Dunn, 1988).

1.1-O SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

1.1.1- O OVÁRIO

Os ovários são estruturas pares responsáveis pela produção, armazenamento e liberação dos gametas femininos. Têm funções endócrinas (esteroidogênese) e exócrina (liberação dos ovócitos). A função endócrina envolve a produção de hormônios esteróides, entre eles, o estrógeno e a progesterona, já a função exócrina está relacionada com a produção de gametas femininos.

Os ovários caracterizam-se por apresentar um revestimento epitelial contínuo com o mesovário. Este epitélio é uma modificação do revestimento peritoneal visceral ovariano. Durante o desenvolvimento inicial do ovário e da ovogênese, o epitélio é cúbico e vai se tornando pavimentoso à medida que o animal envelhece. Sob o epitélio há uma cápsula de tecido conjuntivo denso constituindo a *tunica albuginea ovarii*.

Geralmente os ovários são formados por duas zonas diferentes - o **córtex ou zona parenquimatosa** que se situa externamente e a **medula ou zona vascular** que se situa internamente. Isso ocorre na maioria dos animais com exceção da égua, onde estas zonas são invertidas.

O córtex contém numerosos folículos em vários estágios de desenvolvimento, corpos lúteos, células intersticiais e elementos do estroma.

O tecido conjuntivo do estroma cortical é um tecido especializado, mas com várias células típicas do tecido conjuntivo frouxo. Contudo, este tecido é hiperplásico, estando presentes densos agregados de fibroblastos. Eles podem ser paralelos à superfície ou se arranjar ordenadamente em volta dos vasos que a estes

se associam. Os fibroblastos desta região não são comuns. Eles são adaptáveis e pleomórficos. Podem até mesmo assumir características epitelióides, formando a teca folicular e as células glandulares intersticiais associados aos folículos.

A medula se caracteriza por apresentar grandes vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e algumas estruturas embriológicas remanescentes. Possui um tecido conjuntivo frouxo rico em fibras elásticas e reticulares. Os constituintes medulares são contínuos com o ligamento mesovárico. Os remanescentes embrionários são partes da *rete ovarii*, o homólogo feminino da *rete testis* (Banks, 1992).

1.1.1.1- CÉLULAS FOLICULARES

Concomitantemente à diferenciação dos ovócitos primários, as células foliculares, se associam e circundam o ovócito primário. Neste estágio, o complexo é conhecido como folículo primordial. Estes também são conhecidos como folículos quiescentes que ocorrem isoladamente ou em grupos na periferia do córtex.

A ativação do folículo primordial resulta num folículo primário e as células foliculares se tornam cúbicas ou prismáticas.

O folículo secundário é identificado pelo aumento da população das células foliculares associadas ao ovócito primário e pelo desenvolvimento de uma zona pelúcida entre o ovócito e as células foliculares. As células foliculares são mitoticamente ativas, constituindo agora a membrana granulosa. Elas são separadas do ovócito primário pela zona pelúcida, que é formada por um material amorfo, ácido periódico-reativo de Schiff (PAS) positivo. As células do estroma folicular se diferenciam em duas camadas: uma camada interna, celular e bem vascularizada, denominada *teca interna*, constituída de células tecais de aspecto epitelióide com

proeminentes retículos endoplasmáticos lisos e mitocôndrias com cristas tubulares; e uma região externa, com células fibroblásticas denominada *teca externa*. Estas duas regiões fundem-se imperceptivelmente uma a outra, tornando difícil distingui-las. As células da teca interna produzem o líquido folicular e secretam grandes quantidades de substratos androgênicos. Estes compostos intermediários da biossíntese dos esteróides atingem as células granulosas não-vascularizadas, que os convertem em estrógeno. Além da produção intrafolicular de estrógeno, resultante da esteroidogênese cooperativa entre as células tecais e granulosas, o estrógeno também é produzido diretamente pelas células tecais. Uma vez produzido, passam para o interior de vários vasos sanguíneos da teca interna. Grupos muito dispersos de células secretoras do estroma, conhecidas como células intersticiais, provavelmente produzem uma parte do androgênio utilizado pelas células da granulosa para a conversão em estrógeno. As células intersticiais também sintetizam algum estrógeno diretamente (Cormack, 1991).

O desenvolvimento dos folículos terciários resulta da atividade secretora das células granulosas. Pequenos espaços entre as células granulosas, repletos de fluido PAS-positivo, os corpúsculos de Call-Exner, se tornam aparentes durante o crescimento antral. Essas pequenas lacunas ou fendas intercelulares, preenchidas pelo líquido folicular, confluem e formam o antro folicular. Os corpúsculos de Call-Exner são considerados precursores do líquido folicular. Estes eventos são acompanhados pelo crescimento contínuo do folículo. As células imediatamente próximas ao ovócito se tornam colunares radialmente orientadas, formando a *corona radiata*, provavelmente fornecem o suporte nutricional para o ovócito. O

antro folicular separa as células da granulosa em uma camada visceral, associada ao ovócito, o *cumulus oophorus* e uma camada parietal, associada às tecas (Banks, 1992).

1.1.2- TUBA UTERINA

A tuba uterina ou oviducto é um tubo muscular membranoso de grande mobilidade. Uma de suas extremidades abre-se na cavidade peritoneal, próximo ao ovário, e a outra atravessa a parede do útero abrindo-se no interior deste órgão.

Divide-se o oviducto em quatro segmentos. O primeiro, chamado de intramural, localiza-se no interior da parede uterina. O segundo, ou istmo, é formado pelo terço da tuba adjacente ao útero. O terceiro é a ampola, que se distingue do istmo por ser mais dilatada. O quarto segmento, o infundíbulo, tem a forma de um funil e localiza-se próximo ao ovário. A extremidade livre do infundíbulo, que é a mais larga, apresenta prolongamentos em forma de franjas ou fimbrias.

A parede da tuba é formada por uma camada mucosa, uma muscular e uma serosa.

A mucosa possui dobras longitudinais que são numerosas, longas e ramificadas na ampola. Estas dobras se tornam menores nos segmentos da tuba mais próximos ao útero. O epitélio que reveste a mucosa é simples cilíndrico e ciliado, apresentando algumas células secretoras também cilíndricas, mas desprovidas de cílios. Os cílios batem na direção do útero, causando a movimentação da película líquida viscosa que cobre a superfície. Esta película é formada por atividade de células secretoras intercaladas entre as células ciliadas. O

deslocamento da película que recobre a mucosa da tuba auxilia o transporte do ovócito na direção do útero e dificulta a passagem de microrganismos do útero para a cavidade peritoneal.

A lâmina própria da mucosa é constituída por tecido conjuntivo frouxo e a camada muscular é formada por fibras musculares lisas dispostas em grupos separados por abundante tecido conjuntivo frouxo.

A tuba recolhe o ovócito expulso do ovário e o conduz na direção do útero. Sua luz representa um ambiente adequado à fertilização, e a secreção aí encontrada contribui para a nutrição e proteção do ovócito, bem como à ocorrência de parte do processo de capacitação dos espermatozóides.

Através de mecanismos de movimentação (contração e distensão da parede tubar ou varredura dos cílios superficiais), a tuba transporta o ovócito ou o zigoto até a luz uterina (Junqueira e Carneiro, 1995).

1.1.3- ÚTERO

O útero dos roedores é composto de dois cornos, um corpo e uma cérvix, e as proporções relativas de cada parte, assim como a forma e disposição dos corpos, variam de espécie para espécie (Hafez, 1988).

A parede uterina é constituída por três túnicas, que, de fora para dentro, são: serosa (tecido conjuntivo + epitélio), ou adventícia (somente tecido conjuntivo), conforme região do órgão considerada; o miométrio, uma túnica de músculo liso; e o endométrio, que é uma mucosa, que possui epitélio simples cilíndrico que revestem a luz e secretam muco na superfície e também em glândulas na lâmina própria do endométrio (Junqueira e Carneiro, 1995).

O útero apresenta várias funções. O endométrio e seus fluídos têm grande relevância no processo reprodutivo como : transporte dos espermatozóides do ponto de ejaculação até o local da fertilização na tuba, controle da função do corpo lúteo, início da implantação, gestação e parto.

No acasalamento, a contração do miométrio é essencial para o transporte dos espermatozóides do ponto de ejaculação para o local de fertilização. À medida que os espermatozóides são transportados através da luz uterina para as tubas eles começam a sofrer a capacitação nas secreções endometriais (Hafez, 1988).

O útero é um órgão altamente especializado, adaptado para aceitar e nutrir os produtos da concepção desde a implantação até o parto.

Após a implantação, o embrião depende de um suprimento vascular adequado dentro do endométrio para seu desenvolvimento.

O útero tem capacidade de sofrer modificações extraordinárias no tamanho, estrutura e posição a fim de acomodar as necessidades do produto em crescimento (Hafez, 1988).

A resposta contrátil do útero permanece quiescente até o momento do parto, quando então tem a participação mais destacada para a expulsão fetal. Após o parto, o útero quase readquire seu antigo tamanho e condição por um processo chamado involução (Hafez, 1988).

1.1.3.1- CÉRVIX UTERINA

A cérvix é uma estrutura semelhante a um esfíncter que se projeta caudalmente na vagina.

A mucosa do conduto cervical ou luz do colo é constituída por epitélio simples prismático de células mucinógenas e uma lâmina própria onde se encontram as glândulas cervicais.

Indiretamente, a secreção do colo do útero desempenha importante papel na fertilização. Durante a ovulação as glândulas do colo uterino secretam muco muito fluído, que facilita a passagem dos espermatozóides. Na fase secretória e na gravidez os elevados níveis sanguíneos de progesterona influenciam essas glândulas a produzirem muco viscoso, que impedem a passagem de microrganismos e de espermatozóides para dentro da cavidade uterina (Junqueira e Carneiro, 1995).

1.1.4- A VAGINA

A vagina é um órgão em forma de um tubo fibromuscular que apresenta suas paredes colabadas. Consiste de três camadas: uma membrana mucosa; uma camada muscular; e uma adventícia. A membrana mucosa apresenta um epitélio estratificado e o tecido conjuntivo. A camada muscular é constituída por várias fibras musculares lisas. Mais externamente apresenta ainda tecido conjuntivo e também tecido erétil sendo revestida por uma adventícia fibrosa que une a vagina à uretra e a outros órgãos adjacentes (Ross and Romrell, 1989).

1.2- ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE ALGUNS ÓRGÃOS DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO NOS PERÍODOS:

1.2.1- PRÉ-NATAL

Durante o desenvolvimento pré-natal o ovário apresenta como tecido predominante o córtex. As células germinativas primordiais têm origem extra-gonadal e migram da parede do saco vitelínico para as cristas genitais. Durante o desenvolvimento fetal as oogônias são produzidas por multiplicação mitótica, formando vários milhões de ovócitos. Esta é seguida pela primeira divisão meiótica, processo este que se estaciona na prófase. Uma subsequente atresia reduz o número de ovócitos na época do nascimento e nova redução ocorre na puberdade, de modo que somente algumas centenas estarão presentes no final da vida reprodutiva. Todos os ovócitos originam-se da população original de células germinativas da crista genital. As células foliculares (fibroblasto-like) que circundam o ovócito, desenvolvem-se da camada subjacente do epitélio germinativo, enquanto que as células endócrinas - células da teca e as intersticiais - originam-se da medula ovariana (Hafez, 1988).

1.2.2- PÓS-NATAL

Ao nascimento há uma camada de células foliculares que circunda os ovócitos primários formando os folículos primordiais. De início, estes estão espalhados pelo ovário, porém no recém-nascido eles tornam-se localizados na zona cortical periférica, debaixo da túnica albugínea e circundando a medula vascular (Hafez, 1988).

Os ovócitos começam a sofrer uma maior diferenciação durante o período pós-natal. As ovogônias, estando em prófase da primeira divisão meiótica, são conhecidas como ovócitos primários. Os ovócitos primários se mantêm em prófase até que seja atingida a maturidade sexual (Banks, 1992). Estas diferenciações são produtos da ação de hormônios como o estrógeno e progesterona que, nesta fase do desenvolvimento, se encontram em quantidade circulante bastante baixa. Esta situação persiste até que a diferenciação do trato reprodutivo se complete chegando então na fase puberal (Plapinger, 1982).

1.2.3- PUBERDADE

É a fase de desenvolvimento do organismo durante a qual ocorre uma série de alterações orgânicas e comportamentais capacitando o animal para os mecanismos de reprodução.

Na fase puberal ocorrem modificações somáticas decorrentes de alterações de secreção de hormônios. A puberdade propriamente dita deve-se a modificações do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, que aumentam a secreção de gonadotrofinas indutoras da ativação gonadal, determinando aumento da secreção de estrógenos, responsáveis pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários tornando assim, com o tempo, a fêmea púbere em fêmea sexualmente madura (Rodrigues e Migliorini, 1988).

1.2.4- MATURIDADE SEXUAL

1.2.4.1- O CICLO OVARIANO

Os ovários sofrem alterações cíclicas influenciadas pelos hormônios tróficos secretados pela adeno-hipófise. A atividade desta é regulada pelos fatores

liberadores hipotalâmicos - fator de liberação do hormônio luteinizante e o fator de liberação do hormônio folículo-estimulante. O controle da atividade hipotalâmica está sujeita à estímulos ópticos e olfatórios que podem modular a atividade do eixo hipotálamo-ovariano. A atividade secretora tônica do hipotálamo e a retroalimentação negativa dos hormônios ovarianos influenciam a atividade reprodutora cíclica da fêmea.

A liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) pela adeno-hipófise é o regulador específico da atividade ovariana. O FSH estimula o crescimento e a maturação dos folículos ovarianos, é responsável pela ativação das células da membrana granulosa levando-as a sintetizar uma pequena quantidade de estrógeno, faz também que se criem receptores de LH nas membranas das células da teca interna, e estas, por sua vez secretam andrógenos que, ao alcançar as células granulosas, as levam a secretar ciclina que convertem os andrógenos em estrógeno. O estrógeno estimula o crescimento do folículo juntamente com a proliferação de células granulosa. As células intersticiais também são fonte de estrógeno. Este hormônio é o responsável por várias alterações ocorridas no organismo feminino. É no momento em que o estrógeno se encontra em seu pico que a fêmea aceita o macho para que ocorra a cópula. O estrógeno tem ainda grande papel no aumento da fluidez da membrana das células do epitélio vaginal (Reddy et al., 1989) facilitando a entrada de metabólitos e íons que auxiliam no processo de queratinização das células do epitélio vaginal, seja pela modulação direta do segmento do DNA responsável pela síntese de queratina (Roop, 1987), seja pelo processo enzimático de síntese de

queratina propriamente dito (Kang & West, 1982) ou então pela ligação dos filamentos de queratina entre si (Gupta et al., 1990).

Adicionalmente, as células da granulosa produzem um hormônio protéico, a foliculostatina, que tem uma influência retroalimentadora negativa sobre a produção de FSH suprimindo-o. Assim, ocorre diminuição no nível de estrógeno, já que o FSH diminuiu na corrente sangüínea, e as células da membrana granulosa e as células intersticiais diminuem a secreção de estrógeno. Isso acontece em conjunto com a ativação da adeno-hipófise por parte do fator hipotalâmico liberador de hormônio luteinizante, começando a secretar LH. O LH atinge a corrente sangüínea e chega às células-alvo ovarianas (células da teca) aumentando seu volume de secreção e conseqüentemente o volume do folículo culminando na extrusão do ovócito ou seja, a ovocitação (Banks, 1992).

A ruptura dos folículos ovarianos culmina na alteração das regiões remanescentes do folículo que conduzem a formação do corpo lúteo. As paredes foliculares desabam sobre si mesmas e as células da granulosa invadem a luz residual, hipertrofiam e transformam-se em células granulosa-luteínicas. Estas células são responsáveis pela produção principal de progesterona. Por sua vez, a progesterona colabora com os estrógenos na expressão do comportamento sexual característico associado ao estro, inibe as contrações musculares uterinas, exerce uma influência retroalimentadora negativa sobre o ovário e adeno-hipófise, estimula o crescimento da porção secretora da glândula mamária, gera uma menor influência catabólica sobre as proteínas plasmáticas e pode alterar o balanço eletrolítico.

As influências combinadas do FSH e do LH regulam as atividades cíclicas do ovário. Tais atividades são a diferenciação do ovócito, desenvolvimento dos folículos, ovocitação, degeneração dos folículos, degeneração do corpo lúteo e uma série de outros acontecimentos dentre eles as alterações morfológicas dos segmentos do trato reprodutivo feminino (Banks, 1992).

Existe ainda outro mecanismo hormonal que age sobre o trato genital feminino, estando envolvido, principalmente, na liberação de gonadotrofina, na regressão luteínica, ovulação entre outras funções. Tal mecanismo tem como agentes, hormônios que apresentam como precursor o ácido araquidônico e são denominados prostaglandinas. Estes hormônios podem ser secretados por vários tipos celulares. As prostaglandinas mais intimamente associadas aos eventos reprodutivos são as prostaglandina $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) e a prostaglandina E_2 (PGE_2).

O primeiro enfoque nos estudos de reprodução foi centralizado sobre os efeitos luteolíticos da $PGF_2\alpha$ e os efeitos ocitócicos tanto da $PGF_2\alpha$ quanto da PGE_2 .

Os estudos da propriedade luteolítica da $PGF_2\alpha$ não determinaram com exatidão seu mecanismo de ação, mas, todavia, um de seus efeitos é o fenômeno da vasoconstricção podendo induzir hipóxia, que por sua vez leva a luteólise.

Na maioria dos mamíferos o útero tem uma atuação básica na produção de $PGF_2\alpha$. Altos níveis de $PGF_2\alpha$ são detectados durante a regressão luteínica no sangue venoso uterino. Como a $PGF_2\alpha$ atravessa seletivamente as paredes da veia uterina e da artéria ovariana quando em íntimo contato próximo ao ovário, grande

quantidade de $\text{PGF}_2\alpha$ fica imediatamente disponível ao ovário. Aumentos experimentais dos níveis de estrógeno durante a fase luteínica demonstram que a elevação de estrógeno é sempre seguida pelo aparecimento de $\text{PGF}_2\alpha$ quando o endométrio está preparado por progesterona. À partir de dados experimentais também pôde-se inferir que a regressão do corpo lúteo não está relacionada com a diminuição na secreção de LH, mas pela ação de um fator luteolítico, a prostaglandina $\text{F}_2\alpha$ (Levasseur e Thibault, 1988). As prostaglandinas juntamente com o AMPcíclico também têm uma grande participação na seqüência de eventos que permitem a ruptura do folículo em resposta a ação do hormônio luteinizante e também, têm-se demonstrado que as prostaglandinas participam da regulação da liberação de LH, onde a administração de inibidores da síntese de prostaglandinas inibem completamente este mecanismo de controle e, como conseqüência, a secreção de LH torna-se irregular (Hafez, 1988).

1.2.4.2- O CICLO ESTRAL

O ciclo estral é controlado basicamente pela interação entre o hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estrógeno e progesterona. Estes hormônios são comuns à maioria dos animais; contudo, seus padrões de secreção e seus efeitos relativos variam entre as diferentes espécies. Estas diferenças ocasionam variações na extensão das fases luteínica e folicular do ciclo, assim como as diferenças na duração do cio. A fase folicular do ciclo é caracterizada pela rápida queda dos níveis de progesterona e um aumento nos níveis de estrógeno. O declínio da progesterona, seguido do rápido acréscimo do

estrógeno é um requisito essencial para o aparecimento do comportamento do cio (Kaltenbach e Dunn, 1988).

Denomina-se ciclo estral ao período de variações fisiológicas e morfológicas que ocorrem nos organismos da maioria dos mamíferos. A nível comportamental caracteriza-se por uma fase em que a fêmea aceita a cópula; esta fase é conhecida como estro. Durante o ciclo estral as variações na atividade reprodutora se repetem ciclicamente obedecendo ao comando exercido pelo sistema nervoso central, através dos mecanismos hormonais. Esses acontecimentos estão ordenados em quatro fases ou estágios distintos, porém contínuos: **proestro, estro, metaestro e diestro**. Na fase do proestro, através da influência do FSH, o folículo ovariano começa a crescer e a secretar estrógeno que atingirá seu pico no início da fase do estro ou cio, que é quando ocorre a cópula. O metaestro é um período de transição no qual, através do estímulo de LH, o corpo lúteo começa a secretar progesterona que atingirá seu pico durante o início do diestro (Walmer et al., 1992).

A duração do ciclo varia bastante entre diversos animais. Podem ser monoéstricos, que se caracterizam por apresentar ciclo estral apenas uma vez por ano, onde as fases do proestro, estro, metaestro e diestro são seguidas por um período de quiescência denominado anestro, ou podem ser poliéstricos sazonais onde ciclam somente em determinada época do ano, ou então somente poliéstricos, onde há ciclos sem interrupção passando da fase do diestro para a do proestro sem que haja o anestro. Os roedores pertencem a este último grupo (Levasseur e Thibault, 1988; Banks, 1992).

Com as variações dos níveis hormonais durante o ciclo estral, o trato reprodutivo, em especial a vagina, sofre alterações que se manifestam macro e microscopicamente servindo de espelho às funções ovarianas (Vijayasradhi & Gupta, 1987 e 1988).

Alguns autores documentaram estas modificações, a nível microscópico, em várias espécies animais como por exemplo em vaca (Blazquez et al., 1989), em porca (Branscheid and Holtz., 1988), em cadela (Wright and Parry, 1989), em lontra (Stenson, 1988), em furão (Hamilton & Gold, 1940), em coelha (Barberini et al., 1989), em rata (Parakkal, 1974; Centola, 1978; Vijayasradhi & Gupta, 1987) e em camundongos (Allen, 1927; Perrota, 1962; Galand et al., 1971; Rubio, 1976; Lamb et al., 1978; King, 1983; Corbeil et al., 1985; Young & Hosking, 1986; Nelson et al., 1991; e Horvat et al., 1992). Contudo, como bem descreveu D'Souza (1978), o padrão do epitélio vaginal durante o ciclo estral é espécie específico.

As alterações cíclicas, que ocorrem durante o ciclo estral no epitélio vaginal, caracterizam-se pela queratinização ou secreção das células superficiais do epitélio, variações no número de mitoses no estrato germinativo e conseqüentemente na espessura do epitélio, migração leucocitária do conjuntivo em direção à luz do órgão e aumento populacional de células de Langerhans entre os queratinócitos.

Em roedores, durante o proestro, o nível de estrógeno é máximo. Esse hormônio em alto nível, age sobre os queratinócitos tornando sua membrana mais fluída (Reddy et al., 1989). Tal fluidez facilita a entrada de substâncias para o interior da célula, entre elas o cálcio que, quando em alta concentração no citoplasma, ativa a enzima transglutaminase. Esta enzima tem importante papel na

ligação dos filamentos de queratina entre si (Gupta et al., 1990). O estrógeno também age sobre a enzima glicose-6-fosfatase, que auxilia na síntese de queratina (Kang & West, 1982) além de possuir propriedade de modular a expressão do segmento de DNA responsável pela síntese de queratina (Roop, 1987). A alta no nível estrogênico causa também aumento no número de figuras de mitose já que este hormônio provoca uma redução na duração da fase S do ciclo celular diminuindo o tempo de duplicação do DNA (Galand et al., 1971).

A queratinização se completará durante a fase do estro, e no estro tardio o nível de estrógeno começa a decrescer enquanto o de progesterona começa a subir. Na superfície epitelial durante esta fase ocorre “evaginações” da membrana caracterizando microrrugos interconectantes ou anastomosadas, as quais atuam como “trilhos” para os espermatozóides aptos para que estes possam chegar até o útero ou, criando, obstáculos aos espermatozóides inaptos (Rubio, 1976; Parakkal, 1974; Centola, 1978 e Lamb et al., 1978).

Na fase estrogênica - proestro e estro - o epitélio é bastante espesso. Com a queda do nível de estrógeno e o acréscimo de nível de progesterona - início do metaestro - começa haver um processo de morte celular fisiologicamente programada conhecida por apoptose (Parr et al., 1991). Estas células epiteliais apoptóticas são fagocitadas por células do sistema monócito-macrófago intraepitelial - Células de Langerhans - tornando o epitélio mais atrófico que durante a fase estrogênica (Young et al., 1985). Young (1985), descreve a densidade de Células de Langerhans como sendo diretamente proporcional ao acréscimo do nível de progesterona - metaestro/diestro.

Entre o metaestro tardio e o diestro precoce a progesterona atinge seu ponto máximo (Walmer et al., 1992). A camada de células queratinizadas passa a ser substituída por células secretoras, fato causado por, provavelmente, alguns mecanismos de produção de glicoproteínas ativados pela alta taxa de progesterona. Ocorre também migração leucocitária, provavelmente para proteger o órgão de infecções já que a progesterona exerce um efeito imunodepressor importante ao organismo feminino (Corbeil et al., 1985) ou para fagocitar restos de espermatozoides na luz da vagina e do útero (Branscheid & Holtz, 1988). Nas células superficiais a progesterona causa alterações também a nível da membrana apical das células epiteliais, provocando insinuações do tipo microrrugos em disposição paralelas durante a fase de metaestro e tipo microvilos durante o diestro (Rubio, 1976 e Parakkal, 1974).

1.3- *Calomys callosus*

A super família Muroidea abriga grande número de espécies de roedores que habitam todo o mundo. Incluídos nesta super família temos as famílias - **Cricetidae**, à qual pertencem os hamsters e *Calomys*, e - **Muridae** que incluem ratos e camundongos.

Alguns cricetídeos, especialmente os do hemisfério norte, têm se mostrado bastante adaptáveis, quando mantidos em cativeiro, tornando-se assim animais de utilização comum em laboratório. Isto tem proporcionado um melhor conhecimento

dos diferentes aspectos de sua biologia, em todas as áreas de estudo (Gonzaga e Ferro, 1995).

O gênero *Calomys* é composto por roedores da família dos cricetídeos os quais são amplamente encontrados nas Américas Central e do Sul. Eles ocorrem em diferentes tipos de biomas como em floresta tropical, savanas, “caatingas”, pastagens e em residências humanas (Mello, 1978).

Calomys callosus é um roedor amplamente encontrado em todo território brasileiro. Socialmente, esses animais apresentam relevante importância por serem reservatório do *Trypanosoma cruzi* (Ribeiro, 1973), agente etiológico da doença de Chagas e transmissores da febre hemorrágica argentina (Justines & Johnson, 1969).

Estes animais tem-se mostrado bastante susceptíveis a doenças infecciosas tais como a esquistossomose, leishmaniose (Mello, 1978) e toxoplasmose (Favoreto et al., 1994), o que tem proporcionado um excelente modelo biológico para o estudo destas doenças. Baseados nestes achados, atualmente existe uma forte tendência para uma ampla utilização desta espécie em laboratório.

A biologia desses animais, bem como sua adaptabilidade sob condições laboratoriais foram estudadas por diversos autores (Petter et al., 1967; Justines & Johnson, 1970; Mello, 1978, 1981).

Do ponto de vista reprodutivo, está estabelecido tratarem-se de animais poliétricos, com ciclo de aproximadamente 6 dias com estro pós-parto (Mello, 1978), apresentam um período gestacional de aproximadamente 22 dias. A implantação embrionária ocorre por deslocamento (Gonzaga e Ferro, 1995) e inicia-se, precocemente, na tarde do quarto dia de gestação (Ferro & Bevilacqua, 1994).

2- OBJETIVOS

Com este trabalho pretende-se:

- Caracterizar morfológicamente o epitélio vaginal de *Calomys callosus*.
- Descrever as alterações cíclicas ocorridas no epitélio vaginal de *Calomys callosus* durante o ciclo estral.
- Caracterizar ultra-estruturalmente as células superficiais do epitélio vaginal durante o ciclo estral.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - ESPÉCIMES

Foram utilizados *Calomys callosus* (linhagem canabrava) oriundos do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do Setor de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Uberlândia, com dieta *ad libitum* de água, ração granulada, aveia, girassol e milho, e utilizados ao atingirem a idade de três meses.

3.2- DIAGNÓSTICO DA FASE E COLETA DO MATERIAL

Todas as manhãs foram feitos esfregaços vaginais, processados pela técnica de Shorr (1945) e analisados ao microscópio de luz, sacrificando-se três fêmeas para cada fase do ciclo estral.

Os animais foram anestesiados por inalação com éter, laparotomizados e então retiradas as vaginas. As vaginas então foram cortadas longitudinalmente de modo a obtermos duas metades do órgão; uma metade foi processada para microscopia de luz e a outra para microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

3.3- MICROSCOPIA DE LUZ.

O material foi mantido em solução fixadora de álcool, formol, ácido acético glacial e água (5:3:3:1 v/v) por aproximadamente 48 horas e, em seguida, desidratado em etanóis de concentrações crescentes (de 50 a 100 %), incluído em glicol-metacrilato, cortados com 2 μ m de espessura, corado em azul de toluidina, ou processados pela técnica do P.A.S. contracorado com hematoxilina (McManus, 1948).

3.4- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

O tempo de fixação deste lote de material foi de aproximadamente 12 horas em solução fixadora de glutaraldeído a 2% e paraformaldeído a 2% em tampão fosfato 0.1 M pH 7,4 (Karnovsky, 1965 - modificado). Posteriormente, os fragmentos foram pós-fixados por 1 hora em tetróxido de ósmio à 1%, seguindo-se os procedimentos de rotina para a inclusão em Epon 812. Foram feitos cortes semi-finos para obtenção da área desejada e então feitos os cortes ultra-finos. Após a contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo foram levados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-109 para análise e documentação fotográfica.

3.5- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para processamento dos fragmentos baseamo-nos em método padronizado por Murakami & Jones (1980). Após aproximadamente 30 horas em solução fixadora de Karnovsky-modificado, o material foi cortado em fragmentos menores e então pós-fixados em solução tamponada de tetróxido de ósmio à 1%, por duas horas. Os fragmentos foram lavados em várias trocas de tampão e imersos em solução aquosa, recém preparada e filtrada de ácido tânico à 1% por 20 minutos. Em seguida foram lavados em várias trocas de água destilada e contrastados com solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1%, por duas horas. Posteriormente, foram desidratados em etanóis de concentrações crescentes (50 a 100%) e então levados ao ponto crítico para dessecação, depois colados sobre suportes de alumínio e metalizados com ouro. Terminados os procedimentos acima, foram levados ao microscópio eletrônico de varredura para análise e documentação fotográfica. Esta

parte do experimento foi realizada na Escola Paulista de São Paulo em São Paulo e na Universidade Federal de Minas Gerais em Belo Horizonte.

4- RESULTADOS

4.1 PROESTRO

Durante esta fase o epitélio mostra-se estratificado pavimentoso queratinizado, apresentando cerca de 20 camadas de células. Sobre a camada queratinizada observa-se células prismáticas com aspecto secretor e conteúdo PAS positivo (Fig. 1). Os estratos germinativo, espinhoso, granuloso e córneo são bem definidos sendo o granuloso caracterizado pela presença de estruturas semelhantes a grânulos de querato-hialina geralmente encontrados nesta região do epitélio.

No estrato germinativo os queratinócitos possuem forma prismática e apresentam citoplasma acidófilo com núcleos evidentes e raramente são observadas figuras de mitose. À medida que se aproximam da luz vaginal, as células vão se tornando pavimentosas.

No citoplasma das células do estrato granuloso há um grande número de grânulos que provavelmente são de querato-hialina, os quais aumentam à medida que se aproxima do estrato córneo.

Na região superficial, as células apresentam-se queratinizadas e, acima desta, as células se caracterizam por serem prismáticas e secretoras. O citoplasma destas células apresentam-se preenchidos por grânulos de secreção PAS positivo.

O tecido conjuntivo da lâmina própria é do tipo frouxo próximo ao epitélio e denso desordenado em regiões mais profundas. Vasos sanguíneos são observados e, tanto ao redor destes quanto espalhados no conjuntivo bem como próximos à membrana basal, há grande quantidade de leucócitos.

Ultra-estruturalmente, as células do terço basal apresentam núcleos ovalados, sendo eucromáticos e com nucléolos evidentes (Fig. 2). A junção entre as células e a lâmina basal é feita através de hemi-desmossomos e entre as células adjacentes é feita por desmossomos típicos. No citoplasma observa-se uma grande quantidade de mitocôndrias com cristas tubulares e lamelares, cisternas de retículo endoplasmático granular e numerosos polissomas livres. Filamentos com aproximadamente 10 nm de diâmetro são observados, isolados ou agrupados em feixes. Gotículas lipídicas são observadas.

No terço médio a maioria das células são globosas ou levemente pavimentosas e as demais características do terço basal são mantidas, exceto pelo fato de ser maior o número de desmossomos que mantém as células unidas entre si (Fig. 3).

Na porção apical são observadas duas populações celulares distintas, a mais interna contendo células pavimentosas e a mais externa composta por células prismáticas com aspecto secretor (Fig. 4) e entre estas uma camada de células queratinizadas. Na região de células pavimentosas observa-se citoplasma repleto de

filamentos de espessura aproximada de 10 nm de diâmetro e grânulos elétron-densos. Nota-se uma redução, em relação às porções basal e média, no número de mitocôndrias e cisternas de retículo endoplasmático granular, persistindo ainda o grande número de polissomas livres. As demais características ultra-estruturais são mantidas. As células secretoras apresentam núcleos predominantemente heterocromáticos, citoplasma com organelas em diferentes graus de degeneração e numerosos grânulos de secreção de elétron-densidade variada (Fig. 4).

A superfície do epitélio em uma visão panorâmica da célula por microscopia eletrônica de varredura apresenta microrrugos com formas e orientações variadas (Fig. 5) mas que na maioria das vezes, são interconectantes (Fig. 6).

4.2- ESTRO

O epitélio é estratificado pavimentoso queratinizado com aproximadamente 35 a 40 camadas de células, como na fase anterior, os estratos germinativos, granuloso e córneo são bem definidos.

No estrato germinativo as células são semelhantes às células da mesma porção na fase de PROESTRO, sendo comum a presença de várias figuras de mitose (Fig.7).

No estrato granuloso as células apresentam forma pavimentosa com núcleos de cromatina frouxa. Em seus citoplasmas aparecem grande quantidade de grânulos eletron-densos semelhantes a grânulos de querato-hialina.

As células da porção apical se apresentam completamente queratinizadas e na luz do órgão aparecem algumas células queratinizadas descamadas (Fig 8).

O tecido conjuntivo apresenta características semelhantes à fase anterior.

Ao microscópio eletrônico de transmissão, as células da região basal são semelhantes às células da mesma região na fase anterior. No citoplasma, observa-se retículo endoplasmático granular, polissomas livres, filamentos de aproximadamente 10 nm de diâmetro e mitocôndrias que apresentam variação quanto à forma de suas cristas que podem ser lamelares (Fig. 9) ou tubulares (Fig. 10).

Na porção média, as células são pavimentosas com núcleos eucromáticos. No citoplasma, as organelas são dificilmente observadas com exceção dos polissomas livres e há um considerável aumento na quantidade de grânulos semelhantes a querato-hialina e de feixes de filamentos elétron-densos com diâmetro de 10 nm (Fig. 11). Estes feixes, em alguns pontos de contato com a região queratinizada, aparecem aderidos à face interna dos desmossomos (Fig. 12).

As células da porção apical apresentam-se queratinizadas tendo seus citoplasmas completamente preenchidos por uma substância amorfa, homogênea e elétron-densa e em alguns pontos podem ser notados restos de núcleos (Fig. 13). A

adesão das células queratinizadas adjacentes ou sobrepostas é feita por desmossomos, e entre eles, observa-se uma diminuição do espaço extracelular. Nestes locais há deposição de material elétron-denso (detalhe da Fig. 13).

Com o uso da microscopia eletrônica de varredura, observa-se que as células epiteliais superficiais achatadas apresentam-se em processo de descamação (Fig. 14). Em maiores aumentos a superfície celular mostra-se bastante irregular apresentando grande quantidade de microrrugos, estas são dispostas formando uma superfície “rendada”- microrrugos interconectantes (Fig.15) as quais são características em todas as células superficiais desta fase, podendo haver variações na quantidade por célula.

4.3- METAESTRO

Nesta fase o epitélio é estratificado pavimentoso e composto por aproximadamente 10 camadas celulares e apenas os estratos germinativos e espinhoso são bem definidos (Fig.16).

O estrato germinativo é semelhante ao observado nas fases anteriores, exceto pela diminuição no número de figuras de mitose.

As células da porção apical se apresentam pavimentosas com núcleos de cromatina frouxa. Durante o metaestro tardio, esta camada torna-se P.A.S. positiva (Fig. 16). Em toda extensão do epitélio são observados infiltrados leucocitários por entre os queratinócitos. Na luz do órgão há uma grande quantidade de células

epiteliais descamadas, também há leucócitos e, quando em metaestros precoces, pode-se encontrar, ainda, a camada de células queratinizadas descamando-se do epitélio.

No tecido conjuntivo há um aumento considerável no número de leucócitos próximos ao epitélio.

Ao microscópio eletrônico de transmissão as porções basal e mediana apresentam-se semelhantes às descritas na fase anterior. A porção apical apresenta células pavimentosas e em seus citoplasma aparecem mitocôndrias com cristas lamelares, cisternas de retículo endoplasmático granular, polissomas livres e filamentos de diâmetro de aproximadamente 10nm (Fig.17). Durante o metaestro tardio, aparecem no citoplasma das células da região apical, depósitos de glicogênio (Fig. 18). São observados também, leucócitos entre os queratinócitos (Fig. 19).

Ao microscópio eletrônico de varredura observa-se que o processo de descamação é contínuo, embora menos intenso que durante o estro (Fig. 20). Há microrrugos com disposição paralelas (Fig.21).

4.4- DIESTRO

Durante esta fase, o epitélio pode sofrer uma grande variação quanto ao número de camadas de células. No diestro precoce o epitélio é bastante delgado com aproximadamente 4 a 5 camadas celulares (Fig. 22) e durante o diestro tardio,

15 a 20 (Fig.23). No diestro precoce define-se bem apenas o estrato germinativo e no tardio os estratos germinativos, espinhoso e granuloso são bem evidentes.

As regiões basal e mediana são semelhantes às fases anteriores sendo que, no diestro precoce, as figuras de mitose são raras enquanto que no diestro tardio há um aumento notável.

Na região apical, as células da camada superficial se mostram secretoras em ambas etapas. No diestro precoce, as células secretoras são cúbicas altas (Fig.22) enquanto que no diestro tardio, são prismáticas (Fig.23). Tanto as células cúbicas quanto as prismáticas têm seus citoplasmas marcados pela reação do PAS.

Os leucócitos apresentam-se distribuídos por toda a extensão do epitélio e no diestro precoce formam, próximo às camadas superficiais, aglomerados leucocitários (Fig.22).

Na luz, são vistas células descamadas, leucócitos e bastante substância amorfa PAS positiva.

No tecido conjuntivo os leucócitos são abundantes e apresentam dispersos pela extensão do tecido.

Ultra-estruturalmente as células das regiões basal e média são bastante semelhantes às das fases anteriores.

As células cúbicas altas apresentam núcleos eucromáticos e no citoplasma são observadas mitocôndrias com cristas lamelares, cisternas do retículo

endoplasmático granular, polissomas livres, poucos filamentos elétron-densos, cisternas de complexo de Golgi e alguns grânulos de secreção elétron-densos e homogêneos (Fig.24), já as células prismáticas apresentam núcleos heterocromáticos e no citoplasma os grânulos de secreção apresentam elétron-densidade variada e poucas organelas são evidenciadas (Fig. 25).

Em alguns locais da superfície celular observa-se grânulos de secreção em processo de extrusão (Fig.26).

5 - DISCUSSÃO

Durante o ciclo estral o epitélio vaginal de *Calomys callosus* sofre profundas alterações morfológicas, semelhantes ao que ocorre em furão (Hamilton et al., 1940), coelha (Barberini et al., 1989), em rata (Parakkal, 1974; Centola, 1978; Vijayasaradhi & Gupta, 1987) e em camundongas (Allen, 1927; Perrota, 1962; Galand et al., 1971; Rubio, 1976; Lamb et al., 1978; King, 1983; Corbeil et al., 1985; Young & Hosking, 1986; Nelson et al., 1991; e Horvat et al., 1992), observa-se a aquisição de atividade secretória, alterações nos padrões de queratinização, aumento na taxa de mitose dentre outras características. À semelhança de outros animais, tais alterações dão-se, provavelmente, devido a níveis oscilantes de hormônios ovarianos.

No proestro, o nível de estrógeno é máximo e, assim, influencia os queratinócitos a apresentarem uma maior fluidez na membrana plasmática (Reddy et al., 1989). Esta maior fluidez facilita a entrada de íons cálcio para o interior das células. Níveis aumentados de cálcio geram, entre outras respostas, a ativação de uma enzima, a transglutaminase que exerce importante papel na queratinização dos queratinócitos (Gupta et al., 1990). Além desse efeito indireto, já comprovou-se que o estrógeno influencia diretamente a enzima glicose-6-fosfatase a qual tem papel relevante na síntese de queratina (Kang & West, 1982). Somando-se a isso Roop (1987) demonstrou que o estrógeno

possui a propriedade de modular a expressão do segmento de DNA responsável pela síntese de queratina. Estes dados, obtidos com estudos em ratos e em camundongos, permite-nos inferir que em *Calomys callosus*, o processo de queratinização, iniciado no diestro o qual se torna máximo no estro, muito provavelmente esteja correlacionado, direta ou indiretamente a níveis aumentados de estrógeno.

Sabe-se que durante o estro ocorre a cópula, portanto é necessário uma maior proteção da mucosa vaginal. Esta proteção é dada pela camada de células queratinizadas e também por uma maior espessura das demais camadas de células do epitélio. Esta maior espessura é resultado de um grande número de células basais em mitose. Fato semelhante foi observado por Galand et al., (1971) que demonstrou, em camundongos, que durante a fase estrogênica ocorre aumento no número de figuras de mitose por haver uma diminuição no tempo de duração da fase S do ciclo celular, diminuindo o tempo de duplicação do DNA.

A queratinização das células superficiais culmina na morte destas e em sua superfície é marcante a quantidade de microrrugos anastomosadas, as quais servem para facilitar o transporte dos espermatozóides na vagina, seja funcionando como “trilhos”, ou como local de armazenamento de muco produzido pela cérvix uterina lubrificando as paredes vaginais ou ainda,

servindo de obstáculos a espermatozóides inaptos (Rubio, 1976; Parakkal, 1974; Centola, 1978; e Lamb et al., 1978).

Morfologicamente o final do estro é marcado pela liberação da camada queratinizada na luz do órgão e por uma diminuição na espessura do epitélio. Fisiologicamente caracteriza-se por um decréscimo nos níveis de estrógeno e aumento nos níveis de progesterona. Este momento marca a transição do estro para o metaestro e, à medida que se prossegue no ciclo, as células superficiais do epitélio vaginal iniciam um processo de atividade secretória, notada tanto pela reação P.A.S. quanto pelo aumento no número de organelas citoplasmáticas, responsáveis pelo processo de síntese de glicoproteínas, evidenciadas pela análise ultra-estrutural de tais células. É sabido que durante o progredir da fase de metaestro, níveis de progesterona são crescentes. Apesar de não haver dados conclusivos na literatura é possível que esta relação de secreção/progesterona seja dependente e não casuística. Durante o metaestro observa-se um intenso infiltrado leucocitário por entre as células epiteliais, os quais migram em direção à luz do órgão. Esta infiltração é um fenômeno não muito bem conhecido apesar de já ter sido descrita por diferentes autores (Busch, 1966; Holtz et al., 1968). Fatores atrativos para leucócitos presentes no epitélio vaginal carecem ser investigados, mas é provável que existam. Assim, por um mecanismo ainda obscuro, os leucócitos

migram pelo epitélio em direção à luz com a finalidade de proteger o epitélio de agentes infecciosos (Corbeil et al., 1985), ou para fagocitar restos de espermatozóides que porventura possam estar presentes na luz vaginal (Branscheid & Holtz, 1988).

Ainda na fase do metaestro nota-se uma considerável diminuição na espessura do epitélio. Este fato decorre da diminuição do número de camadas celulares que pela diminuição da ação do estrógeno faz com que a fase S do ciclo celular seja mais longa (Galand et al., 1971) e, conseqüentemente, há um menor número de mitoses. Outra explicação para a diminuição da espessura do epitélio durante a fase luteínica - início do metaestro - é que começa a haver um processo de morte celular fisiologicamente programada denominado apoptose (Parr et al., 1991), e então estas células apoptóticas começariam a ser fagocitadas por células do sistema monócito-macrófago intraepitelial - as células de Langerhan's- tornando o epitélio mais atrófico que na fase estrogênica (Young et al., 1985), apesar deste fenômeno não ser por nós observado.

Durante a fase do diestro as células epiteliais superficiais adquirem formato cúbico ou prismático com características de células secretoras cada vez mais evidentes. A secreção produzida pelas células epiteliais é lançada na luz do órgão e, provavelmente, desempenham importante papel na defesa do

epitélio, uma vez que os leucócitos ficam imersos nesta malha gelatinosa, podendo assim exercer sua função fagocítica na luz do órgão (Branscheid & Holtz, 1988).

Durante o diestro tardio, o estrato granuloso inicia o processo de queratinização, sendo que no próximo proestro, já se encontrará queratinizado, levando então, as células secretoras à morte devido à falta de nutrição, já que as camadas de células queratinizadas exercem uma barreira à infiltração dos nutrientes necessários à sobrevivência das células superficiais.

A grande quantidade de grânulos de secreção observada no citoplasma das células superficiais, tanto no proestro quanto diestro, somado ao fato de tais células se apresentarem P.A.S. positivas, permite-nos inferir que tais células sintetizam e acumulam glicoproteínas. Entretanto, durante o metaestro as células superficiais também são P.A.S. positivas mas a análise ultra-estrutural não revelou grânulos de secreção e sim glicogênio.

6 - CONCLUSÕES

Baseados nas evidências morfológicas obtidas durante as diferentes fases do ciclo estral em *Calomys callosus*, pudemos concluir que:

1 - O ciclo estral em *Calomys callosus* morfológicamente é, como em outras espécies de roedores, dividido em 4 fases distintas e subsequentes: o proestro, estro, metaestro e diestro, as quais são decorrentes, provavelmente da flutuação nos níveis dos hormônios ovarianos.

2 - O epitélio vaginal de *Calomys callosus* é do tipo estratificado pavimentoso podendo ser queratinizado ou secretor dependendo da fase do ciclo estral que se encontra o animal.

3 - Durante o proestro, o epitélio é estratificado pavimentoso queratinizado com células secretoras na camada superficial. Ultra-estruturalmente, algumas células da região basal apresentam mitocôndrias tubulares. Na superfície, as células secretoras apresentam aspecto característico de células em estado degenerativo. Algumas células em sua superfície possuem microrrugos em disposição irregular.

4 - No estro o epitélio é estratificado pavimentoso queratinizado e bastante espesso. As células da região basal apresentam um grande número de núcleos mitóticos e, também, mitocôndrias com cristas tubulares e as microrrugos são interconectantes.

5 - No metaestro o epitélio é estratificado pavimentoso. Na região superficial as células pavimentosas apresentam-se PAS-positivas dado ao

acúmulo de glicogênio que se dá nesta fase. Inicia-se a migração leucocitária em direção à luz vaginal.

6 - Durante o diestro o epitélio é estratificado cúbico ou prismático com células secretoras PAS - positivas dado pelo acúmulo de grânulos de secreção, os quais contém, provavelmente, glicoproteínas. Nesta fase, inicia-se o acúmulo de grânulos, provavelmente querato-hialina na região granulosa do epitélio.

7- As células superficiais do epitélio vaginal de *Calomys callosus* apresentam potencialidade dupla: Morfologicamente caracterizam-se por serem queratinizadas ou secretoras de glicoproteínas. Acreditamos que tais variações dão-se em função de hormônios ovarianos a que o epitélio vaginal encontra-se sujeito.

7- DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

PRANCHA 1

Figs. 01, 02 e 03 - Epitélio vaginal de *Calomys callosus* durante o proestro

Fig. 01 - Epitélio estratificado pavimentoso queratinizado (E). Na região apical observa-se células secretoras com grânulos PAS positivos (G). Sob a camada queratinizada (Q) há granulações semelhantes a grânulos de querato-hialina (Δ). Fotomicrografia, glicol metacrilato, P.A.S. contracorado com hematoxilina, 350 x.

Fig. 02 - Região basal do epitélio onde parte do conjuntivo é observada (C) bem como a lâmina basal (Δ). No citoplasma dos queratinócitos (\star) há grande quantidade de mitocôndrias (M). Alguns desmossomos são também observados (D). Eletromicrografia, Epon, 15.300x.

Fig. 03 - Região média do epitélio onde observa-se grande quantidade de filamentos elétron-densos (F) e grande número de desmossomas (Δ). Eletromicrografia, Epon, 20.000x.



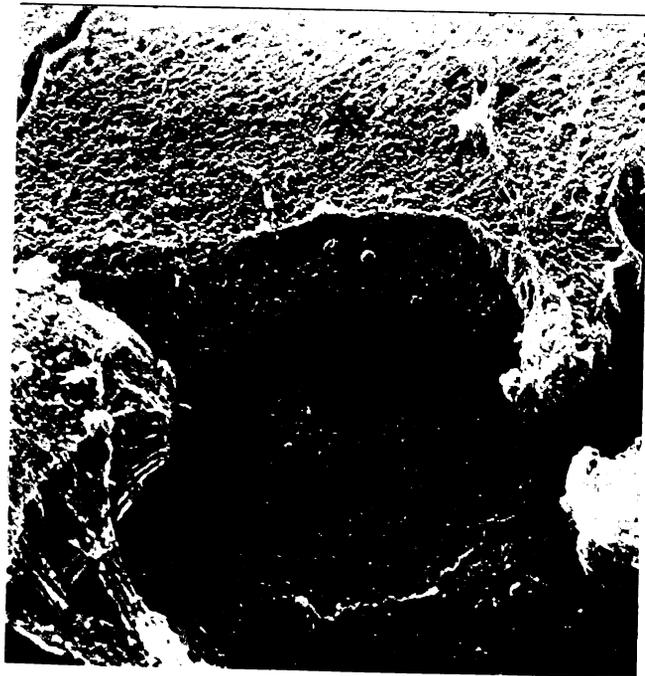
PRANCHA 02

Figs. 04, 05 e 06 - Epitélio vaginal de *Calomys callosus* durante o proestro

Fig. 04 - Região apical do epitélio. Observar parte do epitélio queratinizado (Q) e sobre esta camada, células prismáticas (★) com citoplasma repleto de grânulos de secreção (Δ) heterogêneos e núcleos heterocromáticos (n). Eletromicrografia, Epon, 23.000x.

Fig. 05 - Região superficial do epitélio. Observar células aparentemente livre sobre o epitélio (*) e sob a mesma, provavelmente células da superfície do estrato córneo (C) e alguns grumos de muco (Δ). Eletromicrografia, 6.000x.

Fig. 06 - Observar os limites celulares precisos da superfície do estrato córneo (Δ) e microrrugos na superfície de tais células (→). Eletromicrografia, 12.500x.



PRANCHA - 03

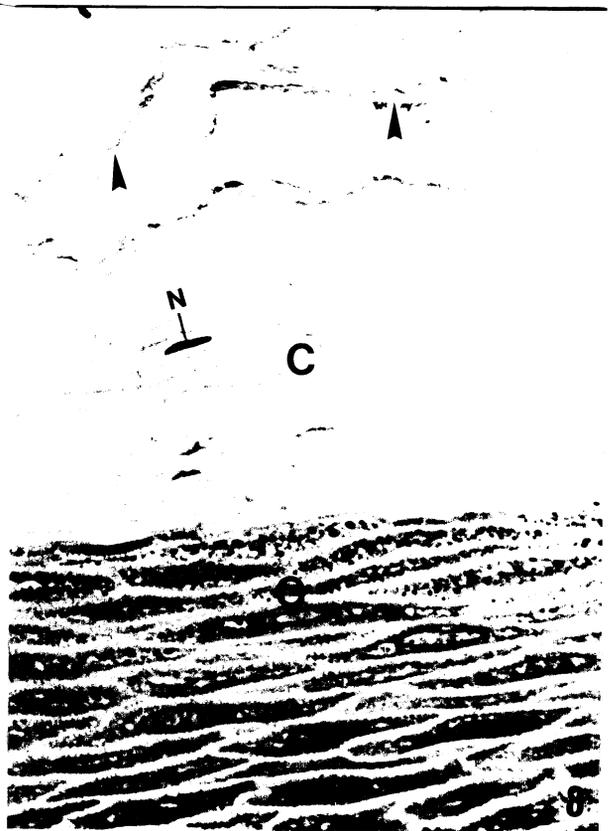
Figs. 07, 08, 09 e 10 - Epitélio vaginal de *Calomys callosus* durante o estro

Fig. 07 - Epitélio estratificado pavimentoso queratinizado (E). No estrato germinativo algumas células em mitose (\rightarrow) são observadas. Sob a camada de queratina (Q) células com grânulos semelhantes a querato-hialina (Δ) caracterizando o estrato granuloso. Fotomicrografia, Glicol metacrilato, H.E., 180x.

Fig. 08 - Interface estrato granuloso (G) estrato córneo (C) onde o processo de descamação do epitélio (Δ) é evidente. Alguns núcleos são observados no estrato córneo (N). Fotomicrografia, Glicol metacrilato, H.E., 250x.

Fig. 09 - Região média do epitélio onde no citoplasma do queratinócito observa-se numerosos polissomas livres (Δ) ou aderidos a cisternas do retículo (\rightarrow). Algumas mitocôndrias apresentam cristas lamelares (m). Eletromicrografia, Epon, 40.000x.

Fig. 10 - Mesma região que a figura anterior onde filamentos elétrondensos são melhor individualizados (\star), polissomas livres (\rightarrow) ou aderidos a cisternas de retículo (Δ) e mitocôndrias com cristas tubulares. Eletromicrografia, Epon, 50.000x.



PRANCHA 4

Figs. 11, 12, 13 e 14 - Epitélio vaginal de *Calomys callosus* durante o estro

Fig. 11 - Detalhe de um queratinócito localizado imediatamente sob a camada queratinizada. O citoplasma da célula é predominantemente eletrônico-lúcido onde poucas organelas são observadas. Numerosos filamentos eletrôn-densos (→) são observados próximos a estruturas semelhantes a grânulos de querato-hialina (★). Eletromicrografia, Epon, 30.000x.

Fig. 12 - Interface células queratinizada (Q) e não queratinizadas (N) onde desmossomos são observados (d) com filamentos eletrônico-densos (◆) aderidos a eles. Eletromicrografia, Epon, 150.000x.

Fig. 13 - Na camada queratinizada (Q) os limites celulares são sinuosos (Δ) e alguns núcleos são observados (n). Eletromicrografia, Epon, 16.000x. Detalhe - Região do estrato córneo onde numerosos desmossomos (→) são observados e entre eles ocorre diminuição do espaço extra-celular com deposição de material eletrônico-denso. Eletromicrografia, Epon, 80.000x.



11



12



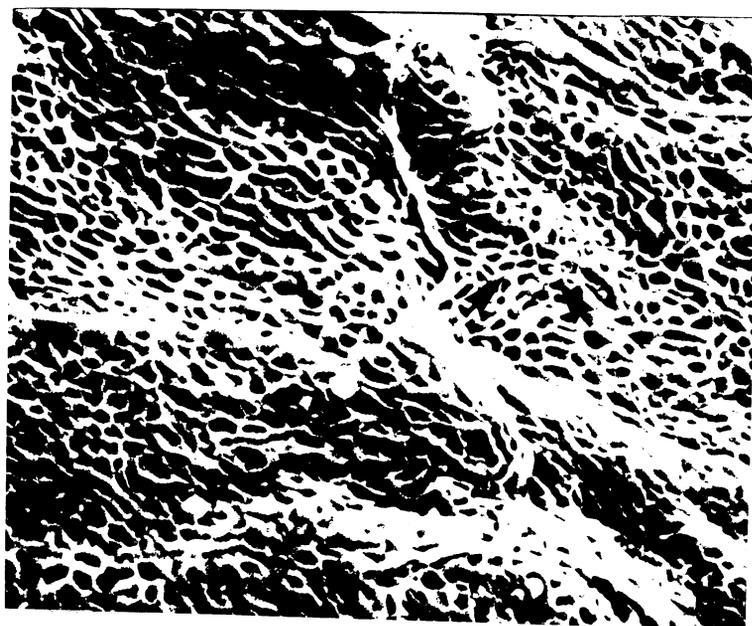
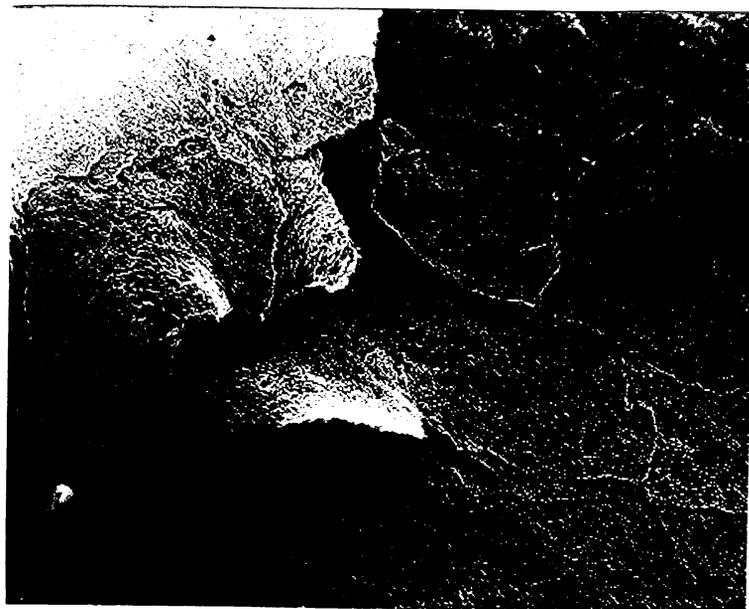
13

PRANCHA 5

Figs. 14 e 15 - Epitélio vaginal de *Calomys callosus* durante o estro

Fig. 14 - Células superficiais do epitélio em franco processo de descamação (♣). Eletromicrografia, 650x.

Fig. 15 - Detalhe da superfície de células da região apical do epitélio. Numerosas microrrugos interconectantes (→) são observadas. Eletromicrografia, 10.000x



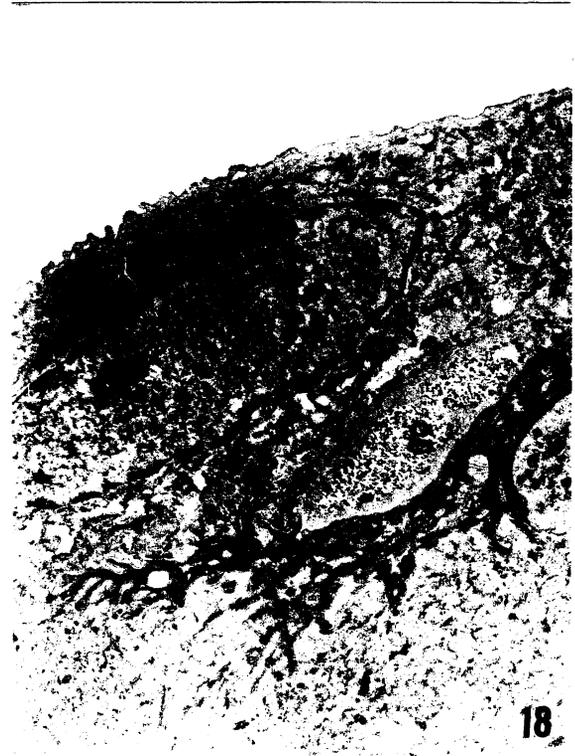
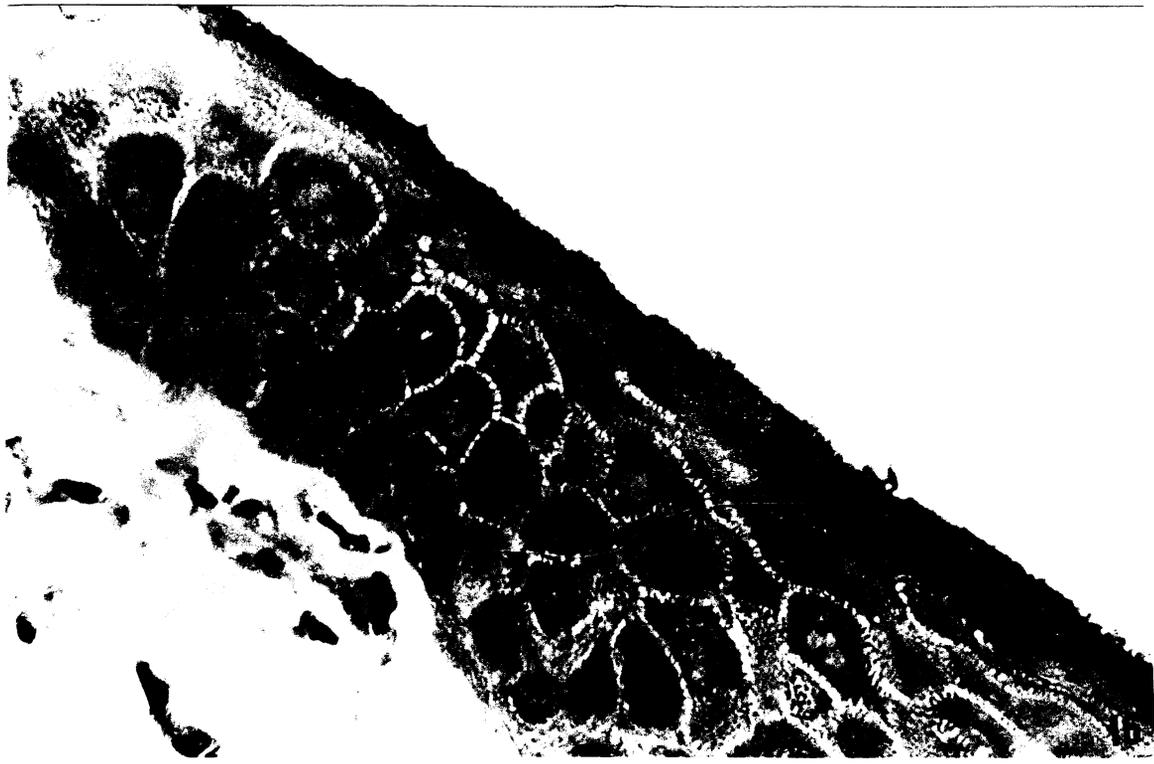
PRANCHA 6

Figs. 16, 17 e 18 - Epitélio vaginal de *Calomys callosus* durante o metaestro

Fig. 16 - Nesta fase o estrato germinativo (g) e o espinhoso (e) são evidentes. Leucócitos(L) são observados na superfície do epitélio juntamente com pontos onde é observada reação P.A.S.. Fotomicrografia, Glicol metacrilato, contracrado com hematoxilina, 470x.

Fig. 17 - Detalhe ultra-estrutural da célula da camada superficial onde mitocôndrias (◆) com cristas lamelares são observadas, bem como cisternas do retículo endoplasmático granular (→), filamentos elétron-densos (*) e desmossomas (Δ). Eletromicrografia, Epon, 45.000x.

Fig. 18 - Célula superficial com amplo depósito de glicogênio (g). Eletromicrografia, Epon, 30.000x.



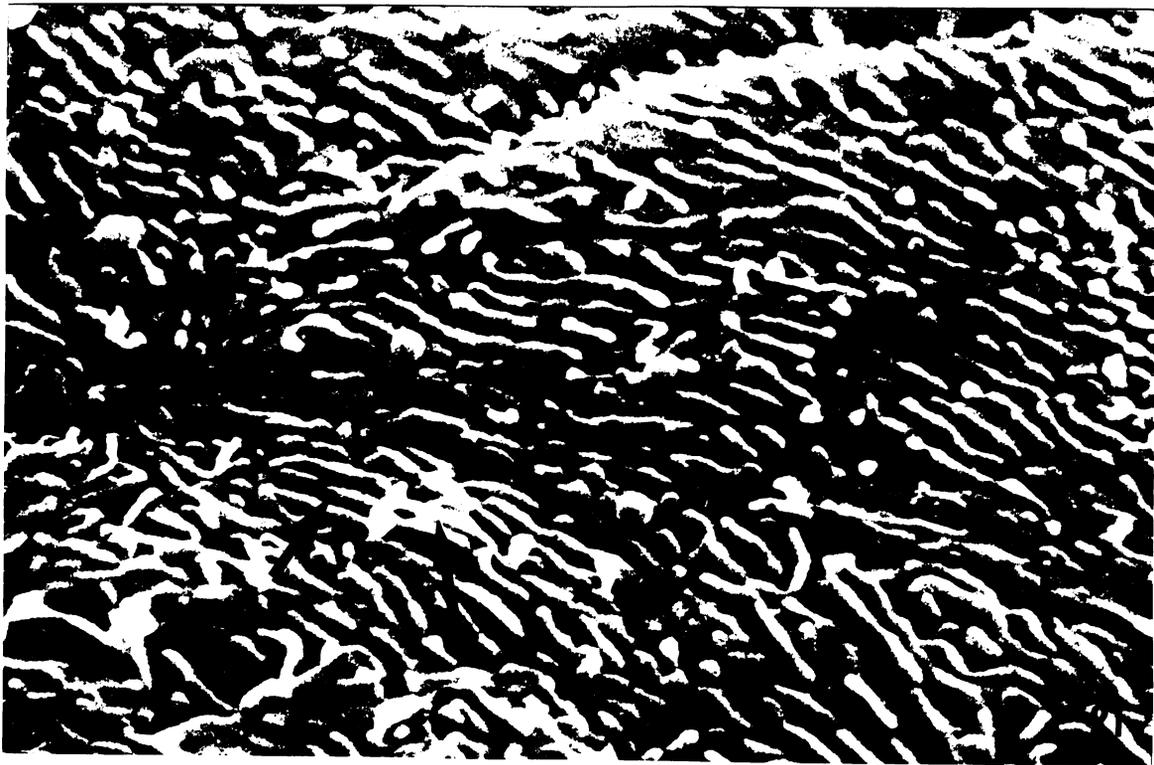
PRANCHA 7

Figs. 19, 20 e 21 - Epitélio vaginal de *Calomys callosus* durante o metaestro

Fig. 19 - Região superficial do epitélio onde observa-se leucócitos (L) infiltrado por entre os queratinócitos (Q). Eletromicrografia, Epon, 20.000x.

Fig. 20 - Superfície do epitélio onde nota-se célula em aparente processo de descamação (◆). Eletromicrografia, 7.000x.

Fig. 21 - Maior aumento da figura anterior onde numerosas microrrugos paralelas (→) são observadas. Eletromicrografia, 30.000x.



PRANCHA 8

Figs. 22, 23 e 24 - Epitélio vaginal de *Calomys callosus* durante o diestro

Fig. 22 - Diestro precoce - O epitélio é fino e observa-se que a camada superficial é formada por células cúbicas altas (*). Grande número de leucócitos (→) são observados por entre o epitélio, no conjuntivo e na luz do órgão. Fotomicrografia, Glicol metacrilato, H.E., 180x.

Fig. 23 - Diestro tardio - o epitélio é espesso e a camada de células superficiais apresenta-se formada por células prismáticas (★). Sob esta camada observa-se células apresentando citoplasma repleto de grânulos (◆), caracterizando a camada granulosa do epitélio. Fotomicrografia, Glicol metacrilato, H.E., 180x.

Fig. 24 - Detalhe ultra-estrutural de célula cúbica alta durante o diestro precoce. No citoplasma observa-se complexo de Golgi (★), mitocôndrias com cristas lamelares (M), polissomas livres (◆), retículo endoplasmático granular (R) e grânulos de secreção eletrôn-densos e homogêneos (G). Eletromicrografia, Epon, 55.000x.

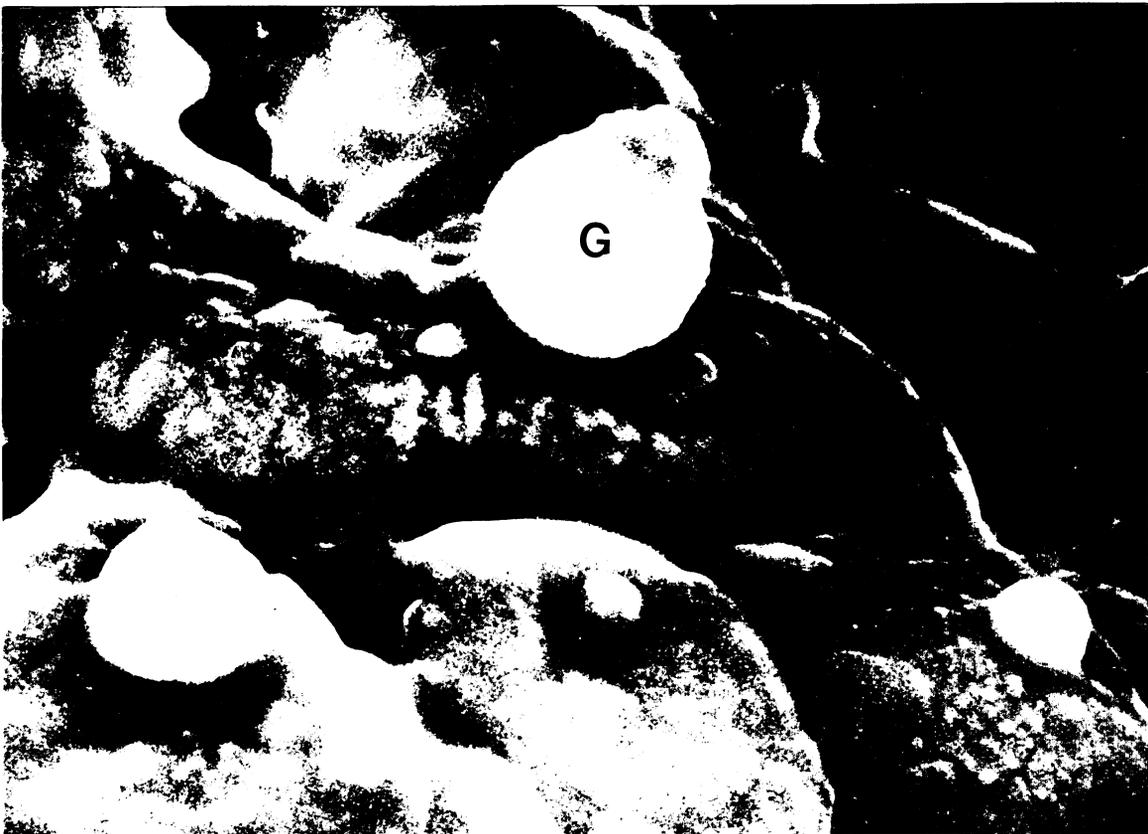
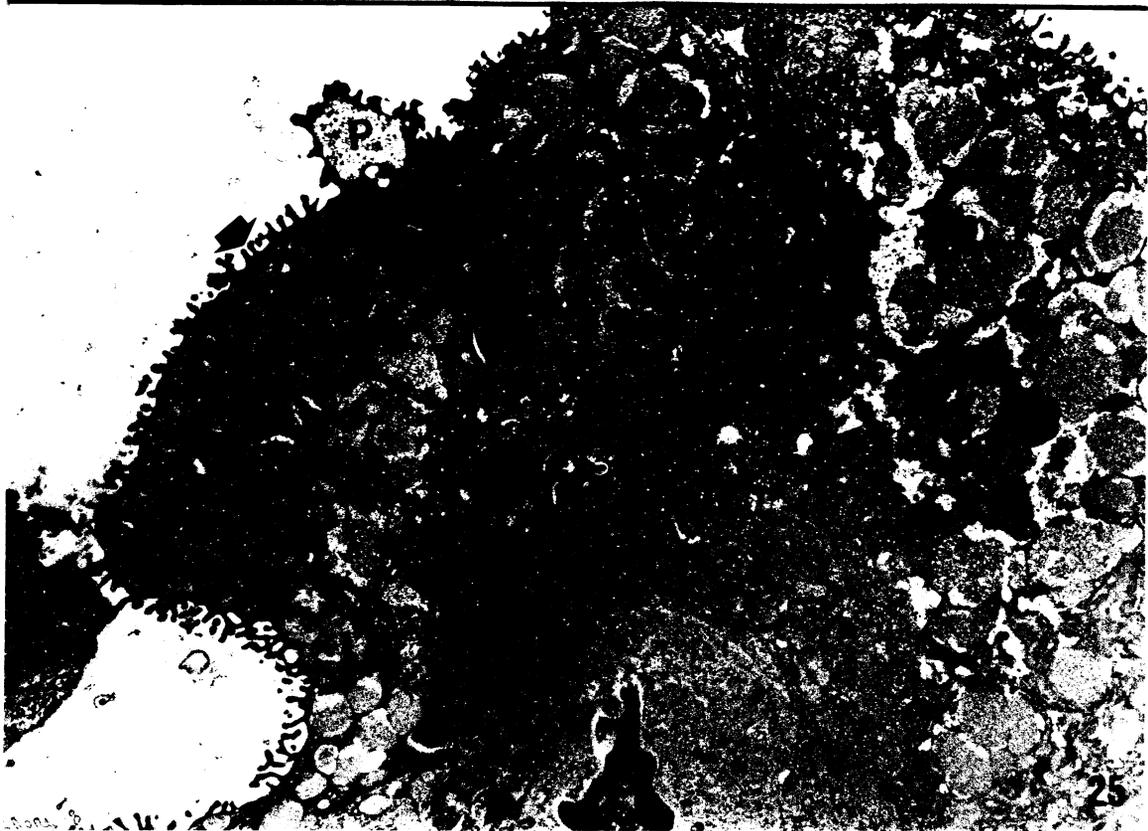


PRANCHA 9

Figs. 25 e 26 - Epitélio vaginal de *Calomys callosus* durante o diestro tardio

Fig. 25 - Célula prismática com núcleo heterocromático (N), grânulos de secreção (G) com elétron-densidade variada. Na superfície apical da célula, nota-se na membrana projeções digitiformes (◆) e projeções bulbosas (P). Eletromicrografia, Epon, 20.000x.

Fig. 26 - Nesta visão observa-se a superfície das células onde nota-se a formação de estruturas (G) que sugerem extrusão de grânulos. Eletromicrografia, 15.000x.



8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ALLEN, E. (1927). The oestrus cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy*, **30 (3)** p. 297 - 371.
- BANKS, W. J. (1992). Sistema Reprodutor Feminino In: *Histologia Veterinária aplicada*. 2ª ed. São Paulo - Editora Monole Ltda. p.p 565-629.
- BARBERINI, F. CORRER, S. SANTIS, F. and MOTTA, P. M. (1989). The mucosa of rabbit vagina: A morphodynamic study by transmission and scanning electron microscopy. *Dev. ultrast. of reprod.* **296: 415- 420.**
- BLAZQUEZ, N. B. BATTEN, E. H. LONG, S. E. PERRY, G. C. WHELEHAN, O. J. A (1989). Quantitative morphological study of the bovine vaginal epithelium during the oestrous cycle. *J. Comp. Path.* **100(2):187-193.**
- BRASCHEID, W. and HOLTZ, W. (1988). Histochemical examination of the vaginal epithelium of sows at various stages of the estrus cycle. *Anat. Histol. Embriol.* **17:12-26.**
- BUSCH, W. (1966). Die periodischen Veränderungen des Vaginalepithels beim Schuein und die Möglichkeiten ihrer Heranziehung Zur Graviditätsdiagnose. *Wiss. z. Humboldt.* **15: 833 - 865.**
- CENTOLA, G. M. (1978). Surface features of exfoliated vaginal epithelial cells during oestrous cycle of the rat examined by scanning electron microscopy. *J. Anat.*, **127: 553-561.**
- CORBEIL, L. B. CHATTERJEE, A. FORESMAN, L. WESTFALL, J. A. (1985). Ultrastruture of cycle change in the murine uterus, cervix and vagina. *Tissue & Cell*, **17: 53-68.**
- CORMACK, D. H., (1991). O Sistema Reprodutor Feminino In: *Ham Histologia*. 9ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. p. 485 - 508.
- D'SOUZA, F. (1978). The detection of oestrus. *Simp. Zool. Soc. Lond.* **43: 175 - 193.**
- FAVORETO Jr, S.; FERRO, E. A. V.; SILVA, M.; CLEMENTE, D.; RODRIGUES, J. F. T. e MINEO, J. R..(1994). Estudo da susceptibilidade de *Calomys callosus* a infecção experimental por *Toxoplasma gondii*. Anais da I Semana de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.
- FERRO, E. A. V. and BEVILACQUA, E. M. A. F. (1994). Trophoblastic invasion of the uterine epithelium in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). *J. Morphol.* **221: 139-152.**

¹ Referências elaboradas seguindo sugestões apresentadas pela Coordenação do Curso de Ciências Biológicas

- GALAND, P. LEROY, F. CHRETIEN, J. (1971). Effect of vaginal on proliferation and histological changes in the uterus and vagina of mice. **J. Endocr.** **49** : 243- 252.
- GONZAGA, J. O.; FERRO, E. A. V. (1995). Invasão decidual pelo trofoblasto durante a implantação embrionária em *Calomys callosus*. Uberlândia (Monografia de Bacharelado - Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia).
- GUPTA, P. D. RELIA, S. B. RAU, S. B. REDDY A.G. (1990). Keratinization of rat vaginal epithelium - V . modulation of intracellular calcium by estradiol **J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.**, **37 (4)** : 521 - 527.
- HAFEZ, E. S. E. (1988). Anatomia Funcional da Reprodução Feminina **In: Reprodução animal**. 4ªed. São Paulo. Manole. p. 32 - 69.
- HAMILTON, W. J. & GOLD, J. H. (1940). The normal oestrus cycle of the ferret the correlation of the vaginal smear and the histology of the genital tract, with notes on the distribution of glycogen, the incidence of growth, and the reaction to intra vitam staining by trypan blue. **Trans. Roy. Soc. Edinb.**, **60** : 87 - 109.
- HOLTZ, W., SMIDT, D., THUME, O. und WESELOH, W. (1968). Veränderungen des Scheiden - pH, der Rektal und Vaginal Gemessenen Körpertemperatur und des Scheidenepithels in Abhängigkeit von Sexualzyklus beim Göttinger Zwergschwein. **Zbl. Vet. Med. A.** **15**: 329 - 352.
- HORVAT, B. VRCIC, H. DAMJANOV, I. (1992). Transdiferentiation of murine squamous vaginal epithelium in proestrus is associated with changes in the expression of keratin polypeptides . **Experimental Cell Research**, **199** : 234 - 239.
- JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J., (1995). Aparelho Reprodutor Feminino **In: Histologia Básica**. 8ªed. São Paulo. Guanabara Koogan. p. 367 - 388.
- JUSTINES, G. & JOHNSON, K. M. (1969). Imune tolerance in *Calomys callosus* infected with machupo virus. **Nature**, **22** : 1090 - 1091
- JUSTINES, G. & JOHNSON, K. M. (1970). Observations on the laboratory breeding of the cricetidae rodent *Calomys callosus*. **Lab. Anim. Core.**, **20** : 57 - 60.
- KALTENBACH, C. C. e DUNN, T. G. (1988). Endocrinologia de Reprodução **In: HAFEZ, E. S. E., Reprodução Animal**, 4ªed. São Paulo. Manole, p. 95 - 127.
- KANG, Y. WEST, W. L. (1982). Ultrastructural localization of glucose-6-phosphatase and alkaline phosphatase in the vaginal epithelium of rat. **Journal of Morphology** **171**: 1-10.

- KARNOVSKY, M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy *J. Cell Biol.* **27**:1374.
- KING, B. F. (1983). Ultrastructure of the nonhuman primate vaginal mucosa: epithelial changes during the menstrual cycle and pregnancy. *J. Ultrastruct. Res.* **82** : 1- 18.
- LAMB, J. C. NEWBOLD, R. R. STUMPF, W. E. & MCLACHLAN, J. A. (1978). Transitional changes in the surface epithelium of the cycling mouse vagina, cervix and uterus : scanning electron microscopic studies. *Biol. Reprod.* **19** : 701-711.
- LEVASSEUR, MARIE-CLAIRE e THIBAUT, C. (1988). Ciclos reprodutivos vitais. In: HAFEZ, E.S. E. **Reprodução animal**. 4ªed. São Paulo-SP. Editora Manole Ltda. p. p. 154-156.
- McMANUS, J. F. (1948). Histological and Histochemical uses of periodic acid. *Stain Thecnology*, **23(3)**: 99 - 100.
- MELLO, D. A. (1978). Biologia of *Calomys callosus* under laboratory conditions (Rodentia, Cricetidae).*Rev. Bras. Biol.*, **38 (4)** : 807 - 811.
- MELLO, D. A. (1981). Studies on reproduction and longevity of *Calomys callosus* (Renger, 1830) under laboratory conditions (Rodentia, Cricetidae), *Rev. Bras. biol.*, **41 (4)** : 841 - 843.
- MURAKAMI, T. & JONES, A.L. (1980). Conductive staining of biological specimens for non-coated scanning electron microscopy: double staining by tannin-osmium and osmium-thiocarbohydrazide-osmium methods. *Scanning Electron Microsc. AMF O'Hare*, v.1 : 221-228
- NELSON, K. G. TAKAHASHI, T. BOSSERT, N. L. WALMER, D. K. MCLACHLAN, J. A. (1991). Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88** : 21-25.
- PARAKKAL, P. F. (1974). Cyclical changes in the vaginal epithelium of the rat seen by scanning electron microscopy. *Anat. Rec.* **178** : 529-538.
- PARR, M. B. VEPPLE, L. and PARR, E. L. (1991). Langerhans cells phagocytose vaginal epithelial cells undergoing apoptosis during the murine estrous cycle. *Biol. of Reproduc.* **45**: 252-260.
- PERROTA, C. A. (1962). Initiation of cell proliferation in the vaginal and uterine epithelia of the mouse. *Am. J. Anat.* **111**: 195 - 204.
- PETTER, F. KARIMI, Y. & ALMEIDA, C. R. (1967). Un nouveau ranger de laboratoire, le cricetidé (Rodentia, Cricetidae). *C. R. Acad. Paris*, **265** : 1974 - 1976.

- PLAPINGER, L. (1982). Surface Morphology of Uterine and Vaginal Epithelia in mice During Normal Postnatal Development. *Biology of Reproduction* **26**: 961 - 972.
- REDDY, A. G. SHIVAJI, S. and GUPTA, P. D. (1989) Effect of estradiol on the membrane fluidity of the rat vaginal epithelial cells. *J. Steroid. Biochem.* **33(6)**: 1229-1233.
- RIBEIRO, R. D. (1973). Novo reservatório do *Trypanosoma cruzi* . *Rev. bras. biol.* **33** : 429 - 437.
- RODRIGUES, J. A. e MIGLIORINI, R. H.,(1988). Fisiologia Endócrina **In**: AIRES, M. M. , *Fisiologia básica* São Paulo Guanabara koogan. p. 464 - 520.
- ROOP, D. R. (1987).Regulation of keratin gene expression during differentiation of epidermal and vaginal epithelial cells. *Current Topics in Developmental Biology* : **22**: 195-207.
- ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J.; O female reproductive system. **In: Histology: a text and atlas.** Second edition. Ed. Williams & Wilkins. p. 650-694.
- RUBIO, C. A. . (1976). The exfoliating cervico-vaginal surface. II - Scanning electron microscopical studies during the estrous cycle in mice. *Anat. rec.* **185** : 359 - 372.
- SHORR, E. (1945). A new technic for staining vaginal smears. A single differentive stain. *Science*, **84** : 545.
- STENSON, G. B. (1988). Oestrus and the vaginal smear cycle of the river otter, *Lutra Canadensis*. *J. Reprod. Fert.* **83**: 605-610.
- VIJAYASARADHI, S. & GUPTA, P. D. (1987). Keratinization of rat vaginal epithelium. I - Cell surface study during natural and induced keratinization. *J. Submicrosc. Cytol.* **19** : 595 - 603.
- VIJAYASARADHI, S. and GUPTA, P. D. (1988). Keratinization of rat vaginal epithelium. IV- Modulation of transglutaminase activity by estradiol.*J. Biosc.***13**: 401 - 408.
- WALMER, D. K. WRONA, M. A. HUGHES, C. L. and NELSON, K. G. (1992). Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: Correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*, **131(3)**:458-1466.
- WRIGHT, P. J. PARRY, B. W. (1989). Cytology of the canine reproductive system. *Veterinary Clinics of North America:Small Animal Practice*: **19(5)**.
- YOUNG, W. G. (1985). Epithelial kinects affect Langerhan's Cells of mouse vaginal epithelium. *Acta anat.* **123**: 131 - 136.

YOUNG, W. G.; NEWCOMB, G. M. and HOSKING, A. R. (1985). The effect of atrophy, hyperplasia and keratinization accompanying the estrous cycle on Langerhan's Cells in mouse vaginal epithelium. *The American journal of anatomy* **174**: 173 - 186.

YOUNG, W. G. HOSKING, A. R. (1986). Langerhans cells in murine vaginal epithelium affected oestrogen an topical vitamin A. *Acta. Anat.* **125**: 59-64.