

**Jackson Lino Paulo Santana de Miranda**

“PERMANÊNCIA DE ESPERMATOZÓIDES EM  
GLÂNDULAS HOSPEDEIRAS DE ESPERMATOZÓIDES E  
EM GLÂNDULAS INFUNDIBULARES NA CODORNA  
*Coturnix coturnix coturnix*, COM DIFERENTES INTERVALOS  
DE ACASALAMENTO”

Tese apresentada na Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área: Reprodução animal

Orientador: Antônio de Pinho Marques Júnior

Co-orientadores: Germán Arturo B. Mahecha  
Martinho de Almeida e Silva

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária-UFMG  
2011

Miranda, Jackson Lino Paulo Santana de, 1980-

M672p

Permanência de espermatozoides em glândulas hospedeiras de espermatozoides e em glândulas infundibulares na codorna *Coturnix coturnix coturnix*, com diferentes intervalos de acasalamento / Jackson Lino Paulo Santana de Miranda. – 2011.

80p.: il

Orientador: Antônio de Pinho Marques Júnior

Co-orientadores: Germán Arturo B. Mahecha e Martinho de Almeida e Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Codorna – Reprodução – Teses. 2. Acasalamento de animais – Teses.  
3. Morfometria – Teses. 4. Espermatozoides – Teses. I. Marques Júnior, Antônio de Pinho. II. Mahecha, Germán Arturo B. III. Silva, Martinho de Almeida e. IV Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 926

Tese defendida e aprovada em 23 de março de 2011 pela comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Antônio de Pinho Marques Júnior  
Presidente

Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins  
(UFMG)

Prof. Dr. Antônio Gilberto Bertechini  
(UFLA)

Prof. Dra. Maria das Graças Ribeiro  
(UFMG)

Prof. Dra. Mariana Machado Neves  
(UFV)



## **EU DEDICO:**

A Deus, por ser o autor da minha vida e porto seguro.

Aos meus pais, José Paulo e Magnólia Santana, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, doando-se por inteiro e renunciado aos seus sonhos, em favor dos meus.

As minhas irmãs e amigas, Gleiciele e Kenia pelo companheirismo, amizade e apoio.

Ao meu amor Luciene pela colaboração e compreensão demonstradas durante o curso e a realização desta Tese.

Com saudades:

Ao meu sobrinho Miguel!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Antônio de Pinho Marques Júnior pelos seus ensinamentos, paciência e ajuda na realização desta pesquisa.

Ao professor Germán Arturo Bohórques Mahecha pelos seus ensinamentos, atenção constante e compromisso nesta pesquisa.

Ao professor Néelson Rodrigo da Silva Martins pela preciosa colaboração.

À professora Cleida Aparecida de Oliveira pela amizade.

À técnica de laboratório Maristane pela ajuda na confecção das lâminas.

À estudante de Pós-Graduação Maria Raquel pela acolhida, apoio e amizade.

À estudante Mônica pela amizade e ajuda na confecção das fotos presentes neste trabalho.

À estudante e estagiária Audrey que me ajudou na realização dos experimentos.

Aos estudantes de Pós-Graduação Fabrícia, Leonardo, Pablo, André, Patrícia, Cláudia, Ana, Regiana e estagiários Lilian, Poliane, Diêgo e Cristiano pela amizade.

*“Não há cousa, a qual natural sendo, que não queira perpétuo o seu estado...”*

*Luis Vaz de Camões*

<b>Sumário</b>		
<b>1.</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>Revisão de Literatura.....</b>	<b>15</b>
2.1.	Oviduto.....	15
2.2.	Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides.....	19
2.3.	Glândulas Infundibulares.....	30
<b>3.</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.</b>	<b>Experimento 1 .....</b>	<b>33</b>
3.1.1	Codornas.....	33
3.1.2	Estudo anatômico.....	35
3.1.3	Estudo histológico.....	35
3.1.4	Estudo morfométrico.....	36
<b>3.2</b>	<b>Experimento 2.....</b>	<b>37</b>
3.2.1	Codornas.....	37
3.2.2	Determinação do melhor intervalo de coberturas em codornas.....	38
<b>3.3</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>39</b>
4.1	Descrição anatômica.....	39
4.2	Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides.....	39
4.2.1	Estudo microscópio.....	40
4.3	Glândulas Infundibulares.....	48
4.3.1	Estudo histológico.....	49
4.4	Estudo da fertilidade dos ovos.....	50
4.5	Estudo da cobertura em codornas.....	55
<b>5.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>72</b>

<b>Lista de Figuras</b>		
Figura 1	Fotografia de um casal de codornas europeias ( <i>Coturnix coturnix coturnix</i> ). Na esquerda identificamos o macho (seta) com a região peitoral coberta por penas marrons.	41
Figura 2	Aspectos morfológicos das Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides na região da junção útero-vaginal de codornas europeias <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de postura.	42

Figura 2A	Aspecto geral das pregas da região útero-vaginal, evidenciando pregas uterinas (setas) e pregas da junção útero-vaginal, em fase de postura. Observam-se as Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides em diferentes cortes transversais dispersos na lâmina própria. Coloração: HE; 200X.	42
Figura 2B	Prega da região útero vaginal com Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides, evidenciando o epitélio de revestimento pseudoestratificado da prega, formado por células ciliadas e não ciliadas (setas). Coloração: HE; 400X.	42
Figura 2C	Prega da região útero-vaginal, evidenciando Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides (setas), com espermatozoides no lume. Coloração: HE; 400X.	42
Figura 2D	Detalhe de uma Glândula Hospedeira de Espermatozoides com espermatozoides (cabeças de seta). Coloração: HE; 800X.	42
Figura 2E	Glândulas Hospedeiras de espermatozoides em secção longitudinal, evidenciando células escuras (setas) no meio das células claras. As células claras são mais frequentes que as células escuras (setas), mas estas apresentam citoplasma com acidofilia mais intensa. Coloração: HE; 400X.	42
Figura 2F	Fotomicrografia mostrando a negatividade das Glândulas Hospedeiras de espermatozoides ao Alcian blue em pH 0,5. Coloração: AB, pH 0,5; 400X.	42
Figura 3	Número de Glândulas Hospedeiras de espermatozoides e Glândulas com espermatozoides ao longo de 3 pregas da junção útero-vaginal do oviduto de codorna europeia <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de postura.	45
Figura 4	Número de Glândulas Hospedeiras de espermatozoides e glândulas com espermatozoides ao longo de 3 pregas da junção útero-vaginal do oviduto de codorna europeia <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de postura do grupo G7.	46
Figura 5	Número de Glândulas Hospedeiras de espermatozoides e Glândulas com espermatozoides ao longo de 3 pregas da junção útero-vaginal do oviduto de codorna europeia <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de postura do grupo G8.	48



Figura 6	Aspectos morfológicos das GIs na região do infundíbulo distal de codornas europeias <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de postura.	51
Figura 7	Aspectos histológicos das GIs na região do infundíbulo distal de codornas europeias <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de postura.	52
Figura 8	Número de Glândulas Infundibulares (GIs) e Glândulas infundibulares com espermatozoides (GIE) ao longo de 3 pregas do infundíbulo distal do oviduto de codorna europeia <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de postura.	55
Figura 9	Número de ovos férteis e não férteis, por dia de postura de 30 fêmeas adultas <i>Coturnix coturnix coturnix</i> .	56
Figura 10	Taxa de fertilização, por dia de postura, nas codornas europeias, <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , do Grupo G1.	56
Figura 11	Taxa de fertilização total nas codornas europeias, <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , do Grupo G1.	58
Figura 12	Taxa de fertilização, por dia de postura, nas codornas europeias, <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , do Grupo G2.	59
Figura 13	Taxa de fertilização total nas codornas europeias, <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , do grupo G2.	60
Figura 14	Taxa de fertilização, por dia de postura, nas codornas europeias, <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , do Grupo G3.	61
Figura 15	Taxa de fertilização total nas codornas europeias, <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , do grupo G3	62

---

**Lista de Tabelas**

---

Tabela 1	Dados morfométricos das Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides (Média e Desvio-padrão) de codorna europeia <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de postura.	43
Tabela 2	Porcentagem de Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides com espermatozoides de codorna europeia <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de postura.	44

Tabela 3	Porcentagem de Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides com espermatozoides (GE) de codorna europeia, <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de postura do grupo G7.	46
Tabela 4	Porcentagem de Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides com espermatozoides de codorna europeia, <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de posturado grupo G8.	47
Tabela 5	Dados morfométricos das Glândulas Infundibulares (GIs) (Média e Desvio-padrão) de codorna europeia <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de postura.	53
Tabela 6	Porcentagem de Glândulas Infundibulares (GIs) com espermatozoides de codorna europeia <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , durante o período de postura.	54
Tabela 7	Verificação da fertilidade dos ovos postos pela codorna europeia, <i>Coturnix coturnix coturnix</i> , após o período de acasalamento de 24 horas	57

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar o tempo de permanência dos espermatozoides nas Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides (GHEs) e nas Glândulas Infundibulares (GIs) da codorna de corte, *Coturnix coturnix coturnix*, utilizando 26 machos e 117 fêmeas, em fase reprodutiva. Os animais foram divididos, inicialmente, em dois lotes, o 1º lote, composto de 12 fêmeas e 77 machos e o 2º lote de 14 machos e 40 fêmeas. As fêmeas do 1º lote foram divididas em 10 grupos e acasaladas por 24 horas em gaiolas individuais. Após este período os machos, utilizados de modo intercalado, foram separados das fêmeas e colocados em descanso. O procedimento adotado para o abate das matrizes foi o seguinte: Grupo Controle G0 (n=6 fêmeas), abatidas no início do experimento; G1 (n= 6 fêmeas), abatidas no 6º dia (144 horas) após o acasalamento; G2 (n= 6), abatidas no 5º dia (120 horas) após o acasalamento; G3 (n=6), abatidas no 4º dia (96 horas) após o acasalamento; G4 (n=6), abatidas no 3º dia (72 horas) após o acasalamento; G5 (n=6), abatidas no 2º dia (48 horas) após o acasalamento e o G6 (n=6), abatidas no 1º dia (24 horas) após o acasalamento. Os fragmentos obtidos da região útero-vaginal e do infundíbulo foram submetidos às técnicas histológicas, histoquímica e histométricas de rotina. As codornas do 2º lote foram divididas em 3 grupos de 10 fêmeas e as mesmas foram acasaladas por 24 horas. Após este período, os machos também foram separados das fêmeas. Ovos dessas fêmeas foram coletados por quinze dias e incubados, para verificação da fertilidade. Posteriormente, estes grupos foram reestruturados, passando a serem formados por 12 fêmeas cada um. Os procedimentos adotados para o acasalamento foram: 1M:2F no grupo G1, 1M:3F no grupo G2 e 1M:4F no grupo G3. Os resultados mostraram que os espermatozoides permanecem armazenados no oviduto por até 10 dias após o acasalamento, sendo os espermatozoides armazenados nas GHEs até o 5º dia após o acasalamento. Estes ascendem em direção as GIs, onde permanecem viáveis e férteis por pelo menos mais 96 horas após deixarem as GHEs, permitindo a estas aves porem ovos férteis. O melhor manejo de cobertura é 1M:3F na codorna europeia, onde ocorreu a diminuição do número de perdas no plantel e a fertilidade dos ovos foi semelhante ao manejo de 1M:2F adotado pelos multiplicadores.

## ABSTRACT

This study aimed to determine the residence time of spermatozoa in the sperm-storage tubules (SSP) and the infundibularum tubules (ITs) cutting quail, *Coturnix coturnix coturnix*, using 26 males and 117 females in the reproductive phase. Initially the animals were divided into two lots, the 1st batch, comprising 12 females and 77 males, and the 2nd batch of 14 males and 40 females. Females of the 1st batch were divided into 10 groups and mated for 24 hours in individual cages. After this period the males used so merged, were separated from females and placed at rest. The procedure adopted for the slaughter of the cows was as follows: control group G0 (n = 6 females) were slaughtered at the beginning of the experiment, G1 (n = 6 females) were slaughtered at 6 days (144 hours) after mating, G2 (n = 6), slaughtered at 5 days (120 hours) after mating, G3 (n = 6) killed on day 4 (96 hours) after mating, G4 (n = 6), killed on the 3rd day (72 hours) after mating; G5 (n = 6), killed on 2nd day (48 hours) after mating and G6 (n = 6), slaughtered on day 1 (24 hours) after mating. The fragments obtained from the utero-vaginal region and the infundibulum were subjected to histological techniques, immunohistochemistry and morphometry routine. The 2nd batch of quails were divided into 3 groups of 10 females and they were mated for 24 hours. After this period, males were also separated from females. Eggs of these females were collected for fifteen days and incubated to check fertility. Subsequently, these groups were restructured to be formed by passing 12 females each. The procedures used for mating were: 1M: 2F G1, 1M: 3F G2 and 1M: 4F in G3. The results showed that spermatozoa remain stored in the oviduct for up to 10 days after mating, with sperm stored in SSPs until the 5th day after mating. These ascend toward the ITs, where they remain viable and fertile for at least 96 hours after leaving the SSPs, allowing these birds to lay eggs fertile. The coverage is better management of 1M: 3F quail in Europe, where there was a decrease in the number of losses in breeding and fertility of eggs was similar to the handling of 1M: 2F adopted by the multipliers. Keywords: female, quail, sperm-storage tubule, spermatozoa, morphometry.

## 1. INTRODUÇÃO

As codornas do gênero *Coturnix* são originárias do Norte da África, da Europa e da Ásia, pertencendo à infraclasse Galloanserae, família Phasianidae e da subfamília dos Perdicionidae, sendo, portanto, da mesma família das galinhas e perdizes (Sibley & Monroe, 1990; Jamieson, 2007).

Atualmente existem três espécies de codornas que são utilizadas na exploração da coturnicultura industrial: a codorna americana ou a “Bobwhite quail” (*Colinus virginianus*), a japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) e a europeia (*Coturnix coturnix coturnix*). Essas aves possuem características peculiares, que direcionam suas aptidões para carne (europeia e americana) ou ovos (japonesa) (Barreto et al., 2007).

A criação de codornas europeias tem sido difundida no Brasil para produção de carne e ovos em razão do rápido crescimento, precocidade na produção e maturidade sexual (35 a 42 dias), alta produtividade (média de 300 ovos/ano), necessidade de pequenos espaços para grandes populações, grande longevidade em alta produção (14 a 18 meses) e baixo investimento (Albino et al., 2002).

Essas aves são maiores do que as da subespécie japonesa e a fêmea chega a 300g quando adultas (Albino e Barreto, 2003 e Barreto et al., 2007). No entanto, existem poucas informações sobre o potencial produtivo e reprodutivo da linhagem europeia quanto ao consumo de ração, à conversão alimentar por dúzia de ovos e à qualidade dos ovos (Móri et al., 2005a).

A criação de codornas para corte enfrenta problemas de manejo, nutrição e sanidade, com perdas na produção, o que impossibilita a expressão do potencial genético das aves (Bertechini et al., 2002).

Apesar de ter sido estudada a exigência nutricional de proteína nas codornas europeias em relação à produção de ovos (Fridrich et al., 2005; Barreto et al., 2007 e Corrêa et al., 2007), não há informação sobre o manejo reprodutivo desta espécie.

Os criadores que trabalham com matrizes e reprodutores de codorna de corte utilizam a proporção de duas matrizes para cada reprodutor. Este tipo de manejo exige uma área maior, o que torna necessário grande número de reprodutores por plantel, com aumento substancial de custos, o que dificulta a expansão de criatórios de pequeno porte. Estudos realizados em matrizes de peru (Schuppin et al., 1983; Miranda, 2006) e frangos (Compton et al., 1977; Compton e

Van Krey, 1978) mostraram que as glândulas tubulares, conhecidas como glândulas tubulares armazenadoras de espermatozoides (GHEs) e Glândulas Infundibulares (GIs), podem armazenar espermatozoides por mais de trinta dias, permitindo a estas aves produzirem ovos férteis por um período mais longo.

As GHEs estão localizadas nas pregas longitudinais da transição útero-vaginal e as GIs estão localizadas no infundíbulo distal do oviduto. Elas foram descritas em perua de granja (*Meleagris gallopavo*) e caipira (Ogasawara e Fuqua, 1972; Schuppín et al., 1983; Miranda, 2006), galinha doméstica (Burket et al., 1971; Compton et al., 1977; Compton e Van Krey, 1978), avestruz (*Struthio camelus*) (Bezuidenhout et al., 1995), tentilhão (*Poephila guttata* e *Lonchura striata*) (Birkead & Hunter, 1990), codorna do campo e silvestre (*Nothura maculosa*) (Rodrigues, 1996), codorna japonesa (*Coturnix japonica*) (Renden et al., 1981), perdiz (*Rhynchotus rufescens*) (Mello, 2000). Contudo, não existe estudo específico sobre as GHEs e GIs na codorna europeia, mas somente sobre a codorna japonesa, em razão do reconhecido potencial reprodutivo (Friess et al., 1978; Birkhead, 1994 e Holm & Ridderstrale, 2002).

Considerável atenção tem sido dispensada a estas glândulas em outras aves (Ogasawara

& Fuqua, 1972; Schuppín et al., 1983; Miranda, 2006), mas pouco se sabe sobre as mesmas na codorna de corte, bem como sobre os mecanismos pelos quais os espermatozoides se direcionam, agrupam e sobrevivem no interior destas estruturas ou como e quando são liberados.

O conhecimento destas estruturas, bem como o tempo que os espermatozoides permanecem nestas glândulas - possibilitando a produção de ovos fertilizados por período maior de tempo, poderá facilitar para que as granjas de codorna de corte modifiquem o padrão adotado na reprodução destas aves. Com isso, poderá ocorrer redução do número de reprodutores e de perdas de matrizes por traumatismos na cabeça por excesso de cópulas diárias no plantel e aumentar a eficiência na reprodução destas codornas.

À vista dos conhecimentos atuais e com o propósito de melhor compreender a característica reprodutiva da codorna foram abordados a hipótese e os objetivos abaixo:

- **HIPÓTESE**

Espermatozoides estão presentes nas GHEs e GIs até o 5º dia após o acasalamento.

- **OBJETIVOS**

Quantificar o número de GHEs e GIs com espermatozoides até o 10º dia após o acasalamento;

Quantificar o número de pregas da junção útero-vaginal com GHEs e GIs com espermatozoides até o 10º dia após o acasalamento;

Realizar estudo morfométrico das GHEs e GIs até o 10º dia após o acasalamento;

Determinar o comprimento médio do diâmetro externo e interno, a altura celular e o número de células glandulares com espermatozoides até o 10º dia após acasalamento;

Avaliar características histológicas e histoquímicas das GHEs e GIs até o 10º dia após o acasalamento.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. OVIDUTO**

O aparelho reprodutor feminino é formado pelo ovário e oviduto esquerdo. Na fase embrionária, os ovários e ovidutos são bilateralmente simétricos, entretanto, os órgãos do lado direito regridem próximo ao período de eclosão e na fase adulta, estes se encontram geralmente rudimentares ou

ausentes (Sisson & Grossman, 1986; Dyce et al.,1997).

O oviduto é um ducto membranoso de cor rosa pálido e semi-translúcido, localizado na cavidade celomática, entre a superfície ventral do rim esquerdo e a cloaca, onde desemboca no urodeo. É no oviduto que ocorre a fertilização do ovócito (Gilbert, 1979; King, 1981; Sibley e Alquist, 1990; Ribeiro, 2003). Este órgão é dividido anatomicamente em cinco regiões distintas, que possuem funções fisiológicas diferentes. No sentido craniocaudal estas regiões são: infundíbulo, magno, istmo, útero e vagina (Tauber, 1875; Gilbert, 1979; Bakst, 1981, 1987, 1989, 1994 e 1998; King, 1981; Ribeiro, 2003, Moraes et al., 2007; Miranda et al., 2009).

O comprimento médio do oviduto da codorna do campo (*Nothura maculosa*), no período de atividade reprodutiva, é de 27cm, e sua massa é de 14g, em média. Os comprimentos médios dos segmentos são: infundíbulo, 5,85 cm; magno, 15,2 cm; istmo, 5,23 cm, útero, 4,68 cm e vagina, 1,09 cm (Moraes et al.,2007). O magno é o segmento que apresenta maior comprimento, como ocorre em galinha doméstica, *Gallus domesticus* (King, 1981), e em perua, *Meleagris gallopavo* (Miranda et al., 2009).

O oviduto é revestido pelas túnicas mucosa, muscular e serosa. A mucosa da parede de cada segmento, consiste em pregas longitudinais distintas, que variam em altura e volume, de acordo com seu estágio funcional. No útero, essas pregas da mucosa formam dobras que parecem ter orientação transversal (King, 1981; Bakst, 1998).

O revestimento epitelial da mucosa consiste de células colunares ciliadas, alternadas com células secretoras, chamadas também de células mucosas ou glândulas unicelulares (King, 1981; Rodrigues, 1996; Bakst, 1998). Segundo Bakst (1998), na porção proximal do infundíbulo são encontradas células ciliadas em abundância, sendo que os batimentos ciliares dessas células são responsáveis pela entrada do ovócito no óstio do infundíbulo. As células não ciliadas são produtoras de mucinas e ocorrem em todo oviduto, incluindo o infundíbulo, onde eram consideradas ausentes (Aitken & Johnston, 1963).

Na lâmina própria do oviduto são encontrados dois tipos de glândulas multicelulares, as glândulas tubulosas simples e sulcos glandulares, estando estes restritos à porção cranial do infundíbulo. As glândulas tubulosas abrem-se nas pregas secundárias da mucosa, estando ausentes na parte cranial do infundíbulo, na região de

transição entre o magno e istmo e na vagina (King, 1981; Rodrigues, 1996).

A túnica muscular é composta de duas camadas de músculo liso, uma camada interna circular e outra externa longitudinal. A espessura da túnica muscular varia nas diferentes regiões do oviduto, sendo mais espessa na vagina e diminuindo progressivamente no útero, istmo, magno e infundíbulo (King, 1981; Rodrigues, 1996).

O infundíbulo é dividido morfológicamente em três compartimentos: fímbria, funil e infundíbulo distal. Abre-se na cavidade peritoneal, imediatamente caudal ao ovário, sem apresentar ligação com o mesmo (King, 1981). É a porção mais proximal do oviduto e local em que é fecundado o ovócito, bem como ocorre a formação da calaza e da primeira camada de albúmen. A mucosa do infundíbulo apresenta pregueamento, cujo aspecto varia na região cranial e caudal, aumentando caudalmente. Na porção cranial do infundíbulo, ocorrem invaginações do epitélio, características dessa região, denominadas de sulcos glandulares. Estas estruturas representam a fase inicial de desenvolvimento das glândulas tubulosas, sendo porém mais rasas que estas (Aitken & Johnston, 1963). Células ciliadas e células secretoras não-ciliadas, células mucosas ou glândulas unicelulares, ocorrem em todas as partes exceto no funil do infundíbulo, onde



células secretoras estão aparentemente ausentes. A lâmina própria apresenta tecido conjuntivo frouxo, com vasos sanguíneos e linfáticos de pequeno calibre, fibras reticulares, células típicas do conjuntivo e glândulas tubulosas subepiteliais no infundíbulo distal. No funil, há o encontro do espermatozóide com o ovócito. Rodrigues (1996), ao estudar codorna comum (*Nothura maculosa*), descreve a região do infundíbulo distal como sítio secundário de armazenamento de espermatozóide do oviduto para essa espécie.

Ao estudarem aves domésticas, galinha e peru, Bakst (1998) e Miranda et al. (2009) descrevem que durante o ciclo de ovulação diária, os espermatozoides são lentamente liberados das GHEs. E estes ascendem para o infundíbulo distal, onde se agrupam nas glândulas tubulares e são provavelmente liberados pela distensão da mucosa, induzida pela passagem do ovócito pelo infundíbulo, combinada com a secreção ativa de proteínas do albúmen.

O magno é o segmento mais longo e espiralado do oviduto e é responsável pela secreção do albúmen. A fresco, o magno apresenta coloração esbranquiçada e internamente caracterizado por apresentar pregas altas e largas, que preenchem a maior parte da luz do magno. A mucosa do magno é bem mais espessa do que em qualquer

outra região do oviduto, em razão do desenvolvimento de numerosas glândulas tubulares simples, ramificadas ou não da lâmina própria. As células ciliadas superficiais alternam-se com as células secretoras. As células secretoras aumentam gradualmente de tamanho na região caudal e, na junção com o istmo, comprimem as células ciliadas e se tornam difíceis de serem diferenciadas. A lâmina própria está constituída por tecido conjuntivo e glândulas tubulosas, com presença de mastócitos e fibras reticulares ao redor das glândulas aí presentes. A camada muscular é mais desenvolvida que o infundíbulo. A camada externa é menos desenvolvida e a interna é mais espessa. (King, 1981; Ribeiro, 2003; Moraes et al., 2007). Estas peculiaridades morfológicas do magno fazem com que haja aumento da área secretora da mucosa em três vezes (Wyburn et al., 1970). Quando o ovo passa pelo magno, as células secretoras presentes no interior das pregas primárias descarregam os componentes que formam a clara do ovo (Moraes et al., 2007).

O istmo é um segmento curto e a região de transição entre o magno e o istmo tem paredes ligeiramente mais finas e diâmetro mais reduzido, em relação a estes segmentos. Para alguns autores (Surface, 1912; Draper et al., 1968) sua extensão vai desde a região glandular, nos limites com o

magno, até o ponto em que o trato reprodutivo se expande para formar o útero. Johnston et al. (1963) e Solomon (1975) sugeriram que o limite caudal do istmo é indicado pela mudança da cor branca opaca para a cor marrom, característica da cor do útero. Desempenha as funções de produzir as membranas da casca e formar os núcleos mamilares da casca. No istmo as pregas são menos largas do que no magno, as glândulas tubulares são menos desenvolvidas e as camadas musculares são mais espessas, particularmente a camada circular interna. Células secretoras predominam sobre as células ciliadas. A lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo é bem vascularizada, onde estão situadas as glândulas tubulares ramificadas. A camada muscular possui fibras longitudinais, circulares e oblíquas e é delimitada pela serosa (Rodrigues, 1996; Moraes et al., 2007). A junção do istmo com o útero, macroscopicamente, não possui nenhuma delimitação (King, 1981; Ribeiro, 2003).

O útero é segmento dilatado fusiforme, o qual, embora de tamanho reduzido, pode ser distinguido mesmo fora da época da postura. A forma do útero persiste independente da presença do ovo em seu lume (Johnston et al., 1963). Neste segmento são reconhecidas a região cranial, caudal e o recesso do útero, que se afunila gradativamente e termina em

súbita junção útero-vaginal (Fujii, 1963). As pregas longitudinais e transversais da mucosa do útero são irregularmente intersectadas por muitos sulcos transversos e oblíquos, sendo assim subdivididas em numerosas lamelas altas e semelhantes a folhas de até 0,5mm de espessura e 4 mm de altura, de acordo com os estudos de Sisson & Grossman (1986). A mucosa do útero é revestida por epitélio pseudoestratificado prismático ciliado, rico em células secretoras. Em codorna doméstica japonesa, as células apicais do epitélio são ricas em grânulos apicais, os quais variam em tamanho e número de célula durante o período de postura (Johnston et al., 1963). A mucosa repousa sobre a lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo vascularizado, sendo preenchida por glândulas tubulares enoveladas. Segundo Moraes et al. (2007), essas glândulas apresentam núcleo esférico e central e o citoplasma pode conter grânulos apicais. A camada muscular do útero é mais desenvolvida em *Nothura maculosa* (Oliveira, 1994). Ela apresenta espessos feixes musculares helicoidais, separados por tecido conjuntivo. Numerosos feixes musculares, acompanhados de fibras elásticas destacam-se dos feixes mais profundos e percorrem o eixo das pregas da mucosa uterina, sem atingir o ápice das mesmas. Neste segmento ocorre o crescimento dos núcleos mamilares, levando

à formação completa da casca do ovo, produção da cutícula da casca e deposição de pigmentos (Gilbert, 1979; King, 1981; Ribeiro, 2003).

A vagina é um tubo estreito e musculoso, acentuadamente curvo, num formato sigmóide e com uma mucosa branca (Fujii & Tamura, 1963). Este segmento continua distalmente como útero, e proximalmente une-se à cloaca através do óstio cloacal do oviduto esquerdo. A junção do útero com a vagina é demarcada por um forte esfíncter. É a junção útero-vaginal, segundo as descrições de Fujii & Tamura (1963) e Bobr et al. (1964). Nessa porção proximal, adjacente ao útero, está localizado o principal local de armazenamento de espermatozoides, muito importante para a sobrevivência dos mesmos no oviduto (Bobr et al., 1964; Bakst, 1998, Mello, 2000).

A vagina das aves domésticas em geral, apresenta túnicas mucosa, muscular e adventícia, com pregas longitudinais altas ao longo de toda a sua extensão. Esse segmento também é constituído pelos ligamentos ventral e dorsal do oviduto, que fixam este segmento à parede celomática. A túnica mucosa apresenta-se revestida por epitélio pseudoestratificado ciliado, intercalado com células não ciliadas e basais, que apresentam citoplasma acidófilo e núcleo elíptico. A lâmina própria é de tecido conjuntivo

frouxo, delicado e vascularizado. A túnica muscular apresenta feixes regulares e feixes irregulares, mais externos. A musculatura vaginal é mais espessa, quando comparada com os segmentos anteriores, e segundo Sturkie (1965) e Moraes et al. (2007), em galinhas e codorna do campo, pode estar implicada na expulsão do ovo, embora não se observe nenhum esfíncter nesta junção. Subjacente a esta camada, encontra-se a adventícia, com muitas células adiposas e fibras elásticas (Ribeiro, 2003 e Miranda, 2006).

O óstio da vagina abre-se na proximidade da prega uroproctodeal. Seu epitélio é colunar ciliado, com células secretoras. O epitélio da vagina no orifício da desembocadura é substituído cranialmente pelo epitélio do urodeo e caudalmente pelo epitélio do proctodeo (Dahm et al., 1980).

## **2.2. GLÂNDULAS HOSPEDEIRAS DE ESPERMATOZOIDES (GHES)**

As GHES são estruturas tubulares, ramificadas ou não, derivadas de invaginações do epitélio da mucosa das pregas longitudinais da junção útero-vaginal do oviduto (Fujii, 1963; Bakst, 1981, 1983,

1992, 1998; Schuppin et al., 1983; Bezuidenhout et al., 1995; Rodrigues, 1996; Mello, 2000; Miranda et al., 2009; Moraes et al., 2009). Estas estruturas glandulares permitem a prolongada sobrevivência dos espermatozoides no oviduto após a cópula, o que permite a sucessiva fertilização dos ovócitos sem a necessidade de novas cópulas (Birkhead & Moller, 1992; Mello, 2000; Miranda et al., 2009).

As GHEs, formadas por células prismáticas não ciliadas, apresentam núcleo arredondado e de posição basal, citoplasma vacuolizado e abundantes microvilos. Na fêmea do peru, essas células possuem  $18,48 \pm 2,99 \mu\text{m}$  de altura e nas galinhas  $15 \mu\text{m}$  (Richardson, 1935; Lorenz et al., 1967; Fujii, 1963; Gilbert et al., 1968; Howarth Jr, 1971; Bakst & Bird, 1987; Wishart, 1987; Birkhead & Hunter, 1990; Brillard & Bakst, 1990; Bakst, 1992, 1988, 1998; Miranda et al., 2009).

Na codorna, *Nothura maculosa*, (Rodrigues, 1996), perdiz, *Rhynchotus rufescens*, (Mello, 2000) e em peru, *Meleagris gallopavo*, (Miranda et al., 2009) as GHEs são constituídas por células secretoras colunares altas e não ciliadas. Como essas glândulas não apresentam ducto, desembocam diretamente nas criptas do epitélio ciliado. O epitélio das glândulas é

formado por células com projeções apicais em forma de microvilos.

Os microvilos da superfície possivelmente indiquem atividade de exocitose, que pode estar associada à fonte de nutrientes para uso dos espermatozoides residentes. Testes histoquímicos realizados nas GHEs em galinhas domésticas e peruas, identificaram glicogênio, lípidos em grânulos sob a forma de fosfolípidos atípicos, secreção de fosfatase ácida e síntese protéica limitada (Gilbert et al., 1968).

No citoplasma das GHEs de patas (Pal, 1977), de codornas (Renden et al., 1981) e de peruas (Schuppin et al., 1983; Miranda et al., 2009) são encontradas vesículas vacuolizadas, em posição supra-nuclear, durante o período de atividade reprodutiva. Estudos histológicos e histoquímicos demonstraram a presença de substâncias lipídicas nessas vesículas celulares em galinhas (Tingari & Lake, 1973), em codornas (Friess et al., 1978) e em peruas (Schuppin et al., 1983). Schuppin et al. (1983) detectaram a presença de fosfolípidios nas GHEs em peruas. Os espermatozoides residentes nas GHEs das galinhas não utilizam os fosfolípidios como fonte de energia. Estes mesmos pesquisadores descreveram que os fosfolípidios têm importante papel na manutenção das organelas e das membranas

plasmáticas das células das GHEs nas peruas. Segundo estes pesquisadores, não foi possível determinar se as vesículas lipídicas em peruas, são secretadas para o lume dos túbulos armazenadores de espermatozoides e nem determinar sua importância na manutenção dos espermatozoides residuais nas GHEs (Schuppín et al., 1983). Miranda et al. (2009) descreveram que essas vesículas vacuolizadas são encontradas apenas durante o período de postura (agosto a fevereiro), indicando que essas vesículas possam estar relacionadas com possível nutrição dos espermatozoides.

Estudos realizados por Schuppín et al. (1983), com auxílio do microscópio eletrônico, revelaram que as GHEs na perua (*Meleagris gallopavo*) são formadas por células colunares não ciliadas, envolvidas por tecido conjuntivo frouxo. Fibroblastos, linfócitos e macrófagos são observados na lâmina própria. As células glandulares apresentam numerosos microvilos, na sua porção apical, que são expansões do citoplasma recobertas por membrana e contendo numerosos microfilamentos de actina. Os microvilos das células das GHEs são paralelos e formam camada muito regular na superfície glandular, a borda estriada, que é visível também ao microscópio de luz. Observam-se secreções de substâncias no ápice dos microvilos,

parecidas com secreções apócrinas, atividades de micropinocitose parecem ocorrer entre os microvilos. Essas mesmas atividades são observadas nas regiões basais e laterais da membrana plasmática nas células das GHEs.

As membranas laterais das células glandulares exibem especializações, características das células epiteliais, que formam as junções celulares. Estas junções servem para a aderência e vedação do espaço intercelular, impedindo o fluxo de moléculas por entre as células. As zônulas de oclusão, características de todas as células epiteliais, ocorrem na região apical, e são caracterizadas pela íntima justaposição periódica das membranas celulares das células vizinhas, com fusão dos folhetos externos das membranas celulares. A zônula de adesão é encontrada logo a seguir. Esta junção circunda toda a célula e contribui para a aderência entre células vizinhas. As zônulas de oclusão e de adesão são responsáveis pela formação da rede terminal. Outra estrutura juncional importante é o desmossomo, estrutura complexa em forma de disco, constituída pelas membranas de duas células contíguas; diminuem em número próximo à região basolateral das células (Burke et al., 1971; Tingari & Lake, 1973; Friess et al., 1978; Schuppín et al., 1983).

O núcleo das células das GHEs está localizado na região basal. A predominância da eucromatina, indica atividade intensa de transcrição gênica. Observa-se apenas um nucléolo, raramente dois são encontrados (Schuppín et al., 1983).

O estudo das GHEs à microscopia de luz mostra que elas são constituídas de células claras e escuras, evidenciadas pela coloração hematoxilina-eosina. As células claras e escuras apresentam núcleo ovalado, vesiculoso, basal e com nucléolo evidente; projeções apicais destas células correspondem a microvilos (Rodrigues, 1996; Mello, 2000 e Miranda et al., 2009). As células claras são mais frequentes do que as escuras, mas estas apresentam citoplasma mais acidófilo durante o período de postura em GHEs de peru (Miranda et al., 2009). Nas GHEs destas aves são encontradas apenas as células claras no período de repouso (abril a junho).

Estudos histoquímicos realizados em GHEs de galinhas não detectaram polissacarídeos em suas secreções. Fujii (1963); Gilbert et al. (1968) novamente não encontraram polissacarídeos, mas detectaram glicogênio em galinha doméstica. Pal (1977) não detectou glicogênio nas GHEs em patas domésticas. Friess et al. (1978) e Renden et al. (1981) não encontraram polissacarídeo e nem glicogênio intracelular nas GHEs de

codornas japonesas. Tingari & Lake (1973) encontraram acúmulos de glicogênio intracelular nas GHEs de galinhas domésticas e semelhantes resultados foram descritos por Ogazawara & Fuqua (1972) nas GHEs de peru. Schuppín *et al* (1983) não detectaram acúmulo de glicogênio nas GHEs destas aves. As células das GHEs de galinhas (Gilbert, 1979), codornas do campo (Rodrigues, 1996) e de peru (Miranda et al., 2009) apresentam reações negativas aos métodos histoquímicos aplicados, como para o PAS (ácido periódico-reativo de Schiff), amilase-PAS e Alcian-blue em pH 0,5 e pH 2,5.

A natureza química das secreções das células glandulares da fêmea do peru não foi confirmada, apresentando reação negativa aos métodos do ácido periódico-reativo de Schiff (PAS), PAS após a digestão pela amilase salivar e ao método de Alcian Blue em pH 0,5 e 2,5 que, segundo Miranda et al. (2009), indica ausência de mucossubstâncias carboxiladas, sulfatadas e glicoproteínas, ricas em ácido siálico. Esses pesquisadores não consideraram estas estruturas secretoras como GHEs, e sim túbulos armazenadores de espermatozoides, pois os resultados histoquímicos do estudo de outros autores (Birkead et al., 1990; King et al., 2002) não demonstraram que tais estruturas tenham capacidade de secretar

substâncias que possam nutrir os espermatozoides; por isso elas não podem ser denominadas de glândulas.

A Nomina Anatômica Avium (King, 1993) recomenda o termo “Tubuli spermatici” para as estruturas tubulares que armazenam espermatozoides em seu interior. Autores como Gilbert et al. (1968); Van Krey (1967) em aves domésticas; Rodrigues (1996); Moraes et al. (2009) em codorna do campo e Mello (2000) em perdiz utilizam o termo GHEs por não considerarem simplesmente túbulos que armazenam espermatozoides em seu interior, mas estruturas que preservam os espermatozoides com sua vitalidade e secretam produtos, de uma forma não conhecida, que nutrem os espermatozoides por prolongados períodos de tempo.

Desde as primeiras observações das GHEs em seu sítio de armazenamento de espermatozoides da região útero-vaginal, essas estruturas foram chamadas de glândulas vaginais (Fujii, 1963), glândulas útero-vaginais (Bobr et al., 1964), glândulas útero-vaginais hospedeiras de espermatozoides (Gilbert et al., 1968) e GHEs (Rodrigues, 1996; Mello, 2000; Moraes et al., 2009). Tendo sido as GHEs, descritas primeiramente por Van Drimmelen (1946) ao estudar galinha doméstica (*Gallus domesticus*), o autor utilizou os termos de ninhos de espermatozoides após

acasalamento natural ou inseminação artificial, na região das Glândulas Infundibulares (GIs) e nas pregas longitudinais da junção útero-vaginal do oviduto. As mesmas observações foram feitas por Gilbert et al. (1968), Tingari & Lake (1973); Rodrigues (1996), em aves domésticas, *Gallus domesticus* e codornas, respectivamente. Estudos realizados por Gilbert et al. (1968), Tingari & Lake (1973) levantaram dúvidas sobre a importância das GIs, como armazenadoras de espermatozoides, que só atingem número considerável quando são depositados acima da junção útero-vaginal. Os estudos indicaram que os espermatozoides alcançam as GIs durante o ciclo diário de ovulação, principalmente quando são depositados na junção útero-vaginal. A região de junção entre o útero e a vagina passou a ser considerada como o local primário de armazenagem de espermatozoides e os sítios armazenadores infundibulares como sítio secundário (Bobr et al., 1964; Fujii e Tamura, 1963; Van Krey et al., 1967; Schindler et al., 1971; Bakst, 1994, 1998; Mello, 2000; Miranda, 2006; Miranda et al., 2009).

Moraes et al. (2009) consideram que as GIs são estruturas glandulares mais importantes no armazenamento dos espermatozoides e fertilização do ovócito no oviduto, pois o estudo morfométrico da região infundíbulo-

magno apresentou mais glândulas ( $11,7 \pm 1,48$ ) do que a região útero-vaginal ( $7,5 \pm 1,36$ ) em codorna do campo, *Nothura maculosa*. Em estudo com a perua, Goodrich-smith & Marquez (1978) encontraram 24.000 GHEs por região útero-vaginal. Birkead & Moller (1992) encontraram 20.000 destas estruturas na região útero-vaginal da perua. Miranda et al. (2009) estudando as GHEs na junção útero-vaginal da perua, *Meleagris gallopavo*, mostraram que durante o período de postura estão presentes em média,  $24.943,2 \pm 2.411,9$  GHEs na região das pregas útero-vaginais. Esses túbulos possuem, em média,  $655,17 \pm 91,08 \mu\text{m}$  de comprimento. O volume glandular e do lume, no período de postura, apresentam em média  $942.851,7 \pm 341.698,7 \mu\text{m}^3$  e  $16.498,7 \pm 12.932,3 \mu\text{m}^3$ , respectivamente. Na fase de repouso reprodutivo observa-se número menor de GHEs nas pregas da junção útero-vaginal, em média  $23.795,7 \pm 2.219,22$  GHEs. O comprimento glandular diminui para  $531,29 \pm 107,36 \mu\text{m}$ , em média. O volume glandular reduz para  $504.960,30 \pm 185099,44 \mu\text{m}^3$  e o volume do lume é  $6.031,32 \pm 4.613,74 \mu\text{m}^3$  em média, mostrando que nesse período ocorre diminuição significativa do volume do citoplasma das células tubulares, inclusive a morte de algumas delas. O fenômeno do declínio sazonal da fertilidade das fêmeas do

peru, é considerado inexplicável por Harper & Arscott (1969) e Wentworth et al. (1975). No entanto, as GHEs participam na fertilidade das fêmeas do peru (Schuppin et al., 1983; Brillard & Bakst, 1990), a redução significativa no volume destas estruturas no período de repouso reprodutivo explica claramente o declínio da fertilidade sazonal destas aves (Miranda, 2006; Miranda et al., 2009).

O estudo morfométrico realizado durante o período de maturação sexual da codorna *Coturnix japonica* mostrou que o desenvolvimento das GHEs no oviduto começa por volta de 28 dias após a eclosão. Neste período é observado o desenvolvimento dos folículos ovarianos, do oviduto e na região útero-vaginal são observadas pequenas invaginações no epitélio da mucosa distal do útero. Este estudo demonstrou que as células do epitélio de revestimento das pregas da junção útero-vaginal apresentam crescimento progressivo até os 42 dias, época que coincide com o início dos acasalamentos. Os dados mostram que por volta de 28 dias de nascimento a altura destas células é em média  $10,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$ . Por volta dos 35 dias são observadas pregas primárias e secundárias na junção útero-vaginal e invaginações do epitélio para dentro da lâmina própria. Neste período, as células basais destas pregas estão



adquirindo as características de células glandulares, com núcleo vesiculoso central, e nucléolo evidente; o citoplasma é mais acidófilo com  $16,4 \pm 1,1 \mu\text{m}$  de altura celular. As GHEs aparecem por volta de 38 dias, chegando ao desenvolvimento completo entre o 40º ao 42º dia. Nesta época são observadas GHEs na lâmina própria, algumas contendo espermatozoides. As pregas e a região da junção útero-vaginal estão praticamente formadas, a mucosa da junção revestida por epitélio pseudoestratificado prismático, com células ciliadas e não ciliadas e a região basal das pregas apresenta células epiteliais não ciliadas, semelhantes às células glandulares, com altura celular em torno de  $27,2 \pm 1,1 \mu\text{m}$ . Por volta de 49 dias inicia a postura dos ovos com o desenvolvimento das GHEs já completado. Neste período só não foram observadas as vesículas lipídicas citoplasmáticas descritas em GHEs de galinhas e fêmeas do peru (Holm & Ridderstråle, 2002). Bakst (1998) registra a presença de GHEs em peruas com trinta semanas de idade, mesmo com o oviduto e ovário imaturo.

Os estudos sobre o desenvolvimento das GHEs e dos folículos ovarianos de aves domésticas e em codorna comum mostram que essas estruturas são influenciadas pelos hormônios sexuais, estrógeno e

progesterona. Aves que receberam injeções diárias de 17 B-estradiol e progesterona apresentaram desenvolvimento e diferenciação das GHEs em peruas jovens (Pescatore & Marquez, 1977). Estudos imunohistoquímicos mostraram a presença de receptores de estrógeno e progesterona nas GHEs de galinhas (Yoshimura et al., 2000). Bakst (1988, 1992) relata em seus estudos, que outros fatores, além dos hormônios sexuais, estão envolvidos no desenvolvimento das GHEs, pois foram encontradas GHEs com espermatozoides em peruas que apresentavam baixa concentração dos hormônios estrógeno e progesterona.

As GHEs nas peruas, segundo King (1981), servem como locais de armazenamento para os espermatozoides por até 36 dias após uma única inseminação, sendo de 33 dias a duração média da fertilidade. Nenhum local de armazenamento foi encontrado no infundíbulo. Verma & Chermis (1965) relatam que em peruas, os espermatozoides podem permanecer cerca de 59 dias nas GHEs.

As GHEs desembocam nas depressões do epitélio das pregas. A região proximal das depressões é revestida por epitélio simples com células ciliadas e não ciliadas, que se alternam em direção distal. Na região basal das depressões do epitélio, as células ciliadas

estão ausentes. São visíveis apenas células prismáticas, com microvilos apicais, características das células das GHEs. Em geral, a mucosa das pregas da junção útero-vaginal encontra-se revestida por epitélio pseudoestratificado, com células prismáticas ciliadas e não ciliadas, intercaladas, que apresentam núcleo vesiculoso basal e no terço médio, com nucléolo evidente, cujas células apresentam grânulos característicos na porção apical. As células basais presentes nesse epitélio são pequenas, arredondadas e permanecem apoiadas na membrana basal. As pregas da junção útero-vaginal apresentam aspectos semelhantes as da região uterina em sua face cranial e sua face caudal apresenta características das regiões vaginais (Rodrigues, 1996; Miranda et al., 2009; Moraes et al., 2009).

A região das pregas da junção útero-vaginal apresenta variações anatômicas entre o período de postura e o período de repouso. No período de postura esta região apresenta pregas longitudinais altas e delgadas que, na peruca caipira são em média  $38 \pm 1,41$  pregas, com pequenas variações de tamanho (Miranda, 2006). Birkhead & Moller (1992) e Goodrich-Smith & Marquez (1978) verificaram que as perucas de exploração comercial apresentam de 24 a 25 pregas na junção útero-vaginal. Estes autores não citaram a raça ou linhagem das perucas por

eles estudadas, mas eram aves selecionadas para aumentar a produção de ovos, segundo Miranda et al. (2009). No período de repouso, a região da junção útero-vaginal apresenta-se menos volumosa, com pregas mais delgadas, menos diferenciadas do que no período de atividade reprodutiva. Mello (2000), ao estudar a junção útero-vaginal de perdiz (*Rhynchotus rufescens*) encontrou variação significativa do número de pregas da junção útero-vaginal entre as fases reprodutivas. Essa variação foi de nove no período de repouso a 36 no período de atividade reprodutiva, demonstrando grandes modificações funcionais ao longo do período reprodutivo.

Após o acasalamento natural ou inseminação artificial, os espermatozoides ascendem em direção ao oviduto, sendo armazenado nas GHEs. O tempo de armazenamento de espermatozoides apresenta grande variação entre as espécies (Birkhead & Moller, 1992). Lake (1975) sugere que a postura, o sistema de acasalamento e a ocorrência de nova postura possam determinar o valor seletivo do armazenamento de espermatozoides e um prolongado período fértil.

As diferenças existentes entre as GHEs de diferentes espécies de aves, e o período de armazenamento de espermatozoides nestas estruturas podem também estar relacionadas a diferenças de comportamento entre as

espécies. Diferenças interespecíficas poderiam ser consideradas adaptações das fêmeas, no que se refere à competição espermática. Diferenças intraespecíficas podem indicar as condições fisiológicas ou a qualidade da fêmea (Lake, 1975; Cheng et al., 1983; Hatch, 1983; Fitch & Schugart, 1984; e Bakst & Bird, 1987; Schugart, 1988).

Os espermatozoides não apresentam organização espacial, quando estão dentro dos túbulos armazenadores de espermatozoides (Friess et al., 1978). Schuppín et al. (1983) relatam que as GHEs, quando cheias de espermatozoides, tendem a apresentar uma estratificação desses espermatozoides, com os mais novos sendo acumulados na porção final das GHEs. Miranda et al., (2009) descreveram que algumas pregas da junção útero-vaginal da fêmea do peru apresentaram maior concentração de GHEs com ou sem espermatozoides em relação às outras, e mesmo dentro de uma mesma prega, foram encontradas regiões com densidade maior de GHEs do que em outras, diferente dos achados de Birkead & Moller (1992). Estes mesmos autores encontraram, nas GHEs da fêmea do peru, espermatozoides mais concentrados na região intermediária das pregas da junção útero-vaginal. King et al. (2002) relataram que os espermatozoides do

último macho que copulou fecundam a maioria dos ovos durante os cinco primeiros dias após a última inseminação. Muitos autores sugerem que os espermatozoides do último macho são os mais atuantes por serem resultado da última estratificação no interior dos túbulos (Burke & Ogasawara, 1969; Compton et al., 1978; Christensen, 1981).

Os espermatozoides apresentavam atividades semelhantes aos dos espermatozoides encontrados no oviduto. Raramente são observados espermatozoides em estágio degenerativo dentro das GHEs. Mesmo os raros espermatozoides encontrados em processo degenerativo foram apenas observados em túbulos, cujas células estavam em processo de apoptose, com ruptura da membrana nuclear e da membrana plasmática das células glandulares (Van Krey et al., 1967 com galinhas; Friess et al., 1978 com codornas; Schuppín et al., 1983 com peruas).

As GHEs não apresentaram modificações morfológicas entre o início e o fim da postura de ovos férteis, apenas ocorrem diminuições gradativas do número de espermatozoides que estavam armazenados nas GHEs, indicando que os espermatozoides são liberados gradativamente durante o ciclo diário de postura. No início da postura de ovos inférteis, ou seja, ovos não fecundados, as

GHEs apresentavam poucos espermatozoides residuais (Schuppin et al.,1983).

Estudos realizados por Schuppin et al. (1983) e Tingari & Lake (1973) revelaram que os espermatozoides residentes no lume das GHEs se aglutinam e é possível que essa disposição reduza o índice de mortalidade desses espermatozoides. Bakst (1981, 1983 e 1992) relatou a presença de grande quantidade de espermatozoides livres no oviduto e alta incidência de mortalidade dos espermatozoides nas GHEs após inseminações artificiais, que continham grande volume de sêmen. Após dias sucessivos de postura, observou nítidas reduções na quantidade de espermatozoides no lume glandular.

Duas hipóteses principais explicariam porque fêmeas de aves armazenam espermatozoides por longo período. Uma delas se refere a uma herança filogenética de seus ancestrais répteis, no quais as GHEs foram descritas em algumas famílias de tartarugas e cobras ou resultar de uma adaptação evolutiva, essencial para assegurar a fertilização, uma vez que a cópula e a ovulação não seriam sincrônicas. Outra hipótese apontaria que a ovulação e fertilização sequenciais produziriam dois efeitos que favoreceriam o armazenamento de espermatozoides. Primeiro, seguindo-se à

inseminação, os espermatozoides são removidos do trato. Armazenando os espermatozoides em sítios especiais, de onde não pudessem ser desalojados pela passagem do ovo, os espermatozoides poderiam reabastecer o infundíbulo e assegurar que todos os ovócitos fossem fecundados. Segundo efeito, como os ovos de uma postura são fertilizados em intervalos de 24 horas ou mais, o armazenamento de espermatozoides evita a necessidade de cópula para fertilizar cada óvulo (Birkead & Moller, 1992).

Além da função de armazenar espermatozoides, a junção útero-vaginal age como barreira seletiva no transporte, sendo que apenas espermatozoides móveis podem passar nesta região (Friess et al.,1978). Froman (2003) descreve que somente espermatozoides móveis ascendem para a vagina, penetram nos túbulos e emergem deles. O autor explica vários fatores que interferem nesse fenômeno, os quais estão relacionados à motilidade do espermatozóide. Os espermatozoides mortos não penetram no útero (Fujii & Tamura, 1963) e possivelmente sejam reabsorvidos na região útero-vaginal.

As aves domésticas e silvestres que estão em seu habitat natural são influenciadas pelas estações do ano, assim como o fotoperíodo interfere no período reprodutivo das aves. O

ciclo reprodutivo destes animais é, em geral, dividido em duas fases: fase de postura (proliferação e secreção) e fase de repouso (regressão e repouso) na codorna comum, perdiz e na perua caipira (Rodrigues, 1996; Mello, 2000; Miranda et al., 2009). Os folículos ovarianos, o oviduto e as GHEs sofrem variações durante as fases do ciclo reprodutivo das aves. As GHEs têm sido descritas, principalmente, na fase de postura, mas seu padrão sazonal é pouco conhecido.

As GHEs de codorna comum, estudadas por Rodrigues (1996), apresentam modificações ao longo das diferentes fases funcionais do ciclo reprodutivo que, todavia, não desaparecem durante o repouso, fato também observado na galinha doméstica e na perua. Mello (2000) afirma que em *Rhynchotus rufescens*, nas fases de secreção, regressão e proliferação, o aspecto macroscópico da região das GHEs apresenta-se pouco diferenciado. Quando em repouso, a região apresenta-se menos volumosa, com pregas mais delgadas. Em *Meleagris gallopavo* é possível identificar as duas fases do ciclo, a fase de postura (agosto a março) e de repouso (abril a julho). Nestes animais as GHEs não chegam a desaparecer na fase de repouso (Miranda et al., 2009).

Em fêmeas de perdizes, as GHEs de espermatozoides de perdiz apresentam características morfológicas, vistas por meio

de microscopia de luz, que permitem dividi-las em quatro etapas: fase de secreção, regressão, repouso e fase de proliferação (Mello, 2000). Na fase de secreção, os túbulos armazenadores de espermatozoides apresentam células prismáticas, estreitas, com borda estriada e trama terminal; o núcleo é vesiculoso, arredondado e o nucléolo evidente. Na fase de regressão, as glândulas entram em progressiva desorganização da arquitetura histológica, com perda dos limites celulares e da trama terminal. Espermatozoides remanescentes são encontrados ainda no lume tubular. As GHEs chegam a desaparecer na fase de repouso, ficando apenas restos de estruturas celulares. Na fase de proliferação observa-se grande quantidade de GHEs em processo de formação e desenvolvimento, assemelhando-se às GHEs da fase de secreção. Mas não possuem espermatozoides no lume glandular (Mello, 2000).

Em peruas, espermatozoides são encontrados nas GHEs durante os dois períodos reprodutivos, de postura e repouso, pois a cópula ocorre durante o ano todo, mesmo no período de repouso. Observações semelhantes foram feitas por Fujii & Tamura (1963), em galinhas domésticas e por Rodrigues (1996), em codorna comum. Nestas aves ocorreu redução significativa do

comprimento glandular (655 para 531  $\mu\text{m}$ ), do volume glandular (94.942.851,7 para 504.960,30 $\mu\text{m}^3$ ), do volume do lume (16.498,7 para 6.031,32 $\mu\text{m}^3$ ), do número de GHEs (24.943 para 23.795), do diâmetro glandular externo (42 para 34 $\mu\text{m}$ ), do diâmetro interno (5,3 para 3,5 $\mu\text{m}$ ), da altura celular (18,4 para 15,4), e do número de células glandulares (14 para 11,5) entre as fases de atividade reprodutiva e de repouso. A redução significativa do volume glandular e do volume do lume no período de repouso deve-se à diminuição do citoplasma das células glandulares na perua caipira (Miranda et al., 2009).

As GHEs da galinha doméstica apresentam, durante a fase de secreção, o diâmetro tubular de 70  $\mu\text{m}$  e epitélio tubular de 25  $\mu\text{m}$ . Na fase de repouso ocorre a redução do diâmetro para 30  $\mu\text{m}$  e da altura para 12  $\mu\text{m}$  (Fujii & Tamura, 1963). Mero & Ogasawara (1970) relatam que as GHEs de galinha doméstica apresentam diâmetros médios de 38,4  $\mu\text{m}$  e 106,9  $\mu\text{m}$  nos cortes transversais e longitudinais, respectivamente. Rodrigues (1996) relata que as GHEs de codorna comum são longas e numerosas apresentando, em cortes transversais, 25 a 30 células, com diâmetro externo de 45  $\mu\text{m}$  a 90  $\mu\text{m}$  e lume sempre amplo.

As GHEs da fêmea de perdiz sofrem gradativas reduções do diâmetro externo,

interno e altura do epitélio, ao longo das quatro fases reprodutivas (secreção, regressão, proliferação e repouso). As médias do diâmetro externo descritas são: 79,2; 67,9; 54,1 e 0 $\mu\text{m}$ , ao longo das quatro fases, com redução gradativa das medidas no diâmetro interno: 11,2; 9,7; 12,1 e 0 $\mu\text{m}$  e da altura do epitélio: 34; 29,1; 21 e 0  $\mu\text{m}$ . Os dados permitiram afirmar que durante a fase de secreção os parâmetros estavam aumentados e que a pequena variação histométrica das fases de secreção, regressão e proliferação torna-a significativa comparada à ausência de glândulas na fase de repouso. Tais dados mostram que a formação das glândulas se dá a partir da ausência total de túbulos e ao seu desenvolvimento máximo na fase de secreção (Mello, 2000).

### **2.3. GLÂNDULAS INFUNDIBULARES (GIs)**

As Glândulas Infundibulares são estruturas tubulares, ramificadas ou não, derivadas de invaginações do epitélio da mucosa das pregas longitudinais ou ligeiramente oblíquas do infundíbulo distal. Estas glândulas tubulosas, observadas na metade caudal do infundíbulo, são particularmente numerosas na sua extremidade final, onde se distribuem de maneira uniforme na lâmina

própria, até preencherem totalmente a extensão das pregas da mucosa. Nesta região estão entremeadas com grupos de glândulas secretoras de albúmen do magno (Aitken & Johnston, 1963; King, 1981; Rodrigues, 1996).

As glândulas tubulosas do infundíbulo distal da codorna do campo, *Nothura maculosa*, em cortes transversais, apresentam-se constituídas de células prismáticas baixas com núcleos em posição basal e citoplasma ligeiramente acidófilo. Os núcleos são arredondados, vesiculosos e com nucléolo evidente. O citoplasma das células glandulares apresenta reação fracamente positiva para o PAS, amilase-PAS e reagem negativamente às colorações pelo Alcian-blue em pH 0,5 e 2,5. Estas glândulas desembocam entre as células do epitélio de revestimento, através de um pequeno ducto. Nestas aves, cada ducto glandular é formado por células prismáticas baixas ou cúbicas, não ciliadas, com núcleo esférico e geralmente de posição central (Rodrigues, 1996).

Nas glândulas tubulosas do infundíbulo são descritos dois tipos de células, à microscopia eletrônica: os tipos celulares I e II. O primeiro é pouco frequente e caracterizado pela presença de abundante retículo endoplasmático granuloso, de aspecto laminado e grânulos de secreção compostos

por um material homogêneo e eletrondenso. Os microvilos destas células estão densamente distribuídos na superfície apical. O tipo celular II é mais comum, não possui o retículo endoplasmático laminado e os microvilos são menos frequentes. Seu citoplasma contém glânulos de secreção que se assemelham aos grânulos do tipo celular I. Um terceiro tipo celular, contendo grânulos de diferentes eletrondensidades, foi posteriormente descrito em galinhas, nos últimos estádios de formação da casca do ovo (Aitken & Johnston, 1963).

Apesar dos tipos celulares das glândulas tubulosas do infundíbulo serem morfológicamente distintos, estas podem representar diferentes estágios funcionais da mesma célula (Aitken & Johnston, 1963).

As células das GIs e do epitélio de revestimento do infundíbulo distal apresentam consideráveis variações morfológicas e tintoriais, dependendo da atividade secretora e do grau de contração das paredes do infundíbulo. Nas preparações coradas pelo azul de toluidina-borato de sódio, estas células apresentam o citoplasma escuro, com finas granulações apicais. Estas células permitem diferenciar as células dos ductos, das células epiteliais adjacentes e das células glandulares em codorna do campo (Rodrigues, 1996).

Estudos morfométricos realizados nestas glândulas mostraram que elas apresentavam lume amplo e de fácil visualização, com diâmetro médio externo em torno de  $32,40 \pm 3,55 \mu\text{m}$ , em codorna do campo (Rodrigues, 1996). O mesmo estudo foi realizado por Moraes et al. (2009) em codorna do campo, que apresenta GIs com diâmetro externo de  $20,7 \pm 1,48 \mu\text{m}$ . Nestas aves, as glândulas são maiores que as GHEs da junção útero-vaginal.

Espermatozoides são encontrados dentro do lume das GIs após acasalamento natural ou inseminação artificial intraperitoneal em galinhas (Van Drimmlen, 1946). Altas concentrações de espermatozoides foram encontradas no infundíbulo distal de galinhas após inseminação artificial, enquanto que nos acasalamentos naturais estas concentrações eram menores. Em ambos os casos, os espermatozoides estavam localizados nas pregas da mucosa do infundíbulo distal (Van Drimmlen, 1946).

Van Drimmlen (1946) e Moraes et al. (2009) descrevem que o infundíbulo distal é o principal local de armazenamento de espermatozoides no oviduto. Van Drimmelen (1946) descreve que as pregas do infundíbulo distal são como “ninhos de espermatozoides” prontos para fertilizarem o óvulo. Estudos morfométricos realizados por Moraes et al. (2009) mostraram que o

número de GIs com espermatozoides é maior do que o número de GHEs na junção útero-vaginal, na codorna de campo. Nestes animais, a topografia do ovário e do infundíbulo explica estes números, uma vez que o ovócito, ao sofrer oocitação, entra em contato o mais rápido possível com os espermatozoides armazenados nas GIs, em comparação com os espermatozoides armazenados nas GHEs. Vale destacar que os espermatozoides das GHEs levam muito mais tempo para chegar ao infundíbulo, sendo que alguns podem morrer durante o trajeto (Moraes et al. 2009).

Bobr et al. (1964) e Schindler et al. (1971) discordaram da hipótese de Van Drimmlen (1946) e Moraes et al. (2009), uma vez que os espermatozoides alcançam as GIs em número considerável, somente quando depositados acima da junção útero-vaginal ou na cavidade peritoneal. Após acasalamento natural ou inseminação artificial, os espermatozoides são encontrados, geralmente, nas GHEs da junção útero-vaginal. Tendo em vista a relação aparente entre a quantidade de espermatozoides armazenados e fertilidade, os autores sugerem que estas glândulas (GHEs e GIs) são os sítios normais de armazenamento dos espermatozoides.

Van Krey et al. (1967) observaram a presença de espermatozoides armazenados



tanto na região infundibular como da junção útero-vaginal, após inseminação artificial. Porém, estes autores omitiram o local em que o sêmen foi depositado no processo de inseminação.

Fujii e Tamura (1963) observaram que as GHEs da junção útero-vaginal armazenam um número consideravelmente maior de espermatozoides e por um tempo mais longo que as pregas do infundíbulo distal. Estes autores sugerem que as GHEs possuem algum fator favorável à sobrevivência dos espermatozoides, podendo estas atuarem como um reservatório preliminar para os espermatozoides, até os mesmos alcançarem o infundíbulo, onde finalmente são armazenados temporariamente para fecundação dos oócitos durante o ciclo diário de ovulação.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 EXPERIMENTO 1:**

##### **3.1.1 CODORNAS**

Foi utilizado um lote com 89 codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*) (77 fêmeas e 12 machos) cedido pelo Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG. As codornas foram mantidas em gaiolas individuais

padronizadas, com 15 cm de comprimento e 13 cm de altura, e receberam 17 horas de luz diária, com ração e água *ad libitum*.

Antes de iniciar o experimento com o primeiro grupo de animais, fez-se a padronização dos grupos no tocante ao manejo nutricional e à coleta de ovos, iniciando os acasalamentos só após todos os animais estarem em postura (experimento aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFMG em 27-08-2008; Protocolo N°140/2008).

Antes de começar os acasalamentos foi realizada a seleção dos machos, conforme sua capacidade de dominância em relação às fêmeas e a frequência com que cobriam as fêmeas durante as duas horas que permaneciam juntos na gaiola.

O experimento teve início em outubro de 2008, com treze grupos, e o Grupo Controle G0 (n=5 fêmeas) foi abatido no início do experimento (tempo zero do experimento).

Os grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9 e G10 eram constituídos de seis fêmeas e seis machos cada um e foram submetidos aos seguintes procedimentos de manejo reprodutivo:

As codornas foram mantidas em gaiolas individuais. No dia do acasalamento, os machos foram transferidos para gaiolas das

fêmeas. O casal permaneceu junto por 24 horas. Após este período os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. O que diferenciou entre os grupos foi o tempo de abate após separação do macho:

G1 (n=6) - No 10º dia (240 horas) após o acasalamento.

G2 (n=6) – No 9º dia (216 horas) após o acasalamento.

G3 (n=6) – No 8º dia (192 horas) após o acasalamento.

G4 (n=6) – No 7º dia (168 horas) após o acasalamento.

G5 (n=6) – No 6º dia (144 horas) após o acasalamento.

G6 (n=6) – No 5º dia (120 horas) após o acasalamento.

G7 (n=6) – No 4º dia (96 horas) após o acasalamento.

G8 (n=6) – No 3º dia (72 horas) após o acasalamento.

G9 (n=6) – No 2º dia (48 horas) após o acasalamento.

G10 (n=6) – No 1º dia (24 horas) após o acasalamento.

As codornas foram abatidas pelo método de deslocamento cervical, para coleta e avaliação do aparelho reprodutivo, incluindo mensuração de diferentes partes do oviduto e o processamento deste para estudo histológico e morfométrico. Para isto, foi realizada a dissecação do oviduto e a retirada do ovário para posterior processamento, descrito nos itens 3.1.3 e 3.1.4.

Nos grupos G11 e G12 foram adotados os seguintes procedimentos de manejo:

G11 (n= 6) - Acasalamento por 24 horas em gaiolas individuais (um macho com 3 fêmeas). Após este período os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. No 2º dia (48 horas) após o acasalamento foi realizado o abate das fêmeas, pelo método de deslocamento cervical e os procedimentos seguintes foram semelhantes aos do G1.

G12 (n= 6) - Acasalamento por 24 horas em gaiolas individuais (um macho com 6 fêmeas). Após este período os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. No 2º dia (48 horas) após o acasalamento foi realizado o abate das fêmeas, pelo método de deslocamento cervical e os procedimentos seguintes foram semelhantes aos do G1.

### **3.1.2 ESTUDO ANATÔMICO**

Após o abate, os animais foram colocados em decúbito dorsal para a retirada das penas de sua região ventral, próxima à cloaca. Em seguida, foram realizadas incisões a dois centímetros abaixo da extremidade caudal do esterno, seccionando a pele, que foi rebatida, deixando exposta a musculatura. O esterno e os músculos foram rebatidos para estudo da relação topográfica do sistema urogenital. Em seguida, as vísceras foram retiradas da cavidade corporal, com a finalidade de expor e permitir melhor visualização dos órgãos do aparelho genital feminino.

O oviduto foi seccionado aproximadamente a dois centímetros de sua abertura na cloaca. Procedeu-se, então, à dissecação e retirada do oviduto. Foi realizada a mensuração do oviduto e de seus segmentos (infundíbulo, magno, istmo, útero e vagina) e posterior estudo anatômico das pregas longitudinais e transversais de cada segmento. O oviduto foi pesado em uma balança de precisão e os fragmentos longitudinais destes segmentos foram destinados ao estudo histológico.

Os estudos e análises se concentraram na região da junção útero-vaginal e do infundíbulo distal, local onde se localizam as GHEs e as GIs (sítios primário e secundário

de armazenamento de espermatozoides) em Galliformes (Bakst, 1994,1998).

Para o estudo das pregas da junção útero-vaginal e do infundíbulo distal foram obtidos fragmentos dessas regiões, que foram fixados em solução saturada de Bouin e estocados em etanol 70%. Alguns fragmentos da junção útero-vaginal e do infundíbulo distal foram macerados em hidróxido de potássio a 4%, seguidos de coloração pela hematoxilina ácida de Herlich, diafanizados em glicerina e levados ao microscópio estereoscópio Leica, modelo Zoom 2000, aumento de 45 vezes, para visualização das GHEs e GIs.

### **3.1.3 ESTUDO HISTOLÓGICO**

Fragmentos longitudinais da região útero-vaginal e do infundíbulo, obtidos por meio de dissecação, foram fixados em formalina tamponada em tampão fosfato, pH 7,2, 0.1M e em líquido de Bouin (Lillie & Fullmer, 1976) durante 24 horas. Posteriormente, os espécimens foram submetidos a processos rotineiros de histologia, incluídos em parafina, cortados de forma semi-seriada com 5 micrômetros de espessura e corados pela técnica de hematoxilina e eosina. Também foram utilizadas técnicas

histoquímicas para averiguação da natureza química das substâncias secretadas: ácido periódico-reativo de Schiff (PAS) (McManus, 1946); azul de Alcian em pH 0,5 (Lev Spicer, 1964) e em pH 2,5 (Mowry, 1956); digestão pela amilase salivar, seguido de PAS (Michalany, 1980).

Os fragmentos da junção útero-vaginal e do infundíbulo destinados à morfometria foram fixados em formol neutro 10% e incluídos em glicol-metacrilato, segundo Chiarini-Garcia (1991), cortados de forma seriada com navalha de vidro acoplada em micrótomo, com espessura de 3 micrômetros e corados pela hematoxilina e eosina e azul de toluidina 0,5% - borato de sódio 1% Dominicci-modificado.

Os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina e azul de toluidina 0,5% - borato de sódio 1% Dominicci-modificado, para observação geral dos tecidos epitelial, conjuntivo, muscular e especialmente das GHEs e GIs.

As lâminas com os cortes histológico e histoquímico, montadas em bálsamo do Canadá foram analisadas ao microscópio de óptico Dimex mod. TT 1500 Nm. Os cortes foram fotografados utilizando-se o fotomicroscópio Nikon Eclipse E600 e analisados usando o software (imagem) do Centro de Ciências e Saúde da Universidade do Texas.

### 3.1.4 ESTUDO MORFOMÉTRICO

Foi utilizado microscópio óptico com régua micrométrica de escala conhecida, acoplada à lente ocular 10X e leitura na objetiva 40X, resultando em aumento de 400X, quando foi quantificado o número total de GHEs e das GIs com ou sem espermatozoides ao longo de todas as pregas da junção útero-vaginal (JUV) e do infundíbulo de cada animal. Para estimar o número total de GHEs e das GIs foram contadas as secções transversais destas estruturas ao longo de 3 pregas da transição útero-vaginal de cada codorna. A média destas contagens foi multiplicada pelo número de pregas encontradas em cada junção útero-vaginal. Desta forma foi obtido o número total médio de GHEs e GIs.

A seguir, foram medidos o diâmetro externo, o diâmetro interno, a altura do epitélio e o número de células das GHEs e das GIs que se encontravam em secções transversais nas três pregas da JUV de cada animal. As medidas foram realizadas com régua micrométrica com escala conhecida, acoplada à lente ocular 10X do microscópio de luz para mensuração com objetiva de 40X. O cálculo da altura do epitélio glandular foi realizado subtraindo-se do diâmetro glandular o diâmetro do lume, dividido por dois. O número de células de cada secção foi registrado pela contagem de

seus núcleos. Foram avaliados os possíveis tipos celulares das GHEs e GIs.

## 3.2. EXPERIMENTO 2

### 3.2.1 CODORNAS

Foi utilizado um lote com 54 codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*), em fase anual de postura, adquiridas do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG. Destas, 40 eram fêmeas e 14 machos. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais padronizadas, com 15 cm de comprimento e 13 cm de altura onde receberam 17 horas de luz diária, dieta e água *ad libitum*.

Antes de iniciar o experimento ocorreu a padronização dos grupos no tocante ao manejo nutricional e à coleta de ovos, com os acasalamentos só iniciando após todos os ovos coletados de cada grupo serem não fertilizados.

Antes de começar os acasalamentos, foi realizada a seleção dos machos, selecionados conforme sua capacidade de dominância em relação às fêmeas e à frequência com que cada um cobria a fêmea durante duas horas.

O experimento teve início em fevereiro de 2009, sendo composto de três grupos.

Os grupos G1, G2 e G3 eram constituídos de dez fêmeas e cinco machos cada um, com os procedimentos de manejo adotados a seguir:

G1 (n= 10 fêmeas e 5 machos): Acasalamento por 24 horas em gaiolas individuais, com um macho para cada 2 fêmeas. O macho cobria cada fêmea do seu grupo individualmente por um período de 24 horas. Após este período os machos eram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. Os 20 primeiros ovos foram coletados, identificados, pesados e armazenados em ambiente fresco e arejado por um período não superior a 7 dias e incubados em chocadeira elétrica. Depois do 14º dia, os ovos foram transferidos para as máquinas de eclosão. Entre o 16º e 17º ocorreu a eclosão dos filhotes. Foram identificados os filhotes com seus respectivos ovos para análise do número de ovos férteis após o acasalamento de 24 horas (Ariki, 1996). Os filhotes foram doados para criadores menores.

G2 e G3 (n= 10 fêmeas e 5 machos): Acasalamento por 24 horas em gaiolas individuais, com um macho para cada 2 fêmeas. O macho cobria cada fêmea do seu grupo individualmente por um período de 24

horas. Após este período os machos eram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso e os procedimentos seguintes foram semelhantes aos do G1.

### **3.2.2 DETERMINAÇÃO DO MELHOR INTERVALO DE COBERTURAS EM CODORNAS**

Antes de iniciar o 2º experimento houve um intervalo de 14 dias para descanso e readaptação dos animais (Gewehr, 2003).

Também foi feita à padronização dos grupos no tocante ao manejo nutricional e à coleta de ovos, e os acasalamentos só foram realizados após todos os ovos coletados de cada grupo serem não fertilizados.

O experimento teve início em abril de 2009, sendo composto de três grupos:

G1: Grupo 2 dias (n= 12 fêmeas e n= 6 machos). As codornas foram mantidas em gaiolas individuais na sequência de duas fêmeas para um macho, no total de 6 subgrupos. O macho de cada subgrupo cobria individualmente cada uma das fêmeas por um período de 24 horas. No 3º dia, os machos eram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. O ciclo de acasalamentos inicia novamente no 4º dia. Cerca de 100 ovos foram coletados, identificados e pesados, armazenados em

ambientes fresco e arejado por um período não superior a 7 dias e incubados em chocadeira elétrica. Depois do 14º dia, os ovos foram transferidos para as nascedouras. Entre o 16º e 17º ocorreu à eclosão dos filhotes. Foram identificados os filhotes com seus respectivos ovos para análise dos números de ovos férteis após o acasalamento de 24 horas. Os filhotes foram doados para criadores menores.

G2: Grupo 3 dias (n= 12 fêmeas e 4 machos). As codornas foram mantidas em gaiolas individuais na sequência de três fêmeas para um macho, no total 4 de subgrupos. O macho de cada subgrupo cobria individualmente cada uma das fêmeas por um período de 24 horas e descansava no 4º dia. Cerca de 100 ovos foram coletados, identificados e pesados, armazenados em ambientes fresco e arejado por um período não superior a 7 dias, incubados em chocadeira elétrica. Depois do 14º dia, os ovos foram transferidos para as nascedouras. Entre o 16º e 17º ocorreu à eclosão dos filhotes. Foram identificados os filhotes com seus respectivos ovos para análise dos números de ovos férteis após o acasalamento de 24 horas. Os filhotes foram doados para criadores menores.

G3: Grupo 4 dias (n= 12 fêmeas e 3 machos). As codornas foram mantidas em gaiolas individuais na sequência de quatro fêmeas

para um macho, no total de 3 subgrupos. O macho de cada subgrupo cobria individualmente cada uma das fêmeas por um período de 24 horas e descansava no 5º dia. O ciclo retornava novamente no 6º dia. Cerca de 100 ovos foram coletados, identificados e pesados, armazenados em ambientes fresco e arejado por um período não superior a 7 dias e incubados em chocadeira elétrica. Depois do 14º dia, os ovos foram transferidos para as nascedouras. Entre o 16º e 17º ocorreu à eclosão dos filhotes. Foram identificados os filhotes com seus respectivos ovos para análise dos números de ovos férteis após o acasalamento de 24 horas. Os filhotes foram doados para criadores menores.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar a significância das diferenças encontradas entre as médias das mensurações, foi feita análise descritiva das variáveis por meio da média, mediana, erro padrão, e realizados os testes Wilcoxon (entre GHEs e GIs), McNemar (para o período de fertilidade dos ovos) e exata de Fisher (sobre o período de cobertura), para averiguar se as variações ocorreram ao acaso ou não. Valores com  $P < 0,05$  foram considerados significativos (Sampaio, 1998).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 DESCRIÇÃO ANATÔMICA

O oviduto esquerdo da codorna europeia (*Coturnix coturnix coturnix*) (Fig.1) pesa em média  $13,5 \pm 1,02$  gramas e tem em média  $33,5 \pm 2,00$ cm de comprimento, sendo formado por cinco segmentos craniocaudalmente: infundíbulo, magno, istmo, útero e vagina. Estes segmentos apresentam cor típica rosa escuro, sendo que o útero apresenta maior pigmentação. O infundíbulo tem média 4,0cm de comprimento, o magno 18,5cm, o istmo 4,9 cm, o útero 5,1cm e a vagina 1cm.

O oviduto direito encontrava-se rudimentar em quase todos os exemplares estudados, com exceção de duas fêmeas que o apresentaram desenvolvido, mas não funcional.

### 4.2 GLÂNDULAS HOSPEDEIRAS DE ESPERMATOZOIDES

As GHEs estão localizadas na junção útero-vaginal (Fig. 2A e 2B), formada por  $21 \pm 1,41$  pregas longitudinais altas e delgadas, com pequenas variações de tamanho. Adjacente à junção útero-vaginal estão presentes as pregas altas e largas do útero de cor rosa escuro, vistas em secção transversal, característica da região uterina.

A região da junção útero-vaginal continua-se com a vagina e é um curto segmento que possui pregas irregulares e baixas. A vagina abre-se na região lateroventral do urodeo, segmento intermédio da cloaca.

#### 4.2.1 ESTUDO MICROSCÓPICO

Histologicamente a mucosa das pregas da junção útero-vaginal encontra-se revestida por epitélio pseudoestratificado com células prismáticas, ciliadas e não ciliadas intercaladas, que apresentam núcleo vesiculoso basal e no terço médio com nucléolo evidente, cujas células apresentam grânulos característicos na porção apical (Fig. 2B e 2C). As células basais presentes nesse epitélio são pequenas e arredondadas e permanecem apoiadas na membrana basal.

Na porção proximal das depressões do epitélio são evidenciadas células ciliadas e não ciliadas, que se alternam em direção distal. Na região basal das depressões do epitélio, as células ciliadas estão ausentes, são visíveis apenas células prismáticas com microvilos apicais. As GHEs desembocam nas depressões do epitélio (Fig. 2E).

As GHEs se formam a partir do epitélio das pregas da região da junção útero-vaginal (Fig. 2E) e se estendem de forma ondulada no interior da lâmina própria, com densidade e frequências aleatórias.

As GHEs são estruturas tubulosas simples não ramificadas, rodeadas por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado. O epitélio das GHEs é formado por células prismáticas não ciliadas com núcleo vesiculoso, basal e elíptico, e com nucléolo evidente (Fig. 2C e 2D). A superfície apical apresenta trama terminal, evidenciada através do microscópio óptico. O citoplasma é acidófilo, fracamente corado pela eosina (Fig. 2C e 2D). Nas GHEs são observados dois tipos celulares, células claras e escuras. As células claras são mais frequentes do que as células escuras, mas as células escuras apresentam citoplasma mais acidófilo. Os dois tipos celulares apresentam núcleo basal, vesiculoso, elíptico e vesículas vacuolizadas no terço médio do citoplasma (Fig.2E).

As células das GHEs apresentam reações negativas aos métodos do ácido periódico – reativo de Schiff (PAS), PAS após a digestão pela amilase salivar e o método Alcian Blue em pH 0,5 (Fig.2F) e em pH 2,5. As reações negativas aos métodos histoquímicos demonstram a ausência de mucossustâncias carboxiladas, sulfatadas e glicoproteínas, ricas em ácido siálico.

Na região das pregas da junção útero-vaginal estão presentes em média,  $2598 \pm 454,9$  GHEs distribuídas ao longo de 21 pregas, em média. Algumas pregas apresentaram maior



concentração de GHEs em relação às outras, e dentro de uma mesma prega foram

encontradas regiões com densidade maior de GHEs do que em outra.



FIGURA 1. Fotografia de um casal de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*). À esquerda o macho (seta), com a região peitoral coberta por penas marrons.

As GHEs, durante o período de postura, apresentam diâmetro médio externo de  $38,28 \pm 3,83 \mu\text{m}$ , diâmetro médio interno de  $6,3 \pm 1,66 \mu\text{m}$ , altura média do epitélio de  $15,98 \pm 2,74 \mu\text{m}$  e  $19,29 \pm 3,96$  células por glândulas, em média (Tab. 1). As glândulas apresentam lume amplo, em média  $6,3 \mu\text{m}$ , com muitos espermatozoides armazenados na sua luz tubular. Estes não desenvolvem organização espacial na luz tubular e ficam espalhados ou aglomerados em uma região do lume. Os espermatozoides residentes estão contidos em material de natureza acidófila e apresentam positividade para o PAS. Após dias sucessivos de postura, observaram-se nítidas reduções na quantidade de espermatozoides no lume

glandular e a presença de espermatozoides livres no oviduto.

Os resultados morfométricos realizados um dia após o acasalamento (grupo G10) mostraram que 46% das GHEs apresentaram espermatozoides em seu lume e que essa porcentagem diminuiu gradativamente nos dias posteriores. No grupo G9 (2º dia após o acasalamento) encontramos 44% de GHEs com espermatozoides, no 3º dia (grupo G8) 14% das glândulas continham espermatozoides, no 4º e 5º dia (grupo G7 e G6). No 6º dia (grupo G5) não havia GHEs com espermatozoides em seu lume (Tab.2 e Fig.3).

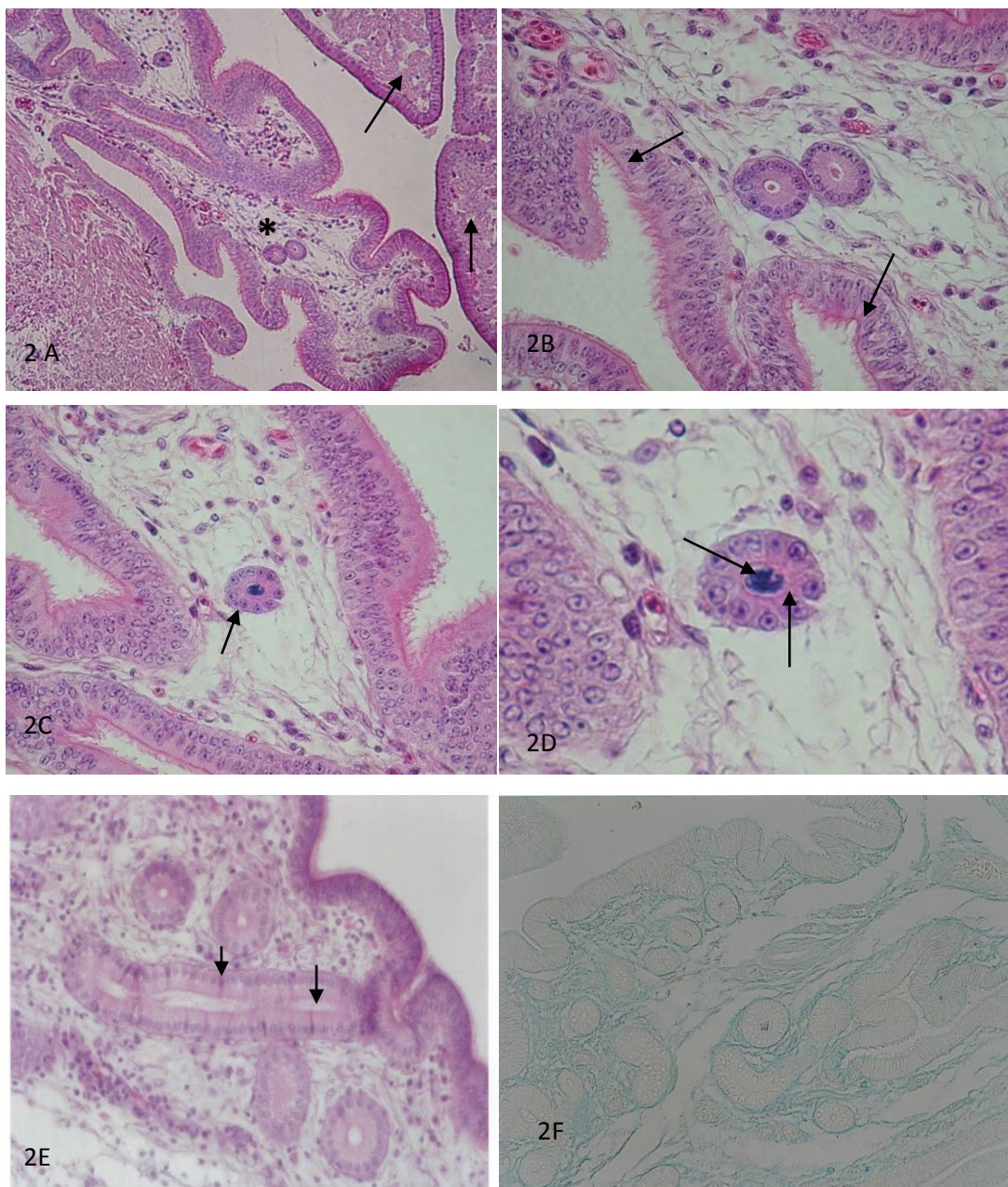


FIGURA 2. Aspectos histológicos e histoquímicos das GHEs da junção útero-vaginal de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*) durante o período de postura. 2A: Aspecto geral das pregas uterinas (setas) e pregas da junção útero-vaginal (asterisco). Observam-se as GHEs em diferentes cortes transversais dispersos na lâmina própria; 2B: prega da junção útero-vaginal com GHEs, evidenciando o epitélio de revestimento pseudoestratificado, formado por células ciliadas e não ciliadas (setas); 2C: prega da junção útero-vaginal, evidenciando GHEs (seta) com espermatozoides no lume; 2D: Detalhe de uma GHEs com espermatozoides (setas). 2E: GHEs em secção longitudinal, evidenciando células escuras (setas) no meio das células claras. As células claras são mais frequentes que as células escuras (setas), estas apresentam citoplasma com acidofilia mais intensa. 2F: fotomicrografia mostrando a negatividade das GHEs ao Alcian blue em pH 0,5. Coloração: HE; 2A: 200X; B, C, E, F(AB, pH 0,5): 400X;D: 800X.

**Tabela 1** - Dados morfométricos das Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides (GHEs) (média e desvio-padrão) de codorna europeia (*Coturnix coturnix coturnix*) em diferentes tempos após o acasalamento de 24 horas.

	De*	Di*	NC	AC*
**G10	38,25 ± 3,52	6,17 ± 1,04	19,34 ± 4,77	16,04 ± 1,64
G9	39,13 ± 2,68	6,19 ± 1,48	20,00 ± 2,95	16,46 ± 1,09
G8	39,05 ± 3,00	5,97 ± 1,36	19,86 ± 2,58	16,53 ± 1,47
G7	38,72 ± 3,95	6,86 ± 1,74	20,77 ± 3,57	15,92 ± 1,57
G6	36,46 ± 4,40	6,04 ± 2,47	19,27 ± 5,94	14,99 ± 2,00
G5	38,57 ± 4,14	6,71 ± 1,7	20,08 ± 4,17	15,93 ± 4,17
G4	38,82 ± 4,04	6,3 ± 1,6	18,91 ± 3,17	16,22 ± 3,17
G3	37,9 ± 4,2	6,42 ± 1,8	18,22 ± 4,27	15,83 ± 4,08
G2	38,21 ± 4,5	6,41 ± 1,7	18,43 ± 4,19	15,93 ± 4,19
G1	37,7 ± 3,94	5,91 ± 1,7	18,04 ± 3,97	15,93 ± 4,07
<b>Média Total</b>	38,28 ± 3,83	6,30 ± 1,66	19,29 ± 3,96	15,98 ± 2,74

\*O diâmetro médio externo (De), diâmetro médio interno (Di) e altura celular (AC) em  $\mu\text{m}$ .

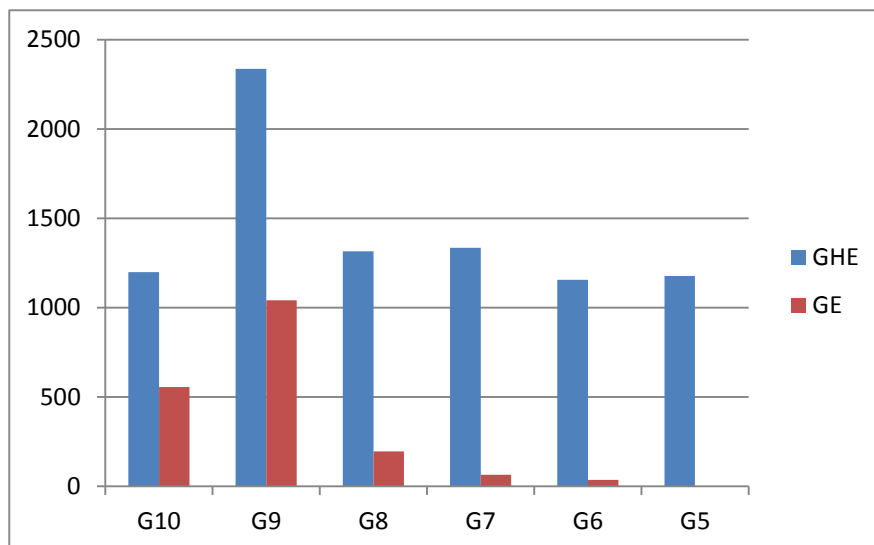
\*\* G1 (n= 6 fêmeas), abatidas no 10º dia (240 horas) após o acasalamento; G2 (n= 6 fêmeas), abatidas no 9º dia (216 horas) após o acasalamento; G3 (n= 6 fêmeas), abatidas no 8º dia (192 horas) após o acasalamento; G4 (n= 6), abatidas no 7º dia (168 horas) após o acasalamento; G5 (n= 6 fêmeas), abatidas no 6º dia (144 horas) após o acasalamento; G6 (n= 6), abatidas no 5º dia (120 horas) após o acasalamento; G7 (n=6), abatidas no 4º dia (96 horas) após o acasalamento; G8 (n=6), abatidas no 3º dia (72 horas) após o acasalamento; G9 (n=6), abatidas no 2º dia (48 horas) após o acasalamento e o G10 (n=6), abatidas no 1º dia (24 horas) após o acasalamento.

**Tabela 2-** Porcentagem de Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides (GHEs) com espermatozoides de codorna europeia (*Coturnix coturnix*) durante o período de postura

	GHEs	GEs*	% de GHEs com espermatozoides
**G10	1200	556	46
G9	2338	1042	44
G8	1316	196	14
G7	1336	66	4
G6	1156	36	3
G5	1178	0	0
G4	1535	0	0
G3	1512	0	0
G2	1514	0	0
G1	1458	0	0

\*GE: GHEs com espermatozoides.

\*\* G1 (n= 6 fêmeas), abatidas no 10º dia (240 horas) após o acasalamento; G2 (n= 6 fêmeas), abatidas no 9º dia (216 horas) após o acasalamento; G3 (n= 6 fêmeas), abatidas no 8º dia (192 horas) após o acasalamento; G4 (n= 6), abatidas no 7º dia (168 horas) após o acasalamento; G5 (n= 6 fêmeas), abatidas no 6º dia (144 horas) após o acasalamento; G6 (n= 6), abatidas no 5º dia (120 horas) após o acasalamento; G7 (n=6), abatidas no 4º dia (96 horas) após o acasalamento; G8 (n=6), abatidas no 3º dia (72 horas) após o acasalamento; G9 (n=6), abatidas no 2º dia (48 horas) após o acasalamento e o G10 (n=6), abatidas no 1º dia (24 horas) após o acasalamento.



**Figura 3** - Número de glândulas hospedeiras de espermatozoides (GHEs) e Glândulas com espermatozoides (GEs) ao longo de 3 pregas da junção útero-vaginal do oviduto de codorna europeia *Coturnix coturnix coturnix*\*, durante o período de postura

\*G5 (n= 6 fêmeas), abatidas no 6º dia (144 horas) após o acasalamento; G6 (n= 6), abatidas no 5º dia (120 horas) após o acasalamento; G7 (n=6), abatidas no 4º dia (96 horas) após o acasalamento; G8 (n=6), abatidas no 3º dia (72 horas) após o acasalamento; G9 (n=6), abatidas no 2º dia (48 horas) após o acasalamento e o G10 (n=6), abatidas no 1º dia (24 horas) após o acasalamento.

O estudo morfométrico do grupo G11 com acasalamento de 2 subgrupos por 24 horas em gaiolas individuais (um macho com 3 fêmeas) mostrou que a porcentagem de GHEs com espermatozoides variaram entre as três fêmeas dos dois subgrupos. A 1ª

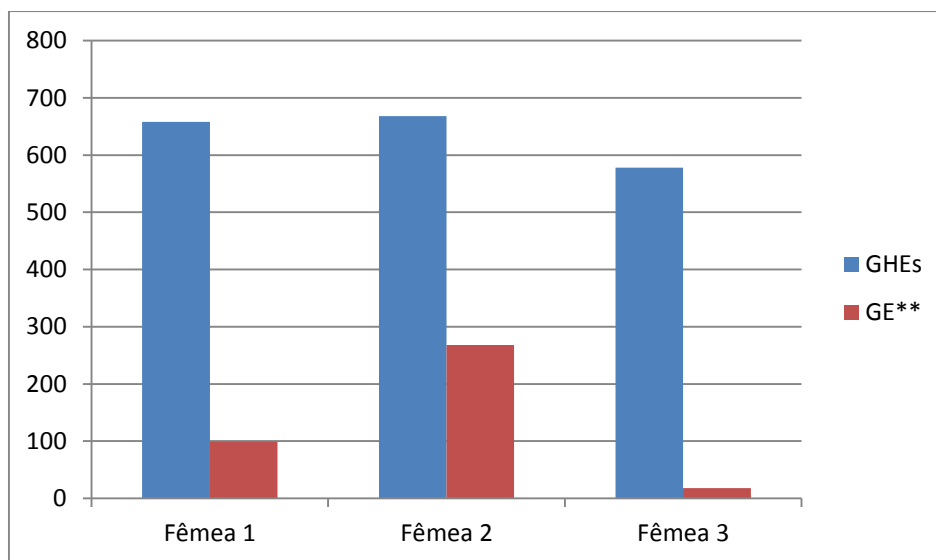
fêmea de cada subgrupo continha 15% de suas glândulas com espermatozoides, a 2ª e a 3ª fêmea de cada subgrupo continham respectivamente 40% e 3% de suas glândulas com espermatozoides (Tab.3 e Fig.4).



**Tabela 3-** Porcentagem de Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides (GHEs) com espermatozoides (GEs) de codorna europeia (*Coturnix coturnix coturnix*) durante o período de postura do grupo G11\*

	GHEs	GEs**	% de GHEs com espermatozoides
<b>Fêmea 1</b>	658	99	15
<b>Fêmea 2</b>	668	268	40
<b>Fêmea 3</b>	578	18	3

\*G11: Acasalamento por 24 horas de 2 subgrupos em gaiolas individuais (um macho com 3 fêmeas). Após este período os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. No 2º dia (48 horas) após o acasalamento foi realizado o abate das fêmeas. \*\*GEs: GHEs com espermatozoides.



**Figura 4** - Número de glândulas hospedeiras de espermatozoides (GHEs) e glândulas com espermatozoides (GEs) ao longo de 3 pregas da junção útero-vaginal do oviduto de codorna europeia *Coturnix coturnix coturnix*, durante o período de postura do grupo G11\*.

\*G11: Acasalamento por 24 horas de 2 subgrupos em gaiolas individuais (um macho com 3 fêmeas). Após este período os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. No 2º dia (48 horas) após o acasalamento foi realizado o abate das fêmeas. \*\*GE : GHEs com espermatozoides.

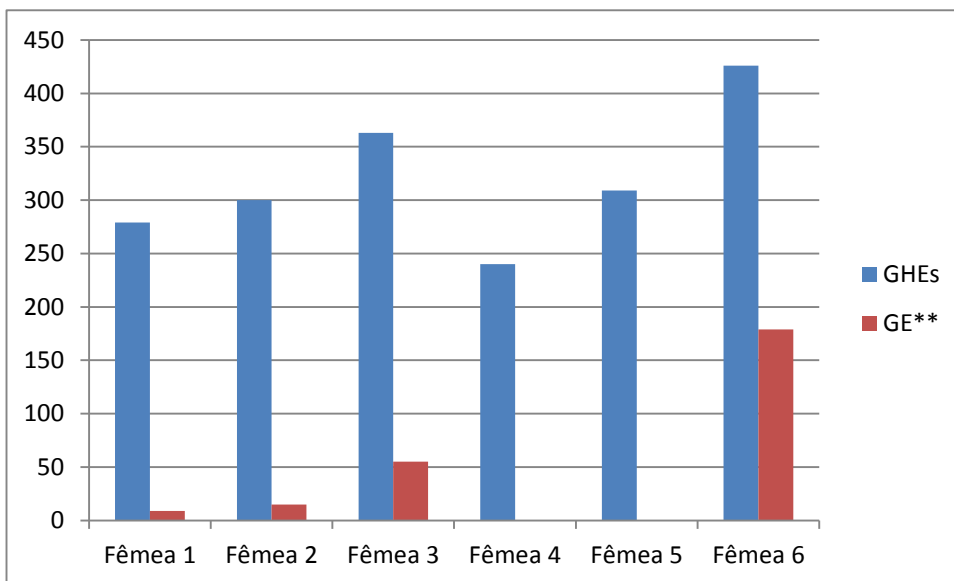
No grupo G12: Acasalamento por 24 horas em gaiolas individuais (um macho com 6 fêmeas) apenas 3 fêmeas continham espermatozoides no lume das GHEs, sendo que a 2ª fêmea continha 5% destas glândulas com espermatozoides, a 1ª, 3ª e 6ª fêmea

continham 3%, 15% e 42% de suas glândulas com espermatozoides (Tab.4 e Fig.5). As 4ª e 5ª fêmeas não continham espermatozoides em seu lume e provavelmente não foram cobertas pelo macho.

**Tabela 4-** Porcentagem de Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides (GHEs) com espermatozoides (GE) do grupo G12\* de codorna europeia, *Coturnix coturnix coturnix*, durante o período de postura

	GHEs	GE**	% de GHEs com espermatozoides
Fêmea 1	279	9	3
Fêmea 2	300	15	5
Fêmea 3	363	55	15
Fêmea 4	240	0	0
Fêmea 5	309	0	0
Fêmea 6	426	179	42

\*G12: Acasalamento por 24 horas em gaiolas individuais (um macho com 6 fêmeas). Após este período os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. No 2º dia (48 horas) após o acasalamento foi realizado o abate das fêmeas. \*\*GE: GHEs com espermatozoides



**Figura 5** - Número de glândulas hospedeiras de espermatozoides (GHEs) e glândulas com espermatozoides (GEs) ao longo de 3 pregas da junção útero-vaginal do oviduto de codorna européia *Coturnix coturnix coturnix*, durante o período de postura do grupo G12\*.

\*G12: Acasalamento por 24 horas em gaiolas individuais (um macho com 6 fêmeas). Após este período os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. No 2º dia (48 horas) após o acasalamento foi realizado o abate das fêmeas. \*\*GE: GHEs com espermatozoides.

### 4.3 GLÂNDULAS INFUNDIBULARES (GIs)

As GIs estão localizadas no infundíbulo distal. Esta região é formada por  $17 \pm 1,21$  pregas altas e largas, próximas umas das outras e dispostas em sentido longitudinal ou ligeiramente oblíquo. Adjacente ao infundíbulo distal está o magno, segmento mais longo e convoluto do oviduto, que não apresenta nenhuma mudança macroscópica

que mostre o nível da transição entre estes dois segmentos.

Macroscopicamente, o infundíbulo distal é um segmento espesso, esbranquiçado e opaco, compreendendo o terço inferior do infundíbulo, que se estende até a junção infundíbulo-magno.



### 4.3.1 ESTUDO HISTOLÓGICO

As pregas altas e largas da mucosa do infundíbulo distal são revestidas por epitélio de revestimento pseudoestratificado prismático, com células ciliadas e não ciliadas intercaladas. As células não ciliadas apresentam núcleo de forma, localização e intensidade de colorações variáveis, com acúmulo de secreções em seu citoplasma, deslocando o núcleo. As células ciliadas apresentam citoplasma volumoso e ligeiramente acidófilo. O núcleo das células ciliadas é esférico ou oval, de aspecto vesiculoso e geralmente com um ou dois nucléolos evidentes. A localização deste núcleo varia de basal a central.

As GIs se formam a partir do epitélio das pregas da mucosa do infundíbulo distal (Fig. 6A e 6B). Na região basal das depressões do epitélio, as células ciliadas estão ausentes, são visíveis apenas células prismáticas com microvilos apicais. As GIs desembocam diretamente entre as células do epitélio de revestimento pseudoestratificado prismático, com células ciliadas e não ciliadas intercaladas, sem formação de ducto.

As GIs são estruturas tubulosas simples e não ramificadas, rodeadas por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado. Estas inicialmente são esparsas, depois

formam pequenos grupos e finalmente distribuem-se de forma aleatória na lâmina própria, até preencherem toda a extensão da prega da mucosa. Elas são formadas por células prismáticas não ciliadas, com núcleo vesiculoso basal, elíptico, com nucléolo evidente (Fig. 6A e 6B). A superfície apical apresenta trama terminal, evidenciada através do microscópio óptico. O citoplasma é acidófilo, fracamente corado pela eosina (Fig. 6A e 6B). Nas GIs são observadas apenas células claras. As células glandulares apresentam núcleo basal vesiculoso, elíptico e vesículas vacuolizadas no terço médio do citoplasma.

As células das GIs apresentam reações negativas aos métodos do ácido periódico – reativo de Schiff (PAS), PAS após a digestão pela amilase salivar e o método Alcian Blue em pH 0,5 e em pH 2,5. As reações negativas aos métodos histoquímicos demonstram a ausência de mucossustâncias carboxiladas, sulfatadas e glicoproteínas ricas em ácido siálico.

No infundíbulo distal encontram-se pregas com grande concentração de GIs (média 18 glândulas) em relação às outras (média 5 glândulas), e pregas sem glândulas. Dentro de uma prega foram encontradas regiões

com densidade maior de GIs do que em outra.

As GIs, durante o período de postura, apresentam diâmetro médio externo de  $16,40 \pm 1,58 \mu\text{m}$ , diâmetro médio interno de  $5,85 \pm 1,23 \mu\text{m}$ , altura média do epitélio de  $5,37 \pm 0,68 \mu\text{m}$  e  $10,47 \pm 1,33$  células por glândulas, em média (Tab. 5). As glândulas apresentam lume pequeno, mas de fácil visualização, em média  $5,85 \mu\text{m}$ , com poucos espermatozoides armazenados na sua luz, em média 2 espermatozoides em cada lume. Estes apresentam organização espacial na luz tubular, ficando com a cabeça voltada para o ápice das células glandulares, tocando a trama terminal e a cauda voltada para o epitélio de revestimento da prega. Estes se dispõem paralelamente (Fig.7A e 7B).

O número de GIs com espermatozoides aumentou gradativamente a partir do 2º dia (9,7% de GIs com espermatozoides) até o 5º dia, quando a porcentagem de GIs com espermatozoides atinge 20,1%. A partir do 6º dia observa-se que a porcentagem de glândulas com espermatozoides diminui até o 10º dia. (Tab.6 e Fig.8).

O teste Wilcoxon mostrou que existem diferenças significativas entre as GHEs e as GIs, no que tange às quatro mensurações estudadas, diâmetro externo e interno, altura celular e número de células. As GHEs da

junção útero-vaginal são maiores que as GIs do infundíbulo distal ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4 ESTUDO DA FERTILIDADE DOS OVOS**

Os ovos das fêmeas da codorna europeia pesam, em média,  $13,5 \pm 1,1 \text{g}$ , com padrão de deposição de pigmentação na casca semelhante entre os membros do mesmo grupo familiar.

Em média, os 10 primeiros ovos (Fig. 9 e Tab.7) das fêmeas dos três grupos (G1, G2 e G3) ( $n=10$ ) após o acasalamento de 24 horas, apresentaram fertilidade com eclosão dos filhotes em torno de 17 dias. A taxa média de embriões que morreram durante o período de desenvolvimento foi de 20% e eles eram provenientes dos 7º e 10º ovos postos pelas fêmeas após o período de cobertura.

O teste McNemar mostrou que existe diferença significativa na fertilidade dos ovos, quando se compara o bloco A (ovos coletados entre 3º e 5º dias após o acasalamento) com o bloco B (superior a 5º dia). Após o 5º dia ocorreu diminuição gradativa da fertilidade.

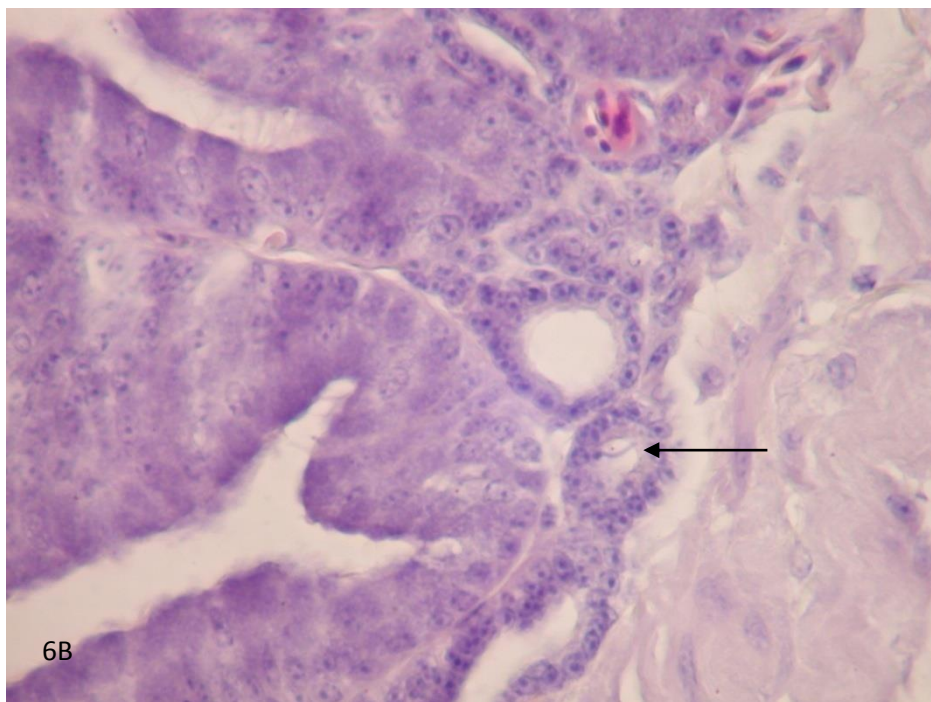
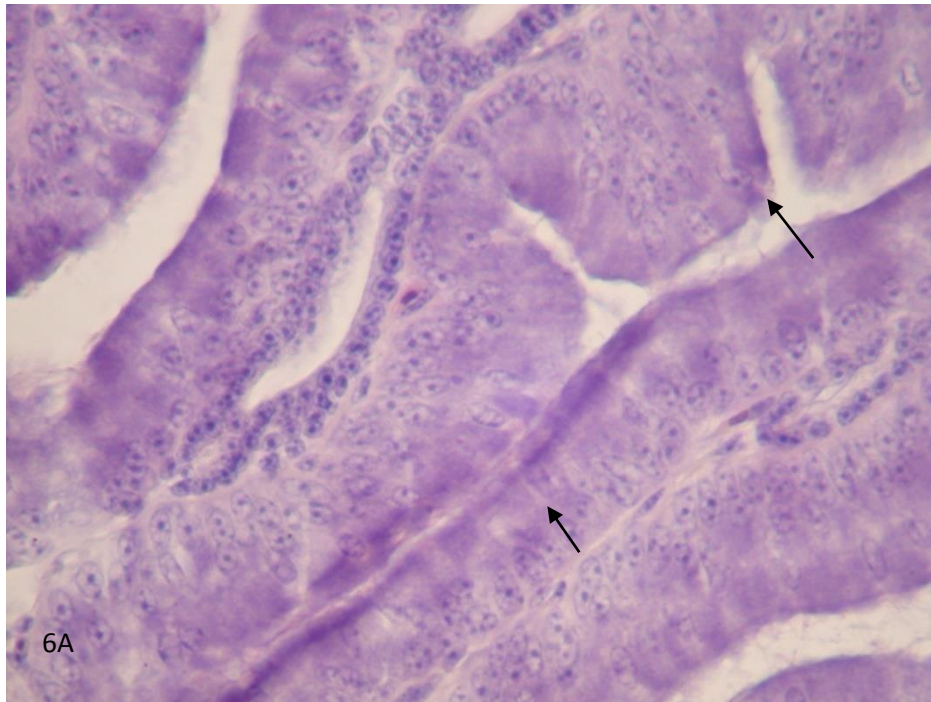


FIGURA 6. Aspectos morfológicos das GIs na região do infundíbulo distal de codornas européias *Coturnix coturnix coturnix*, durante o período de postura. A: Aspecto geral de 2 pregas infundibulares com GIs, evidenciando o epitélio de revestimento pseudoestratificado prismático da prega, formado por células ciliadas e não ciliadas (setas); B: Detalhe da base de uma prega infundibular com GIs contendo espermatozóide (seta) no lume, após 48 horas do início do acasalamento. Coloração: HE; A: 400X; B: 800X.

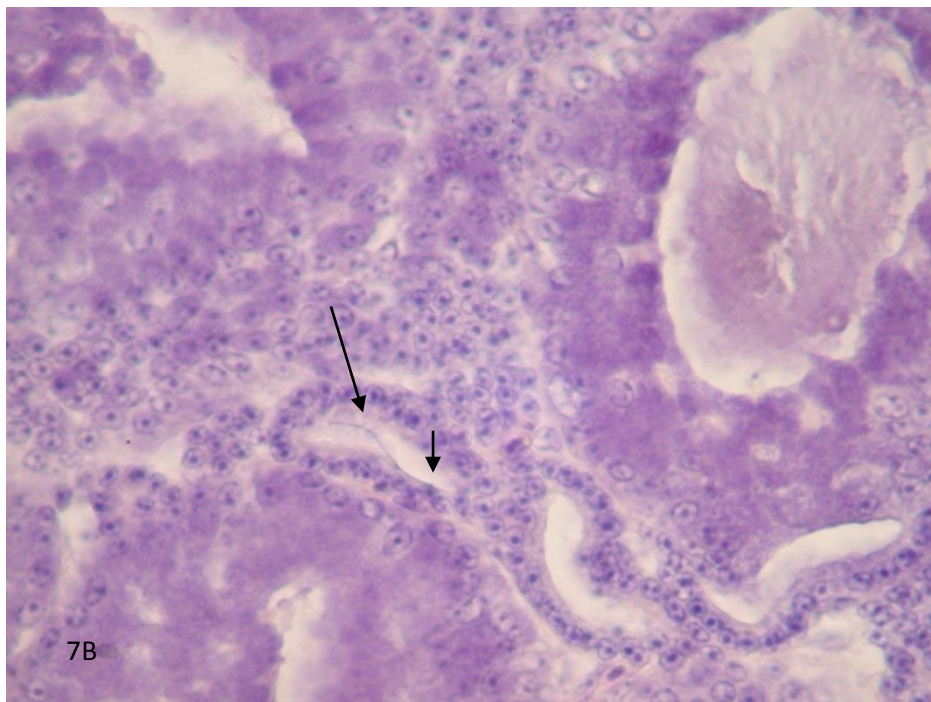
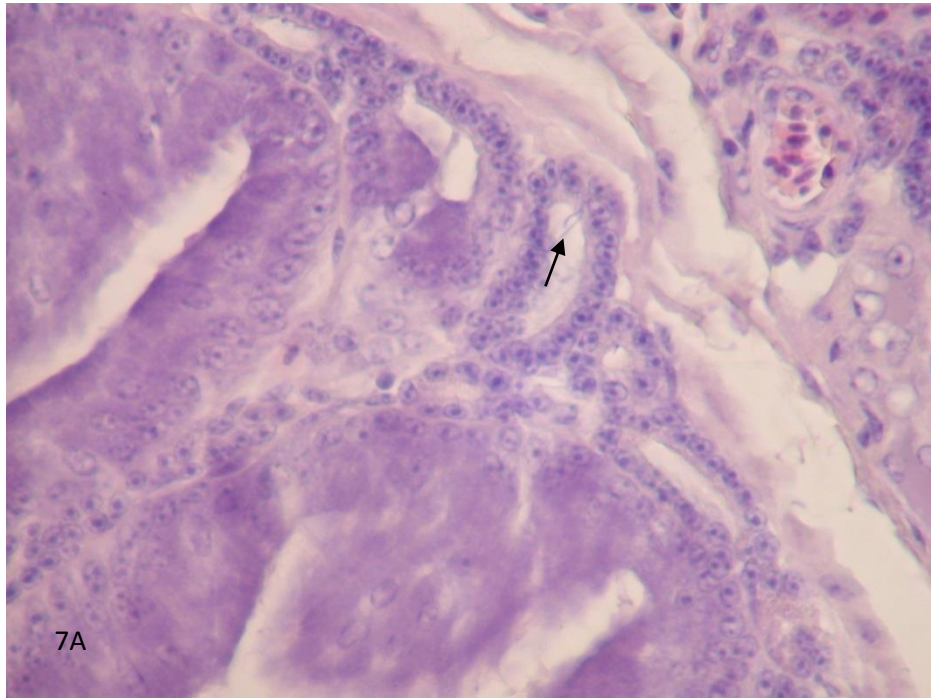


FIGURA 7. Aspectos histológicos das GIs na região do infundíbulo distal de codornas européias (*Coturnix coturnix coturnix*) durante o período de postura. A: Glândula infundibular (GI) formada por células prismáticas claras, com núcleo vesiculoso e nucléolo evidente. Dois espermatozóides no lume (seta), em paralelo, após 96 horas do início do acasalamento. B: Detalhe de uma GI com espermatozóides (setas) em seu lume, após 120 horas do início do acasalamento. Coloração: HE; A e B: 800X.

**Tabela 5** - Dados morfométricos das Glândulas Infundibulares (GIs) (média e desvio-padrão) de codorna europeia *Coturnix coturnix coturnix*, durante o período de postura

	De*	Di*	NC*	AC*
**G1	16,3±1,71	5,6±1,07	10,6±1,31	5,3±0,78
G2	15,6±1,29	5,4±1,03	9,1±1,01	5±0,86
G3	16,52±1,81	6,31±1,5	11,57±1,56	5,89±0,88
G4	15,87±1,23	5,62±1,26	9,25±1,21	5,66±0,95
G5	15,57±1,33	5,42±1,16	9,10±1,11	5,06±0,65
G6	18,65±1,54	6,75±1,07	11,94±1,56	5,69±0,70
G7	16,32±1,61	6,01±1,2	11,27±1,66	5,14±0,68
G8	16,77±1,71	6,2±1,34	11,48±1,66	5,31±0,8
G9	16,3±1,75	5,54±1,26	10,54±1,45	5,42±0,79
G10	16,14±1,83	5,65±1,45	9,89 ± 1,73	5,24±0,64
<b>Média Total</b>	16,40±1,58	5,85±1,23	10,47±1,33	5,37±0,68

\*O diâmetro médio externo (De), diâmetro médio interno (Di), número de células (NC) e altura celular (AC) em  $\mu\text{m}$ .

\*\*G1 (n= 6 fêmeas), abatidas no 10º dia (240 horas) após o acasalamento; G2 (n= 6 fêmeas), abatidas no 9º dia (216 horas) após o acasalamento; G3 (n= 6 fêmeas), abatidas no 8º dia (192 horas) após o acasalamento; G4 (n= 6), abatidas no 7º dia (168 horas) após o acasalamento; G5 (n=6), abatidas no 6º dia (144 horas) após o acasalamento; G6 (n=6), abatidas no 5º dia (120 horas) após o acasalamento; G7 (n=6), abatidas no 4º dia (96 horas) após o acasalamento; G8 (n=6), abatidas no 3º dia (72 horas) após o acasalamento; G9 (n=6), abatidas no 2º dia (48 horas) após o acasalamento G10 (n=6), abatidas no 1º dia (24 horas) após o acasalamento.

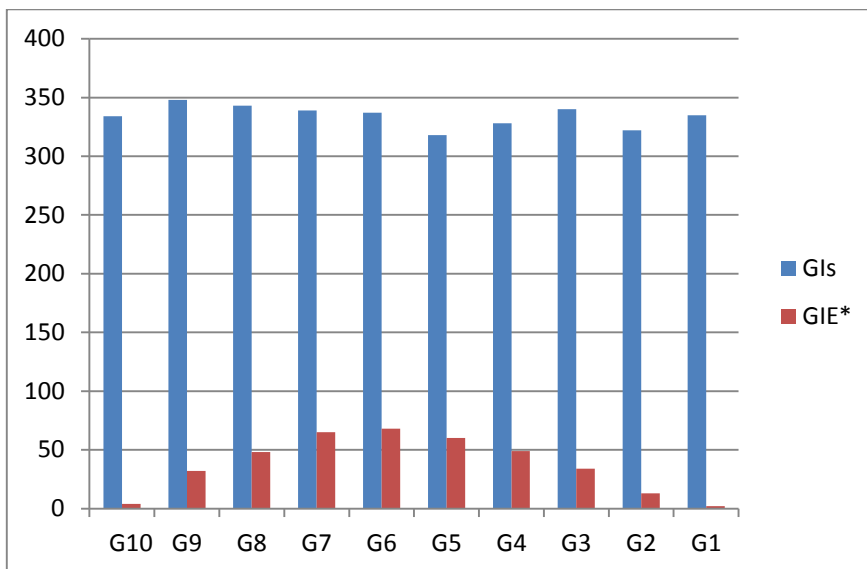
**Tabela 6** - Porcentagem de Glândulas Infundibulares (GIs) com espermatozoides de codorna europeia *Coturnix coturnix coturnix*, durante o período de postura

	GIs	GIE*	% de GIs com espermatozoides
**G10	334	4	1,1
G9	348	32	9,7
G8	343	48	14,2
G7	339	65	19
G6	337	68	20,1
G5	318	60	19
G4	328	49	15
G3	340	34	10
G2	322	13	4
G1	335	2	0,5

\*GIE: GIs com espermatozoides.

\*\* G1 (n= 6 fêmeas), abatidas no 10º dia (240 horas) após o acasalamento; G2 (n= 6 fêmeas), abatidas no 9º dia (216 horas) após o acasalamento G3 (n= 6 fêmeas), abatidas no 8º dia (192 horas) após o acasalamento; G4 (n= 6), abatidas no 7º dia (168 horas) após o acasalamento; G5 (n= 6 fêmeas), abatidas no 6º dia (144 horas) após o acasalamento; G6 (n= 6), abatidas no 5º dia (120 horas) após o acasalamento; G7 (n=6), abatidas no 4º dia (96 horas) após o acasalamento; G8 (n=6), abatidas no 3º dia (72 horas) após o acasalamento; G9 (n=6), abatidas no 2º dia (48 horas) após o acasalamento e o G10 (n=6), abatidas no 1º dia (24 horas) após o acasalamento.





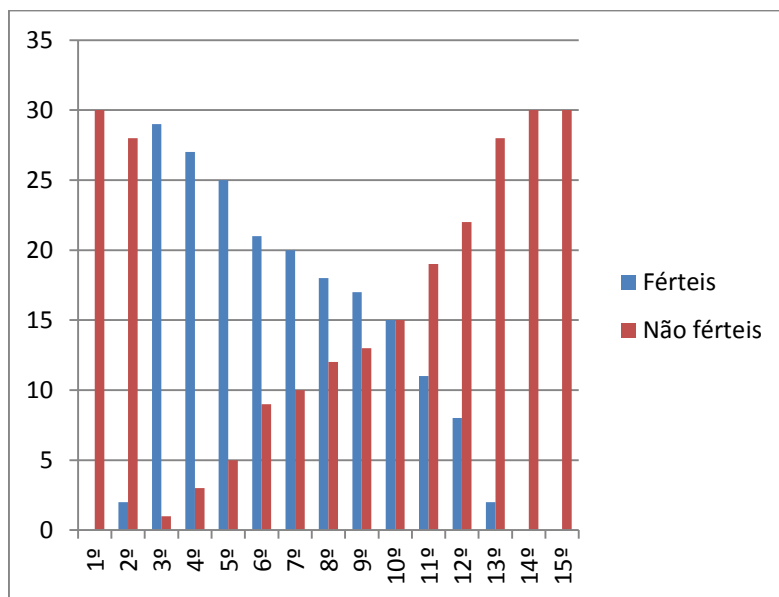
**Figura 8** - Número de Glândulas Infundibulares (GIs) e Glândulas Infundibulares com Espermatozóides (GIE) ao longo de 3 pregas do infundíbulo distal do oviduto de codorna europeia *Coturnix coturnix*\*, durante o período de postura.

G1 (n= 6 fêmeas), abatidas no 10º dia (240 horas) após o acasalamento G2 (n= 6 fêmeas), abatidas no 9º dia (216 horas) após o acasalamento G3 (n= 6 fêmeas); G3 (n= 6 fêmeas), abatidas no 8º dia (192 horas) após o acasalamento; G4 (n= 6), abatidas no 7º dia (168 horas) após o acasalamento; G5 (n= 6 fêmeas), abatidas no 6º dia (144 horas) após o acasalamento; G6 (n= 6), abatidas no 5º dia (120 horas) após o acasalamento; G7 (n=6), abatidas no 4º dia (96 horas) após o acasalamento; G8 (n=6), abatidas no 3º dia (72 horas) após o acasalamento; G9 (n=6), abatidas no 2º dia (48 horas) após o acasalamento e o G10 (n=6), abatidas no 1º dia (24 horas) após o acasalamento.

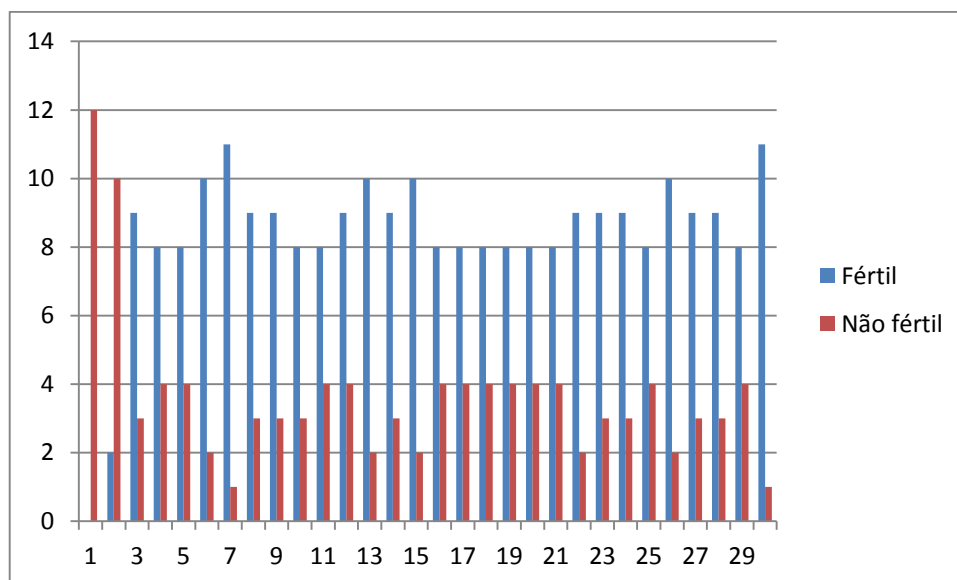
#### 4.5 ESTUDO DA COBERTURA EM CODORNAS

O Gupo G1 (6 machos e 12 fêmeas, acasaladas em intervalos de 2 dias) não teve ovos férteis nas primeiras 48 horas, resultado esperado, pois a fecundação ocorre após a maturação e capacitação dos espermatozoides no oviduto e sua ascensão até as GIs. Após 72 horas, todas as fêmeas já haviam sido cobertas e ovos férteis começaram a aparecer, tempo necessário

para capacitação espermática e fecundação dos ovos (Fig. 10 e 11). As oscilações de fertilidade observadas podem ter ocorrido em razão das condições naturais, o que necessita ser ainda melhor estudado. Pode significar falha técnica temporária em uma das incubadoras; problema de adaptação e comportamento de alguns animais e “Timing” entre movimentos peristálticos do oviduto e a presença do ovo em trânsito, dificultando a fertilização.



**Figura 9** - Número de ovos férteis e não férteis, por dia de postura de 30 fêmeas adultas *Coturnix coturnix coturnix*



**Figura 10**- Taxa de fertilização, por dia de postura, nas codornas européias (*Coturnix coturnix coturni*) do Grupo G1\*.

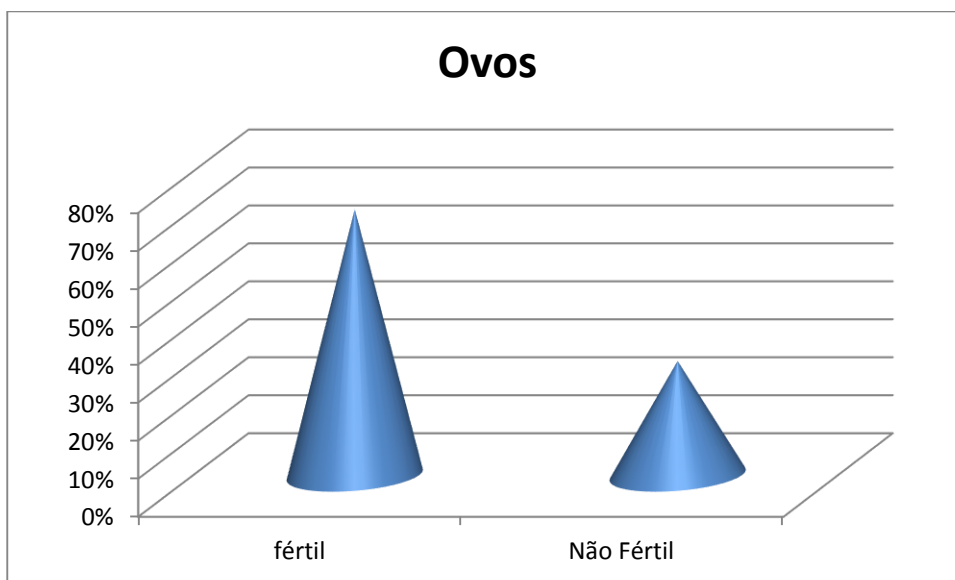
\*G1: Formado por 6 subgrupos; cada subgrupo era formado por 1 macho e 2 fêmeas. O macho de cada subgrupo cobria individualmente cada uma das fêmeas por um período de 24 horas. No 3º dia, os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. O ciclo de acasalamentos inicia novamente no 4º dia.



**Tabela 7-** Verificação da fertilidade dos ovos postos pela codorna europeia (*Coturnix coturnix coturnix*) após o período de acasalamento de 24 horas

Ovos	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	
<b>Animal</b>																
1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	
2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	
3	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	
4	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	
5	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	
6	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	
7	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	
8	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	
9	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	
10	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2	
11	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2	
12	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	
13	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	
14	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2	2	
15	2	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	
16	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	
17	2	2	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	
18	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	
19	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	
20	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	
21	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	
22	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	
23	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	
24	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	
25	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	
26	2	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	2	2	2	
27	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	
28	2	2	2	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	
29	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	
30	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	
	1 ovos férteis							2 ovos não férteis								
%*	0	6,7	96,6	90	83,3	70	66,7	60	56,7	50	36,7	26,7	6,7	0	0	

\* porcentagem de ovos férteis por dia

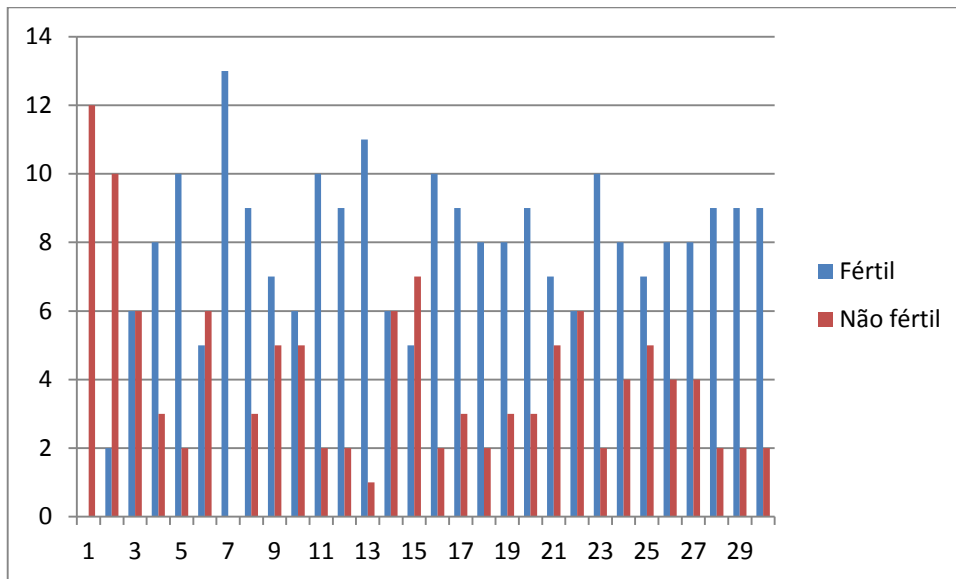


**Figura 11**-Taxa de fertilização total nas codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*) do Grupo G1\*.

\*G1: Formado por 6 subgrupos; cada subgrupo era formado por 1 macho e 2 fêmeas. O macho de cada subgrupo cobria individualmente cada uma das fêmeas por um período de 24 horas. No 3º dia, os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. O ciclo de acasalamentos inicia-se novamente no 4º dia.

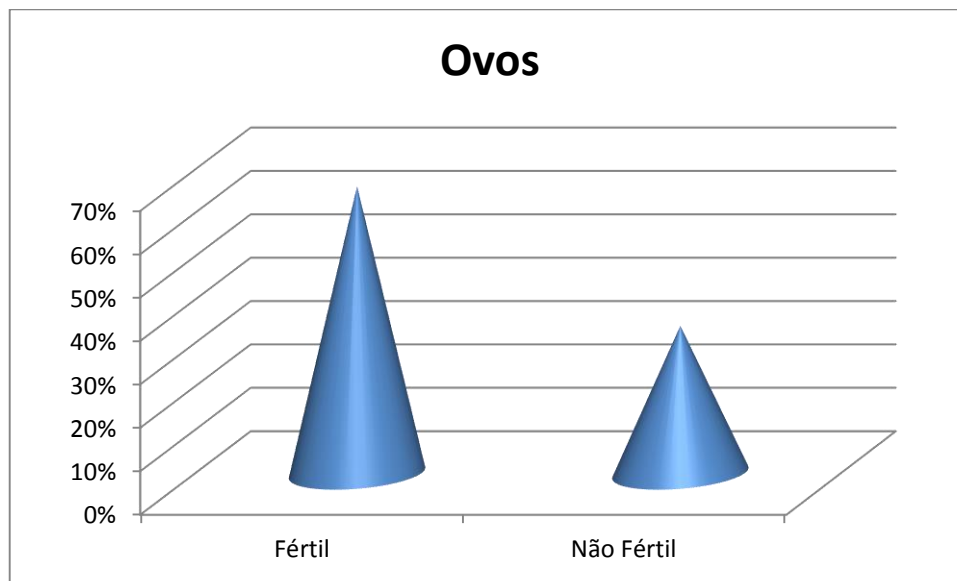
No grupo G2 (4 machos e 12 fêmeas, acasaladas em intervalos de 3 dias) não houve ovos férteis nas primeiras 48 horas, já que a fecundação só ocorre após maturação e capacitação dos espermatozoides no trato genital feminino e ascensão dos espermatozoides até as GIs (Fig.12 e 13); no entanto, a partir do terceiro dia ocorreu o

aumento progressivo do número de ovos férteis. Após 96 horas, todas as fêmeas já haviam sido cobertas e tido tempo para capacitação espermática no seu trato genital. As oscilações de fertilidade neste grupo podem ter ocorrido em decorrência das mesmas razões apresentadas para o Grupo 1.



**Figura 12-** Taxa de fertilização, por dia de postura, nas codornas europeias, (*Coturnix coturnix coturnix*) do Grupo G2\*.

\*G2: Formado por 4 subgrupos; cada subgrupo era formado por 1 macho e 3 fêmeas. O macho de cada subgrupo cobria individualmente cada uma das fêmeas por um período de 24 horas. No 4º dia, os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. O ciclo de acasalamentos inicia-se novamente no 5º dia.

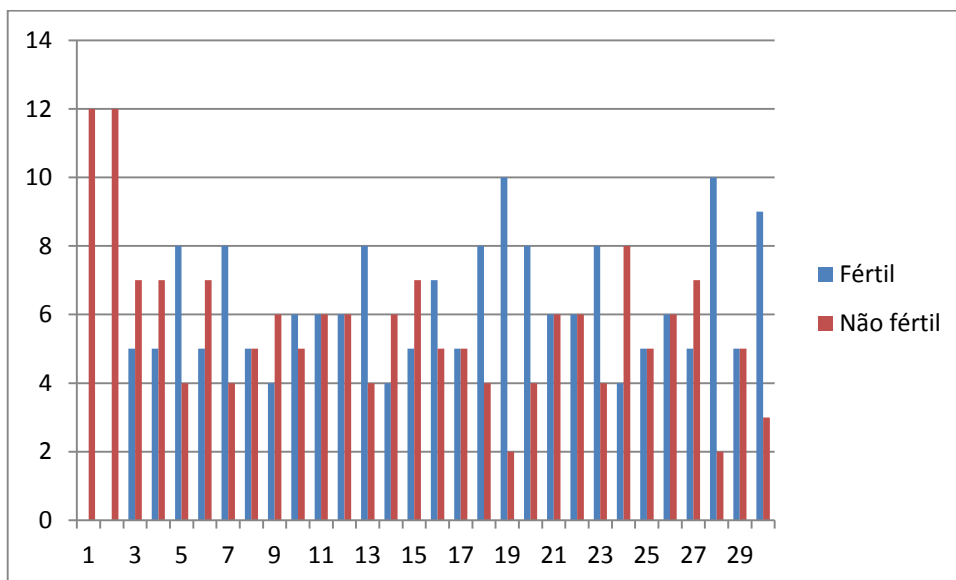


**Figura 13-** Taxa de fertilização total nas codornas europeias (*Coturnix coturnix coturni*) do grupo G2\*.

\*G2: Formado por 4 subgrupos; cada subgrupo era formado por 1 macho e 3 fêmeas. O macho de cada subgrupo cobria individualmente cada uma das fêmeas por um período de 24 horas. No 4º dia, os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. O ciclo de acasalamentos inicia-se novamente no 5º dia.

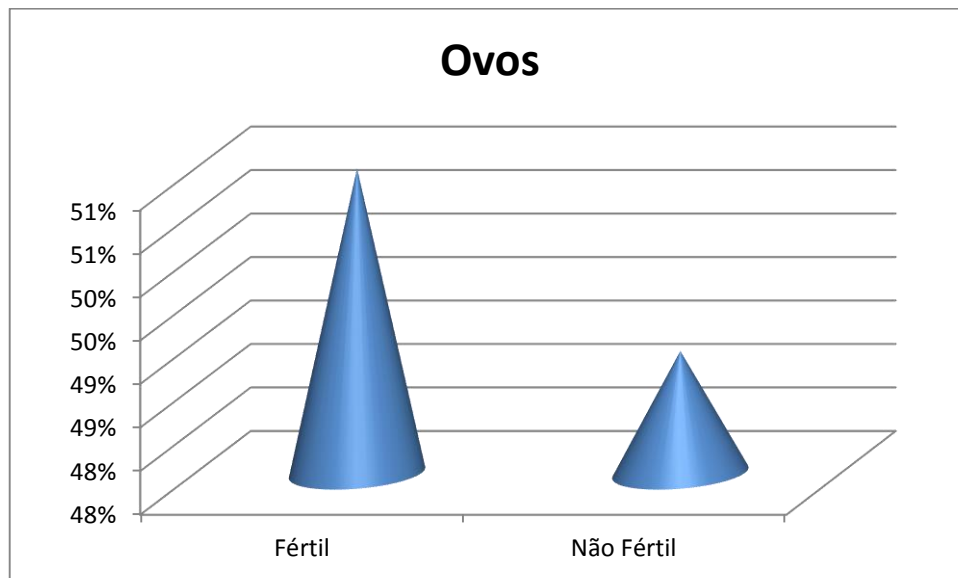
No grupo G3 (3 machos e 12 fêmeas, acasaladas em intervalos de 4 dias) não houve ovos férteis nas primeiras 48 horas, já que a fecundação só ocorre após maturação e capacitação dos espermatozoides no trato genital feminino e ascensão dos espermatozoides até as GIs (Fig.14 e 15); no entanto, a partir do terceiro dia ocorreu

aumento progressivo do número de ovos férteis. Após 120 horas, todas as fêmeas já haviam sido cobertas e tido tempo de capacitação espermática em seu trato genital. As oscilações de fertilidade podem ter ocorrido em decorrência das mesmas razões apresentadas para o Grupo 1.



**Figura 14-** Taxa de fertilização, por dia de postura, nas codornas européias (*Coturnix coturnix coturnix*) do Grupo G3\*.

\*G3: Formado por 3 subgrupos; cada subgrupo era formado por 1 macho e 4 fêmeas. O macho de cada subgrupo cobria individualmente cada uma das fêmeas por um período de 24 horas. No 5º dia, os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. O ciclo de acasalamentos inicia-se novamente no 6º dia.



**Figura 15-** Taxa de fertilização total nas codornas europeias (*Coturnix coturnix coturni*) do grupo G3\*.

\*G3: Formado por 3 subgrupos; cada subgrupo era formado por 1 macho e 4 fêmeas. O macho de cada subgrupo cobria individualmente cada uma das fêmeas por um período de 24 horas. No 5º dia, os machos foram retirados do contato com as fêmeas e colocados em descanso. O ciclo de acasalamentos inicia-se novamente no 6º dia.

O Teste exato de Fisher mostrou que não existe diferença significativa entre os grupos estudados G1 (1M:2F) e G2 (1M:3F). Os cálculos foram feitos dentro do limite de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). O melhor intervalo de cobertura para *Coturnix*

*coturnix coturnix* foi de 3 dias, comparado ao intervalo utilizado no grupo G2. Neste intervalo utilizou-se número menor de machos e houve menor número de fêmeas com traumatismo craniano, em decorrência da cópula.

## 5. DISCUSSÃO

Na codorna europeia (*Coturnix coturnix coturnix*), aves (em geral), tartaruga, cobra e lagartos, os espermatozoides apresentam prolongada sobrevivência no oviduto, após a cópula ou inseminação artificial (Birkead & Moller, 1992; Mello, 2000). Isso se deve à presença das GHEs e das GIs. As GHEs estão localizadas principalmente nas pregas longitudinais da transição útero-vaginal e as GIs, no infundíbulo distal do oviduto (Bakst, 1998; Bezuidenhout et al., 1995; Rodrigues, 1996; Mello, 2000). Segundo Bakst (1998), essas glândulas conservam os espermatozoides para fecundar os ovos de sucessivas ovulações.

Após cópula natural ou inseminação artificial, os espermatozoides depositados na cloaca, ascendem pelo oviduto até a junção útero-vaginal. Neste local os espermatozoides permanecem armazenados por mais de 60 dias, dependendo da espécie, do estado reprodutivo e da idade da fêmea. Estudos realizados por Verma e Chermis (1965) na fêmea do peru, *Meleagris gallopavo*, mostraram que os espermatozoides podem permanecer cerca de 59 dias nas GHEs. Na galinha doméstica, os espermatozoides permanecem férteis no interior do oviduto por um período de 10 a 21 dias (Gilbert et al., 1968) ou 27 dias após a inseminação artificial (Fujji & Tamura,

1963). De acordo com Lake (1975), os ovos férteis são detectáveis por várias semanas após inseminação artificial em fêmeas de gansos, perus, patos, codornas, faisões, pombos e galinhas-d'angola. Neste trabalho, observou-se que a porcentagem de GHEs com espermatozoides foi alta no 1º dia após cópula natural, e esta porcentagem diminui gradativamente até o 5º dia (44% no 2º dia, 14% no 3º dia, 4% no 4º dia, 3% no 5º dia) e a partir do 6º dia já não se encontram glândulas com espermatozoides. As GHEs não apresentaram modificações durante este período, apenas ocorreram diminuições gradativas do número de espermatozoides que estavam armazenados, indicando que estes são liberados durante o ciclo diário de postura, observações às descritas por Schuppin et al. (1983) e Miranda et al. (2009) em peru.

As GHEs da codorna europeia são estruturas tubulares simples e não ramificadas, derivadas das invaginações do epitélio da região útero-vaginal. O epitélio das GHEs é formado por células prismáticas, não ciliadas, com núcleo oval, vesiculoso, elíptico, com nucléolo evidente. O citoplasma das células é acidófilo, sendo que a superfície apical apresenta trama terminal e projeções apicais sob a forma de microvilos, formando a borda estriada, vista através do microscópio óptico, descrição semelhante às feitas por Brillard & Bakst

(1990) em peru, Rodrigues (1996) em codorna do campo, Mello (2000) em perdiz e Miranda et al (2009) em peru caipira. Rodrigues (1996) descreve que as células das GHEs de galinha são ciliadas.

A natureza química das secreções celulares das GHEs da codorna europeia não foi confirmada por meio das reações aos métodos do ácido periódico-reativo de Schiff (PAS), PAS após digestão pela amilase salivar e ao método de Alcian Blue em pH 0,5 e 2,5, indicando ausência de mucossustâncias carboxiladas, sulfatadas e glicoproteínas ricas em ácido siálico; o mesmo ocorreu em galinha doméstica (Gilbert, 1979); codorna comum (Rodrigues, 1996); perdiz (Mello, 2000); peru caipira (Miranda et al., 2009). Gilbert et al. (1968) relataram a presença de glicogênio nestas células. A membrana basal das GHEs de perdiz (Mello, 2000) apresenta ligeira positividade para o PAS, o que não foi observado na membrana basal das GHEs de peru (Miranda et al., 2009) e nem da codorna europeia. O epitélio da junção útero-vaginal apresentou reação positiva para o PAS e negativa para o Alcian Blue na codorna europeia, semelhante às descrições feitas por Mello (2000) em perdiz e Miranda et al. (2009) em peru caipira. A codorna comum apresenta reação negativa para o PAS e Alcian Blue nessa região (Rodrigues, 1996).

Apesar dos resultados histoquímicos do presente trabalho e de outros autores (Birkead et al., 1990; King et al., 2002 e Miranda et al., 2009) não demonstrarem que estas estruturas tenham capacidade de secretar substâncias que possam nutrir os espermatozoides, observa-se que os espermatozoides armazenados nas GHEs conservam sua vitalidade e são capazes de fecundar ovos postos pela codorna europeia durante o ciclo diário de ovulações por dez dias após o acasalamento. Não foi utilizado o termo “Tubuli spermatici”, recomendado pela Nomina Anatomica Avium (King, 1993) e adotado por Miranda et al. (2009) em peru, por considerar que as GHEs tenham a capacidade de secretar substâncias que possam nutrir os espermatozoides de uma forma não conhecida (Gilbert et al., 1968).

O estudo histomorfométrico realizado nas GHEs da codorna europeia demonstrou que as glândulas possuem diâmetro médio externo de  $38,28 \pm 3,83 \mu\text{m}$  e diâmetro médio interno de  $6,3 \pm 1,66 \mu\text{m}$ , sendo que em média cada glândula possui  $19,29 \pm 3,96$  células. Nestas glândulas identificam-se dois tipos celulares distintos, células claras e escuras, com altura celular média de  $15,9 \pm 2,74 \mu\text{m}$ . As células claras são mais frequentes do que as células escuras, que apresentam citoplasma mais acidófilo. Esses dois tipos celulares apresentam núcleo basal,



vesiculoso e elíptico, semelhantes às descrições feitas por Rodrigues (1996) em codorna comum, Mello (2000), em perdiz e Miranda et al. (2009), em peru caipira. Nesses mesmos animais observam-se nítidas variações entre estes dois tipos celulares durante o período de postura sazonal. Nesta fase de postura ocorre predominância das células claras e em peru, *Meleagris gallopavo*, as células escuras estão ausentes durante o período de repouso reprodutivo. Nas aves silvestres e domésticas, as GHEs sofrem variações morfológicas significativas entre os períodos de atividade reprodutiva e de repouso. Em perdiz e codorna do campo, as GHEs passam por quatro fases, duas em cada período reprodutivo. No período de repouso reprodutivo, identifica-se a fase de regressão e de repouso, ou seja, ausência das GHEs. Entre essas duas fases, as glândulas entram em apoptose e desaparecem da junção útero-vaginal e, no período de atividade reprodutiva, identifica-se a fase de proliferação e de secreção, período em que ocorrem os acasalamentos e início da nidificação. Estudos histoquímicos realizados por Bakst (1992) demonstraram a presença de canais aquíferos (aquaporinas 2,3 e 9) na membrana plasmática das células das GHEs de peru. Através da presença de células claras e escuras e de canais de aquaporinas nas GHEs pode-se inferir que

estas células são capazes de secretar fluidos para a luz do túbulo e estes líquidos interagem com os espermatozoides dentro das GHEs, fato importante para a sobrevivência dos espermatozoides armazenados no lume dessas glândulas.

Nas GHEs de codorna comum (Friess et al., 1978; Rendem et al., 1981; Rodrigues, 1996), de perdiz (Mello, 2000), de peru (Shuppin et al., 1983; Miranda et al., 2009), de pato (Pal, 1977) e de galinhas domésticas (Fujii, 1963; Gilbert et al., 1968; Tingari & Lake, 1973) são encontradas vesículas lipídicas no citoplasma em posição supranuclear durante o período de postura. Estes relatos são semelhantes aos de Miranda et al. (2009) em fêmea de peru; nas codornas europeias não foram detectadas essas vesículas vacuolizadas que, segundo os autores citados, teriam função nutritora dos espermatozoides durante o período de armazenamento. Há necessidade de estudos posteriores para esclarecer qual a importância dessas vesículas lipídicas, se elas são mesmo secretadas para o lume glandular e se são importantes para a manutenção dos espermatozoides no mesmo.

As GHEs estão dispostas de forma desordenada nas pregas da junção útero-vaginal, achados semelhantes às descrições de Verma & Chermis (1965); Howarth Jr

(1971); Ogasawara & Fuqua (1972); Bakst (1981, 1987, 1989, 1994, 1998); Christensen (1981); Schuppin et al (1983); Brillard & Bakst (1990); King et al. (2002) e Miranda et al. (2009). Observou-se que algumas pregas apresentavam maior concentração de GHEs em relação a outras, e mesmo dentro de uma prega encontram-se regiões com densidade maior de glândulas do que em outra região, descrição à de Miranda et al. (2009), em peru caipira. Birkhead & Moller (1992) relataram que as GHEs da perua industrial *Meleagris gallopavo* tendem a ter maior número de glândulas nas pregas que ficam na região intermediária da junção útero-vaginal, entre o útero e a vagina. Neste trabalho observa-se que tanto as pregas da região intermediária quanto as pregas das regiões ventrolateral e dorsolateral apresentam pregas com glândulas ou não e dentro das pregas com glândulas, regiões com maior densidade do que outras áreas da mesma prega.

As GHEs desembocam diretamente nas criptas do epitélio das pregas útero-vaginais, onde os tipos celulares ciliados e não ciliados, se alternam, não havendo formação de ductos nestas glândulas, dados semelhantemente às descrições de Rodrigues (1996) em codorna comum, Mello (2000), em perdiz e Miranda et al. (2009), em peru caipira. Nas GHEs de

galinha doméstica há formação de ductos, constituídos somente por células ciliadas (Van Krey et al., 1967; Tingari & Lake, 1973). As pregas da região útero-vaginal são revestidas por epitélio pseudoestratificado prismático, formado por células ciliadas e não ciliadas que se alternam, com células basais; semelhantes às das GHEs da galinha doméstica, peru, codorna comum, perdiz e peru caipira (Gilbert et al., 1968; Bakst, 1981, 1987, 1989, 1994, 1998; Rodrigues, 1996, Mello, 2000; Miranda et al., 2009).

Na região da junção útero-vaginal estão presentes, em média,  $21 \pm 1,41$  pregas longitudinais altas e delgadas, com pequenas variações de tamanho. Observa-se que o número de pregas na região útero-vaginal sofre grandes variações entre as espécies estudadas. Goodrich-Smith & Marquez (1978) e Birkhead & Moller (1992) verificaram que as peruas de exploração comercial apresentam de 24 a 25 pregas nesta região do oviduto. Miranda et al. (2009) estudaram a mesma espécie, mas esta era de linhagem caipira (não industrial) e encontraram em média  $38 \pm 1,4$ . Segundo Miranda et al. (2009), as linhagens estudadas pelos autores Goodrich-Smith & Marquez (1978) e Birkhead & Moller (1992) eram aves selecionadas para aumentar a postura de ovos e este processo pode ter resultado na diminuição no número de pregas. Mello

(2000) encontrou variação significativa do número de pregas da junção útero-vaginal ao estudar esta região em perdiz *Rhynchotus rufescens*, esta variação foi de 9 no período de repouso a 36 no período de postura, demonstrando grandes modificações funcionais ao longo do período reprodutivo nas aves silvestres.

O número de GHEs acompanha as variações que ocorrem na região útero-vaginal entre o período de postura e de repouso nas aves estacionárias. Goodrich-Smith & Marquez (1978) encontraram 24.000 GHEs na região útero-vaginal e Birkead & Moller (1992), 20.000 destas estruturas na região útero-vaginal de peru industrial. Miranda et al. (2009) encontraram 24.943 GHEs no período de postura e 23.795 no período de repouso. Segundo estes autores o número menor de GHEs no período de repouso é atribuído à renovação glandular que ocorre neste período. Mello (2002) não encontrou nenhuma glândula na junção útero-vaginal durante o período de repouso em perdiz. As glândulas só apareceram no início da fase reprodutiva, à qual ele denominou de fase proliferativa os meses que antecedem a fase reprodutiva. Na galinha doméstica, as GHEs não chegam a desaparecer entre as estações reprodutivas e de repouso, apenas observam-se reduções do diâmetro glandular e altura das células glandulares. Fujji & Tamura

(1963) descrevem que durante a fase reprodutiva, as GHEs têm diâmetro médio de 70  $\mu\text{m}$  e altura celular de 25  $\mu\text{m}$ . Na fase de repouso, as glândulas apresentam diâmetro médio de 30  $\mu\text{m}$  e altura celular de 12  $\mu\text{m}$ .

No presente trabalho foram encontradas  $2.598 \pm 454,9$  GHEs distribuídas ao longo de 21 pregas, em média, sendo que algumas pregas apresentaram maior concentração de GHEs em relação às outras, e dentro de uma mesma prega foram encontradas regiões com densidade maior de GHEs do que em outra. Nestas codornas existem fêmeas com aparelho reprodutor bem desenvolvido, com maior número de GHEs e GIs. Mas são necessários estudos posteriores para analisarem se estas fêmeas apresentam maior potencial reprodutivo.

Os espermatozoides residentes nas GHEs da codorna europeia estavam frequentemente agrupados em feixes, semelhante às descrições feitas em galinhas domésticas por Schindler et al. (1971) e Schuppin et al. (1983) em peru e Rodrigues (1996) em codorna do campo. Segundo Schuppin et al. (1983) , Tingari & Lake (1973) essa disposição reduz o índice de mortalidade dos espermatozoides no lume das GHEs. Nesta espécie não se observa a tendência de localização periférica para a cabeça e central

para cauda dos espermatozoides, semelhantemente às descrições da codorna comum (Rodrigues, 1996) e diferentemente da disposição dos espermatozoides na galinha doméstica (Burke et al., 1971). Após dias sucessivos de postura, observaram-se nítidas reduções na quantidade de espermatozoides no lume glandular e a presença de espermatozoides livres no oviduto. Bakst (1981) relatou a presença de grande quantidade de espermatozoides livres no oviduto e alta incidência de mortalidade de espermatozoides após inseminação artificial. Não foram observados espermatozoides fagocitados pelas GHEs e nem em processo degenerativo na codorna europeia, semelhante às descrições de Van Krey et al. (1967) em galinhas; Friess et al. (1978) em codornas; Schuppín et al. (1983) em peruas.

Os espermatozoides armazenados nas GHEs da codorna europeia estão contidos em material de natureza acidófila e apresentam positividade para o PAS. Observações semelhantes foram realizadas por Rodrigues (1996) em codorna do campo. Segundo a autora, essa positividade é perdida após tratamento com amilase salivar, confirmando a presença de glicogênio. Tendo em vista que o glicogênio não foi detectado no citoplasma das células glandulares, nem no epitélio de revestimento

da junção útero-vaginal da codorna europeia, pode-se inferir que o glicogênio não tem origem do oviduto. Sabendo que os ductos deferentes da codorna do campo produzem secreções ricas em glicogênio (Oliveira, 1994), pode-se inferir também que o fluido que envolve os espermatozoides pode ter sido carreado junto com os espermatozoides, desde os ductos deferentes, durante a cópula.

Nas codornas europeias foram detectados ovos férteis apenas no 2º dia após a cópula, tempo necessário para os espermatozoides que estão armazenados nas GHEs ascenderem pelo oviduto em direção ao infundíbulo distal, local de fertilização dos ovos, onde permanecem armazenados nas GIs. Após 48 horas, ovos férteis são observados até 10º dia após a cópula. Durante este período, as GHEs não apresentaram modificações morfológicas, apenas ocorreram diminuições gradativas do número de espermatozoides armazenados. No 6º dia após o acasalamento, já não foram encontrados espermatozoides nestas glândulas. O armazenamento temporário de espermatozoides nas GIs permite a postura de ovos férteis por mais 4 dias. Observações semelhantes foram descritas por Fujii & Tamura (1963); Van Krey et al. (1967) em galinhas e Schuppín et al. (1983), em peru. Na literatura consultada não houve este

relato sofre a sincronização entre as GHEs da junção útero-vaginal com as GIs do infundíbulo distal, período importante para a produção de ovos férteis, mesmo havendo o esvaziamento das GHEs.

Os espermatozoides armazenados nas GIs apresentam, na codorna europeia, disposição paralela no lume tubular e são facilmente contados; estão em pequeno número ( de 1 a 3), com as cabeças orientadas para as células glandulares e posição central para as caudas. Descrições semelhantes foram encontradas em galinha doméstica, com a diferença de concentração de espermatozoides entre as glândulas da junção útero-vaginal e do infundíbulo distal (Fujji & Tamura, 1963).

As GIs do infundíbulo distal da codorna europeia são estruturas tubulosas simples e não ramificadas, rodeadas por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado. As GIs são formadas por células prismáticas, não ciliadas, com núcleo vesiculoso basal, elíptico, com nucléolo evidente; com superfície apical e apresenta trama terminal evidente. O citoplasma destas células glandulares é acidófilo, fracamente corado pela eosina, semelhante às descrições apresentadas em Codorna de campo (Rodrigues, 1996) e em galinha doméstica (Gilbert et al.,1968).

As GIs da codorna europeia apresentam reações negativas aos métodos do ácido

periódico – reativo de Schiff (PAS), PAS após a digestão pela amilase salivar e o método Alcian Blue em pH 0,5 e em pH 2,5, semelhantes às descrições em relação à galinha doméstica (Gilbert et al.,1968). As reações negativas aos métodos histoquímicos demonstram a ausência de mucossubstâncias carboxiladas, sulfatadas e glicoproteínas ricas em ácido siálico nessas estruturas, diferentemente das GIs da codorna de campo que apresenta reação fracamente positiva para o PAS, amilase-PAS e negativa às colorações pelo Alcian-blue em pH 0,5 e 2,5. Diferentemente das GHEs, as GIs são formadas apenas por células claras. Há necessidade de estudos mais aprofundados para determinar a ausência de células escuras nas GIs e sua função nestas glândulas.

No início do segmento distal do infundíbulo, as GIs da codorna europeia formam pequenos grupos e posteriormente, distribuem-se de forma aleatória na lâmina própria. até preencherem toda a extensão da mucosa das pregas, semelhante às descrições em codorna de campo (Rodrigues, 1996). No infundíbulo distal estão presentes pregas com grande concentração de glândulas e pregas sem glândulas. Dentro das pregas com grande concentração, encontram-se regiões com maior densidade GIs do que em

outra, semelhantemente a distribuição das GHEs nas pregas da junção útero-vaginal.

As GIs desembocam diretamente entre as células do epitélio de revestimento pseudoestratificado prismático, que apresenta células ciliadas e não ciliadas intercaladas, sem formação de ductos. Na codorna do campo, estas glândulas desembocam entre as células do epitélio de revestimento, através de um pequeno ducto, formado por células cilíndricas baixas ou cúbicas, não ciliadas, com núcleo arredondado e de posição central (Rodrigues, 1996).

O estudo morfométrico das GIs mostraram que elas possuem diâmetro médio externo de  $16,40 \pm 1,58 \mu\text{m}$ , diâmetro médio interno de  $5,85 \pm 1,23 \mu\text{m}$ , altura média do epitélio de  $5,37 \pm 0,68 \mu\text{m}$  e  $10,47 \pm 1,33$  células por glândula, em média. As glândulas apresentam lume pequeno, em média de  $5,85 \mu\text{m}$ , de fácil visualização, com poucos espermatozoides armazenados na sua luz, em média 2 espermatozoides em cada glândula. Estes espermatozoides apresentam organização espacial na luz tubular, com a cabeça voltada para o ápice das células glandulares, tocando a trama terminal e a cauda voltada para a desembocadura da glândula, no epitélio da prega. Estes se dispõem paralelamente um ao outro.

Os espermatozoides depositados na cloaca da codorna europeia ascendem pelo oviduto em direção ao infundíbulo distal, local de fertilização dos óvulos. Na região da junção útero-vaginal, os espermatozoides são armazenados nas GHEs. A junção útero-vaginal apresenta em média  $2.598 \pm 454,9$  glândulas, que armazenam espermatozoides por no máximo 5 dias na codorna europeia. Neste período, os espermatozoides armazenados são liberados das glândulas e ascendem em direção ao infundíbulo distal, onde são armazenados temporariamente. O estudo morfométrico realizado nas codornas europeias mostrou que as duas regiões agem sincronicamente no período após a cópula, permitindo assim a postura de ovos férteis por 10 dias nesta espécie. Após 24 horas do acasalamento, foram encontrados 46% destas glândulas com espermatozoides; posteriormente esta porcentagem diminuiu gradativamente e o número de GIs aumentou até o 5º dia (9,7% de GIs com espermatozoides no 2º dia; 14,2% no 3º dia; 19% no 4º dia e 20,1% no 5º dia). Apesar de as GIs armazenarem poucos espermatozoides, estas permitem que ovos férteis sejam produzidos por mais 4 ou 5 dias após as GHEs terem liberados todos os espermatozoides, fato não descrito em outras espécies pesquisadas (Bakst, 1994, 1998; Mello, 2000; Moraes et al.; 2009)

O local onde os espermatozoides permanecem armazenados no interior do oviduto foi abordado por Van Drimmlen (1946), Bobr et al. (1964), em galinhas; Bakst (1994, 1998), Miranda et al. (2009) em peru, Mello (2000) em perdiz, Moraes et al. (2009) em codorna japônica. Entretanto, existem ainda discordâncias entre os autores sobre qual é o principal sítio de armazenamento de espermatozoides no oviduto das aves. Autores como Van Drimmlen (1946) e Moraes et al. (2009) descreveram que o infundíbulo distal é o principal local de armazenamento de espermatozoides no oviduto, pois número considerável de espermatozóide atingem as GIs e ali permanecem armazenados. Moraes et al. (2009) descreveram que o número de GIs na codorna japônica é maior do que o número das GHEs. O número de GHEs, a quantidade de glândulas nesta região, assim como a própria organização dos espermatozoides nestas estruturas são significativamente maiores (Teste de Wilcoxon) do que de GIs na codorna europeia; considera-se que as GHEs são o sítio primário de armazenamento de espermatozoides nestas aves. Posteriormente esses espermatozoides são liberados para as GIs, podendo este local, ser considerado como sítio secundário de armazenamento.

O número consideravelmente maior de GHEs com espermatozoides foi observado por Fujii & Tamura (1963), em galinhas. Os autores descrevem também que as GHEs armazenam os espermatozoides por tempo maior que as GIs, mostrando que a junção útero-vaginal é o sítio primário de armazenamentos de espermatozoides no oviduto. Na codorna europeia observou-se que os espermatozoides não permanecem tempo maior nas GHEs, apenas permanecem armazenados temporariamente, em pequena quantidade na região do infundíbulo distal para a fecundação dos ovócitos, em pequena quantidade, durante o ciclo diário de ovulações. São necessários mais estudos para responder qual é o fator responsável pela sobrevivência dos espermatozoides nestes reservatórios.

Com base nos conhecimentos histomorfométricos obtidos das GHEs e das GIs da codorna europeia observou-se que o manejo ideal é de 1 macho para 3 fêmeas, em gaiolas individuais, com rodízio do macho entre as gaiolas das fêmeas. Esse macho deverá permanecer com cada fêmea por 24 horas, pois nesse tipo de manejo a taxa de ovos inférteis será menor. Nos manuais de criação de codorna europeia (Ariki, 1996) recomenda-se 1 macho para cada grupo de 6 ou 10 fêmeas, em gaiolas coletivas. Nesse tipo de manejo observa-

seque o índice de fertilidade dos ovos é baixo, pois o macho tende a acasalar com fêmeas menos agressivas e mais receptivas ao acasalamento, ficando assim fêmeas cobertas e outras sem cobertura. O ideal para pequenos e médios multiplicadores que visam ampliar o seu criadouro é a utilização de gaiolas individuais na proporção de 1 macho para cada 3 fêmeas. Neste tipo de manejo, o multiplicador terá redução do número de reprodutores e de perdas de matrizes por excesso de cópulas diárias, com aumento porcentagem de ovos férteis em seu plantel.

## 6. CONCLUSÃO

- As Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides (GHEs) armazenam os espermatozoides por um período de até 120 horas.

- Os espermatozoides, por movimento ascendente, se deslocam em direção às Glândulas infundibulares (GIs), onde permanecem viáveis e férteis por pelo menos 96 horas após deixarem as GHEs, possibilitando assim a produção de ovos férteis por 10 dias após o acasalamento na codorna europeia.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.N.C.; JOHNSTON, H.S. Observations on the fine structure of the infundibulum of the avian oviduct. *J. An.*, v.97, p.87-99, 1963.

ALBINO, L.F.T. BARRETO, S.L.T. *Criação de codornas para produção de ovos e carnes*. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2003, 289p.

ALBINO, L.F.T; PINTO, R.; FERREIRA, A.S.; GOMES, P.C.; JÚNIOR, J.G.V. Níveis de proteínas e energia para codornas japônicas em postura. *R. Bras. Zootec.*, v.31, p.1761-1770, 2002.

ARIKI, J. Criação de codornas. *Tecnologia e Treinamento Agropecuário*, v.1, p.23-24, 1996.

BAKST, M.R. Sperm recovery from oviducts of turkeys at known intervals after insemination and oviposition. *J. Reprod. Fert.*, v.62, p.159-164, 1981.

BAKST, M.R. Fate of turkey spermatozoa after intrainfundibular and intramaginal inseminations. *J. Reprod. Fert.*, v.67, p.315-317, 1983.

BAKST, M.R. Anatomical basis of sperm-storage in the avian Oviduct. *Scanning Micros.*, v.1, p.1257-1266, 1987.



- BAKST, M.R. Turkey hen fertility and egg production after artificial insemination and multiple oviduct eversion during the pre-laying period. *J. Reprod. Fertil.*, v.83, p.873-877, 1988.
- BAKST, M.R. Oviductal storage in the turkey: its relevance to artificial insemination technology. *Br. Poult. Sci.*, v.30, p.441-47, 1989.
- BAKST, M.R. Observations on the turkey oviductal sperm-storage tubule using differential interference contrast microscopy. *J. Reprod. Fert.*, v.95, p.877-883, 1992.
- BAKST, M.R. Fate of fluorescent stained sperm following insemination: New Light on oviductal sperm transport and Storage in the Turkey. *Biol. Reprod.*, v.50, p.987-992, 1994.
- BAKST, M.R. Structure of the Avian Oviduct with emphasis on sperm storage in poultry. *J. Exp. Zool.*, v.282, p.618-626, 1998.
- BAKST, M.R., BIRD, D.M. Localization of oviductal sperm-storage tubules in the American kestrel (*Falco sparverius*). *Auk*, v.104, p.321-324, 1987.
- BARRETO, S.L.T; QUIRINO, B.J.S.; BRITO, C.O.; UMIGI, R. T.; ARAUJO, M.S.; ROCHA, T. C.; PEREIRA C.G. Efeitos de níveis nutricionais de energia sobre o desempenho e a qualidade de ovos de codornas europeias na fase inicial de postura. *R. Bras. Zootec.*, v.36, p.86-93, 2007.
- BERTECHINI, A.G.; KATO, R.K.; FASSANI, E.J. Novos conceitos aplicados à produção de codornas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COTURNICULTURA I., 2002, Lavras. *Anais...* Lavras: UFLA; NECTA, 2002, 218p.
- BEZUIDENHOUT, A. J.; SOLEY, J. T.; GROENEWALD, H.B. et al. Sperm-storage tubules in the vagina of the ostrich (*Struthio camelus*). *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.107, p.193-199, 1995.
- BIRKHEAD, T. R. Sperm storage and release of sperm from the sperm storage in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Ibis*, v.136, p.101-105, 1994.
- BIRKHEAD, T. R.; HUNTER, F.M. Numbers of sperm-storage tubules in the Zebra Finch (*Poephila guttata*) and Bengalese Finch (*Lonchura striata*). *Auk*, v.107, p.193-197, 1990.
- BIRKHEAD, T. R.; PELLAT, J.E.; HUNTER, F.M. Numbers and distribution of sperm in the Uterovaginal Sperm Storage

of the Zebra Finch. *Condor*, v.92, p.508-516, 1990.

BIRKHEAD, T.R.; MOLLER, A.P. *Sperm Competition in Birds*; Evolutionary Causes and Consequences. London: Academic Press, 1992, 288p.

BOBR, L.W.; LORENZ, F.W.; OGASAWARA, F.X. Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. 1. Residence sites of spermatozoa in fowl oviducts. *J. Reprod. Fert.*, v.8, p.39-47. 1964.

BRILLARD, J.P.; BAKST, M.R. Quantification of spermatozoa in the sperm storage tubules of turkey hens and its relation to sperm numbers in the perivitelline layer of eggs. *Biol. Reprod.*, v. 43, p.271-275, 1990.

BURKET, W.H.; OGASAWARA, F.X. Presence of spermatozoa in uterovaginal fluids of the hen at various stages of the ovulatory cycle. *Poultry Science*, v.48, p.408-413, 1969.

BURKET, W. R.; OGASAWARA, F.X.; FUQUA, C. L. A study of the ultrastructure of the uterovaginal sperm-storage glands of the hen, *Gallus domesticus*, in relation to mechanism for the release of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v.29, p.29-36, 1971.

CHIARINI-GARCIA, H. Inclusão de material biológico em resinas plásticas. Belo Horizonte. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG/Departamento de Morfologia, 1991, 21p.

CHENG, K.M.; BURNS, J.T.; MCKINNEY, C.R. Forced copulation in captive mallards. III. Sperm competition. *Auk.*, v.100, p.302-310, 1983.

CHRISTENSEN, V.L. Effect of insemination interval on oviductal sperm storage in turkeys. *Poult. Sci.*, v.60, p.2150-2156, 1981.

COMPTON, M. M.; VAN KREY, H.P.; SIEGEL, P.B. The filling and meeting of uterovaginal sperm-host glands in the domestic hen. *Poult. Sci.*, v.57, p.1696-1700, 1977.

COMPTON, M. M.; VAN KREY, H.P. A histological examination of the uterovaginal sperm storage glands in the domestic hen following insemination with variable semen dosages. *Poult. Sci.*, v.58, p.478-480, 1978.

CORRÊA, G.S.S; SILVA, M.A; CORREA, A.B.; ALMEIDA, V.; FONTES, D.O.; TORRES, R.A.; DIONELLO, N.J.L. Exigência de proteína bruta e energia metabolizável em codornas de corte durante a fase de crescimento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.488-494, 2007.

DAHM, H.H.; SCHRAMM, V.; LANGE, W. Scanning and transmission electron microscopic observations of the epithelia of the domestic fowl. *Cell Tissue Res.*, v.211, p.83-93, 1980.

DRAPER, M.H.; JOHNSTON, H.S.; WYBURN, G.M. The fine structure of the oviduct of the laying hen. *Journal of Physiology*, v.196, p.7-8, 1968.

DYCE, K.M. et al. Anatomia das aves. In: DYCE, K.M. et al. *Tratado de anatomia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 631-650p.

FITCH, M.A.; SCHUGART, G.W. Requirements for Mixed Reproductive Strategy in Avian Species. *Am. Nat.*, v.124, p.116-126, 1984.

FRIDRICH, A.B.; VALENTE, B.D.; FELIPE-SILVA, A.S. et al. Exigência de proteína bruta para codornas europeias no período de crescimento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.261-265, 2005.

FRIESS, A. E.; SINOWATZ, F.; WROBEL, K.H. et al. The uterovaginal sperm host glands of the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Cell Tissue Res.*, v.191, p.101-114, 1978.

FROMAN, D. Deduction of a model for sperm storage in the oviduct of the domestic

fowl (*Gallus domesticus*). *Biology of Reproduction*, v.69, p.248-253, 2003.

FUJII, S. Histological and histochemical studies on the oviduct of the domestic fowl with special reference to the region of uterovaginal juncture. *Arch. Histol. Jap. Niigata*, v.23, p. 447-59, 1963.

FUJII, S.; TAMURA, T. Location of sperms in the oviduct of the domestic fowl with special reference to storage of sperms in the vaginal gland. *J. Fac. Fish. Anita. Husb. Hiroshima Univ.*, v.5, p.145-163, 1963.

GEWEHR, C.E. *Avaliação de programas de iluminação em codornas (Coturnix coturnix)*. 2003. 81p. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GILBERT, A.B. Female genital organs. In: King, A. S.; MCLELLAND, J. (ed). *Forms and function in birds*. New York: Academic Press, 1979, 237-360p.

GILBERT, A.B.; REYNOLDS, M.E.; LORENZ, F.W. Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic hen: V. histochemistry of the uterovaginal sperm host glands of the domestic hen. *J. Reprod. Fert.*, v.16, p.433-444, 1968.

GOODRICH-SMITH, M.; MARQUEZ, B.J. Estimation of the numbers of sperm storage

tubules located at the uterovaginal junction in turkey oviduct. *Poult. Sci.*, v.57, p.1139, 1978.

HARPER, J. A.; ARSCOTT, G.H. Seasonal decline in fertility of turkey eggs. *Poult. Sci.*, v.48, p.2109-2113, 1969.

HATCH, S.A. Mechanism and ecological significance of sperm storage in the northern fulmar with reference to its occurrence in other birds. *Auk.*, v.100, p.593-600, 1983.

HOLM, L.; RIDDERSTRALE, Y. Development of storage tubules in the quail during sexual maturation. *J. Exp. Zool.*, v.292, p.200-205, 2002.

HOWARTH Jr, B. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of turkey hens. *Poult Sci.*, v.50, p.84-89, 1971.

JAMIESON, B.G.M. *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds*. 6<sup>th</sup> ed. Austrália: University of Queensland, 2007, 1-35p.

JOHNSTON, H.S. et al. In: MORAES, C.; BARALDI-ARTONI, S.M.; PACHECO, M.R. et al (2007). The fine structure of the uterus of the domestic fowl. *Journal of Anatomy*, v.97. p.333-344, 1963.

KING, A.S. – Aparelho urogenital das aves. In: GETTY, R. *Anatomia dos animais domésticos*. 5<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1981, 1708-1839p.

KING, A.S. Apparatus urogenitalis. In: *Handbook of Avian Anatom: Nomina Anatomica Avium*. 2<sup>nd</sup>.ed. Cambridge, Mass.:{Nuttall Ornithological Club}, 1993, 329-397p.

KING, L.M.; BRILLARD, J.P.; GARRET, W.M, et al. Segregation of spermatozoa within sperm storage tubules of fowl and turkey hens. *Reproduction*, v. 123, p.79-86, 2002.

LAKE, P.E. Gamete production and the fertile period with particular reference to domesticated birds. *Symposium Zoological Society*, London, v.35, p.225-224, 1975.

LEV, R.; SPICER, S.S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, v.12, p.309, 1964.

LILLIE, R. D.; FULLMER, H.M. Histopatologic technic and practical histochemistry. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 1976, 942p.

LORENZ, F.W.; REYNOLDS, M.E.; GILBERT, A.B. Secretory activity of the sperm-host glands of the domestic fowl. *Physiologist Wash.*, v.10, p.236, 1967.

McMANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after mucin after periodic acid. *Nature*, v.158, p.202, 1946.

- MELLO, H.E.S. Aspectos morfológicos das Glândulas Hospedeiras de Espermatozoides na perdiz, *Rhynchotus rufescens* (Temminck, 1815) (aves, Tinamiformes) nas fases do ciclo reprodutivo. 2000. 50p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MERO, K.N.; OGASAWARA, F.X. Dimensions of uterovaginal sperm-storage tubules of the chicken and their possible significance in sperm release. *Poultry Sci.*, v.49, p.1304-1308, 1970.
- MICHALANY, J. Técnica histológica em anatomia patológica; com instrução para o cirurgião, enfermeira e citotécnico, São Paulo: EPU, 1980, 277p.
- MIRANDA, J.L.P.S. *Aspectos morfológicos, histoquímicos e de morfometria dos túbulos armazenadores de espermatozoides da fêmea do peru Meleagris gallopavo* (Phasianidae-Galliformes). 2006. 91p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MIRANDA, J.L.P.S.; OLIVEIRA, C.A.; MAHECHA, G.A.B. Aspectos morfológicos, histoquímicos e de morfometria dos túbulos armazenadores de espermatozoides da fêmea do peru *Meleagris gallopavo*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, vol.61, p.72-79, 2009.
- MORAES, C.; BARALDI-ARTONI, S.M.; PACHECO, M.R. et al. Morfologia e morfometria do oviduto de codornas *Nothura maculosa*. *Ciência Rural*, v.37, p.146-152, 2007.
- MORAES, C.; BARALDI-ARTONI, S.M.; PACHECO, M.R. et al. Histologia e morfometria das glândulas das junções infundíbulo-magno e útero-vagina de codorna doméstica. *Ciência Rural*, v.39, p.421-427, 2009.
- MÓRI, C.; GARCIA, E.A.; PAVAN, A.C. et al. Desempenho e rendimento de carcaça de quatro grupos genéticos de codornas para produção de carne. *Rev. Bras. Zoot.*, v.34, p.870-876, 2005.
- MOWRY, R. W. Alcian blue technic for the histochemical study of acid carbohydrates. *J. Histochem. Cytochem.*, v.4, p.407, 1956.
- OGASAWARA, F. X.; FUQUA, C.L. The vital importance of the uterovaginal sperm-host glands for the turkey hen. *Poult. Sci.*, v.51, p.1035-1039, 1972.
- OLIVEIRA, C.A. *Aspectos morfológicos da cloaca e aparelho copulador de Nothura maculosa* (Temminck, 1815)

(Aves, Tinamiformes). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1994. 184p. (Dissertação, Mestrado em Morfologia).

PAL, D. Histochemistry of the uterovaginal junction with special reference to the sperm-host glands in the oviduct of the domestic duck. *Folia Histochem. Cytochem.*, (Krakow), v.15, p.235-242, 1977.

PESCATORE, A.J; MARQUEZ, B.J. Sperm storage tubule development in immature turkeys injected with female sex steroids. *Poult. Sci.*, v. 56, p.1746-1747, 1977.

RENDEN, J. A.; MAY, E.B.; BENOFF, F.H. Histochemistry of uterovaginal sperm-host glands in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) with reference to the period of oviposition. *Poult. Sci.*, v.60, p.2529-2535, 1981.

RIBEIRO, M.G. – *Aspectos histomorfométricos e histoquímicos dos órgãos genitais femininos de Meleagris gallopavo (Phasianidae-galliformes)*. 2003. 169p. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

RICHARDSON, K. The Secretary Phenomena in the Oviduct of the Fowl, Including the Process of Shell Formation Examined by Microincineration Technique.

*Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B., Biol. Scien.*, v.225, p.149-195, 1935.

RODRIGUES, C.A.T. *Morfologia do oviducto esquerdo da codorna comum, Nothura maculosa* (Temminck, 1815) (aves, Tinamiformes), nas fases de secreção, regressão e proliferação. 1996. 229p. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 1998, 221p.

SCHINDLER, H.; BEN-DAVID, E.; HURWITZ, S. et al. The relation of spermatozoa to the glandular tissue in the storage sites of the hen oviduct. *Poult. Sci.*, v. 46, p.1462-1471, 1971.

SCHUPPING, G. T.; VAN KREY, H.P.; DENBOW, D.M. Ultrastructural analysis of uterovaginal sperm storage glands in fertile and infertile turkey breeder hens. *Poult. Sci.*, v.63, p.1872-1882, 1983.

SCHUGART, G.W. Uterovaginal sperm-storage glands in sixteen species with comments on morphological differences. *Auk*, v.105, p.379-385, 1988.

- SIBLEY, C.G.; AHQUIST, J.E. *Phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution*. New Haven: Yale University, 1990, 976p.
- SIBLEY, C. G.; MONROE Jr., B.L. *Distribution and taxonomy of birds of the world*. New Haven: Yale University, 1990, 1111p.
- SISSON, S.; GROSSMAN, J.D. *Anatomia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986, v.2.
- SOLOMON, S.E. Studies on the isthmus region of the domestic fowl. *Bri. Poult. Sci.*, v.16, p.255-258, 1975.
- STURKIE, P.D. *Avian physiology*. London: Bailliére, 1965, v.2.
- SURFACE, F.M. The histology of the oviduct of the domestic chicken. *Bulletin Agricultural Experiment Station, Augusta*, v.206, p.397-430, 1912.
- TAUBER, P. Fertilization of eggs in the oviduct of the hen. *Natuurk. Tijdschr. Ned. Indie.*, v.10, p.63, 1875.
- TINGARI, M.D.; LAKE, P.E. Ultrastructural studies on the uterovaginal sperm-host glands of the domestic hen, *Gallus domesticus*. *J. Reprod. Fertil.*, v.34, p.423-431, 1973.
- VAN DRIMMELEN, G.C. "Sperm nests" in the oviduct of the domestic hen. *J. African.*, Pretoria, v.17, p.42-52, 1946.
- VAN KREY, et al. Light and electron microscopic studies of possible sperm gland emptying mechanisms. *Poult. Sci.*, v.46, p.69-78, 1967.
- VERMA, G.P.; CHERMS, F.L. Observations on the oviducts of turkeys. *Avian Dis.*, v.8, p.19-26, 1965.
- WENTWORTH, B.C.; WINELAND, M.J.; PATON, G.D. Fertility of turkey hens correlated with depth of insemination. *Poult. Sci.*, v.54, p.682-687, 1975.
- WHISHART, G.J. Regulation of the length of the fertile period in the domestic fowl by numbers of oviductal spermatozoa, as reflected by those trapped in laid eggs. *J. Reprod. Fertil.*, v.80, p.493-498, 1987.
- WYBURN, G.M.; JOHNSTON, H.S.; DRAPER, M.H. The magnum of the hen's oviduct as a protein secreting organ. *J. Anat.*, v.106, p.174, 1970.
- YOSHIMURA, Y.; KOIKE, K.; OKAMOTO, T. Immunolocalization of progesterone and estrogen receptors in the sperm storage tubules of laying and diethylstilbestrol-injected immature hens. *Poult. Sci.*, v.79, p.94-98, 2000.

