GISELE REISDOERFER

**EFEITOS DO ENVELHECIMENTO NOS COMPONENTES
FIBROELÁSTICOS DA JUNCTÃO VÉSICO-URETRAL DE
RATOS WISTAR**

GISELE REISDOERFER

**EFEITOS DO ENVELHECIMENTO NOS COMPONENTES
FIBROELÁSTICOS DA JUNÇÃO VÉSICO-URETRAL DE RATOS
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

**São Paulo
2007**

GISELE REISDOERFER

**EFEITOS DO ENVELHECIMENTO NOS COMPONENTES
FIBROELÁSTICOS DA JUNÇÃO VÉSICO-URETRAL DE RATOS
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

**São Paulo
2007**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que acreditam em seus sonhos e os fazem se tornar realidade sem medir os esforços, as consequências, o suor e as lágrimas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS e à NOSSA SENHORA APARECIDA, pela proteção, amparo e sabedoria para discernir o certo do errado e o justo do injusto e pelas pessoas maravilhosas que Deus colocou em meu caminho nesta trajetória.

Ao Prof. Dr. Renato Paulo Chopard, pelo seu excelente profissionalismo, pelo verdadeiro mestre que és, pelos ensinamentos científicos e anatômicos, pela sua amizade, companheirismo, lealdade e também pelos bons bate-papos, onde tudo isso levarei sempre em minha memória por onde for.

Ao Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, por sua dedicação, préstimos, apoio, pela sua importante contribuição profissional neste trabalho, pelas suas maravilhosas histórias e pela sua Disciplina de Técnicas Anatômicas, a qual foi de grande valia para minha vida pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Romeu de Souza, pelos seus ensinamentos, disponibilidade e ajuda científica para melhoria de nosso estudo.

À minha família, Marcos, Margarete e Laura, pela torcida, compreensão, carinho e comemorações a cada obstáculo superado.

Ao meu noivo, Tiago, por seu amor imenso, superação, apoio, conselhos, paciência infinita e ajuda para que este projeto de vida se realizasse.

Aos meus avós Celestino e Francisca, pelo amor e carinho ofertado.

Às queridas pessoas Sra. Lourdes, Sr. Sérgio e Carla Galina pelo afeto e amizade.

À Profa. Dra. Maria Luiza Barreto Chaves, pelo carinho, amizade e apoio.

À Profa. Dra. Maria Inês Nogueira, pelos seus préstimos laboratoriais, conversas e amizade.

Aos demais professores do Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas III, sejam através de seus préstimos profissionais e laboratoriais ou pela amizade adquirida, ajudaram para que este trabalho fosse concluído da melhor maneira possível.

Ao laboratório de Histologia e aos seus funcionários (as) Marta, Sônia e Boleta, que foram pessoas importantíssimas para que as preparações histológicas e eletrônicas realizadas neste trabalho pudessem concretizar-se, também pelo empenho, boa vontade, amizade pura, carinho e maravilhosas tardes passadas nos micrótomos com muita conversa boa, lanchinhos e cafezinhos, vocês foram excelentes.

Ao Instituto Butantã, pela Microscopia Eletrônica de Transmissão, como ao Sr. Alexsander e a Prof. Dra. Marta.

À Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas pelo material bibliográfico concedido, especialmente a Sra. Ana Paula.

Aos verdadeiros amigos que tive a honra de conhecer durante este tempo, Jaqueline Carvalho, Maria Tereza, Fabrício, Renata Vasconcelos, Leila, Luciano, Guilherme, Alexandre, Dorival, Márcia, Priscilla, William, Josemberg, Amanda, Leonardo, Flávio, Lincon, Ana Cláudia, Marcela, Maria Alícia, Gabriela, Cibele, Rúbia, Amábile, Kleber, Luana e Joelcimar que me ajudaram a ter firmeza e que me cederam suas casas, caronas, ajuda profissional, carinho, conselhos, e também horas de lazer e descontração, principalmente na padaria, agradeço por tudo e serei sempre grata.

À amiga Mary Maoli, pela amizade, bate-papos, quebra-galhos e por tudo mais.

À minha segunda família paulistana Maria Tereza, Fabrício e Maria Eduarda (bolacha); Renata Vasconcelos; Leila Campos; Luciano Gonçalves; Dorival e Márcia.

Aos demais colegas do Departamento de Anatomia Humana.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Ciências Bimédicas III, Patrícia e Cristiane.

Aos funcionários (as) do Biotério do Departamento de Anatomia Humana, Luciana, Renival e Rodrigo; do Museu, Nilson e Cristina; do Xérox; da SBA e demais secretárias.

Aos funcionários do Bloco Didático do Departamento de Anatomia Humana, meus sinceros agradecimentos.

À Sra. Rosana D. Prisco, pela sua contribuição estatística e amizade.

Às queridas Káren Dalla Costa, Nilce Santana, Juliana Pacheco, Ana Paula Pacheco, Francielly Waldhauer, Rosane Cella, pelas suas orações e grande apoio, e aos Funcionários da Empresa Reunidas.

A Comunidade Cristus Dominus, pelas orações e fortalecimento espiritual.

A Secretária Municipal de Saúde de Clevelândia.

Aos colegas da Clínica Odontológica Municipal de Clevelândia.

Aos Professores Dr. Renato Paulo Chopard, Dr. Edson Aparecido Liberti e Dr. Richard Halti Cabral, verdadeiros mestres no ensinamento da Anatomia Humana, onde suas condutas serão o espelho e guia da minha carreira profissional.

“Um dia sonhei que o vôo seria alto
Voaste mais que pensei
Não com asas de ícaro
Mas com asas do saber
Asas de aço
Moldadas na Oficina do Pai.”

Marcos Reisdorfer

RESUMO

REISDOERFER, G. **Efeitos do Envelhecimento nos Componentes Fibroelásticos da Junção Vésico-Uretral de Ratos Wistar**. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Para avaliar as fibras elásticas do sistema elástico, na junção vésico-uretral de Ratos Wistar, em diferentes faixas etárias, foram realizados estudos histológicos, de microscopia eletrônica de transmissão e histomorfométricos. O estudo histológico do sistema de fibras elásticas revelado por métodos seletivos de coloração, mostrou a presença dos três tipos de fibras elásticas, em todas as faixas etárias estudadas, a microscopia eletrônica de transmissão, com uso da técnica do ácido tânico associado ao fixador glutaraldeído, mostrou satisfatoriamente as diferenças ultra-estruturais entre as fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas, presentes entre os espaços intercelulares das células musculares e feixes de fibras colágenas. A avaliação histomorfométrica revelou que com o avanço da idade há uma diminuição, estatisticamente significativa, da densidade linear das fibras elásticas maduras e oxitalânicas e a densidade linear das fibras elaunínicas apresentou-se aumentada. Dessa forma podemos inferir que na junção vésico-uretral de animais velhos, há uma queda nas propriedades de elasticidade, recuo elástico e ancoragem, devido uma perda de elastina e microtúbulos, mas que são compensadas pelas fibras elaunínicas, por estas possuírem características intermediárias entre elásticas maduras e oxitalânicas. Concluímos que o processo de envelhecimento das fibras elásticas na junção vésico-uretral não contribui sozinha e diretamente no estado de incontinência urinária, mas compensa e dá suporte a muscular, principalmente devido ao aumento das fibras elaunínicas, o que torna o sistema elástico na junção vésico-uretral indiretamente responsável pela manutenção da continência urinária.

Palavras-chave: Junção vésico-uretral. Fibras Elásticas. Envelhecimento.

ABSTRACT

REISDOERFER, G. **Effects of the Aging in Fibroelastics Components of Junction Vesico-Urethral in Rat Wistar.** 2007. 104 f. Master thesis (Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

To evaluate the elastic fibers of the elastic system, in the junction vesico-urethral of rat wistar, in different age groups, studies histologies was accomplished, electron microscopy of transmission and histomorphometrics studies. Study histologic of the system elastic fibers for selective methods of coloration, showed the presence of the three types of elastic fibers, in all the studied age groups, eletron microcopy of transmission, with use technique tannic acid associated glutaraldehyde, showed the ultra-structural differences satisfactorily among the mature elastic fibers, elaunin and oxytalan, which were located among in the intercellular spaces of the muscular layer as well as between fibres collagens. Study histomorfometric revealed that with the progress age there is a decrease of the linear density of the mature elastic fibers and oxyitalans, whilst the linear density of the fibers elauninns came increased. So, we can infer that in the junction vesico-urethral of old animals, there is a fall in the properties of elasticity, elastic recoil and anchorage, due an elastin loss and microfibrils, but they are compensated by the fibers elaunins, for these they possess intermediary characteristics among elastic mature and oxytalans. We concluded that the process aging of the elastic fibers in the junction vesico-urethral doesn't contribute alone and directly in the state of urinary incontinence, but it compensates and she gives muscular support, mainly due to the increase of the fibers elaunins, what turns the elastic system in the junction vesico-urethral responsible for the maintenance of the urinary continence.

Key-words: Junction vesico-urethral. Elastic fibers. Aging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fotomicrografia da JVU, coloração Verhoeff, grupo neonato	45
Figura 2. Fotomicrografia da JVU, coloração Verhoeff, grupo adulto	46
Figura 3. Fotomicrografia da JVU, coloração Verhoeff, grupo velho.....	47
Figura 4. Fotomicrografia da JVU, coloração Weigert, grupo neonato	48
Figura 5. Fotomicrografia da JVU, coloração Weigert, grupo adulto	49
Figura 6. Fotomicrografia da JVU, coloração Weigert, grupo velho	50
Figura 7. Fotomicrografia da JVU, coloração Weigert-Oxona, grupo neonato	51
Figura 8. Fotomicrografia da JVU, coloração Weigert-Oxona, grupo adulto	52
Figura 9. Fotomicrografia da JVU, coloração Weigert-Oxona, grupo velho	53
Figura 10. Eletromicrografia da JVU, grupo neonato, 30K	54
Figura 11. Eletromicrografia da JVU, grupo neonato, 100K	54
Figura 12. Eletromicrografia da JVU, grupo neonato, 43.120X	55
Figura 13. Eletromicrografia da JVU, grupo neonato, 43.120X	55
Figura 14. Eletromicrografia da JVU, grupo neonato, 100K	56
Figura 15. Eletromicrografia da JVU, grupo neonato, 100K	56
Figura 16. Eletromicrografia da junção vésico-uretral, grupo neonato, 43.120X	57

Figura 17. Eletromicrografia da JVU, grupo neonato, 43.120X	57
Figura 18. Eletromicrografia da JVU, grupo neonato, 100K	58
Figura 19. Eletromicrografia da JVU, grupo neonato, 100K	58
Figura 20. Eletromicrografia da JVU, grupo adulto, 100K	59
Figura 21. Eletromicrografia da JVU, grupo adulto, 100K	59
Figura 22. Eletromicrografia da JVU, grupo adulto, 40K	60
Figura 23. Eletromicrografia da JVU, grupo adulto, 100K	60
Figura 24. Eletromicrografia da JVU, grupo adulto, 50K	61
Figura 25. Eletromicrografia da JVU, grupo adulto, 100K	61
Figura 26. Eletromicrografia da JVU, grupo adulto, 100K	62
Figura 27. Eletromicrografia da JVU, grupo adulto, 100K	62
Figura 28. Eletromicrografia da JVU, grupo velho, 40K	63
Figura 29. Eletromicrografia da JVU, grupo velho, 40K	63
Figura 30. Eletromicrografia da JVU, grupo velho, 50K	64
Figura 31. Eletromicrografia da JVU, grupo velho, 35K	64
Figura 32. Eletromicrografia da JVU, grupo velho, 75K	65
Figura 33. Eletromicrografia da JVU, grupo velho, 100K	65

Figura 34. Gráfico da Densidade Linear das fibras do sistema elástico, colorações, em relação à idade	68
Figura 35. Gráfico da LD das fibras do sistema elástico, tipificação das fibras elásticas, em relação à idade	69
Figura 36. Curva de regressão quadrática das fibras do sistema elástico, colorações, em relação à idade	70
Figura 37. Curva de regressão quadrática das fibras do sistema elástico, tipificação das fibras elásticas, em relação à idade	70

LISTA DE ABREVIATURAS

- A – área total do sistema-teste
- At – área total examinada em campos
- C ou CR– número de intersecções das fibras elásticas com as retas paralelas do sistema teste
- D (μm) – distância entre as retas do sistema-teste
- EL – elastínicas
- EM – elásticas maduras
- F – fator de correção para amostras não homogêneas
- FC – fibras colágenas
- HD – número total de pontos do sistema teste
- HF – número total de pontos do sistema teste sem estrutura tecidual
- JVU – junção vésico-uretral
- L (μm) – comprimento de fibras por unidade de volume
- LD – densidade linear
- M – molar
- OX – oxitalânicas
- PU – número total de pontos do sistema teste

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Elementos estruturais	24
2.2 Sistema elástico – fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas	25
3 PROPOSIÇÃO	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Material	37
4.2 Métodos	37
4.2.1 Microscopia de luz	37
4.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão	39
4.2.3 Histomorfometria	40
5 RESULTADOS	43
5.1 Estudo histológico	43
5.2 Estudo microscopia eletrônica de transmissão	43
5.3 Estudo histomorfométrico	66
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
APÊNDICES	88

1 INTRODUÇÃO

A junção vésico-uretral (JVU) é um dos componentes do trígono da bexiga, que juntamente com o colo vesical possui relevante importância para fixação e posicionamento da bexiga urinária (DORSCHENER, 2002), pois as fibras musculares constituintes do trígono são compactas e possuem abundante componente fibroso dando suporte eficiente para sua ação funcional.

A JVU também controla o armazenamento e esvaziamento da urina (MENEZES, 2000), sendo que no momento que este ocorre, a camada muscular superficial da musculatura do trígono, já está em contração, para evitar o refluxo vésico-ureteral, agindo com as estruturas do colo para colaborar com seu afunilamento e abertura, facilitados pelo relaxamento dos diafragmas pélvico e urogenital (TANAGHO et al., 1968).

A continência urinária é mantida por meio de uma complexa relação que envolve estruturas do trato urinário inferior, sendo este dividido em bexiga e uretra associado ao colo vesical, De Lancey et al., 2004.

A bexiga urinária é um órgão muscular oco, constituído por uma camada serosa circundada por camadas musculares denominadas de músculo detrusor (DE LANCEY, 2004; GOSLING, 1979; HAURI, 1978; WEY, 2004) e uma camada mucosa de epitélio de transição. Segundo Levy et al. (1990), existem quatro camadas distintas na bexiga, como se segue, o urotélio, a lâmina própria, a submucosa e o músculo detrusor, a submucosa é dividida em uma camada superficial e uma profunda através de um feixe neurovascular. O músculo detrusor é formado com uma região central de fibras arranjadas circularmente entre camadas de feixes de fibras longitudinais, este acúmulo de tecido muscular permite a bexiga se expandir em todas as direções, conforme descrito por Hauri (1978) e Gosling (1979).

As fibras do sistema elástico estão presentes em várias estruturas do nosso organismo (JOHNSON et al., 1982) e o arranjo destas fibras contribui para a arquitetura tecidual, pois promove uma ação passiva no tecido quando este é exposto à tensão mecânica, para que o mesmo volte à sua disposição original; juntamente com as fibras colágenas, as fibras elásticas são estruturas importantes para a manutenção da resistência normal tecidual (BARROS et al., 2002), assim o tecido fibroelástico, presente na junção vésico-uretral é considerado o principal fator na geração da pressão de fechamento da uretra e da JVU em repouso (AWAD et al., 1976). As fibras elásticas dispostas circularmente na JVU podem ser parcialmente responsáveis pela elasticidade e plasticidade da região, permitindo a sua expansão e recuo rápido, com o fluxo da urina. Sendo assim, as fibras elásticas presentes nesta região atuam juntamente com a musculatura lisa e controle nervoso, formando um conjunto importante para a manutenção da continência urinária (WOODBURNE, 1961).

O sistema elástico foi estudado através da microscopia de luz (COTTA-PEREIRA et al., 1977; GAWLIK, 1965), e microscopia eletrônica de transmissão associada à técnica do ácido tânico (COTTA-PEREIRA et al., 1976; KAJIKAWA et al., 1975; SACCHETTI, 1996), onde foi possível evidenciar e tipificar os três tipos de fibras elásticas que compõem esse sistema.

Porém existem alguns pontos não esclarecidos nesta região, quanto ao sistema elástico e sua participação nos estados de continência/incontinência urinária, assim o presente trabalho tem por objetivo o estudo do sistema elástico da JVU, com qualificação e tipificação através de microscopia de luz e transmissão e quantificação através de estudo histomorfométrico em relação ao avanço da idade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A junção vésico-uretral (JVU) é a região de transição da bexiga com a uretra; localizada no colo da bexiga, é marcada pelo óstio interno da uretra. O colo vesical, a parte mais inferior e fixa da bexiga, apresenta uma musculatura com comportamento diferenciado, pois as camadas musculares nessa região, são dispostas circularmente ao óstio interno da uretra, constituindo o esfíncter interno da uretra (WOODBURNE, 1961). Segundo Vernet (1968) o termo colo vesical é regional e funcional, não se referindo apenas a uma simples entidade anatômica, assim esta área é uma área da base da bexiga onde o lúmen uretral passa através de uma fina camada de músculo detrusor da base da bexiga circundado o trígono e o óstio interno da uretra. Gray et al. (1973), descrevem que no homem, o colo está assentado na base da próstata, com sua parede estando em continuidade direta com a glândula; na mulher o colo se relaciona com a fáscia pélvica que circunda a parte superior da uretra. Além disso, Netter et al. (1976) consideram que no homem, óstio interno da uretra encontra-se cerca de 1 a 2 cm posteriormente à margem inferior da sínfise púbica. Na mulher, a posição desse óstio é ligeiramente inferior, ao passo que no recém-nascido, pode situar-se ao nível da margem superior da sínfise púbica.

A JVU faz parte do trígono da bexiga, um triângulo aproximadamente equilátero definido, pelos dois óstios dos ureteres e pelo óstio interno da uretra (DORSCHENER et al., 2002; GARDNER et al., 1971). Dorschener et al. (2002) definiram o trígono vesical como uma região topográfica que auxilia na orientação da bexiga urinária.

Para Netter et al. (1976) o revestimento mucoso na região do trígono é anatômica e embriologicamente distinto da mucosa do resto da bexiga. Anatomicamente, a mucosa do trígono encontra-se fortemente aderida à camada muscular, de modo a parecer moldada por igual sobre a musculatura subjacente. Devido a este fator, mesmo quando a bexiga encontra-

se vazia, a mucosa desta área não é pregueada como no restante do órgão, permanecendo lisa e plana. Com base na sua embriologia, o trígono representa uma área mesodérmica diferentemente das outras partes da bexiga e também a mucosa, que são de origem endodérmica.

Sob o aspecto histológico, a camada muscular da base da bexiga, na região do trígono, é facilmente distinguida da musculatura das demais partes do órgão, já que o músculo detrusor tem uma arquitetura muscular fascicular, quando comparado com os aspectos uniformes do trígono, sendo este estreitado logo abaixo do óstio da uretra e em seguida alarga-se e se espessa em direção da musculatura vesical e prostática (BASKIN et al., 2004).

O sistema muscular do trígono é formado por duas camadas, uma superficial e outra profunda. A mais superficial é originada da musculatura do ureter justa-vesical, sendo que, no homem estas fibras procedem ao longo da parede posterior da uretra prostática produzindo uma elevação mediana chamada de crista posterior mediana ou crista uretral, contínua para baixo em direção a musculatura do ducto ejaculatório. Apesar de não haver interconexão muscular entre o trígono superficial e o colo vesical, a passagem de fibras sobre o colo vesical influencia em sua função, Tanagho et al. (1968). Além das fibras da camada média do detrusor que a bainha de Waldayer recebe no momento em que estas fibras passam através do hiato ureteral, a camada profunda do trígono, em direta continuação com esta bainha, faz conexões profundas com o músculo detrusor ao redor do colo vesical, Tanagho et al. (1963). Esta porção mais profunda do trígono adere firmemente à musculatura vesical e é formada pelo músculo esfíncter trigonal ou pelo músculo esfíncter vesical que circunda elípticamente o óstio interno da uretra e não se estende para a uretra. A musculatura que forma o trígono é considerada um sistema anelar, sendo que a circunferência dorsal é no trígono, onde está a bexiga e as bordas encontram-se sobre a musculatura interuretral, a circunferência ventral é em frente à uretra abaixo da camada média circular do músculo detrusor vesical, e

caudalmente a musculatura do trígono se encerra sobre o colículo seminal dentro da próstata, no homem. Devido a este posicionamento, este sistema muscular anelar não circunda o óstio interno da uretra concentricamente, mas se molda como uma elipse (DIETRICH et al., 1994). As duas camadas do trígono são totalmente musculares e sua espessura é quase igual à espessura da parede da bexiga. As fibras musculares do trígono são mais compactas do que aquelas do detrusor, sendo ricas em seu elemento muscular tão quanto em seu componente fibroso, o qual dá ao trígono força, firmeza e fixação (TANAGHO et al., 1968). Funcionalmente, cada camada do trígono tem papel específico na função do colo vesical, como no ciclo de esvaziamento da urina, a camada superficial do trígono contrai alguns segundos antes da contração detrusora (TANAGHO et al., 1965), onde esta possui dois propósitos: 1.) ocluir o ureter intravesical para evitar refluxo durante o início da fase que marca o aumento da pressão intravesical causada pela ativa contração do detrusor; 2.) para deprimir o lábio posterior do colo vesical ajudando outros mecanismos para iniciar o afunilamento da saída da bexiga, simultaneamente o esfíncter estriado externo relaxa e o diafragma urogenital vai para baixo, resultando no afunilamento do colo vesical e uma progressiva queda na pressão de fechamento uretral. A contração do trígono superficial sozinho, sem o relaxamento do diafragma urogenital, é insuficiente para abrir o colo vesical ou conduzi-lo para o afunilamento. A camada profunda do trígono faz a parte do suporte do colo vesical quando a bexiga está em plenitude, e a contração de suas fibras disparam a contração muscular de todo o músculo detrusor que inicia no colo vesical e se propaga para o resto da bexiga aumentando o afunilamento da saída do órgão direcionando o escoamento da urina (TANAGHO et al., 1968).

As camadas musculares, circular média e longitudinal externa, do músculo detrusor se encerram no óstio interno da uretra formando um anel ao redor do mesmo (DORSCHENER al., 1994). Segundo Gray (1946) e Netter et al. (1976), próximo à parte inferior da bexiga, em

torno do óstio interno da uretra, as fibras musculares da camada circular média desta túnica agrupam-se em uma camada espessa e condensada formando o músculo esfíncter interno. Nele se distinguem um componente de abertura e outro de fechamento, um conjunto de fascículos de fibras musculares lisas unidas por tecido elástico, formando assim um sistema mioelástico. Este por sua vez, tem importante função na fisiologia normal e patológica da micção, sendo considerado por Tanagho et al. (1968), um mecanismo para a manutenção da continência urinária.

A função de contração da bexiga depende de um adequado suprimento de oxigênio e nutrientes oriundos do sangue, sendo sua arquitetura microvascular caracterizada por dois principais plexos vasculares (adventício-seroso e mucoso) e duas distintas cadeias capilares (muscular e subepitelial) podem ser distinguidos nas sucessivas camadas da parede da bexiga. Os vasos da bexiga, exceto os capilares, caracterizam-se por sua tortuosidade, oscilando em ondulações e espirais. Abundantes ramos das principais artérias e veias extras vesicais formadas no plexo adventícia-seroso apresentam um curso altamente tortuoso e com numerosas anastomoses, este plexo supre e drena a rede de capilares da muscular e também envia vasos longos e perpendiculares de 100-300 μm de diâmetro, perfurando esta e comunicando-se diretamente com o plexo mucoso. Este plexo, por sua vez, consiste de alguns capilares, finas artérias (50-100 μm) e numerosas veias espessas (80-250 μm), apresentando um aspecto tortuoso e freqüentes entrelaçamentos, formando uma distinta camada vascular paralela à superfície interna da bexiga e seguindo o perfil da prega mucosa. A muscular contém muitos ramos arteriais e venosos tortuosos, em sua maioria derivada do plexo adventícia-seroso e capilares irregulares de finos calibres (8-12 μm). Em contraste, os capilares sub-epiteliais são extremamente densos, em forma de uma malha plana com diâmetros de 10-20 μm , de contorno desigual com constrições e dilatações. Somente na área do trígono e ao redor do óstio interno da uretra, na JVU, eles são arranjados em uma cadeia

frouxa de malhas alongadas e, especialmente na região posterior, possuem um diâmetro mais uniforme. Essa arquitetura vascular permite que os vasos sanguíneos se adaptem às mudanças que o órgão sofre durante seus ciclos de enchimento e esvaziamento, sem comprometer a vascularização sanguínea local (MIODONSKI et al., 1999).

O trato urinário inferior tem como função o armazenamento e a liberação periódica da urina, sendo que isto depende da atividade de duas unidades funcionais: 1.) um reservatório (bexiga urinária); 2.) uma saída, consistindo do colo vesical, uretra, músculos estriados uretrais (GROAT et al., 1997), musculatura do assoalho pélvico, ligamentos e controle neural (CANNON et al., 2004).

Como descrito por Menezes (2000) a JVU, têm por sua vez, função de controlar o armazenamento e o esvaziamento da urina e, em adultos normais o controle urinário pode ser subdividido em fases de enchimento da bexiga e armazenamento da urina, por isso para ocorrer um funcionamento normal desse processo, o trato urinário inferior requer capacidade para armazenar urina em uma baixa pressão, tão quanto capacidade para esvaziar completamente a bexiga voluntariamente com pouca resistência para a passagem da urina. Sob condições normais, aproximadamente 300 ml de urina pode ser acumulada antes de um aumento significativo da pressão vesical que leva à urgência consciente da necessidade de ocorrer à micção e para ocorrer a continência urinária é necessário que a pressão intra-vesical permaneça abaixo da pressão intra-uretral, sabendo-se que aquela pressão depende do tônus do músculo detrusor, do volume da bexiga e da pressão intra-abdominal, já a pressão intra-uretral está sob dependência da pressão intra-abdominal, tônus da musculatura lisa da uretra e do colo vesical, tônus da musculatura estriada uretral e da camada mucosa uretral, Williams et al. (1982).

O controle neural das funções do trato urinário inferior são governadas por um processo complexo que envolve o encéfalo, a medula espinal, a musculatura lisa da bexiga e a

parte posterior da uretra, além da musculatura estriada do esfíncter externo (Menezes, 2000). Para Groat (1997) a dependência do controle nervoso central, distingue o trato urinário inferior de muitas outras estruturas viscerais (trato gastrointestinal e sistema cardiovascular), pois mantêm certo nível igual de função depois da eliminação de estímulos neurais centrais. O controle da função vésico-esfincteriana é adquirido a partir dos 2 anos de idade, no lactente a micção ocorre espontaneamente pelo reflexo medular quando a distensão vesical provoca um estímulo via aferente do arco reflexo sacral resultando em micção automática. Entre 1 e 2 anos, a aquisição da continência depende do aumento gradativo da capacidade vesical e maturação dos lobos frontal e parietal. O controle total urinário ocorre, em maioria, aos 4 anos e meio de idade, a partir daí, tanto a continência urinária como a micção, ambas são governadas por uma integração complexa entre sistema somático medular e parassimpático, por intermédio do nervo pudendo (S2-S4), do simpático pelo plexo nervoso hipogástrico (T11-L2) e pelos centros nervosos supramedulares (BADAWI, et al., 1974; BRADLEY et al., 1978; GROAT, 1997; TANAGHO, et al., 1969). O centro parassimpático sacral promove a principal excitação na bexiga, neurônios pré-ganglionares colinérgicos localizados na região intermédia lateral da coluna espinal sacral enviam axônios, via nervos pélvicos para células ganglionares no plexo pélvico e nas paredes da bexiga, onde receptores parassimpáticos estão localizados em toda a musculatura vesical e uretra proximal e os simpáticos no colo vesical, uretra proximal e corpo vesical. O músculo detrusor é innervado primariamente pelo sistema nervoso parassimpático e a base da bexiga, colo vesical e esfíncter muscular liso pelo sistema nervoso simpático (alfa-adrenérgico) como evidenciado por Resnick et al. (1985). O circuito reflexo que controla a micção consiste de quatro componentes básicos: neurônios espinais eferentes, interneurônios espinais, neurônios primários aferentes e neurônios cerebrais, que modulam as vias reflexas espinais (GROAT, 1997). Segundo Feneley et al. (1982) durante o enchimento da bexiga as contrações do detrusor são inibidas e durante o esvaziamento a

contração detrusora é associada com o relaxamento do esfíncter uretral até ocorrer o completo esvaziamento da bexiga. O relaxamento do detrusor é realizado pela inibição do tônus parassimpático através do sistema nervoso central, o fechamento dos esfíncteres é mediado pelo aumento reflexo alfa-adrenérgico e atividade somática, por outro lado, a contração detrusora é mediada pelo sistema nervoso parassimpático, e o relaxamento dos esfíncteres requerem a inibição de impulsos nervosos somáticos e simpáticos para a saída da urina. A mútua relação entre o detrusor e o escoamento da urina é coordenado pelo centro da micção na ponte, e os centros do sistema nervoso central, no córtex e diencéfalo, também permitem um reflexo contrátil de detrusor em resposta a distensão da bexiga.

Assim como ocorrem mudanças estruturais em todo o organismo com o envelhecimento, o mesmo também acontece com as estruturas do trato urinário inferior, Chun et al. (1988) observaram que em ratos velhos, o peso da bexiga urinária aumentou 20% enquanto sua complacência diminuiu, Susset (1983) através de evidências bioquímicas sugeriu mudanças significativas no tecido conjuntivo de bexigas urinárias de indivíduos idosos, onde o conteúdo colágeno aumentou em 30%, sendo que algumas possibilidades colocam o detrusor ou a submucosa como locais onde ocorrem estes aumentos. Em bexigas urinárias de indivíduos idosos, Levy et al. (1990) descreveram a presença de aglomerações eletrodensas e fibras elásticas, ambas associadas com células musculares, assim como a presença de células musculares lisas fragmentadas.

Em alguns casos as funções do trato urinário inferior podem estar alteradas para estados patológicos, como em situações de aumento da pressão interna da bexiga acima da pressão que mantém a uretra ocluída, resultando em um processo patológico denominado de incontinência urinária, ou seja, uma perda involuntária de urina em que geralmente há uma deficiência ou ausência de atividade detrusora e/ ou eventos que a pressão uretral é sobre ativa ou incompetente, sendo assim estas alterações sempre resultarão em pressões intra-vesical e

uretral alteradas (FENELEY et al., 1982). Alguns autores (BROCKLEHURST et al., 1968; WILLINGTON et al., 1969), consideram que a incontinência urinária não é uma consequência inevitável do aumento da idade, mas sim em alguns casos, consequência de estados patológicos, sem descartar que o envelhecimento pode afetar o trato urinário de várias maneiras. Resnick et al. (1985) descreve que no indivíduo idoso a capacidade da bexiga, a habilidade para diferir o esvaziamento, a complacência da bexiga e uretra, pressão de fechamento uretral, e a taxa de fluxo urinário são todos provavelmente reduzidos, por outro lado, o volume urinário residual pós-esvaziamento da bexiga e a prevalência para desinibir a contração do detrusor são aumentados, onde cada uma dessas mudanças predispõe para a incontinência, mas nenhuma sozinha irá desenvolvê-la ou antecipá-la. Para Jørgensen et al. (1993) o aparecimento destas condições está associado ao aumento da probabilidade de que uma pessoa idosa é submetida a patologias, problemas psicológicos e uso de fármacos, fazendo com que ocorra uma maior incidência de incontinência urinária no idoso, ao mesmo tempo, podem ocorrer alterações variáveis em relação à taxa de fluxo urinário com o aumento da idade, mesmo em indivíduos normais, Jørgensen et al. (1993). Tortora (2007) descreve que lesões à inervação que controla a bexiga urinária, perda da flexibilidade da bexiga com o envelhecimento, doença ou irritação da bexiga urinária e/ ou uretra, danos ao esfíncter externo da uretra e determinados medicamentos, podem levar à condição de incontinência urinária.

2.1 Elementos Estruturais

Dentre os elementos estruturais da junção vésico-uretral estão as fibras musculares lisas, fibras colágenas e fibras elásticas. Dass et al. (1999) em trabalho com imagens computadorizadas quantificaram as fibras elásticas em secções realizadas na base da bexiga,

JVU e uretra de cobaias (machos e fêmeas) observando que há um aumento significativo de fibras elásticas circularmente dispostas na JVU, em relação às outras duas regiões examinadas. Os autores relataram que esta disposição particular das fibras elásticas pode ser parcialmente responsável pela elasticidade e plasticidade da JVU, permitindo a sua expansão e recuo rápido com o fluxo da urina. Mencionaram ainda que as fibras elásticas presentes na JVU possam ser parcialmente responsáveis pela força oclusiva e passiva nesta região.

Para alguns pesquisadores, o tecido fibroelástico assumiu o papel de ser o principal fator na geração da pressão de fechamento da uretra e da JVU em repouso, onde Awad e Dawnie (1976) depois de eliminar os fatores neurais responsáveis pela pressão intrauretral observaram uma pressão residual. Esta descoberta foi confirmada por Bump et al. (1988) demonstrando que os elementos fibroelásticos apresentaram efeitos na pressão uretral com perfil equivalente ao mostrado pela camada vascular.

Gosling et al. (1983) sugeriram que as inúmeras fibras elásticas observadas por Lápides, 1958, nas junções vésico-uretrais de uretras humanas femininas, eram importantes no fornecimento de oclusões passivas para a luz da uretra. A presença de fibras elásticas na JVU e a relevância destas para manter a continência foram também descritas e comentadas por Woodburne (1961).

2.2 Sistema elástico – fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas

O sistema elástico é o principal componente da matriz extracelular que dá ao tecido conjuntivo resiliência, permitindo grande deformação e recuo passivo sem perda de energia, sendo estas propriedades importantes para a função de algumas estruturas como as artérias, as quais sofrem repetidas ações de extensão e recuo, pulmões, pele e outros tecidos conjuntivos dinâmicos, assim esta função elástica é complementar às fibrilas colágenas que concedem

resistência à tração aos tecidos, Kielty et al. (2002). As fibras do sistema elástico compreendem elementos amorfos e fibrosos (GREENLEE et al., 1966) com aproximadamente 0,2 a 1,5 μm , podendo se ramificar e anastomosar (RICHARDS, 1902¹ APUD USHIKI, 2002); (ROSS, 1973) para formar uma firme cadeia nos tecidos conjuntivos frouxos, e em tecidos elásticos densos as fibras elásticas se fundem para formar lâminas achatadas (RICHARDS et al., 1902 APUD USHIKI, 2002). Ross (1973) descreveu que as fibras elásticas são estruturas extensíveis podendo ser estiradas 1/3 e meio do seu comprimento e quando relaxam retornam ao seu comprimento normal, sendo que estas fibras quando contraídas em sua estrutura se retorcem e se encurtam concedendo ao tecido onde está presente uma flexibilidade dinâmica.

Estudos sob microscopia de luz e eletrônica permitem distinguir no sistema elástico, três tipos de fibras – oxitalânicas, elaunínicas e elásticas maduras ou elásticas, com propriedades ultraestruturais diferentes (AVERY et al., 1980; CARVALHO et al., 1996; COTTA-PEREIRA et al., 1977; FULLMER et al., 1960; GAWLIK, 1965; GREENLEE et al., 1966; SACHETTI, 1996; SAKAY et al., 1986; SAWADA et al., 2006) sendo que esses três diferentes tipos de fibras pertencem a uma série contínua, em ordem cronológica, que estão ligadas ao fenômeno da elastogênese (BRADAMANTE et al., 1977; SAGE et al., 1979). Albert (1972) sugere que a forma prematura ou precursora da elastina é uma estrutura fibrilar, e mais tarde no desenvolvimento, a morfologia convencional do tecido elástico começa a se manifestar na forma de material amorfo embebido em uma massa fibrilar e como maturação progressiva do tecido elástico, a quantia de material amorfo aumenta e de material fibrilar diminui, sendo então esta maturação formada, quase que exclusivamente, por componente amorfo. Do mesmo modo, Farrenbach et al. (1966); Gawlik (1965) em estudo sobre a ultraestrutura do desenvolvimento das fibras elásticas, afirmam que o primeiro componente

¹ RICHARDS, A. N.; GIES, W. J. Chemical studies of elastin, mucoid, and other proteids in elastic tissue, with some notes on ligament extractives. The American Journal of Physiology, v. 7, p. 93-134, 1902.

formado durante a elastogênese é a fibra oxitalânica, formada por microfibrilas sintetizadas e secretadas por fibroblastos no meio extra celular, onde essas microfibrilas estão dispostas em feixes paralelos indicando a direção e a forma da futura fibra elástica. Em seguida, pequena quantidade de substância amorfa, elastina, se adere a essas microfibrilas, formando o segundo componente do sistema elástico: a fibra elaunínica, com o acúmulo de maior quantidade de elastina entre as microfibrilas, a fibra se torna espessa e aparece o terceiro componente do sistema elástico: as fibras elásticas maduras, em que a presença dos três componentes do sistema elástico nos tecidos indica uma elastogênese completa. Em certos tecidos, de indivíduos adultos, feixes de microfibrilas desprovidos de material amorfo (fibras oxitalânicas) e feixes de microfibrilas entremeados com material amorfo (fibras elaunínicas) estão presentes, e mesmo no estado de completa maturação, essas fibras não atingem o desenvolvimento completo da fibra elástica. Estas observações mostram que nem todos os feixes de microfibrilas são destinados a servirem de molde para a deposição de elastina e conversão em fibras elásticas maduras. Conclui-se então que um feixe de microfibrilas pode ser um progenitor para a maturação completa (em tecidos fetais) ou uma entidade independente do tecido conjuntivo (fibra oxitalânica), como mencionado por Cotta-Pereira et al. (1976). Gawlik (1965) demonstra através de estudo em aortas fetais e de recém-nascidos humanos, que as fibras que surgem inicialmente são as oxitalânicas e após, estas adquirem características de elaunínicas e finalmente formam-se lâminas de fibras elásticas maduras assim, estas fibras representam etapas evolutivas da elastogênese. Cotta-Pereira et al. (1975) em estudo do componente elástico em pele humana, demonstrou que durante a elastogênese o componente fibrotubular aparece antes do material amorfo, sendo possível relacionar os fibrotúbulos observados na derme superficial com fibras elásticas jovens destituídas de elastina. Baseados em observações ultra-estruturais, os autores concluem, que as fibras superficiais da derme (oxitalânicas) possuem apenas constituição fibrotubular e as fibras

elaunínicas têm características intermediárias entre as oxitalânicas e as elásticas maduras. Fullmer et al. (1960) propõem que o termo fibra oxitalânica seja usado para designar as fibras elásticas presentes em áreas, que na fase adulta não possuem as características da fibra elástica madura, e o termo fibra pré-elástica para aquelas que iriam adquirir características de fibra elástica madura.

As fibras oxitalânicas são constituídas por microfibras de 10 a 16 nm de espessura, agrupados paralelamente, com aproximadamente 150 Å de diâmetro, sendo que, o componente amorfo e fibrotubular destas fibras são diferentes dos presentes nas fibras elásticas maduras (AVERY et al., 1980; CARVALHO et al., 1996). Sakay et al. (1986); Sawada et al. (2006) também descreveram que as fibras oxitalânicas são constituídas por feixes amplos de microfibrilas, os quais não estão associados a elastina, sendo constituídas por várias glicoproteínas, incluindo a fibrilina, e componente amilóide P. Estas fibras foram reconhecidas e individualizadas pela primeira vez, sob microscopia de luz, por Fullmer e Lillie (1958). Ao estudarem tecidos humanos, do rato, do camundongo, da cobaia e do macaco afirmaram que as fibras oxitalânicas são encontradas somente nas membranas periodontais, tendões, ligamentos, adventícia de vasos sanguíneos, bainhas de tecido conjuntivo dos anexos da pele, epineuro e perineuro, sugerindo uma distribuição restrita ao local onde o tecido conjuntivo é submetido à tensão. Goldfischer, et al. (1983) observaram microfibrilas (fibras oxitalânicas) em aortas, arranjadas em feixes retos ou curvos e anastomosados, servindo para limitar a membrana plasmática de algumas células murais. Alguns trabalhos inferem possíveis funções das fibras oxitalânicas como ancoragem, manutenção da elasticidade, guia para migração celular, estabilização de vasos sanguíneos e regularização do fluxo sanguíneo (BEERTSEN et al., 1974; EVERTS et al., 1998; FULLMER et al., 1974; SAKAI et al., 1986; SIMS et al., 1973, 1975; TAKAGI et al., 1989). Esses autores também citam que estas fibras podem ser evidenciadas pelos métodos de

coloração da resorcina-fucsina e da aldeído-fucsina após prévia oxidação com oxona, e que as mesmas por apresentarem resistência à hidrólise ácida são denominadas de oxitalânicas e como evidenciado por Sculean et al. (1997) sem prévia oxidação, as fibras oxitalânicas não podem ser demonstradas através de nenhum método de coloração. Junqueira e Carneiro (1999) citam que sob o aspecto ultra-estrutural, as fibras oxitalânicas são constituídas exclusivamente de microfibrilas sem elastina.

As fibras elaunínicas foram, inicialmente, evidenciadas à microscopia de luz por Gawlik (1965) através da coloração resorcina-fucsina e aldeído-fucsina sem prévia oxidação. Cotta-Pereira et al. (1977) verificaram sob microscopia eletrônica de transmissão, que essas fibras apresentam-se formadas por feixes de microfibrilas dispersos em material amorfo constituído por elastina. Descrevem também, que as fibras elaunínicas são mais espessas que as oxitalânicas, com disposição tortuosa ou em espiral e seu diâmetro e comprimento variam com as características do tecido ao qual pertencem, refletindo sua adaptação funcional.

Segundo Junqueira e Carneiro (1999) as fibras elásticas maduras são constituídas por uma grande quantidade de elastina e uma proporção muito menor de microfibrilas, sendo a elastina uma glicoproteína estrutural. Greenlee et al. (1966) descreve que estas fibras contêm dois componentes morfológicos, onde se observa uma região central ampla “núcleo” circundada por uma fina camada de fibrilas, cada qual com 100Å de diâmetro aproximadamente. As fibras elásticas maduras podem ser evidenciadas à microscopia óptica após coloração com resorcina-fucsina e aldeído-fucsina e também pelo método da hematoxilina férrica que é exclusivo para estas fibras (VERHOEFF, 1908).

O sistema elástico, em trabalhos prévios, foi evidenciado através da microscopia de transmissão usando-se a técnica do ácido tânico. Kajikawa et al. (1975) utilizando esse ácido como corante dos preparos histológicos, relataram que o mesmo marca o componente amorfo das fibras elásticas intensamente, Souza et al. (1996) adicionaram ácido tânico (0,1%) ao

fixador (glutaraldeído 3%), obtendo uma coloração de vários componentes do tecido conjuntivo de corações humanos, incluindo as fibras elásticas. De acordo com Cotta-Pereira et al. (1976) uma visualização uniforme e fiel das fibras elásticas é alcançada se o fixador (glutaraldeído) conter ácido tânico, onde haverá um aumento da densidade eletrônica da elastina e microfibrilas, sendo possível distinguir fibras elásticas maduras e elaunínicas, onde estas se apresentam formadas por porções de material amorfo circundado por feixes de microtúbulos e aquelas se apresentam espessadas e com componente amorfo mais compacto e abundante. Sacchetti (1996) em estudo do sistema elástico da cápsula esplênica, utilizou o método do ácido tânico (0,25%) diluído em glutaraldeído (3%) em tampão fosfato 0,1M (Ph 7,4) como fixador para microscopia de transmissão, e descreveu que as fibras elásticas maduras apresentaram seu material amorfo fortemente eletrodense circundado por um sistema de microfibrilas, as fibras elaunínicas com escassa substância amorfa dispersas em meio ao componente microfibrilar e por sua vez, fibras oxitalânicas representadas por pequenos feixes de microtúbulos.

Carvalho et al. (1996) descrevem que segundo Mander et al. (1985) e Uitto (1977), os vários tipos de fibras do sistema elástico também podem ser diferenciados por meio de sua composição química, e esta é distinta entre os tipos de fibras do sistema elástico, o que explica as diferentes reações aos métodos de coloração. Segundo Böck et al. (1984) os parâmetros usados para diferenciar fibras elaunínicas de elásticas maduras são baseados no diâmetro da fibra e variação nas distribuições de microfibrilas e elastina.

A arquitetura das fibras elásticas é altamente específica ao tecido onde está presente, refletindo funções específicas em diferentes tecidos como, por exemplo, devido ao seu arranjo nas paredes dos vasos sanguíneos, estas fibras concedem elasticidade e resiliência ao local; nos pulmões o sistema elástico está presente nas paredes dos vasos sanguíneos e ao longo de toda a árvore respiratória, auxiliando na expansão e recuo alveolar durante a respiração, já na

pele formam uma cadeia contínua fornecendo elasticidade para todas as suas porções de derme para epiderme (KIELTY et al., 2002). As propriedades elásticas do sistema elástico estão relacionadas ao seu maior ou menor conteúdo de elastina (COTTA-PEREIRA et al., 1977), onde a diferença na distribuição das fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas nos tecidos, sugerem que há diferença na qualidade da elasticidade (ROSS et al., 1969), em que mesmo em regiões teciduais próximas a distribuição das fibras elásticas pode não ser homogênea, como observado por Chopard et al. 2000 nos três segmentos da artéria anterior cerebral no homem. Dependendo do tecido onde estão presentes, as fibrilas de elastina podem se apresentar individualmente ou em feixes, se estiverem em feixes podem formar fibras ou lâminas de elastina (USHIKI et al., 1991), esta organização da elastina em fibras ou lâminas aparentemente influenciam na resiliência tecidual quanto as suas propriedades mecânicas. As fibrilas de elastina e as microfibrilas presentes nas fibras oxitalânicas, elaunínicas e elásticas maduras do sistema elástico, formam em conjunto um sistema microfibrila-elastina, o qual representa o papel de um distribuidor uniforme das forças de tensão no tecido e mantenedor de resiliência se adaptando conforme a exigência tecidual, sendo que, neste sistema as microfibrilas estão usualmente presentes ao redor das fibras de elastina, estando arranjadas coincidentemente a elas, assim, quando as fibras de elastina são estiradas, as microfibrilas mudam de direção junto com a elastina em resposta a este estiramento. As microfibrilas podem também partir das fibras de elastina para formar feixes ou emaranhados nos tecidos onde estão presentes, Ushiki (2002). As fibras elásticas cedem facilmente mesmo a trações mínimas, porém retomam a sua forma inicial tão logo cessem as forças deformantes, ou seja, elas conferem a propriedade de recuo elástico para locais cuja habilidade para funcionar efetivamente exige extensibilidade reversível, sendo que a elastina constitui o primeiro componente de suporte de tensão e é responsável pelo restabelecimento do arranjo da forma tecidual após a deformação, como descrito por Buckwalter et al. (1976). As fibras oxitalânicas

não se alongam sobre mecanismos de estresse/tensão (ROSS, 1973), e por isso essas fibras estão presentes onde o tecido é submetido ao stress como no periodonto (FULLMER et al., 1978), junção derme-epiderme (COTTA-PEREIRA et al., 1976), em que estas fibras previnem um superestiramento do tecido, onde as microfibrilas possuem função de ancoragem (GIBSON et al., 1987). As fibras elaunínicas, que contém feixes de microfibrilas e pouco material amorfo, possuem propriedades intermediárias entre as fibras elásticas maduras e oxitalânicas (COTTA-PEREIRA et al., 1984). Sawada et al. (2006) em estudo do ligamento periodontal na região molar de ratos, afirmou que as fibras elaunínicas presentes estavam em áreas mais expostas à tensão mecânica, sendo que o sistema elástico da área estudada tem papel fundamental na proteção e manutenção da integridade vascular durante a mastigação. Paniagua et al. (1983) em estudo do sistema elástico no ducto deferente, em humanos, observou que as fibras elásticas aparecem na lâmina própria da estrutura e formam duas camadas, uma interna com estrias paralelas e longas, as quais se interconectam por delicados ramos e penetram na prega epitelial, a outra camada é formada por uma malha irregular e é menos densa que a interna, sem limites definidos, podendo se misturar com as fibras elásticas da camada interna ou com a camada muscular, já na microscopia eletrônica foi observado grupos de microfibrilas localizados entre fibras colágenas da lâmina própria e nos espaços intercelulares da camada muscular, pouca massa de elastina também foram encontradas entre as microfibrilas, verificou-se também que as fibras elásticas no ducto deferente aparecem apenas na puberdade, quando esta estrutura se torna funcional, sugerindo o importante papel do sistema elástico no funcionamento desta estrutura, como também em outras estruturas tubulares do trato urinário, glândulas mamárias e ducto prostático, os quais contém muitas fibras elásticas. Gawlik (1965) afirma que, a ocorrência de elementos elásticos está restrita aos órgãos que estão sujeitos ao estiramento bi ou multi-direcional. Carvalho et al. (1997) reportam que o trabalho das microfibrilas é muito importante no fornecimento de

complacência ao tecido durante a contração da musculatura lisa e restabelecimento elástico da morfologia após forças compressivas, sendo que isto não é somente resultado da extensibilidade resultante da associação elastina – microfibrilas, mas também da flexibilidade de rearranjo e organização. Costa et al. (2004) em estudo sobre hiperplasia prostática, relata que uma constante remodelação do componente elástico também ocorre devido a uma elevada variação da densidade volumétrica de tais fibras. Segundo Karlinsk et al. (1976) os elementos fibrosos (colágeno e elastina) dos tecidos conjuntivos têm função de preenchimento, enquanto o componente microfilamentoso representa um elemento capaz de sustentar as variações de distensão do tecido garantindo sua integridade.

Estudos experimentais têm sido realizados em vários tecidos com relação às modificações que ocorrem no sistema elástico com o envelhecimento, pois as fibras elásticas são designadas para manter a função elástica do tecido por toda a vida, entretanto várias enzimas são capazes de fazer a quebra das moléculas das fibras elásticas levando à perda de elasticidade devido a essas mudanças degradativas que ocorrem quando há o envelhecimento do tecido conjuntivo (ASHWORTH et al., 1999² e KIELTY et al., 1994³; APUD KIELTY et al., 2002). Niewoehner, et al. (1977) verificou em pulmões humanos, que em idades avançadas o número total de fibras elásticas continuavam presentes, sendo que em média o calibre dessas fibras continuou aumentando com a idade, não excluindo a possibilidade de que ocorre nova síntese de fibras, em taxas iguais, as que são destruídas. Carvalho et al. (1996) relataram que, durante o processo de envelhecimento diversas alterações têm sido evidenciadas no sistema elástico em relação a sua morfologia, composição química e quantidade de fibras. Em estudo do sistema muscular no colo vesical, Rother et al. (1996) observaram que o volume das células muscular e das fibras diminui por volta de 2% a cada 10

² ASHWORTH, J. L.; KELLY, V.; ROCK, M. J. Regulation of fibrillin carboxy-terminal furin processing by N-glycosylation, and association of amino- and carboxy-terminal sequences. *Journal of Cell Science*, v. 112, p. 4163-4171, 1999.

³ KIELTY, C. M.; WOOLEY, D. E.; WHITTAKER, S. P. Catabolism of intact fibrillin microfibrils by neutrophil elastase, chymotrypsin and trypsin. *FEBS Letters*, v. 351, p. 85-89, 1994.

anos. Souza et al. (1996) em estudo das fibras elásticas no coração humano, descreveram que há uma diferença na quantidade e estrutura destas fibras entre crianças, adultos e velhos, onde o comprimento das fibras por unidade de volume permanece constante da criança para o adulto e aumenta do adulto para o velho, demonstrando uma constante degradação de elastina ao longo da vida, para Sephel et al. (1986) e Uitto (1988) com o avanço da idade ocorrem um declínio nas taxas de biosíntese de elastina. Gogly et al. (1997) em estudo de pele e gengiva humana, observaram que com o envelhecimento as fibras oxitalânicas, presentes nessas estruturas, tornam-se irregulares e curtas, as fibras elaunínicas são fragmentadas e as fibras elásticas maduras aparecem dispersas, fragmentadas e espessadas. Na fáscia transversal do triângulo inguinal em humanos, observado por Rodrigues, Jr. et al. (1990) também foram evidenciadas fibras elásticas, sendo que, em pacientes jovens, os microfilamentos das fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas são mais distintos, onde este componente microfilamentoso diminui com a idade por volta dos 50 aos 60 anos e continua diminuindo com intensidade por volta dos 70 aos 80 anos de idade, evidenciando-se também um aumento na quantidade de material amorfo, onde este se apresentou fragmentado, mostrando assim, ultra estruturalmente, que com o aumento da idade há uma diminuição de fibras oxitalânicas e um aumento de fibras elásticas maduras. Sculean et al. (1997) em estudo do ligamento periodontal em macacos, revelou que as fibras oxitalânicas estavam presentes em ligamento periodontal recém-formado, atribuindo que estas fibras possuem um potencial de regeneração. Chopard et al. 1998 em avaliação dos segmentos proximal e distal da artéria basilar, em homem, verificou em diferentes faixas etárias uma diminuição das fibras do sistema elástico, onde ocorreu perda de fibras oxitalânicas em indivíduos de 20-50 anos quando comparados com indivíduos de 0-1 ano de idade, as fibras elaunínicas diminuíram apenas após os 50 anos e com as elásticas maduras houve um decréscimo das mesmas na primeira (0-1 ano) e na segunda (20-50 anos) faixas etárias, permanecendo estável na terceira faixa etária (mais de 51

anos). Barros et al. (2002) observaram em ligamentos interespinais, que com o envelhecimento, as fibras do sistema elástico mostraram-se, em sua maioria, curtas, espessadas, trançadas e agrupadas, e algumas fibras se apresentaram alongadas e finas, sendo que o grande número de fibras elásticas fragmentadas e degeneradas, presentes nos ligamentos com o aumento da idade, promovem uma perda da complacência normal do tecido, não obstante com as mudanças estruturais, revelou-se que com o envelhecimento houve uma indução no desaparecimento de fibras oxitalânicas, as quais são responsáveis pela resistência tecidual.

Paniagua et al. (1983) através de observações eletromicroscópicas de ductos deferentes, relatou que com o aumento da idade há um aumento da substância amorfa, que forma amplas massas estruturais contendo abundante inclusão eletrodensa e áreas de rarefação, enquanto que as microfibrilas tornam-se gradualmente menos numerosas, onde também há uma fragmentação e desorganização das fibras elásticas, sugerindo assim que com o envelhecimento há uma diminuição da síntese de glicoproteína estrutural (microfibrilas), conseqüentemente as fibras elásticas tornam-se mais susceptíveis à ação da elastase, ficando totalmente desintegradas em idades mais avançadas. Chopard et al. 2000 relataram que em dois segmentos da artéria cerebral anterior, no homem, houve aumento de fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas com o envelhecimento, enquanto que em um terceiro segmento desta artéria, as fibras mostraram-se diminuídas em seu contingente.

3 PROPOSIÇÃO

Utilizando a microscopia de luz e eletrônica de transmissão, foi estudada a junção vésico-uretral de ratos em diferentes faixas etárias verificando a participação dos sistemas fibrosos elásticos nesta estrutura, objetivando:

1. Qualificação das fibras do sistema elástico através de microscopia de luz;
2. Tipificação ultraestrutural do sistema de fibras elásticas através de microscopia eletrônica de transmissão;
3. Quantificação do sistema de fibras elásticas através de estudo histomorfométrico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Para a realização dos experimentos foram utilizados 27 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, mantidos em condições controladas de temperatura (21° C) e de iluminação (12 horas de luz / 12 horas de escuro), com ração balanceada⁴ e água a vontade, sem restrições nutricionais. Os animais foram divididos em 3 grupos distinguidos por diferentes faixas etárias, sendo 9 animais por grupo:

Grupo Neonato (21 dias);

Grupo Adulto (200 dias);

Grupo Velho (450 dias).

O material de estudo será obtido através da remoção da junção vésico-uretral contendo o colo vesical, orifícios uretéricos e uretra proximal.

4.2 Métodos

4.2.1 Microscopia de luz:

Para obtenção do material de estudo para a microscopia de luz⁵, foram utilizados 5 animais de cada grupo, onde estes foram anestesiados através de injeção intraperitoneal com o uso de coquetel anestésico (40% água destilada + 25% quetamina + 25% xilazina + 10%

⁴ Ração Nuvilab CR1/Nuvital

⁵ Leica Wild MPS 52

acepromazina) em que os batimentos cardíacos foram mantidos até a perfusão⁶ do animal. Para a perfusão foi realizada a abertura da cavidade torácica para exposição do coração, após foi introduzido no ventrículo esquerdo uma cânula metálica e o átrio direito foi aberto para fazer o escoamento do sangue e da solução salina, esta foi injetada através da bomba de perfusão e uma cânula metálica acoplada com o objetivo de lavar o sistema sanguíneo evitando a formação de coágulos, posteriormente ao uso da solução salina e com o mesmo método, foi utilizado uma solução de formaldeído a 10% para promover uma primeira fixação da estrutura almejada. Após o completo proceso de perfusão, a parede abdominal foi aberta através de laparotomia e iniciou-se a dissecação das estruturas até a visualização da bexiga urinária, ureteres e uretra proximal. Removemos o bloco bexiga urinária, ureteres intravesicais e uretra proximal, o qual foi dissecado até a obtenção da JVU, contendo também o óstio interno da uretra e óstios uretéricos com o auxílio de microscópio estereoscópico⁷. Após fixação, o material obtido foi lavado em água corrente por três minutos e ficou embebido em álcool 70% por 12 horas, sendo processado na sequência através de desidratação em série crescente de álcoois (95%I, 95%II, absoluto I, II e III), então, seguiu-se com a diafanização das peças utilizando Xilol I, II e III. Após, as peças passaram por 3 banhos de parafina, de 30 minutos cada, foram incluídas em blocos de parafina de acordo com as técnicas convencionais. Os blocos preparados foram seccionados em micrótomo⁸ com obtenção de cortes transversais semi-seriados com 5 µm de espessura. Estes cortes foram preparados em lâminas histológicas e corados pelos seguintes métodos:

- Hematoxilina férrica (Verhoeff, 1908): para evidênciação de fibras elásticas maduras;

⁶ Bomba de Perfusão Masterflex Pump Controller

⁷ Stemi SV6 Zeiss Germany

⁸ Leica RM 2145

- Resorcina-fucsina (Weigert, 1898): para evidênciação de fibras elásticas e elaunínicas;
- Resorcina-fucsina (Weigert, 1898) após oxidação com solução aquosa a 1% de oxona: para evidênciação de fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas.

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão:

Para o estudo ao microscópio eletrônico de transmissão^{9, 10} foram utilizados materiais obtidos de 4 animais de cada grupo, onde o anestésico e o método de perfusão utilizado foram os mesmos para a microscopia de luz, exceto o fixador, onde neste caso utilizamos glutaraldeído a 25%. Após laparotomia e obtenção das peças (idem microscopia de luz), os segmentos selecionados contendo a junção vésico-uretral foram reduzidos utilizando uma navalha e fixados durante 3 horas a 4° C em solução de glutaraldeído a 2,5% e ácido tânico a 0,25%, em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). As amostras receberam cuidadosa lavagem com tampão fosfato a 0,1M (pH 7,4) e seguiu-se a pós-fixação das mesmas em tetróxido de ósmio a 2% durante 2 horas a 4° C. As peças foram lavadas em solução salina e colocadas em solução de uranila 0,5% por 12 horas em temperatura ambiente. Após este período o material em estudo foi novamente lavado em solução salina e iniciou-se o processo de desidratação em séries crescentes de álcoois - 70°, 80°, 95° - banho de 15 minutos cada, 100° - 4 banhos de 15 minutos cada, e dois banhos de óxido de propileno 99% por 15 minutos cada. Depois da passagem em óxido de propileno, as amostras foram colocadas em uma mistura de resina e óxido de propileno na proporção de 1:1. A infiltração foi feita agitando-se o material em rotação (1/2 r.p.m), em suporte com 45° de inclinação em relação ao solo, acoplado a um eixo de motor elétrico, durante 4 horas. Após este período, foi trocada esta mistura por resina pura

⁹ Leo 906 – Instituto Butantan, São Paulo

¹⁰ Jeol Jem 1010 – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo

e novamente o material foi colocado em rotação por mais 12 horas. Novamente a resina foi trocada por resina pura e ficou em estufa a 37° C por 1 hora; após as peças foram incluídas em resina spurr¹¹, mantendo-se na estufa por 5 dias a 60° C. Foram utilizados cortes semi-finos de 400 µm obtidos em ultra- micrótomo¹², corando os cortes com azul de toluidina para localizar as estruturas em estudo. Depois de localizadas, foram feitos cortes ultra-finos em ultra-micrótomo¹³ coletados com uma tela de 200 mesh e constraçados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Então as amostras foram fotografadas através de microscópio eletrônico de transmissão, para análise das diferenças dos componentes ultraestruturais entre fibras oxitalânicas, elaunínicas e elásticas maduras dos grupos neonato, adulto e velho.

4.2.3 Histomorfometria:

O estudo histomorfométrico do sistema elástico foi realizado através do cálculo da densidade linear (LD). O comprimento das fibras do sistema elástico é obtido pela fórmula $L=2Q \times EV$ (L = comprimento de fibras por unidade de volume, Q = número de intersecções de fibras elásticas em uma secção plana e EV é a unidade de volume).

A densidade linear (LD) dos sistemas fibrosos elásticos avalia o comprimento total das fibras elásticas no tecido. Esta é a base fundamental para a avaliação histomorfométrica aplicada a sistemas fibrosos (NIEWOEHRNER e KLEINERMAN, 1977).

A estimativa para se obter a Densidade Linear (LD) é dada pela fórmula $LD = 2XC/A$, sendo **A**: área total examinada em campos; **C**: número de intersecções das fibras com as retas paralelas do sistema teste. Para se obter serão utilizadas as seguintes relações:

$$At = L \times d \times p \times m$$

¹¹ Spurr Embedding Kit / Ladd, Burlington, Vermont

¹² Sorvall MT2-B

¹³ Leica Ultracut UCT

$$f = Pu/p \times m$$

$$A = At \times f$$

At = área total do sistema-teste;

A = área total examinada em m campos;

L = comprimento do segmento de reta do sistema-teste;

D = distância entre as retas do sistema-teste;

P = número de pontos do sistema teste;

M = número de campos estudados;

f = fator de correção para amostras não-homogêneas;

Pi = pontos incidentes da túnica média;

Pu = número total de pontos do sistema teste;

C = número de intersecções das fibras elásticas com as retas paralelas do sistema-teste.

Foram estudados 50 campos, em cortes histológicos aleatórios, de cada animal nas três faixas etárias (neonato, adulto e velho) para cada coloração utilizada (Verhoeff, Weigert e Weigert-Oxona), através do uso de um sistema teste, onde as secções histológicas da junção vésico-uretral foram analisadas ao microscópio de luz com objetiva de luz de 100x em imersão ocular de compensação Kf 10x18, em graticulo de integração¹³ de 400 pontos (sistema teste), ¹⁴exibindo 20 linhas paralelas, sendo a densidade (D) entre as linhas de 4,94 μm , entre os pontos de 5 μm e a área total de 386250 μm^2 .

As análises estatísticas dos valores da LD foram obtidos através da análise de variância (ANOVA) com um fator idade seguida de comparações múltiplas pelo método de Tukey. A suposição de homogeneidade de variâncias foi verificada e o nível de significância adotado foi $p < 0.05$. Os valores da densidade linear também foram expressos através de um modelo de regressão quadrática usando a seguinte equação: $LD = \alpha + \beta \times \text{idade} + c \times \text{idade}^2$,

¹⁴ Wild Leitz 6MBH

obtendo assim um coeficiente de correlação (r), que deve ser entre 1 e -1, relacionando a LD em função da idade.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo Histológico

As análises de nossos resultados referentes ao estudo histológico mostram a presença dos três tipos de fibras do sistema elástico em todas as faixas etárias estudadas, estas estão distribuídas em toda a junção vésico-uretral, na camada muscular que está localizada logo abaixo da lâmina própria do epitélio. As fibras elásticas aparecem tanto na camada superficial como na camada profunda da muscular e também nas regiões onde circunda os óstios uretéricos e o óstio uretral. A orientação das fibras elásticas na JVU é longitudinal e oblíqua e às mesmas não estão arranjadas em lâminas ou feixes, aparecendo de forma dispersa na camada muscular da JVU. Dentre as colorações utilizadas, todas evidenciaram de forma satisfatória e específica às fibras do sistema elástico, ou seja, quanto à especificidade as colorações de Verhoeff (hematoxilina férrica) destacou as fibras elásticas maduras, de Weigert (resorcina-fucsina) as fibras elásticas maduras e elaunínicas e de Weigert-Oxona (resorcina-fucsina, com prévia oxidação) evidenciou as fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas.

As preparações histológicas que demonstram as fibras do sistema elástico na junção vésico-uretral, obtidos pelos métodos de coloração Verhoeff, Weigert e Weigert-Oxona, são mostradas nas figuras de 1 a 9.

5.2 Estudo Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a realização do estudo através da microscopia eletrônica de transmissão foram realizados cortes transversais na JVU, em que observamos a ultra-estrutura dos três tipos de

fibras do sistema elástico, onde através da técnica do ácido tânico tipificamos as mesmas. A análise deste estudo, representado pelas figuras de 10 a 33, demonstra que as fibras elásticas maduras são formadas por componente material amorfo eletrodenso, compacto e abundante (elastina), as fibras elaunínicas por escasso material amorfo (elastina) e componente microtubular em maior quantidade e as oxitalânicas compostas apenas por componente microtubular formando feixes e dispostos paralelamente não estando associados a elastina. Essas fibras mostraram-se orientadas longitudinalmente, obliquamente e circularmente, formando um emaranhado, entre os espaços intercelulares da camada muscular e também entre os feixes de fibras colágenas. Verificamos que no grupo neonato ocorre uma transição de fibras oxitlânicas para elaunínicas; elaunínicas para maduras, caracterizando as etapas da elastogênese (Figuras 18 e 19), no grupo velho observamos a presença de fibras elásticas maduras irregulares e degradadas (Figuras 28 e 30).

Figura 1 – Fotomicrografia da JVU, coloração Verhoeff, Grupo Neonato.
A- 10x; B- 20x; C- 40x.
Notar fibras elásticas (setas), Epitélio (EP).

Figura 2 – Fotomicrografia da JVU, coloração Verhoeff, Grupo Adulto.
D- 20x; E- 40x; F- 40x.
Notar fibras elásticas (setas). Epitélio (EP).

Figura 3 – Fotomicrografia da JVU, coloração Verhoeff, Grupo Velho.
 G- 10x; H- 20x; I- 40x.
 Notar fibras elásticas (setas).

Figura 4 – Fotomicrografia da JVU, coloração Weigert, Grupo Neonato.
 J- 20x; K- 20x; L- 40x.
 Notar fibras elásticas (setas), Epitélio (EP)

Figura 5 – Fotomicrografia da JVU, coloração Weigert, Grupo Adulto.
 M- 40x; N- 40x; O- 40x.
 Notar fibras elásticas (setas).

Figura 6 – Fotomicrografia da JVU, coloração Weigert, Grupo Velho.
P- 20x; Q- 20x.
Notar fibras elásticas (setas).

Figura 7 – Fotomicrografia da JVU, coloração Weigert-Oxona, Grupo Neonato.
R- 10x; S- 20x; T- 40x.
Notar fibras elásticas (setas), Epitélio (EP).

Figura 8 – Fotomicrografia da JVU, coloração Weigert-Oxona, Grupo Adulto.
 U- 20x; V- 20x; X- 40x.
 Notar fibras elásticas (setas), Epitélio (EP).

Figura 9 – Fotomicrografia da JVU, coloração Weigert-Oxona, Grupo Velho.
 Z- 20x; W- 20x; Y- 40x.
 Notar fibras elásticas (setas).

Figura 10 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar neonato (21 dias).
Notar fibras elásticas maduras (EM), fibras colágenas (FC) e
célula muscular (CM). (30K)

Figura 11 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar neonato
(21 dias).
Notar fibras elásticas maduras (EM) e célula muscular
(CM). (100K)

Figura 12 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar neonato (21 dias).
 Notar fibra elauínica (EL), fibras colágenas (FC) e
 célula muscular (CM) (43.120X).

Figura 13 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar neonato (21 dias).
 Notar fibras elauínicas (EL) e fibras colágenas (FC). (43.120x)

Figura 14 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar neonato (21 dias).
Notar fibra elaunínica (EL), fibras colágenas (FC). (100K)

Figura 15 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar neonato (21 dias).
Notar fibras elaunínicas (EL) e colágenas (FC). (100K)

Figura 16 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar neonato (21 dias).
 Notar fibras oxitalânicas (OX), e fibras colágenas (FC).
 (43.120X).

Figura 17 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar neonato (21 dias).
 Notar fibras oxitalânicas (OX), e fibras colágenas (FC).
 (43.120X).

Figura 18 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar neonato (21 dias).
Transição de fibra oxitalânica para elaunínica (seta).
(100K)

Figura 19 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar neonato (21 dias).
Transição de fibra elaunínica para elástica madura. (100K)

Figura 20 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar adulto (200 dias).
Notar fibras elásticas maduras (EM), e célula muscular (CM).
(100 K).

Figura 21 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar adulto (200 dias).
Notar fibras elásticas maduras (EM), e célula muscular (CM).
(100 K).

Figura 22 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar adulto (200 dias).
 Notar fibra elástica madura (EM), fibras colágenas (FC) e
 célula muscular (CM). (40 K).

Figura 23 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar adulto (200 dias).
 Notar fibras elásticas maduras (EM) elauínicas (EL) e fibras
 colágenas (FC). (100 K).

Figura 24 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar adulto (200 dias).
Notar fibras elaunínicas (EL) e fibras colágenas (FC). (50K)

Figura 25 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar adulto (200 dias).
Notar fibra elaunínica (EL) e fibras colágenas (FC). (100K)

Figura 26 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar adulto (200 dias). Notar fibras oxitalânicas (OX), fibras colágenas (FC) e célula muscular (CM). (100K)

Figura 27 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar adulto (200 dias). Notar fibras oxitalânicas (OX), fibras colágenas (FC) e célula muscular (CM). (100K)

Figura 28 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar velho (450 dias).
 Notar fibra elástica madura (EM) e fibras colágenas (FC).
 (40K)

Figura 29 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar velho (450 dias).
 Notar fibras elásticas maduras (EM) e fibras colágenas (FC).
 (50K)

Figura 30 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar velho (450 dias).
Notar fibras elásticas (EL) e fibras colágenas (FC). (50K)

Figura 31 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar velho (450 dias).
Notar fibras elástica madura (EM), elaunínicas (EL) e fibras colágenas (FC). (35K)

Figura 32 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar velho (450 dias).
Notar fibras elaunínicas (EL) e colágenas (FC). (75K)

Figura 33 – Eletromicrografia da JVU de rato Wistar velho (450 dias).
Notar fibras oxitlânicas (OX), fibras colágenas (FC). (100K)

5.3 Estudo Histomorfométrico

Para a realização deste estudo utilizou-se de relações matemáticas entre a densidade linear e as idades dos animais em dois aspectos, primeiramente em relação aos métodos de coloração empregados e posteriormente para cada tipo de fibra presente na região estudada, resultando em comparações entre os grupos. Na figura 34, foi observada a densidade linear das fibras do sistema elástico em relação à idade (neonatos, adultos e velhos) nos três métodos de colorações usados (Verhoeff, Weigert e Weigert-Oxona). Quando observado os métodos de Verhoeff, que evidência as fibras elásticas maduras, Weigert, fibras elásticas maduras e elaunínicas e Weigert-Oxona, fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas, temos que a LD das fibras elásticas coradas por esses métodos, respectivamente, aumentam do grupo neonato (21 dias) para o grupo adulto (200 dias) e por outro lado, diminui com o envelhecimento, ou seja, do grupo adulto (200 dias) para o grupo velho (450 dias) ($p < 0,05$), sendo que não houve relação significativa dos valores da LD entre os grupos neonato (21 dias) e velho (450 dias). Os valores das densidades lineares, de cada coloração estão dispostos nas tabelas 1, 2 e 3. Na figura 35, foi analisada a LD de cada tipo de fibra que compõe o sistema elástico (elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas) quanto à idade através das seguintes relações: $LD \text{ Verhoeff} = LD \text{ fibras elásticas maduras}$; $LD \text{ Weigert} - LD \text{ Verhoeff} = LD \text{ Elaunínicas}$; $LD \text{ Weigert-Oxona} - LD \text{ Elaunínicas} - LD \text{ Verhoeff} = LD \text{ Oxitalânicas}$, temos que as fibras elásticas maduras aumentam dos animais do grupo neonato (21 dias) para aqueles do grupo adulto (200 dias) ($p < 0,05$) e diminui sua LD do grupo adulto (200 dias) para o velho (450 dias), não mostrando significância da LD entre os grupos neonato (21 dias) e velho (450 dias). As fibras elaunínicas em relação à sua LD, não demonstraram diferenças significativas entre os grupos neonato, adulto e velho. Por sua vez, a LD das fibras oxitalânicas diminuiu com o aumento da idade, dos animais adultos (200 dias) para os velhos

(450 dias), não revelando valores significativos entre o grupo neonato (21 dias) com os grupos adulto (200 dias) e velho (450 dias).

Em análise às regressões quadráticas, observamos que a LD das fibras elásticas coradas pelos métodos Verhoeff, Weigert e Weigert-Oxona aumenta do grupo neonato (21 dias) para o grupo adulto (200 dias) e, deste grupo para o grupo velho (450 dias) há uma diminuição desta LD associado ao envelhecimento do animal (Figura 36). Quando observamos as fibras do sistema elástico, cada uma em separado vemos que a LD das fibras elásticas maduras e oxitalânicas, esta corada com o método de Verhoeff e aquela pelo método de Weigert, aumenta do grupo neonato (21 dias) para o grupo adulto (200 dias) e diminui do adulto para o velho (450 dias), entretanto a LD das fibras elaunínicas (coradas com Weigert) aumenta com o aumento da idade de 21 dias para 450 dias, ou seja, no animal velho estas fibras estão com os valores de sua densidade linear aumentados (Figura 37). As médias da densidade linear da junção vésico-uretral de cada faixa etária das fibras elásticas do sistema elástico, tanto quanto às colorações como a tipificação, estão representadas nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

**Densidade Linear Sistema Elástico – JVU
(colorações)**

Figura 34 – Gráfico da LD das fibras do sistema elástico, de cada coloração, em relação à idade. Aumento da LD das fibras do sistema elástico do grupo neonato 21 dias) para o grupo adulto* (200 dias) nas colorações Verhoeff, Weigert e Weigert-Oxona ($p < 0,05$); Diminuição da LD das fibras do sistema elástico do grupo adulto (200 dias) para o grupo velho** (450 dias) nas colorações Verhoeff, Weigert e Weigert-Oxona ($p < 0,05$).

Densidade Linear Fibras Elásticas - JVU

Figura 35 – Gráfico da LD, com tipificação das fibras do sistema elástico, em relação à idade. Aumento da LD das fibras elásticas maduras do grupo adulto (200 dias) para o grupo neonato* (21 dias) ($p < 0,05$). Diminuição da LD das fibras elásticas maduras e das fibras oxitalânicas do grupo adulto (200 dias) para o grupo velho** (450 dias) ($p < 0,05$).

Densidade Linear Sistema Elástico – JVU (colorações)

Figura 36 – Curva de regressão quadrática dos valores da LD das fibras do sistema elástico, para cada coloração, em relação à idade.

Densidade Linear Fibras Elásticas - JVU

Figura 37 – Curva de regressão quadrática da LD, com tipificação das fibras do sistema elástico, em relação à idade.

Tabela 1 – Valores das Densidades Lineares de Cada Animal em Cada Faixa Etária na Coloração de Verhoeff.

PU	CR	DIAS	f = PU/PT	AT	A = AT x F	C = CRX2	LD = 2XC/A
17.538	421	21	0,8769	386250	338702,62	842	0,0049719
18.369	435	21	0,91845	386250	354751,31	870	0,0049048
18.279	443	21	0,91395	386250	353013,18	886	0,0050196
17.356	346	21	0,8678	386250	335187,75	692	0,004129
17.917	446	21	0,89585	386250	346022,06	892	0,0051557
17.832	845	200	0,8916	386250	344380,5	1.690	0,0098147
17.739	686	200	0,88695	386250	342584,43	1.372	0,0080097
17.755	777	200	0,88775	386250	342893,43	1.554	0,009064
18.049	750	200	0,90245	386250	348571,31	1.500	0,0086065
17.541	862	200	0,87705	386250	338760,56	1.736	0,0102491
16.675	461	450	0,83375	386250	322035,93	922	0,005726
17.298	498	450	0,8649	386250	334067,62	996	0,0059628
17.263	449	450	0,86315	386250	333391,68	898	0,005387
17.708	530	450	0,8854	386250	341985,75	1.060	0,006199
16.906	421	450	0,8453	386250	326497,12	842	0,0051577

Tabela 2 – Valores das Densidades Lineares de Cada Animal em Cada Faixa Etária na Coloração de Weigert.

PU	CR	DIAS	f = PU/PT	AT	A = AT X F	C = CRX2	LD = 2XC/A
17.559	889	21	0,87795	386250	339108,18	1.778	0,0104863
17.327	614	21	0,86635	386250	334627,68	1.228	0,0073395
17.116	485	21	0,8558	386250	330552,75	970	0,0058689
18.062	751	21	0,9031	386250	348822,37	1.502	0,0086118
17.919	544	21	0,89595	386250	346060,68	1.088	0,0062879
18.113	1.006	200	0,90565	386250	349807,31	2.012	0,0115034
17.648	1.123	200	0,8824	386250	340827	2.246	0,0131797
17.659	1.076	200	0,88295	386250	341039,43	2.152	0,0126202
18.202	1.179	200	0,9101	386250	351526,12	2.358	0,0134157
17.950	1.290	200	0,8975	386250	346659,37	2.580	0,0148849
17.443	904	450	0,87215	386250	336867,93	1.808	0,0107341
17.782	1.051	450	0,8891	386250	343414,87	2.102	0,0122417
17.363	927	450	0,86815	386250	335322,93	1.854	0,0110580
17.875	837	450	0,89375	386250	345210,93	1.674	0,0096984
17.701	661	450	0,88505	386250	341850,56	1.322	0,0077343

Tabela 3 – Valores das Densidades Lineares de Cada Animal em Cada Faixa Etária na Coloração de Weigert.

PU	CR	DIAS	f = PU/PT	AT	A = AT X F	C = CRX2	LD = 2XC/A
16.995	1.002	21	0,84975	386250	328215,93	2.004	0,0122114
17.820	902	21	0,891	386250	344148,75	1.804	0,0104838
18.019	1.118	21	0,9009	386250	347991,93	2.236	0,0128508
18.408	651	21	0,9204	386250	355504,5	1.302	0,0073248
17.896	854	21	0,8948	386250	345616,5	1.708	0,0098837
17.685	1.640	200	0,88425	386250	341541,56	3.280	0,0192070
18.209	1.789	200	0,91045	386250	351661,31	3.578	0,0203491
18.052	1.594	200	0,9026	386250	348629,25	3.188	0,0182887
18.104	1.742	200	0,9052	386250	349633,5	3.484	0,0199294
18.292	1.544	200	0,9146	386250	353264,25	3.088	0,0174826
17.564	844	450	0,8782	386250	339204,75	1.688	0,0099526
17.370	1.111	450	0,8685	386250	335458,12	2.222	0,0132475
17.370	1.040	450	0,8685	386250	335458,12	2.080	0,0124009
18.640	1.073	450	0,932	386250	359985	2.146	0,0119227
17.674	939	450	0,8837	386250	341329,12	1.878	0,011004

Tabela 4 - Valores Médios da Densidade Linear das Fibras do Sistema Elástico da JVU (Colorações)

Grupo	Verhoeff	Weigert	Weigert-Oxona
Neonato	0,004836	0,007719	0,010535
Adulto	0,009146	0,013120	0,019052
Velho	0,005687	0,010293	0,011706

Tabela 5 - Valores Médios da Densidade Linear das Fibras do Sistema Elástico da JVU

Grupo	Elástica Madura	Elaunínica	Oxitalânica
Neonato	0,004836	0,002883	0,002816
Adulto	0,009146	0,003974	0,005932
Velho	0,005687	0,004607	0,001412

6 DISCUSSÃO

O sistema de fibras elásticas, tem sido evidenciado em vários tecidos como na aorta (GAWLIK, 1965; GOLDFISCHE et al., 1983), pele (COTTA-PEREIRA et al., 1975), periodonto (FULLMER e LILIE, 1958; FULLMER, 1978; SAWADAculean et al., 2006, SCULEAN et al., 1997), ducto deferente (PANIAGUA et al., 1983), cápsula esplênica (SACHETTI, 1996), musculatura lisa (CARVALHO et al., 1997), coração (SOUZA et al., 1996), junção vésico-uretral (AWAD et al., 1976; DASS et al., 1999; LÁPIDES, 1958), uretra (BUMP et al., 1988), próstata (KARLINSKI et al., 1976), fáscia transversal inguinal (RODRIGUES, Jr. et al., 1990), pulmão (NIEWOEHNER et al., 1994), colo vesical (ROTHER et al., 1996), neste estudo também confirmamos a distribuição das fibras do sistema elástico na junção vésico-uretral concordando com os achados de Lápides (1958); Awad et al. (1976) e Dass et al. (1999) referentes à mesma estrutura.

Trabalhos prévios como de Beertesen et al. (1974); Cotta-Perira et al., 1977; Everts et al. (1998) ; Fullmer et al., (1974) Gawlik (1965); Sakai et al., 1986; Sims et al. (1973, 1975); Takagi et al. (1989) relataram que as fibras que compõem o sistema elástico são evidenciadas, na microscopia de luz, pelos métodos de coloração hematoxilina férrica (Verhoeff), resorcina-fucsina (Weigert) e resorcina-fucsina com prévia oxidação (Weigert-Oxona), corando fibras elásticas maduras, fibras elásticas maduras e elaunínicas, fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas, respectivamente. Em nosso trabalho, também foi possível identificar e tipificar o sistema elástico, através da microscopia de luz com o uso dessas colorações específicas, em que foi possível realizar a evidenciação das fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas na JVU, sendo assim observamos que essas fibras estão localizadas em toda a camada muscular da JVU não estando organizadas em feixes, cadeias ou lâminas como

aqueelas encontradas na pele (KIELTY et al., 2002), ducto deferente (PANIAGUA et al., 1983).

A tipificação ultra-estrutural, das fibras do sistema elástico, através da microscopia eletrônica de transmissão e uso da técnica do ácido tânico foi estudada por alguns autores, onde se preconizou que o uso do ácido tânico marca o componente amorfo das fibras elásticas intensamente (KAJIKAWA et al., 1975) e uma visualização uniforme e fiel das fibras elásticas é alcançada se o fixador (glutaraldeído) conter ácido tânico, havendo um aumento da densidade eletrônica da elastina e microfibrilas (COTTA-PEREIRA et al., 1976), em nossa pesquisa concordamos com os autores que ocorre uma melhor marcação da elastina e das microfibrilas presentes na composição ultra-estrutural das fibras do sistema elástico através da utilização do ácido tânico associado ao fixador glutaraldeído, onde também conseguimos evidenciar cada tipo de fibra elástica em relação às diferenças que estas apresentam quanto a sua ultra-estrutura, em que as fibras elásticas maduras apresentaram um material amorfo fortemente eletrodense, compacto e abundante, composto por elastina apenas, concordando com os achados de Kajikawa et al. (1975); Cotta-Pereira et al. (1976); Souza et al. (1996) e Sachetti (1996) as fibras elaunínicas, por sua vez, caracterizaram-se ultra-estruturalmente por serem constituídas por escasso material amorfo disperso em meio ao componente microfibrilas, assim como evidenciado previamente por Cotta-Pereira et al. (1976, 1977); Sachetti (1996), já as fibras oxitalânicas estão representadas por feixes de microtúbulos dispostos paralelamente, confirmando os achados de Avery et al. (1980), Carvalho et al. (1996); Sachetti (1996). Verificamos também que as fibras elásticas da JVU encontram-se nos espaços intercelulares da camada muscular e entre os feixes de fibras colágenas, apresentando assim, a mesma localização das fibras elásticas do ducto deferente como relatado previamente por Paniagua et al. (1983) em estudo eletro-microscópico desta estrutura.

Alguns autores colocam que o arranjo das fibras do sistema elástico nos tecidos se refletem nas funções que elas deveram desempenhar, sejam de suporte, elasticidade, resiliência, complacência, expansão ou recuo elástico (CARVALHO et al., 1997; COTTA-PEREIRA et al., 1977, KIELTY et al., 2002, ROSS et al, 1969; USHIKIK et al., 1991, 2002), visto que em nosso estudo observamos grande quantidade dos três tipos de fibras elásticas na JVU estando dispersas em toda a musculatura, assim associando este achado com sua função e principalmente a do óstio interno da uretra, de elasticidade, plasticidade, expansão e recuo rápido com o fluxo da urina, evidenciamos então que o sistema elástico da JVU está presente em toda a muscular e em várias direções para desempenhar a elasticidade, fornecimento de pressão de fechamento do local em repouso, e principalmente a propriedade de recuo elástico sem haver deformação da estrutura após a passagem da urina, complementando desta forma a ação muscular e lhe dando suporte, exercendo sobre a JVU não apenas uma, mas várias funções, confirmando os achados de Awad et al. (1976); Bump et al. (1988); Dass et al. (1999); Gosling et al. (1983); Woodburne (1961) tornando a JVU em um tecido com flexibilidade dinâmica e de extensibilidade reversível. Sabemos também que cada tipo de fibra elástica desempenha uma função, sendo esta determinada pela quantidade de elastina e microtúbulos, onde a elastina é responsável pela elasticidade e recuo elástico (ROSS et al., 1969) e os microtúbulos por fornecer complacência durante a contração da musculatura lisa, ancoragem e flexibilidade de rearranjo estrutural, prevenindo um super-estiramento tecidual (CARVALHO et al., 1997), através disso determinamos que as fibras oxitalânicas na JVU estão presentes por ser esta região submetida a constante tensão, reforçando esta definição clássica das funções dos microtúbulos nos tecidos, como relatado pelos autores. Por outro lado, as fibras elásticas maduras (elastina), tornam-se responsáveis pela elasticidade e recuo elástico da JVU e por sua vez, as fibras elaunínicas assume função intermediária entre as oxitalânicas e as elásticas maduras fornecendo adaptação funcional à JVU, conforme descrito

previamente por Cotta-Pereira et al. (1977, 1984) em estudo na pele, assim a função de uma fibra elástica complementa a ação da outra e forma na JVU um sistema microfibrila-elastina, como já descrito por Ushiki (2002) funcionando como um distribuidor uniforme das forças de tensão no tecido, mantenedor da resiliência tecidual e adaptação do local para o fluxo urinário.

Vários estudos, ao longo dos anos, relatam algumas alterações do sistema elástico em relação ao envelhecimento do tecido, em nossos achados com relação ao sistema elástico presente na JVU de ratos Wistar e o avanço da idade destes animais observamos que a densidade linear das fibras elásticas é diferente entre os animais neonatos, adultos e velhos, concordando com os achados de Souza et al. (1996) em coração humano, em que a o comprimento das fibras elásticas por unidade de volume estava diferente para crianças, adultos e idosos e com Carvalho et al. (1997) que relataram que durante o processo de envelhecimento ocorrem alterações nas fibras do sistema elástico. Quanto à densidade linear de cada tipo de fibra do sistema elástico da JVU, obtemos que a densidade linear das fibras elásticas maduras aumentou do neonato para o adulto, mas diminui do adulto para o velho complementando os achados de Sephel et al. (1986) e Uitto (1998) que afirmam que com o avanço da idade ocorre um declínio nas taxas de biossíntese de elastina, afirmando que na JVU ocorre o processo inverso que no ducto deferente, em que Paniagua et al. (1983) verificou que há um aumento de elastina com relação ao avanço da idade, exceto com relação às fibras oxitalânicas, que nesta estrutura está menos numerosa, assim como na JVU, onde a densidade linear destas fibras também diminui nos animais velhos, ocorrendo também o mesmo com os achados de Rodrigues, Jr. et al. (1990) em estudo da fáscia transversa inguinal, que com o aumento da idade há uma diminuição de fibras oxitalânicas e um aumento de fibras elásticas maduras e concordando com Barros et al. (2002) que com o envelhecimento há uma indução no desaparecimento das fibras oxitalânicas. As fibras elaunínicas, em nosso estudo,

foi o único tipo de fibra da JVU que apresentou sua densidade linear aumentando tanto do animal neonato para o adulto, como deste para o velho, ou seja, com o envelhecimento. Conseqüentemente se há uma diferença nas densidades lineares das fibras elásticas, então também teremos uma mudança nas funções da JVU com o envelhecimento, funções estas relacionadas apenas com o sistema elástico, portanto se a densidade linear das fibras elásticas maduras diminui com o envelhecimento, subtede-se que através da diminuição das fibras elásticas maduras, há proporcionalmente uma queda na quantidade de elastina na JVU. Segundo Cotta-Pereira et al. (1977) as propriedades elásticas e a propriedade de recuo elástico são determinadas pela presença de elastina, assim se há uma diminuição de fibras elásticas maduras temos uma diminuição na capacidade de recuo elástico da região estudada com o processo de envelhecimento. Com relação às fibras oxitalânicas que estão presentes em tecidos submetidos à tensão (FULLMER e LILLIE, 1958) e com funções de ancoragem e manutenção da elasticidade (SIMS et al., 1973), a JVU terá uma diminuição destas funções em animais velhos, visto que em nosso trabalho a densidade linear das fibras oxitalânicas está diminuída nestes animais. Quanto às fibras elaunínicas nossos resultados apontaram um aumento da densidade linear destas fibras que são formadas por microtúbulos e elastina (COTTA-PEREIRA et al., 1977), estando relacionadas também à ancoragem, então no envelhecimento, como estas fibras possuem características intermediárias entre as fibras elásticas maduras e oxitalânicas (COTTA-PEREIRA et al., 1984), elas irão manter, no animal velho, a resitência à tensão e a plasticidade da JVU, alguma elasticidade e propriedade de recuo elástico, sendo estas funções provavelmente diminuídas, mas não ausentes.

No nosso entendimento as alterações do sistema elástico que ocorrem nos animais velhos, estão associados ao processo natural de envelhecimento, e certamente com a diminuição da tonicidade muscular, tornaram o esfíncter fisiológico mais permeável, favorecendo processos progressivos de incontinência urinária, sendo que sozinhas, as fibras

elásticas não são responsáveis por este estado patológico, pois estudos evidenciaram que a incontinência urinária ocorre por problemas urodinâmicos como deficiência ou ausência da atividade detrusora, pressão uretral sobre ativa ou incompetente levando a alterações pressóricas intra-vesicais indesejáveis (FENELEY et al., 1982), patologias sistêmicas e psicológicas e uso de alguns fármacos (RESNICK et al., 1985).

A ação esfintéfrica e a manutenção pressórica dependem não só da morfologia da JVU, mas também da parede uretral, que funcionam associadas ao diafragma pélvico, que suporta o colo vesical direta ou indiretamente.

Acreditamos que na JVU a distribuição das fibras elásticas é homogênea existindo um sistema mioelástico formado pelo sistema elástico juntamente com a muscular e as fibras colágenas presentes, onde os achados de microscopia eletrônica de transmissão revelaram qualitativamente, um aumento no contingente do conteúdo colágeno nos animais velhos. Assim, se transferirmos os achados nos animais para o homem, hipoteticamente, podemos supor que o sistema elástico na JVU serve como suporte compensatório da camada muscular do trigono por ela apresentar mais alterações funcionais no processo de envelhecimento e também ser um alvo propício para patologias e intervenções cirúrgicas, sendo que através do aumento das fibras elásticas, provavelmente há um remodelamento do sistema elástico durante o envelhecimento natural da junção vésico-uretral, bem como de todo o trato urinário inferior, devido a isto atribuímos ao sistema elástico na JVU uma responsabilidade indireta de manutenção da continência urinária independente da faixa etária que o espécime se encontra.

7 CONCLUSÕES

No presente trabalho concluímos que:

- Nas três faixas etárias estudadas, estão presentes todos os tipos de fibras do sistema elástico;
- As diferenças ultra-estruturais das fibras elásticas na JVU podem ser distinguidas através da técnica do ácido tânico associado ao glutaraldeído nas preparações das peças para a microscopia eletrônica de transmissão, em que as fibras elásticas maduras possuem um componente amorfo eletrodenso e compacto, as elaunínicas um componente microtubular mais abundante que o componente amorfo e as oxitalânicas formadas exclusivamente por microtúbulos;
- As fibras elásticas maduras e as oxitalânicas apresentaram seu comprimento total diminuídos com o avanço da idade, enquanto que as fibras elaunínicas tiveram seu comprimento aumentado com o envelhecimento;
- O sistema elástico da JVU não é um componente que determina o aparecimento da incontinência urinária no processo fisiológico de envelhecimento;
- O sistema elástico na região é indiretamente responsável pela continência urinária, em todas as faixas etárias estudadas e no animal velho atua como suporte para a musculatura lisa do local que provavelmente tem alterações mais relevantes com o avanço da idade do que o próprio sistema elástico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALBERT, E. N. Developing elastic tissue. An electron microscopic study. **The American Journal of Pathology**, v. 69, p. 89-102, 1972.

AVERY, J. K.; SIMMONS, T. A. Electron dense staining affinities of mouse oxytalan and elastic fibers. **Journal of Oral Pathology**, v. 9, p. 183-188, 1980.

BADWAY, A.; SCHENCK, E. A. A new theory of the innervation of bladder musculature: III Inervation of the vesico-urethral junction and external sphincter. **The Journal of Urology**, v. 111, p. 613, 1974.

BARROS, E. M. K. P.; RODRIGUES, C. J.; RODRIGUES, N. R. Aging of the elastic and collagen fibers in the human cervical interspinous ligaments. **The Spine Journal**, v. 2, p. 57-62, 2002.

BASKIN, S. L.; YUCEL, S. An anatomical description of the male and female urethral sphincter complex. **The Journal of Urology**, v. 171, n. 5, p. 1891, 2004.

BEERTESSEN, W.; EVERTS, V.; VAN DE HOOF, A. Fine structure of fibroblasts in the periodontal ligament of the rat incisor and their possible role in the tooth eruption. **Archives of Oral Biology**, v. 19, p. 1087-1098, 1974.

BÖCK, P.; STOCKINGER, L. Light and electron microscopic identification of elastic, elaunin and oxytalan fibers in human tracheal and bronchial mucosa. **Acta Anatomica**, v. 170, p. 145-153, 1984.

BRADAMANTE, Z.; SVAJGER, A. Pré-elastic (oxytalan) fibres in the developing elastic cartilage of the external ear of the rat. **Journal of Anatomy**, v. 123, p. 735-743, 1977.

BRADLEY, W. F. Innervation of the male urinary bladder. *The Urologic Clinics of North America*, v. 5, p. 279, 1978.

BUCKWALTER, J. A.; COOPER, R. R.; MAYNARD, J. A. Elastic fibers in human intervertebral discs. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 58, p. 73, 1976.

CANNON, T. W.; DAMASER, M. Pathophysiology of the lower urinary tract: continence and incontinence. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 28, 2004.

CARVALHO, H. F.; LINE, S. R. P. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. **Cell Biology International**, v. 20, p. 809-819, 1997.

CHOPARD, R. P.; LUCAS, G. A.; GERHARD, R.; LOURENÇO, M. G. A. Histomorphological study in age related changes in the elastic fiber system of the basilar artery **Journal of Anatatomy and Embryology**, v. 103, n. 4, p. 157-75, 1998.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHOPARD, R. P.; GERHARD, R. Histomorphometrical study of the elastic fiber system in the anterior cerebral artery of man. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 58, n.4, p. 1040-1046, 2000.

CORTIVO, R.; PAGANO, F.; PASSERINI, G. Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. **British Journal of Urology**, n. 53, p. 134, 1981.

COSTACURTA, L. **Anatomia médico-cirúrgica da pelve humana**. São Paulo: Atheneu, 1982. p. 23-33.

COSTA, W. S.; CARVALHO, M. A.; BABINSKI, M. A. Volumetric density of elastic and reticular fibers in transition zone of controls and patients with benign prostatic hyperplasia. **Adult Urology**, v. 64, n. 4, p. 693-697, 2004.

COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F. G.; BITTENCOURT-SAMPAIO, S. Oxytalan, elastin and elastic fibers in the human skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, p. 15, 1975.

COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F. G.; DAVID-FERREIRA, J. F. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic and elastic-related fibers. **Stain Technology**, v. 51, n. 1, p. 7-11, 1976.

COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F. G.; FERREIRA, D. The elastic system fibers. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 79, p. 19-30, 1977.

COTTA-PEREIRA, G.; DEL-CLARO, L. M.; MONTES, G. S. Distribution of elastic system fibers in hyaline and fibrous cartilages of the rat. **Acta Anatomica**, v. 119, p. 80-85, 1984.

CHUN, A. L.; WALLACE, L. J.; GERALD, M. C. Effect of age on in vivo urinary bladder function in the rat. **The Journal of Urology**, v. 139, p. 625, 1988.

DASS, N.; MCMURRAY, G.; BRADING, A. F. Elastic fibers in the vesicourethral junction and urethra of the guinea pig: quantification with computerized image analyses. **Journal of Anatomy**, v. 195, p. 447-53, 1999.

DIETRICH, F.; DORSCHNER, W.; STOLZENBURG, J. – U. A new theory of micturition and urinary continence based on histomorphological studies. 2. The musculus sphincter vesicae: continence or sexual function. **Urologia Internationalis**, v. 52, p. 155-157, 1994.

DORSCHNER, W.; STOLZENBURG, J. – U.; POSTENJAK, M. Sphincteric musculature of female canine urethra in comparison to woman including 3D reconstruction. **Cells, Tissues, Organs**, v. 170, n. 2-3, p. 153, 2002.

DORSCHNER, W.; STOLZENBURG, J. – U.; LEUTERT, G. A new theory of micturition and urinary continence based on histomorphological studies. 1. The musculus detrusor vesicae: occlusive function or support of micturition? **Urologia Internationalis**, v. 52, p. 62-63, 1994.

EVERTS, V.; NIEHOF, A.; JANSEN, D.; BEERTSEN, W. Type VI collagen is associated with microfibrils and oxytalan fibers in the extracellular matrix of periodontm, mesenterium and periosteum. **Journal of Periodontology Research**, v. 33, p. 125, 1998.

EWALT, D. H.; HOWARD, P. S.; BLYTH, B. Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? **Journal of Urology**, v. 148, p. 544-549, 1992.

FAHRENBACH, W. H.; SANDBERG, L. B.; CLEARY, E. G. Ultrastructural studies on early elastogenesis. **Anatomical Record**, v. 155, p. 563-576, 1966.

FENELEY, R. C. L.; THOMAS, D. G.; BLANNIN, J. P. Urinary incontinence. **Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 16, n. 2, p. 89-93, 1982.

FILHO, E. T. C.; CARVALHO, C. A. F.; SOUZA, R. R. Modificações das fibras do sistema elástico no envelhecimento. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 25-30, 1996.

FILHO, E. T. C.; CARVALHO, C. A. F.; SOUZA, R. R. Age-related changes in elastic fibers of human heart. **Gerontology**, v. 42, p. 211-217, 1996.

FULLMER, H. M. The oxytalan fiber: a previously undescribed connective tissue fiber. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 6, n. 6, p. 425-430, 1958.

FULLMER, H. M. A comparative histochemical study of elastic, pre-elastic and oxytalan connective tissues fibers. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 8, p. 290-295, 1960.

GARDNER, E.; GRAY, J. D. **Estudo regional do corpo humano**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1971. cap. 42, p. 482-83.

GAWLIK, Z. Morphological and morphochemical properties of the elastic system in the motor organ of the man. **Folia Histochemica et Cytochemica**, v. 3, p. 233-251, 1965.

GIBSON, M. A.; CLEARY, E. G. The immunohistochemical localization of microfibril-associated glycoprotein in elastic and nonelastic tissues. **Immunology and Cell Biology**, v. 65, p. 345-356, 1987.

GILPIN, S.A.; GILPIN, C. J.; DIXON, J. S. The effect of age on the autonomic innervation of the urinary bladder. **British Journal of Urology**, v. 58, p. 378-381, 1986.

GOGLY, B.; GODEAU, G.; GILBERT, S.; Morphometric analysis of collagen and elastic fibers in normal skin and gingival in relation to age. **Clinical Oral Investigation**, v. 1, p. 147-152, 1997.

GOLDFISCHER, S.; SCHWARTZ, E.; BLUMENFELD, O. O. Ultrastructure an staining properties of aortic microfibrils (oxytalan). **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 31, n. 3, p. 382-390, 1983.

GOSLING, J. The structure of the bladder and urethra in relation to function. **The Urologic Clinics of North America**, v. 44, p.31-8, 1979.

GRAY, H. Tratado de anatomia humana. 24. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1946 p. 1453.

GREENLEE, T. K.; ROSS, R.; HARTMAN, J. L. The fine structure of elastic fibers. **The Journal of Cell Biology**, v. 30, p. 59-71, 1966.

GROAT, C. W. A neurologic basis for the overactive bladder. **Urology**, v. 50, n. 6A, p. 36-39; 44, 1997.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 218.

HARVI, D. Post-prostatectomy incontinence. **Urological Research**, v. 6, p. 493-6, 1978.

JOHNSON, E. F.; CHETTY, K.; MOORE, I. M. The distribution and arrangement of elastic fibers in the intervertebral discs of the adult human. **The Journal of Anatomy**, v. 135, n. 2, p. 301-304, 1982.

JØRGENSEN, J. B.; JENSEN, K. M. –E.; MOGENSEN, P. Longitudinal observations on normal and abnormal voiding in men over the age of 50 years. **British Journal of Urology**, v. 72, p. 413-420, 1993.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 78-80.

KAJIKAWA, K.; YAMAGUCHI, T.; KATSUDA, S.; MIWA, A. An improved electron stain for elastic fibers using tannic acid. **Journal of Electron Microscopy**, v. 24, n. 4, p. 287-288, 1975.

KARLINSKY, J. B.; SNIDER, G. L.; FRANZBLAU, C. In vitro effects of elastase and collagenase on mechanical properties of hamster lungs. **The American. Review of Respiratory Disease**, v. 113, p. 769-777, 1976.

KIELTY, C. M.; SHERRATT, M. J.; SHUTTLEWORTH, C. A. Elastic fibers. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 2.817-2.828, 2002.

LEVI, B. J.; WIGHT, T. N. Structural changes in the aging submucosa: new morphologic criteria for the evaluation of the unstable human bladder. **Journal of Urology**, v. 144, p. 1044-1055, 1990.

MADERSBACHER, S.; PYCHA, A.; SCHATZL, G. The aging lower urinary tract: a comparative urodynamic study of men and women. **Urology**, v.51, n.2, p. 206-212, 1998.

MENESES, P. R. Atualização em nefrologia pediátrica: distúrbios funcionais da micção na infância. **J. Bras. Nefrol.**, v. 22, n. 2, p. 95-102, 2000.

MIODÓNSKI, J. A.; LITWIN, A. J. Microvascular architecture of the human urinary bladder wall: A corrosion casting study. **The Anatomical Record**, v. 254, p. 375 - 381, 1999.

NETTER, F. H.; SHAPTER, R. K. **Ilustrações médicas**: rins, ureteres e bexiga. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. v. 6, p. 20 – 2.

NIEWOEHNER, D. E.; KLEINERMAN, J. Morphometric study of elastic fibers in normal and emphysematous human lungs. **American Review of Respiratory Disease**, v. 115, p. 15-21, 1977.

PANIAGUA, R.; REGADERA, J.; NISTAL, M. Elastic fibers of the human ductus deferens. **Journal of Anatomy**, v. 137, n. 3, p. 467-476, 1983.

RESNICK, M. D.; YALLA, S. V. Management of urinary incontinence in the elderly. **The New England Journal of Medicine**, v. 26, Sept., p. 800-805, 1985.

RODRIGUES JR., A. J.; TOLOSA, E. M. C.; CARVALHO, C. A. F. Electron microscopy study on the elastic and elastic related fibres in the human fascia transversalis at different ages. **Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch**, v. 136, n. 6, p. 645-652, 1990.

ROSS, R.; BORNSTEIN, P. The elastic fiber: I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. **The Journal of Cell Biology**, v. 40, p. 366-381, 1969.

ROSS, R. The elastic fiber: a review. **Journal of Histochemica et Cytochemica**, v. 21, p. 199-208, 1973.

ROTHER, P.; LÖFFLER, S.; DORSCHENER, W.; REIBIGER, I.; BENGS, T. Anatomic basis of micturition and urinary continence – muscle systems in urinary bladder neck during ageing. **Surgical Radiologic Anatomy**, v. 18, p. 173-177, 1996.

SACCHETTI, J. C. L. **Estudo histomorfométrico e ultraestrutural dos componentes fibrosos elásticos da cápsula esplênica**. 1996. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

SAGE, H.; GRAY, W. R. Studies on the evolution of elastin: I. Phylogenetic distribution, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 64, p. 313-327, 1979.

SAKAY, L. Y.; KEENE, D. R.; ENGVALL, E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, p. 2509, 1986.

SAWADA, T.; SUGAWARA, Y.; ASAI, T. Immunohistochemical characterization of elastic system fibers in rat molar periodontal ligament. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 54, n. 10, p. 1095-1103, 2006.

SCULEAN, A.; KARRING, T.; THEILADE, J. The regeneration potential of oxytalan fibers: An experimental study in the monkey. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, p. 932-936, 1997.

SEPHEL, G. C.; DAVIDSON, J. M. Elastin production in human skin fibroblast culture and its decline with age. **Journal Investigative Dermatology**, v. 86, p. 279-285, 1986.

SUSSET, J. G.; SERVOT-VIGUIER, D.; LAMY, F. Collagen in 155 human bladders. **Investigative Urology**, n. 16, p. 204, 1978.

SUZUKI, K. **Distribuição das fibras elásticas, elauínicas e oxitalânicas no ligamento vocal em diferentes idades.** 131 f. Dissertação (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.

TANAGHO, E. A.; PUGH, R. C. B. The anatomy and function of the ureterovesical junction. **British Journal of Urology**, v.35, p. 151-165, 1963.

TANAGHO, E. A.; HUTCH, J. A.; MEYERS, F. H. Primary vesicoureteral reflux: experimental study of its etiology. **Journal of Urology**, v. 93, p. 165-176, 1965.

TANAGHO, E. A.; MEYERS, F. H.; SMITH, D. R. The trigone: anatomical and physiological considerations, 2. In relation to the bladder neck. **The Journal of Urology**, v. 100, p. 633-639, 1968a.

TANAGHO, E. A.; SMITH, D. R. Mechanism of urinary continence: 1- Embryologic, anatomic and pathologic considerations. **The Journal of Urology**, v. 100, p. 640-646, 1968b.

TANAGHO, E. A.; MEYERS, F. H.; SMITH, D. R. Urethral resistance: Its components and implications. II. Striated muscle component. **Investigative Urology**, v. 7, p. 195, 1969.

TORTORA, G. J. **Princípios de anatomia humana.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p.

UITTO, J.; FAZIO, M. J.; OLSEN, D. R. Molecular mechanisms of cutaneous aging: age-associated connective tissue alterations in the dermis. **Journal Investigative Dermatology**, v. 90, p. 643, 1988.

USHIKI, T.; MURAKUMO, M. Scanning electron microscopic studies of tissue elastin components exposed by a KOII-Collagenase or simple KOH digestion method. **Archives of Histology and Cytology**, v. 54, p. 427-436, 1991.

USHIKI, T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers: A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. **Archives of Histology and Cytology**, v. 65, n. 2, p. 109-126, 2002.

VERNET, G. S. **Morphology and function of the vesicoprostatic-urethral musculature.** Treviso: Edizioni Canova, 1968.

WEI, J. T.; DE LANCEY, J. O. L. Functional anatomy of the pelvis floor and lower urinary tract. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.47, n. 1, p. 13, 2004.

WILLIAMS, M. E.; PANNILL, F. C. Urinary incontinence in the elderly. **Annals of Internal Medicine**, v. 97, p. 895-907, 1982.

WOODBURNE, R. T. The sphincter mechanism of the urinary bladder and the urethra. **The Anatomical Records**, v. 141, p. 11-20, 1961.

APÊNDICES

APÊNDICE A - COLORAÇÃO VERHOEFF

Animal: 1

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	25	63	42	71	88	33	22	42	45	27	48	70	59	28
HD	375	337	358	329	312	367	378	358	355	373	352	330	341	372
Contagem	5	9	9	8	14	9	5	10	9	8	6	5	8	11

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	75	14	68	71	54	70	40	100	35	54	51	124	124	70
HD	325	386	332	329	346	330	360	300	365	346	349	276	276	330
Contagem	17	6	6	5	12	9	6	6	8	7	8	11	7	15

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	33	29	39	19	30	52	60	29	34	37	37	22	19	38
HD	367	371	361	381	370	348	340	371	366	363	363	378	381	362
Contagem	7	8	6	4	11	13	10	16	7	6	5	6	3	5

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	29	52	58	35	58	54	30	55	2.462
HD	371	348	342	365	342	346	370	345	17538
Contagem	4	8	8	10	13	13	10	9	421

Animal: 2

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	19	21	11	19	4	10	79	8	19	22	17	31	47	18
HD	381	379	389	381	396	390	321	392	381	378	383	369	353	382
Contagem	12	7	15	8	10	6	4	7	9	12	9	6	4	11

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	39	24	12	19	44	9	110	59	27	20	9	67	22	54
HD	361	376	388	381	356	391	290	341	373	380	391	333	378	346
Contagem	6	10	15	12	3	2	5	6	6	14	8	10	11	6

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	7	18	15	35	23	46	19	57	47	50	57	9	13	34
HD	393	382	385	365	377	354	381	343	353	350	343	391	387	366
Contagem	12	6	12	13	6	10	4	6	8	14	10	7	11	6

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	44	73	87	43	23	41	41	9	1.631
HD	356	327	313	357	377	359	359	391	18.369
Contagem	13	9	8	9	9	11	10	7	435

Animal: 3

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	49	19	60	27	4	24	35	25	48	19	102	44	30	24
HD	351	381	340	373	396	376	365	375	352	381	298	356	370	376
Contagem	4	7	6	9	11	9	9	9	6	4	6	7	4	10

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	53	22	46	26	53	17	32	37	37	30	45	21	32	7
HD	347	378	354	374	347	383	368	363	363	370	355	379	368	393
Contagem	5	11	14	9	8	6	10	9	17	9	18	6	10	3

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	47	36	9	17	25	18	32	22	45	12	8	56	56	78
HD	353	364	391	383	375	382	368	378	355	388	392	344	344	322
Contagem	17	13	12	13	18	6	7	7	9	11	5	20	7	10

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	23	53	33	10	37	44	63	27	1.721
HD	377	347	367	390	363	356	337	373	18.279
Contagem	6	6	10	5	5	6	8	6	443

Animal: 4

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	29	50	46	42	67	60	12	35	50	127	70	27	55	15
HD	371	350	354	358	333	340	388	365	350	273	330	373	345	385
Contagem	4	3	6	3	5	7	6	13	15	8	5	12	5	15

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	23	28	84	92	62	71	67	58	70	80	41	56	46	63
HD	377	372	316	308	338	329	333	342	330	320	359	344	354	337
Contagem	7	5	5	6	5	8	10	4	8	11	6	12	6	5

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	79	13	117	52	39	20	37	20	68	54	63	65	73	34
HD	321	387	283	348	361	380	363	380	332	346	337	335	327	366
Contagem	8	9	12	8	4	10	7	5	4	5	3	4	3	5

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	95	48	46	18	33	20	64	60	2.644
HD	305	352	354	382	367	380	336	340	17.356
Contagem	4	7	8	8	8	7	7	5	346

Animal: 5

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	32	19	26	27	118	137	9	108	25	25	50	40	27	41
HD	368	381	374	373	282	263	391	292	375	375	350	360	373	359
Contagem	9	10	8	6	5	3	8	8	5	8	6	3	6	9

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	69	48	41	31	62	45	25	30	58	27	35	17	21	42
HD	331	352	359	369	338	355	375	370	342	373	365	383	379	358
Contagem	6	5	4	4	9	10	3	4	7	15	16	10	7	4

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	28	14	45	13	30	10	--	49	122	28	45	36	60	22
HD	372	386	355	387	370	390	400	351	278	372	355	364	340	378
Contagem	7	5	9	9	10	11	18	8	12	12	11	12	13	13

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	18	43	90	69	72	30	14	10	2.083
HD	382	357	310	331	328	370	386	390	17.917
Contagem	11	8	11	16	15	5	8	14	446

Animal: 1

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	56	158	36	90	32	48	38	74	21	134	29	51	38	9
HD	344	242	364	310	368	352	362	326	379	266	371	349	362	391
Contagem	13	13	23	25	16	9	7	9	18	15	18	25	10	20

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	41	43	5	82	10	16	60	44	28	22	19	43	32	25
HD	359	357	395	318	390	384	340	356	372	378	381	357	368	375
Contagem	19	19	42	16	13	17	10	14	36	27	31	6	11	15

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	24	21	38	27	106	24	14	44	15	54	23	39	21	22
HD	376	379	362	373	294	376	386	356	385	346	377	361	379	378
Contagem	11	5	40	19	17	36	14	9	13	5	12	13	14	20

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	29	76	46	50	53	38	40	80	2.168
HD	371	324	354	350	347	362	360	320	17.832
Contagem	31	13	14	15	13	8	12	14	845

Animal: 2

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	118	35	40	108	67	65	31	69	100	65	32	30	9	36
HD	282	365	360	292	333	335	369	331	300	335	368	370	391	364
Contagem	10	10	17	15	14	14	24	25	11	23	12	7	8	16

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	23	39	42	76	38	41	42	131	44	133	32	59	35	61
HD	377	361	358	324	362	359	358	269	356	267	368	341	365	339
Contagem	6	10	6	9	12	15	19	12	12	11	8	11	9	14

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	25	19	10	54	27	85	23	17	17	16	31	38	10	20
HD	375	381	390	346	373	315	377	383	383	384	369	362	390	380
Contagem	18	19	14	16	14	13	12	15	15	19	17	22	13	17

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	11	43	32	32	46	69	20	15	2.261
HD	389	357	368	368	354	331	380	385	17.739
Contagem	13	13	11	14	19	11	8	13	686

Animal: 3

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	141	76	20	18	177	90	114	49	52	71	37	73	25	29
HD	259	324	380	382	223	310	286	351	348	329	363	327	375	371
Contagem	19	28	34	27	24	17	15	22	18	26	9	7	11	17

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	38	12	14	42	31	19	58	18	36	35	27	41	38	43
HD	362	388	386	358	369	381	342	382	364	365	373	359	362	357
Contagem	9	23	16	11	16	12	16	18	21	15	14	7	15	16

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	34	49	104	33	43	18	28	19	32	27	30	54	39	28
HD	366	351	296	367	357	382	372	381	368	373	370	346	361	372
Contagem	11	19	14	19	18	7	15	9	11	11	13	15	17	13

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	25	38	17	8	74	19	65	37	2.245
HD	375	362	383	392	326	381	335	363	17.755
Contagem	15	17	8	7	15	15	13	9	777

Animal: 4

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	18	41	41	5	48	62	10	7	34	70	15	41	62	17
HD	382	359	359	395	352	338	390	393	366	330	385	359	338	383
Contagem	37	16	13	23	9	4	30	21	48	28	22	16	14	14

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	37	25	22	61	28	17	10	7	61	36	44	85	55	34
HD	363	375	378	339	372	383	390	393	339	364	356	315	345	366
Contagem	14	19	9	15	11	13	14	15	11	15	15	7	8	20

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	9	27	16	27	31	25	32	57	23	31	25	35	43	100
HD	391	373	384	373	369	375	368	343	377	369	375	365	357	300
Contagem	32	14	23	9	12	9	11	22	18	9	6	11	12	8

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	83	46	27	122	28	39	89	43	1.951
HD	317	354	373	278	372	361	311	357	18.049
Contagem	8	5	9	13	7	9	13	9	750

Animal: 5

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	106	80	68	44	67	69	64	72	79	88	49	114	111	47
HD	294	320	332	356	333	331	336	328	321	312	351	286	289	353
Contagem	21	19	18	24	8	13	25	14	9	22	17	25	16	27

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	62	24	8	80	5	67	68	30	9	40	42	13	10	32
HD	338	376	392	320	395	333	332	370	391	360	358	387	390	368
Contagem	22	21	12	21	11	14	14	14	29	33	22	17	11	23

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	27	35	110	75	65	53	50	14	17	83	35	39	25	22
HD	373	365	290	325	335	347	350	386	383	317	365	361	375	378
Contagem	26	16	7	12	17	14	19	13	17	11	11	30	22	15

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	20	29	43	48	25	30	32	35	2.460
HD	380	371	357	352	375	370	368	365	17.540
Contagem	10	31	17	15	13	16	13	11	868

Animal: 1

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	82	150	65	175	74	132	87	127	133	115	32	45	60	57
HD	318	250	335	225	326	268	313	273	267	285	368	355	340	343
Contagem	9	6	8	10	8	16	11	3	6	13	11	5	11	6

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	60	35	38	41	115	52	48	54	30	32	112	80	20	20
HD	340	365	362	359	285	348	352	346	370	368	288	320	380	380
Contagem	8	5	7	12	10	3	5	12	7	11	9	12	11	10

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	78	80	35	56	87	28	59	28	32	72	62	102	89	29
HD	322	320	365	344	313	372	341	372	368	328	338	298	311	371
Contagem	6	9	14	12	11	14	8	4	7	12	12	11	9	7

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	90	51	35	76	21	17	46	35	3.279
HD	310	349	365	324	379	383	354	365	16.721
Contagem	7	5	10	10	9	13	17	9	461

Animal: 2

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	26	42	87	122	102	78	140	122	72	267	18	49	76	21
HD	374	358	313	278	298	322	260	278	328	133	382	351	324	379
Contagem	5	15	5	7	3	5	7	9	9	8	8	13	8	11

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	44	47	48	32	35	10	40	96	29	21	44	65	51	82
HD	356	353	352	368	365	390	360	304	371	379	356	335	349	318
Contagem	11	9	10	9	10	7	9	14	10	9	9	11	4	8

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	85	18	47	51	28	60	21	43	15	44	25	14	22	56
HD	315	382	353	349	372	340	379	357	385	356	375	386	378	344
Contagem	8	3	5	11	7	17	8	13	14	13	9	7	8	15

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	64	38	25	35	36	39	30	40	2.702
HD	336	362	375	365	364	361	370	360	17.298
Contagem	13	11	12	23	16	13	12	17	498

Animal: 3

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	46	30	53	73	166	103	181	211	100	48	45	49	11	88
HD	354	370	347	327	234	297	219	189	300	352	355	351	389	312
Contagem	6	8	14	9	6	10	7	10	6	6	5	9	12	14

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	16	41	38	32	36	44	70	94	95	32	51	23	45	39
HD	384	359	362	368	364	356	330	306	305	368	349	377	355	361
Contagem	4	10	8	15	7	11	13	9	7	10	5	9	10	14

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	26	64	16	14	71	35	58	31	16	28	44	44	117	24
HD	374	336	384	386	329	365	342	369	384	372	356	356	283	376
Contagem	9	7	12	11	13	5	7	5	7	8	10	11	6	8

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	37	27	69	52	15	23	16	50	2.737
HD	363	373	331	348	385	377	384	350	17.263
Contagem	7	8	6	9	5	9	8	14	449

Animal: 4

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	68	47	34	22	101	98	144	145	144	49	82	33	49	35
HD	332	353	366	378	299	302	256	255	256	351	318	367	351	365
Contagem	13	10	9	6	7	17	5	8	14	19	8	9	10	10

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	34	48	33	20	60	9	22	45	50	37	38	27	72	17
HD	366	352	367	380	340	391	378	355	350	363	362	373	328	383
Contagem	7	13	7	9	11	13	7	6	6	5	11	11	14	14

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	12	29	28	16	33	41	26	47	49	37	36	58	55	45
HD	388	371	372	384	367	359	374	353	351	363	364	342	345	355
Contagem	19	12	10	12	8	7	11	10	13	11	12	20	12	17

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	43	21	40	50	15	12	21	15	2.292
HD	357	379	360	350	385	388	379	385	17.708
Contagem	5	11	13	16	9	7	8	8	530

Animal: 5

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	141	96	104	127	214	139	75	186	175	14	40	57	47	33
HD	259	304	296	273	186	261	325	214	225	386	360	343	353	367
Contagem	14	13	5	10	9	12	10	14	9	7	8	5	10	9

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	113	75	15	36	9	60	15	43	16	55	39	52	77	16
HD	287	325	385	364	391	340	385	357	384	345	361	348	323	384
Contagem	5	7	5	4	6	6	8	5	6	7	7	11	5	3

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	27	43	25	55	36	57	100	30	38	67	31	28	21	63
HD	373	357	375	345	364	343	300	370	362	333	369	372	379	337
Contagem	11	4	4	6	4	7	6	4	4	9	7	5	9	6

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	43	36	49	58	62	6	82	68	3.094
HD	357	364	351	342	338	394	318	332	16.906
Contagem	8	6	7	7	9	9	5	10	421

PLANILHA – COLORAÇÃO VERHOEFF

PU	CR	DIAS	f = PU/PT	AT	A = AT X F	C = CRX2	LD = 2XC/A
17.538	421	21	0,8769	386250	338702,62	842	0,0049719
18.369	435	21	0,91845	386250	354751,31	870	0,0049048
18.279	443	21	0,91395	386250	353013,18	886	0,0050196
17.356	346	21	0,8678	386250	335187,75	692	0,004129
17.917	446	21	0,89585	386250	346022,06	892	0,0051557
17.832	845	200	0,8916	386250	344380,5	1.690	0,0098147
17.739	686	200	0,88695	386250	342584,43	1.372	0,0080097
17.755	777	200	0,88775	386250	342893,43	1.554	0,009064
18.049	750	200	0,90245	386250	348571,31	1.500	0,0086065
17.541	862	200	0,87705	386250	338760,56	1.736	0,0102491
16.675	461	450	0,83375	386250	322035,93	922	0,005726
17.298	498	450	0,8649	386250	334067,62	996	0,0059628
17.263	449	450	0,86315	386250	333391,68	898	0,005387
17.708	530	450	0,8854	386250	341985,75	1.060	0,006199
16.906	421	450	0,8453	386250	326497,12	842	0,0051577

APÊNDICE B - COLORAÇÃO WEIGERT

Animal: 1 Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	22	10	134	10	23	35	55	28	31	12	57	20	106	31
HD	378	390	266	390	377	365	345	372	369	388	343	380	294	369
Contagem	12	26	11	18	8	13	17	18	27	20	20	19	15	6

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	56	42	88	77	27	34	33	108	93	40	45	82	47	33
HD	344	358	312	323	373	366	367	292	307	360	355	318	353	367
Contagem	20	16	9	32	26	18	16	22	27	20	17	12	24	11

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	89	46	36	44	20	21	28	99	113	67	55	44	51	23
HD	311	354	364	356	380	379	372	301	287	333	345	356	349	377
Contagem	15	20	13	13	19	21	29	9	10	9	20	9	33	24

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	30	15	58	25	36	62	34	66	2.441
HD	370	385	342	375	334	338	366	334	17.559
Contagem	20	16	11	18	29	28	12	11	889

Animal: 2

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	14	12	38	18	5	72	100	51	22	59	53	28	10	76
HD	386	388	362	382	395	328	300	349	378	341	347	372	390	324
Contagem	6	12	10	12	14	14	21	16	8	7	8	11	10	13

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	19	41	121	93	45	30	65	38	184	108	57	76	63	99
HD	381	359	279	307	355	370	335	362	216	292	343	324	337	301
Contagem	10	16	8	10	13	14	13	11	11	11	14	14	24	10

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	96	68	90	45	31	80	36	13	42	36	83	33	35	5
HD	304	332	310	355	369	320	364	387	358	364	317	367	365	395
Contagem	28	20	20	4	7	8	10	22	15	10	14	8	5	9

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	11	85	19	62	61	77	25	43	2.673
HD	389	315	381	338	339	323	375	357	17.327
Contagem	11	6	12	13	12	10	14	16	614

Animal: 3

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	37	22	54	46	95	97	70	38	34	19	39	16	120	32
HD	363	378	346	354	305	303	330	362	366	381	361	384	280	368
Contagem	17	27	12	7	15	17	5	6	10	10	5	7	9	12

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	61	66	56	74	45	92	76	81	58	87	116	97	56	64
HD	339	334	344	326	355	308	324	319	342	313	284	303	344	336
Contagem	6	9	11	7	5	7	7	12	8	10	7	10	8	12

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	86	57	34	37	105	80	35	35	32	90	35	65	28	82
HD	314	343	366	363	295	320	365	365	368	310	365	335	372	318
Contagem	5	9	6	10	10	9	12	8	10	7	3	11	13	7

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	19	90	63	30	56	37	16	24	2.884
HD	381	310	337	370	344	363	384	376	17.116
Contagem	6	11	16	7	16	9	9	13	485

Animal: 4

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	3	14	32	122	23	22	37	38	72	25	62	32	13	113
HD	397	386	368	278	377	378	363	362	328	375	338	368	387	287
Contagem	8	4	13	11	33	19	20	13	25	15	12	14	16	27

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	17	20	15	12	19	23	12	30	145	4	40	12	42	32
HD	383	380	385	388	381	377	388	370	255	396	360	388	358	368
Contagem	17	12	12	22	17	9	20	16	14	12	12	17	49	26

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	47	55	12	113	32	22	21	76	43	11	23	35	19	47
HD	353	345	388	287	368	378	379	324	357	389	377	365	381	353
Contagem	24	25	20	10	16	10	12	12	13	16	4	12	9	18

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	55	27	14	63	11	47	24	110	1.938
HD	345	373	386	337	389	353	376	290	18.062
Contagem	6	6	13	11	10	4	7	8	751

Animal: 5

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	18	33	4	41	17	77	56	15	69	122	33	87	34	12
HD	382	367	396	359	383	323	344	385	331	278	367	313	366	388
Contagem	21	17	9	9	15	6	3	19	22	12	16	18	6	8

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	91	22	24	22	23	36	53	39	19	53	22	22	39	83
HD	309	378	376	378	377	364	347	361	381	347	378	378	361	317
Contagem	5	5	15	12	7	14	14	15	10	15	7	9	13	6

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	64	16	30	20	15	63	17	35	45	67	11	38	46	49
HD	336	384	370	380	385	337	383	365	355	333	389	362	354	351
Contagem	7	13	4	7	11	13	14	11	10	9	6	11	12	10

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	74	41	14	16	29	81	112	32	2.081
HD	326	359	386	384	371	319	288	368	17.919
Contagem	8	10	5	14	9	11	10	11	544

Animal: 1

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	26	--	122	50	31	51	11	50	134	30	43	55	41	26
HD	374	400	278	350	369	349	389	350	266	370	357	345	359	374
Contagem	20	36	46	38	29	29	24	31	18	29	7	24	24	24

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	37	23	35	90	39	39	42	18	24	57	38	68	38	27
HD	363	377	365	310	361	361	358	382	376	343	362	332	362	373
Contagem	12	21	14	13	32	9	15	38	36	10	16	10	21	16

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	33	23	49	88	55	7	24	36	27	18	43	34	20	32
HD	367	377	351	312	345	393	376	364	373	382	357	366	380	368
Contagem	11	25	16	13	10	14	25	13	12	16	16	12	26	19

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	15	17	18	9	24	19	25	26	1.887
HD	385	383	382	391	376	381	375	374	18.113
Contagem	14	21	19	17	21	19	15	10	1.006

Animal: 2

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	67	104	74	26	79	135	49	13	75	83	64	13	31	18
HD	333	296	326	374	321	265	351	387	325	317	336	387	369	382
Contagem	26	23	25	34	32	22	17	25	26	19	22	18	17	18

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	44	9	10	22	54	39	77	19	25	13	19	57	56	52
HD	356	391	390	378	346	361	323	381	375	387	381	343	344	348
Contagem	15	21	23	25	27	23	22	29	15	16	18	22	26	15

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	56	92	54	24	72	17	42	15	30	52	77	72	69	57
HD	344	308	346	376	328	383	358	385	370	348	323	328	331	343
Contagem	18	20	23	29	20	15	25	25	31	31	23	20	19	22

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	61	55	26	30	19	42	32	31	2352
HD	339	345	374	370	381	358	368	369	17648
Contagem	19	19	31	29	21	23	16	23	1123

Animal: 3

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	60	62	33	36	100	104	37	64	55	50	39	70	43	22
HD	340	338	367	364	300	296	363	336	345	350	361	330	357	378
Contagem	40	46	70	56	24	19	38	27	24	19	20	21	25	28

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	44	33	60	46	33	52	22	23	33	40	30	44	17	32
HD	356	367	340	354	367	348	378	377	367	360	370	356	383	368
Contagem	23	14	14	14	15	11	17	33	17	12	18	21	19	12

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	11	23	38	37	37	25	55	61	80	68	33	64	13	60
HD	389	377	362	363	363	375	345	339	320	332	367	336	387	340
Contagem	17	16	30	19	17	17	12	18	15	14	24	19	23	11

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	158	89	9	44	40	34	37	41	2.341
HD	242	311	391	356	360	366	363	359	17.659
Contagem	16	15	14	16	14	16	17	19	1.076

Animal: 4

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	33	27	40	32	43	97	39	47	54	62	31	65	96	50
HD	367	373	360	368	357	303	361	353	346	338	369	335	304	350
Contagem	36	37	47	60	29	16	32	30	35	33	30	26	29	22

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	15	92	23	15	4	7	17	42	64	32	46	17	12	51
HD	385	308	377	385	396	393	383	358	336	368	354	383	388	349
Contagem	13	29	15	16	11	9	20	20	28	18	24	17	24	21

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	37	17	19	15	32	31	23	35	24	22	46	16	52	106
HD	363	383	381	385	368	369	377	365	376	378	354	384	348	294
Contagem	21	24	22	20	20	23	29	17	16	30	23	19	14	6

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	19	22	21	22	21	24	23	18	1.798
HD	381	378	379	378	379	376	377	382	18.202
Contagem	26	18	24	20	18	15	24	23	1.179

Animal: 5

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	92	86	71	34	102	13	40	34	19	34	63	89	7	14
HD	308	314	329	366	298	387	360	366	381	366	337	311	393	386
Contagem	24	19	30	33	30	43	36	20	41	42	17	20	25	27

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	14	14	44	19	102	31	17	83	38	97	33	32	35	25
HD	386	386	356	381	298	369	383	317	362	303	367	368	365	375
Contagem	19	35	27	32	25	32	17	18	23	11	16	23	15	23

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	21	32	44	24	30	30	38	45	30	114	14	5	35	48
HD	379	368	356	376	370	370	362	355	370	286	386	395	365	352
Contagem	13	24	27	40	29	40	16	30	31	22	33	28	23	22

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	20	30	21	36	22	20	29	80	2.050
HD	380	370	379	364	378	380	371	320	17.950
Contagem	48	31	18	9	15	19	33	16	1.290

Animal: 1

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	89	59	20	70	181	59	31	29	108	79	50	49	55	64
HD	311	341	380	330	219	341	369	371	292	321	350	351	345	336
Contagem	40	25	18	24	23	35	27	29	27	22	24	15	11	12

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	23	41	36	19	154	58	38	60	55	31	95	69	58	30
HD	377	359	364	381	246	342	362	340	345	369	305	331	342	370
Contagem	15	16	10	12	12	11	10	18	25	22	20	26	18	22

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	65	19	28	69	41	64	33	25	48	25	55	11	49	22
HD	335	381	372	331	359	336	367	375	352	375	345	389	351	378
Contagem	26	19	16	16	14	16	20	34	20	18	8	9	8	16

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	14	41	40	77	28	38	37	18	2.557
HD	386	359	360	323	372	362	363	382	17.443
Contagem	20	10	14	9	11	11	9	11	904

Animal: 2

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	104	126	53	124	--	73	43	129	49	75	47	9	105	31
HD	296	274	347	276	400	327	357	271	351	325	353	391	295	369
Contagem	18	31	29	19	50	32	26	22	33	35	14	22	15	18

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	44	36	58	26	12	47	17	33	26	14	42	25	21	33
HD	356	364	342	374	388	353	383	367	374	386	358	375	379	367
Contagem	17	23	21	19	16	16	22	21	20	17	20	18	23	21

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	50	44	21	17	50	40	39	17	64	30	34	12	8	15
HD	350	356	379	383	350	360	361	383	336	370	366	388	392	385
Contagem	17	29	23	11	23	18	20	8	14	26	21	20	26	14

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	26	27	28	25	39	95	84	51	2.218
HD	374	373	372	375	361	305	316	349	17.782
Contagem	19	23	15	12	18	28	14	14	1.051

Animal: 3

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	116	95	100	84	73	41	39	26	66	127	33	36	47	43
HD	284	305	300	316	327	359	361	374	334	273	367	364	353	357
Contagem	38	29	29	23	28	41	19	23	38	20	23	18	18	30

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	40	33	20	61	34	44	32	47	29	17	70	80	30	35
HD	360	367	380	339	366	356	368	353	371	383	330	320	370	365
Contagem	19	12	19	5	15	8	14	10	15	16	25	13	15	16

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	50	31	46	38	46	71	77	62	98	32	93	61	50	26
HD	350	369	354	362	354	329	323	338	302	368	307	339	350	374
Contagem	11	12	15	18	23	23	13	15	11	12	17	27	22	18

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	76	26	40	61	41	26	28	60	2.637
HD	324	374	360	339	359	374	372	340	17.363
Contagem	13	19	17	18	7	13	18	6	927

Animal: 4

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	36	27	79	43	21	29	75	11	17	31	67	65	59	59
HD	364	373	321	357	379	371	325	389	383	369	333	335	341	341
Contagem	42	36	22	30	28	23	20	10	25	47	11	16	15	12

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	30	40	36	38	22	28	27	17	58	12	9	18	67	68
HD	370	360	364	362	378	372	373	383	342	388	391	382	333	332
Contagem	8	9	9	9	16	12	10	18	18	13	8	16	9	10

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	59	50	33	28	44	56	56	122	42	41	36	90	43	43
HD	341	350	367	372	356	344	344	278	358	359	364	310	357	357
Contagem	12	17	16	19	16	19	15	17	14	11	13	5	10	23

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	33	27	63	45	24	27	12	62	2.125
HD	367	373	337	355	376	373	388	338	17.875
Contagem	16	13	12	13	19	24	15	16	837

Animal: 5

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	33	20	64	41	82	160	58	38	36	31	34	38	19	26
HD	367	380	336	359	318	240	342	362	364	369	366	362	381	374
Contagem	16	10	18	8	29	21	15	19	28	10	10	18	9	8

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	36	41	62	43	30	84	128	88	30	38	43	43	17	48
HD	364	359	338	357	370	316	272	312	370	362	357	357	383	352
Contagem	15	12	12	17	6	6	10	8	9	13	11	11	16	13

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	24	27	84	79	48	25	45	29	48	70	35	35	25	28
HD	376	373	316	321	352	375	355	371	352	330	365	365	375	372
Contagem	10	16	14	14	10	8	8	9	13	18	12	7	15	16

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	25	34	24	41	30	24	50	58	2.299
HD	375	366	376	359	370	376	350	342	17.701
Contagem	12	15	15	9	15	16	16	15	661

PLANILHA – COLORAÇÃO WEIGERT

PU	CR	DIAS	f = PU/PT	AT	A = AT X F	C = CRX2	LD = 2XC/A
17.559	889	21	0,87795	386250	339108,18	1.778	0,0104863
17.327	614	21	0,86635	386250	334627,68	1.228	0,0073395
17.116	485	21	0,8558	386250	330552,75	970	0,0058689
18.062	751	21	0,9031	386250	348822,37	1.502	0,0086118
17.919	544	21	0,89595	386250	346060,68	1.088	0,0062879
18.113	1.006	200	0,90565	386250	349807,31	2.012	0,0115034
17.648	1.123	200	0,8824	386250	340827	2.246	0,0131797
17.659	1.076	200	0,88295	386250	341039,43	2.152	0,0126202
18.202	1.179	200	0,9101	386250	351526,12	2.358	0,0134157
17.950	1.290	200	0,8975	386250	346659,37	2.580	0,0148849
17.443	904	450	0,87215	386250	336867,93	1.808	0,0107341
17.782	1.051	450	0,8891	386250	343414,87	2.102	0,0122417
17.363	927	450	0,86815	386250	335322,93	1.854	0,0110580
17.875	837	450	0,89375	386250	345210,93	1.674	0,0096984
17.701	661	450	0,88505	386250	341850,56	1.322	0,0077343

APÊNDICE C - COLORAÇÃO WEIGERT -OXONA

Animal: 1

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	80	137	35	51	127	85	123	41	96	92	69	141	61	70
HD	320	263	365	349	273	315	277	359	304	308	331	259	339	330
Contagem	17	14	23	10	22	10	32	25	9	15	19	23	24	20

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	21	102	58	17	129	32	13	45	40	79	47	63	53	24
HD	379	298	342	383	271	368	387	355	360	321	353	337	347	376
Contagem	19	19	28	15	14	13	27	13	18	27	19	16	22	9

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	39	52	24	41	31	29	40	36	54	32	72	48	22	23
HD	361	348	376	359	369	371	360	364	346	368	328	352	378	377
Contagem	36	31	30	19	26	10	15	24	24	20	21	13	22	29

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	54	69	53	49	25	72	30	179	3.005
HD	346	331	347	351	375	328	370	221	16.995
Contagem	22	15	36	27	26	10	13	11	1.002

Animal: 2

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	58	29	56	66	55	124	15	20	13	20	82	19	58	37
HD	342	371	344	334	345	270	385	380	387	380	318	381	342	363
Contagem	5	12	5	15	24	20	26	24	19	19	18	14	20	24

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	40	20	57	58	54	42	33	49	28	48	40	62	31	26
HD	360	380	343	342	346	358	367	351	372	352	360	338	369	374
Contagem	20	42	23	31	28	27	37	25	26	15	24	12	25	20

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	32	55	43	16	17	81	40	40	40	30	14	23	35	61
HD	368	345	357	384	383	319	360	360	360	370	386	377	365	339
Contagem	12	16	26	12	12	10	15	15	22	10	9	18	8	24

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	35	30	36	82	28	25	23	154	2.180
HD	365	370	364	318	372	375	377	246	17.820
Contagem	11	10	6	9	11	17	22	13	902

Animal: 3

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	25	18	48	4	21	16	85	31	46	20	47	37	16	74
HD	375	382	352	396	379	384	315	369	354	380	353	363	384	326
Contagem	32	10	25	15	12	27	19	15	8	14	36	17	30	18

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	82	28	183	102	17	17	37	85	34	32	48	34	24	18
HD	318	372	217	298	383	383	363	315	366	368	352	366	376	382
Contagem	16	18	23	13	16	17	49	18	35	25	35	32	17	15

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	111	14	63	43	24	44	28	13	12	61	13	10	32	15
HD	289	286	337	357	376	356	372	387	388	339	387	390	368	385
Contagem	9	13	15	32	43	46	53	15	18	20	18	8	28	21

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	15	44	38	64	42	24	19	23	1.981
HD	385	356	362	336	358	376	381	377	18.019
Contagem	22	17	22	23	27	29	24	8	1.118

Animal: 4

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	32	20	33	70	11	21	43	7	8	10	26	71	94	73
HD	368	380	367	330	389	379	357	393	392	390	374	329	306	327
Contagem	23	16	21	8	16	18	13	15	15	6	10	19	14	11

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	68	10	34	33	104	11	22	87	16	53	16	32	18	5
HD	332	390	366	367	296	389	378	313	384	347	384	368	382	395
Contagem	6	13	6	14	14	12	13	26	22	6	6	7	18	8

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	98	14	15	10	13	63	9	11	11	8	28	53	26	17
HD	302	386	385	390	387	337	391	389	389	392	372	347	374	383
Contagem	12	8	32	21	25	9	15	13	3	6	11	14	14	20

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	23	57	28	12	10	19	21	18	1.592
HD	377	343	372	388	390	381	379	382	18.408
Contagem	12	10	6	6	19	5	5	9	651

Animal: 5

Grupo: Neonato

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	92	150	150	90	130	38	47	83	38	16	53	23	43	26
HD	308	250	250	310	270	362	353	317	362	384	347	377	357	374
Contagem	11	12	3	13	9	10	23	5	21	38	28	8	27	16

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	12	31	10	29	20	32	14	62	6	38	10	90	80	45
HD	388	369	390	371	380	368	386	338	394	362	390	310	320	355
Contagem	32	21	28	27	36	24	41	11	15	8	8	17	41	24

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	96	19	20	19	24	16	22	24	35	16	29	96	24	14
HD	304	381	380	381	376	384	378	376	365	384	371	304	376	386
Contagem	19	19	20	19	24	10	20	6	15	6	13	7	11	6

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	24	17	20	23	40	24	27	17	2.104
HD	376	383	380	377	360	376	373	383	17.896
Contagem	19	15	8	12	18	12	5	13	854

Animal: 1

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	42	24	61	56	42	35	53	31	11	59	70	30	23	105
HD	358	376	339	344	358	365	347	369	389	341	330	370	377	295
Contagem	42	36	24	56	39	52	35	33	56	20	36	37	23	27

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	74	45	26	36	29	20	67	58	38	94	37	48	97	45
HD	326	355	374	364	371	380	333	342	362	306	363	352	303	355
Contagem	19	32	62	24	25	29	25	46	24	15	15	38	27	23

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	47	23	38	21	32	33	57	52	56	37	25	47	39	83
HD	353	377	362	379	368	367	343	348	344	363	375	353	361	317
Contagem	15	13	37	46	36	40	47	23	19	61	15	24	55	36

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	39	92	21	19	39	76	56	27	2.315
HD	361	308	379	381	361	324	344	373	17.685
Contagem	39	50	39	35	14	14	24	38	1.640

Animal: 2

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	41	63	49	12	23	48	31	39	56	55	34	37	30	27
HD	359	337	351	388	377	352	369	361	344	345	366	363	370	373
Contagem	28	17	13	25	58	44	40	38	43	36	33	34	35	36

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	22	18	8	68	39	44	54	90	22	37	40	20	33	18
HD	378	382	392	332	361	356	346	310	378	363	360	380	367	382
Contagem	46	50	55	28	37	48	44	10	49	51	45	50	50	41

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	24	14	36	33	14	10	11	24	10	9	53	42	11	47
HD	376	386	364	367	386	390	389	376	390	391	347	358	389	353
Contagem	34	62	56	38	60	20	18	35	28	29	16	16	22	23

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	11	23	118	47	30	26	23	117	1.791
HD	389	377	282	353	370	374	377	283	18.209
Contagem	46	38	28	36	21	28	40	20	1.789

Animal: 3

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	33	27	33	20	63	23	35	45	32	55	42	43	30	36
HD	367	373	367	380	337	377	365	355	368	345	358	357	370	364
Contagem	28	28	42	38	45	37	32	44	46	30	26	25	25	22

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	20	21	85	34	14	22	37	26	30	35	17	21	33	16
HD	380	379	315	366	386	378	363	374	370	365	383	379	367	384
Contagem	18	24	28	27	33	29	32	32	39	35	30	25	45	29

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	45	32	53	38	25	24	62	24	35	40	42	46	37	59
HD	355	368	347	362	375	376	338	376	365	360	358	354	363	341
Contagem	19	42	34	22	33	18	34	38	31	35	28	40	43	57

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	64	52	93	50	50	48	46	55	1.948
HD	336	348	307	350	350	352	354	345	18.052
Contagem	50	22	22	30	31	17	22	32	1.594

Animal: 4

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	46	65	40	29	9	16	12	19	94	55	36	47	9	33
HD	354	335	360	371	391	384	388	381	306	345	364	353	391	367
Contagem	40	27	27	35	38	50	53	53	32	30	30	23	84	43

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	14	2	100	15	45	70	17	11	82	37	17	122	104	32
HD	386	398	300	385	355	330	383	389	318	363	383	278	296	368
Contagem	54	61	24	20	18	15	21	32	21	29	26	15	19	17

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	28	12	75	52	26	18	25	17	30	40	17	34	20	77
HD	372	388	325	348	374	382	375	383	370	360	383	366	380	323
Contagem	40	65	15	25	37	44	19	27	22	45	40	35	39	54

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	13	19	34	14	60	44	8	55	1.896
HD	387	381	366	386	340	356	392	345	18.104
Contagem	57	25	46	45	43	29	28	25	1.742

Animal: 5

Grupo: Adulto

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	32	27	43	18	31	41	11	21	35	28	13	44	27	58
HD	368	373	357	382	369	359	389	379	365	372	387	356	373	342
Contagem	29	32	63	30	30	28	58	30	32	38	46	32	26	26

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	93	43	54	20	18	34	119	90	30	33	20	23	68	27
HD	307	357	346	380	382	366	281	310	370	367	380	377	332	373
Contagem	50	35	17	17	16	19	16	29	54	30	21	40	33	25

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	42	57	41	25	15	38	35	32	25	22	30	30	23	10
HD	358	343	359	375	385	362	365	368	375	378	370	370	377	390
Contagem	27	23	42	50	23	26	29	25	23	36	18	36	21	22

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	15	24	15	18	18	29	41	22	1.708
HD	385	376	385	382	382	371	359	378	18.292
Contagem	30	43	29	27	35	33	26	18	1.544

Animal: 1

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	24	28	50	63	39	39	37	24	28	55	28	19	108	85
HD	376	372	350	337	361	361	363	376	372	345	372	381	292	315
Contagem	42	32	23	32	24	29	38	39	29	19	15	16	16	14

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	150	90	54	91	80	33	70	20	26	50	82	26	255	42
HD	250	310	346	309	320	367	330	380	374	350	318	374	145	358
Contagem	15	13	14	16	17	16	10	8	16	10	11	17	14	15

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	35	9	21	12	54	70	8	18	17	18	19	73	36	113
HD	365	391	379	388	346	330	392	382	383	382	381	327	364	287
Contagem	12	20	11	11	13	9	12	11	9	12	20	9	10	17

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	15	6	19	6	20	14	150	7	2.436
HD	385	394	381	394	380	386	250	393	17.564
Contagem	16	18	14	10	23	8	7	12	844

Animal: 2

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	40	49	56	84	72	82	33	53	125	35	28	43	39	51
HD	360	351	344	316	328	318	367	347	275	365	372	357	361	349
Contagem	40	15	22	21	31	40	17	46	39	37	20	14	19	18

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	32	39	27	37	27	53	11	45	39	32	45	33	30	24
HD	368	361	373	363	373	347	389	355	361	368	355	367	370	376
Contagem	19	24	38	24	24	20	29	18	9	4	6	14	28	13

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	41	51	40	15	21	47	9	44	41	65	82	17	86	125
HD	359	349	360	385	379	353	391	356	359	335	318	383	314	275
Contagem	23	32	46	29	19	28	13	15	52	25	15	19	14	11

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	50	31	37	74	70	130	200	90	2.630
HD	350	369	363	326	330	270	200	310	17.370
Contagem	14	9	15	22	14	18	17	12	1.111

Animal: 3

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	33	50	59	48	92	66	58	132	54	23	24	5	25	42
HD	367	350	341	352	308	334	342	268	346	377	376	395	375	358
Contagem	80	33	31	33	9	30	21	22	31	19	19	18	20	9

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	80	32	47	60	38	60	88	41	43	57	40	64	25	90
HD	320	368	353	340	362	340	312	359	357	343	360	336	375	310
Contagem	14	18	9	32	26	32	25	18	26	17	9	17	17	28

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	158	130	33	83	78	42	22	16	40	34	40	33	53	109
HD	242	270	367	317	322	358	378	384	360	366	360	367	347	291
Contagem	29	9	17	9	13	11	22	26	12	16	17	22	24	23

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	21	28	33	48	58	40	25	30	2.630
HD	379	372	367	352	342	360	375	370	17.370
Contagem	12	20	24	11	19	12	15	14	1.040

Animal: 4

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	41	74	24	26	19	78	14	11	64	46	24	12	83	22
HD	359	326	376	374	381	322	386	389	336	354	376	388	317	378
Contagem	34	21	50	22	32	25	27	33	26	35	11	12	11	10

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	39	21	17	47	81	10	21	40	10	41	6	32	8	10
HD	361	379	383	353	319	390	379	360	390	359	394	368	392	390
Contagem	7	12	16	22	15	6	8	20	15	14	16	24	17	15

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	25	8	12	23	2	2	52	6	8	10	4	15	11	10
HD	375	392	388	377	398	398	348	394	392	390	396	385	389	390
Contagem	24	30	15	15	35	46	37	25	10	29	17	23	34	21

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	84	7	20	16	9	37	6	72	1.360
HD	316	393	380	384	391	363	394	328	18.640
Contagem	10	12	32	28	16	11	26	21	1.073

Animal: 5

Grupo: Velho

Campos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HF	88	69	54	66	55	57	14	13	22	46	69	38	50	182
HD	312	331	346	334	345	343	386	387	378	354	331	362	350	218
Contagem	27	15	18	21	24	20	33	45	29	26	10	12	10	11

Campos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HF	126	50	56	31	21	46	35	48	55	29	50	40	58	60
HD	274	350	344	369	379	354	365	352	345	371	350	360	342	340
Contagem	8	14	14	9	6	6	11	9	9	13	14	7	12	21

Campos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HF	46	13	10	28	90	37	32	30	40	92	13	36	17	25
HD	354	387	390	372	310	363	368	370	360	308	387	364	383	375
Contagem	15	11	11	19	9	15	19	24	35	19	26	26	16	15

Campos	43	44	45	46	47	48	49	50	Soma
HF	60	15	28	41	10	31	58	46	2.326
HD	340	385	372	359	390	369	342	354	17.674
Contagem	19	21	36	31	30	28	26	34	939

PLANILHA COLORAÇÃO - WEIGERT – OXONA

PU	CR	DIAS	f = PU/PT	AT	A = AT X F	C = CRX2	LD = 2XC/A
16.995	1.002	21	0,84975	386250	328215,93	2.004	0,0122114
17.820	902	21	0,891	386250	344148,75	1.804	0,0104838
18.019	1.118	21	0,9009	386250	347991,93	2.236	0,0128508
18.408	651	21	0,9204	386250	355504,5	1.302	0,0073248
17.896	854	21	0,8948	386250	345616,5	1.708	0,0098837
17.685	1.640	200	0,88425	386250	341541,56	3.280	0,0192070
18.209	1.789	200	0,91045	386250	351661,31	3.578	0,0203491
18.052	1.594	200	0,9026	386250	348629,25	3.188	0,0182887
18.104	1.742	200	0,9052	386250	349633,5	3.484	0,0199294
18.292	1.544	200	0,9146	386250	353264,25	3.088	0,0174826
17.564	844	450	0,8782	386250	339204,75	1.688	0,0099526
17.370	1.111	450	0,8685	386250	335458,12	2.222	0,0132475
17.370	1.040	450	0,8685	386250	335458,12	2.080	0,0124009
18.640	1.073	450	0,932	386250	359985	2.146	0,0119227
17.674	939	450	0,8837	386250	341329,12	1.878	0,011004