

Irina Geraldo

Alterações estruturais dos ductulos eferentes de galos domésticos (*Gallus gallus domesticus*) acometidos pela Litíase Epididimária

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2005

G354a Geraldo, Irina, 1976-

Alterações estruturais dos ductulos eferentes de galos domésticos (*Gallus gallus domesticus*) acometidos pela litíase epididimária / Irina Geraldo. – 2005.

29 p. : il

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Galo – Doenças – Teses. 2. Epidídimo – Anomalias – Teses. 3. Epidídimo–
Histologia – Teses. I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Universidade Federal de
Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 9

Agradeço ao Professor Germán Arturo Bohórquez Mahecha e ao Professor Nelson Rodrigo da Silva Martins pela oportunidade e atenção dedicada. Dedico meu título a minha mãe Nora Celina Cuneo e ao meu pai Francisco Geraldo que me ensinaram a valorizar a pesquisa e o desenvolvimento intelectual.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 - ANATOMIA E HISTOLOGIA DOS TESTÍCULOS.....	9
2.2 – ANATOMIA E HISTOLOGIA DA REGIÃO EPIDIDIMÁRIA	10
2.3 –LITÍASE EPIDIDIMÁRIA	11
2.3.1 – <i>Primeira descrição</i>	11
2.3.2 – <i>Descrições recentes</i>	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 – LOCAL.....	13
3.2 – OS ANIMAIS.....	13
3.3 – MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ.....	13
3.4 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4.1- LESÕES OBSERVADAS NO EPITÉLIO.....	14
4.2- LESÕES DO TECIDO CONJUNTIVO	16
4.3- FORMAÇÃO DOS CÁLCULOS.....	16
5. CONCLUSÕES	16
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura I - Representação esquemática dos ductos da região epididimária	17
Figura II – Aspecto histológico da região epididimária de galo não acometido pela Litíase Epididimária.....	18
Figura III – Alterações ultraestruturais (MET) do epitélio dos ductos eferentes de galos com Litíase Epididimária	19
Figura IV – Aspectos histológicos do processo de vacuolização celular. Coloração histológica com azul de toluidina borato de sódio.....	20
Figura V – Aspectos ultraestruturais da vacuolização celular (MET)	21
Figura VI – Aspectos ultraestruturais de outras alterações do epitélio dos ductos eferentes (MET)	22
Figura VII - Aspectos ultraestruturais da descamação epitelial (MET)	23
Figura VIII - Aspectos ultraestruturais das alterações do tecido conjuntivo sub-epitelial dos ductos eferentes (MET).....	24
Figura IX – Aspectos histológicos da reação inflamatória do tecido conjuntivo sub-epitelial dos ductos eferentes. Coloração histológica com azul de toluidina borato de sódio.	25
Figura X - Histologia das fases de formação dos cálculos epididimários .Coloração histológica com azul de toluidina borato de sódio.....	26
Figura XI - Aspectos de cálculos epididimários. Coloração histológica com azul de toluidina borato de sódio.	27

RESUMO

A Litíase Epididimária (LE) vem sendo descrita recentemente em galos nos Estados Unidos e no Brasil. A causa dessa disfunção, que é associada com baixa fertilidade, é desconhecida. O presente trabalho descreve os aspectos histológicos da LE, por análises através da microscopia óptica de luz e microscopia eletrônica de transmissão dos epidídimos de galos maduros. O epitélio dos ductulos eferentes apresentou áreas de aspecto normal intercaladas por áreas com alterações variadas, que não dependeram da presença de cálculos no seu lúmen, sendo que todos os animais apresentavam algum grau de alteração. Observou-se no epitélio dos ductulos eferentes, o aumento do número e do tamanho dos lisossomas das células não ciliadas. Algumas regiões dos ductulos eferentes se apresentaram dilatadas, com perda do pregueamento e presença de vacúolos basais. As células ciliadas perderam seus cílios e com a ruptura das membranas apicais houve saída de conteúdo citoplasmático para a luz dos ductulos. Essas alterações celulares levam à perda do epitélio por descamação com ou sem lesão da membrana basal, que quando ocorre levam a profundas alterações no tecido conjuntivo sub-epitelial. No lúmen dos ductulos eferentes ocorreu um acúmulo de espermatozóides que se juntam com as células epiteliais descamadas formando aglomerados celulares. Esses aglomerados celulares se organizam, formando massas compactas que sofrem calcificação, resultando nos cálculos nos ductulos eferentes. A alta disseminação e severidade da LE são indicativas da sua importância como causa de infertilidade em galos.

Palavras chave: litíase epididimária, *Gallus gallus domesticus*, galos domésticos, ductulos eferentes, infertilidade.

ABSTRACT

Epididymary lithiasis (EL) was studied using light and electronic microscopy histopathology in roosters (*Gallus gallus domesticus*) naturally affected by EL in Minas Gerais, Brazil. EL has been described in the United States and Brazil as a cause of low fertility of male chickens, although the actual primary etiology is as yet unknown. Industrial and free-range chickens were studied and all animals presented some degree of alteration in the eferent ductules (ED), although normal areas were seen alongside variedly altered areas which did not correlate with the presence of luminal stones. ED epithelium non-ciliated cells presented several and large lysosomes. Plicae loss and basal vacuoles were observed in the epithelium of ED dilated regions. Ciliated cells cilia loss and apical cytoplasmic membrane rupture resulted in leak of the cytoplasmic contents to the ED lumen, and ED epithelium desquamation loss occurred with or without lesion to the basal membrane. Basal membrane alterations were associated to profound subepithelial connective tissue damage. Aggregations of desquamated epithelium and spermatozoa were seen in the lumen of ED and compact aggregates were considered the basis for calculi formation. The widespread occurrence and high severity of EL lesions are indicative of the importance of EL as a cause of infertility in male chickens.

Keywords: Epididymal lithiasis, *Gallus gallus domesticus*, eferent ductule, rooster, infertility.

1. INTRODUÇÃO

A galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) é a principal espécie de ave explorada como fonte de proteína animal para a alimentação humana. A espécie tem sido, desde épocas remotas, manipulada geneticamente, por cruzamentos, de linhagens dedicadas ao crescimento rápido, aumento da sua produção de carne e de ovos. Originalmente a galinha doméstica, em estado silvestre, apresentava reprodução natural tipicamente sazonal e uma limitada produção de ovos por ano. Após a domesticação, esta ave passou a exibir uma produção contínua ao longo do ano, sendo também incrementada sua produção de carne e ovos (Mahecha et al., 2002).

Recentemente, foi reportado que o macho de *Gallus gallus domesticus* (galo doméstico), quando atinge o primeiro ano de vida, apresenta uma marcada redução da espermatogênese, chegando inclusive à perda total da fertilidade. Este fenômeno tem sido descrito como síndrome da baixa fertilidade prematura do galo (Muncher et al., 1995). Os animais que apresentam essa síndrome podem exibir o pico da fertilidade (96%) com aproximadamente 32 semanas e uma baixa extrema na fertilidade (5%) com 110 semanas de idade (Rosenstrauch et al., 1994, Muncher et al., 1995). A patogenia da síndrome da infertilidade prematura foi relacionada à presença de cálculos de carbonato de cálcio nos ductulos eferentes de galos.

Janssen et al. (2000) identificaram, em diferentes criações de galos domésticos dos Estados Unidos, a doença denominada litíase epididimária (LE). Estes autores demonstraram que os galos afetados pela LE apresentavam redução da espermatogênese e dos níveis sanguíneos de testosterona, tendo a capacidade reprodutiva comprometida.

Mahecha et al., (2002) encontraram a LE também nas criações comerciais e domésticas de galos no Brasil, com incidência de 94,3%, e

descreveram alterações testiculares e epididimárias ocasionadas por esta anomalia. Devido à alta incidência e ao impacto econômico decorrentes da LE, maiores informações sobre essa doença, tais como as lesões produzidas, sua etiologia, tratamento e reais conseqüências, tornam-se indispensáveis.

O presente trabalho objetivou descrever os aspectos histológicos da LE, por análises em microscopia óptica de luz e microscopia eletrônica de transmissão dos epidídimos de galos sexualmente maduros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os órgãos reprodutivos das aves diferem dos mamíferos em aspectos importantes. Alguns exemplos são a localização, a forma, o peso e o tamanho dos testículos. Seu aumento varia em virtude de certos fatores tais como a idade e a exposição à luz. Na ave galiforme madura são igualmente importantes, a ausência de pênis e de um aparelho copulador verdadeiro, como o fálus (Bull, 1994), presente em aves de outras ordens, como Anseriformes e Struthioniformes, e a existência da cloaca.

O aparelho genital masculino das aves é formado pelos testículos, ductulos eferentes, região epididimária, ducto deferente e, em algumas espécies, pelo aparelho copulador.

2.1 - Anatomia e histologia dos testículos

Os testículos são órgãos pares situados dorsalmente na cavidade corporal, a cada lado da linha mediana, ventralmente à porção cranial dos rins e caudalmente à superfície ventral dos pulmões.

Para Schwarze e Schroder (1970), os testículos do galo imaturo medem 1 cm de comprimento e 0,5 cm de largura, enquanto que na atividade sexual atingem 3,5 cm x 2,5 cm.

A organização histológica da gônada masculina de aves difere daquela dos

mamíferos. A maior parte do testículo é composta por túbulos seminíferos que são separados por um escasso tecido intersticial. Cada túbulo é formado por uma camada de tecido conjuntivo chamado tecido peritubular que é revestido, em sua superfície interna, por um epitélio germinativo e externamente pela membrana basal (Amer e Shalin, 1975). O epitélio germinativo é formado pelas espermatogônias situadas entre as células de Sertoli. Segundo Lake (1957) e Tingari (1971), os túbulos seminíferos se abrem diretamente na chamada rede testicular. De acordo com Aire (1982), a rede testicular liga os túbulos seminíferos à região epididimária através dos túbulos retos (Figura I). Na região da rede testicular há uma mudança abrupta no epitélio desses túbulos (Tingari, 1971).

2.2 – Anatomia e histologia da região epididimária

Os epidídimos são estruturas alongadas e fusiformes, intimamente aderidas ao longo do comprimento da borda dorsomedial dos testículos (Gray, 1937; Amer e Shalin, 1975; Getty, 1981). Ao contrário dos mamíferos, o epidídimo das aves é extremamente curto e não é dividido em cabeça, corpo e cauda (Lake, 1957). A região epididimária é composta pela rede testicular, ductos eferentes e ductos epididimários (Figura I) (Tingari, 1971; Budras e Sauer, 1975; Hess et al., 1976). De acordo com Tingari (1971), Aire (1979) e Aire et al. (1979) os ductos eferentes são estruturas que ocupam a maior proporção da área da região epididimária, sugerindo que eles representam funcionalmente a estrutura mais importante das vias genitais das aves.

O desenvolvimento anormal dos ductos eferentes, em qualquer ave, reduz a fertilidade e ocasiona anormalidades morfológicas e funcionais nos espermatozoides (Janssen et al., 2000). A baixa fertilidade dos galos tem sido associada à má formação de origem genética dos ductos eferentes (Kirby et al., 1990). Tingari (1971) afirma que, quando a atividade

sexual é mínima, os ductos eferentes são mais estreitos e mais pregueados e a altura das células reduzida.

A função primária dos ductos eferentes das aves é a reabsorção de fluido testicular, transporte, concentração do espermatozóide e secreção de proteínas (Tingari, 1972; Hess e Thurston, 1977; Clulow e Jones, 1988; Nakai et al., 1989; Ilio e Hess, 1994 citados por Janssen et al. 2002).

Budras e Sauer (1975) consideram que os ductos eferentes do galo apresentam duas porções contínuas: o ducto eferente proximal e o ducto eferente distal (Figura I). O diâmetro da região proximal é mais amplo. A mucosa da face luminal é pregueada para aumentar a superfície de contato (Figuras IIa e IIb). Segundo Aire et al. (1979), há dois tipos celulares neste epitélio: células não ciliadas e células ciliadas.

As células não ciliadas sempre se estendem da membrana basal para o lúmen. Seus núcleos são redondos ou ovais e ocupam a metade basal da célula. Apresentam vilosidades na face luminal e possuem vacúolos de tamanhos variados. São consideradas por Aire (1980) células não ciliadas tipo I. As células ciliadas aparentemente não atingem a membrana basal, seus núcleos são ovais ou alongados e estão localizados na metade luminal das células e é por isso que o epitélio se apresenta pseudoestratificado. Os cílios projetam-se livremente para o lúmen do ducto que, à medida que se torna mais estreito, passa a ser referido como ducto eferente distal.

O epitélio dos ductos eferentes distais também é constituído de células ciliadas, idênticas àquelas da região proximal, e células não ciliadas do tipo II. A diferença desse tipo celular para o tipo I é que estas, quando possuem vacúolos, são poucos e menores. Ainda um quarto tipo celular é encontrado em todo o trajeto do ducto eferente, o linfócito

intraepitelial, cujo papel é ainda discutido (Aire, 1980).

Tingari (1971) e Aire (1979) consideram que os ductos eferentes conectam-se aos ductos epididimários via ductos de conexão. Estes ductos possuem o lúmen mais estreito e a face externa é mais regular e lisa. Possuem epitélio colunar pseudoestratificado ciliado.

Os ductos de conexão abrem-se no ducto epididimário. O ducto epididimário apresenta um percurso ondulado estendendo-se desde a extremidade cranial até a extremidade caudal da superfície dorsal do epidídimo. Seu epitélio é colunar pseudoestratificado ciliado. Entre as células colunares aparecem células redondas com citoplasma claro e núcleo esférico (Gray, 1937). Caudalmente, o ducto epididimário continua-se com o ducto deferente. O ducto epididimário está preso ao restante do epidídimo por tecido conjuntivo frouxo, entretanto o ducto deferente encontra-se livre. De acordo com Tingari (1971), a parte inicial do ducto epididimário é estreita, mas ocorre um aumento gradual de seu diâmetro.

O ducto deferente possui dobras epiteliais na superfície luminal e células não ciliadas colunares com núcleos esféricos localizados na metade da célula, com poucas e curtas vilosidades (Aire et al., 1979), apresentando, ainda, células basais ocasionais (Getty, 1981).

2.3 – Litíase Epididimária

2.3.1 – Primeira descrição

Nos estudos realizados nos Estados Unidos com galos Leghorn por Janssen et al. (2000) foram encontradas alterações no epidídimo de 75% dos animais pesquisados. Entre 18 e 26 semanas de idade apareceram inclusões císticas esféricas, lisas e repletas de fluido transparente. Acima de 26 semanas, os cistos se tornaram sólidos, irregulares e com cálculos amarelo-esverdeados no seu interior. O tamanho e o número de cálculos aumentaram

com a idade, sendo que o primeiro variou de 9 a 160µm. A análise química desses cálculos mostrou que eram formados por pouco material orgânico (7,72%) e que o cálcio era o principal componente (48%). Os cálculos foram encontrados apenas em machos sexualmente maduros.

Nesse mesmo estudo, o exame histológico do trato reprodutivo revelou inflamação crônica no epidídimo caracterizada pela presença de abundante infiltrado intersticial de células mononucleares. Nos ductos que continham cálculos, havia menos projeções luminiais. Em alguns segmentos, o epitélio colunar foi substituído por um epitélio cuboidal escamoso ou estava completamente erodido. De um lado a outro, poucas dobras estavam presentes, reduzindo, assim, a superfície de contato com o lúmen.

Em galos que apresentavam cálculos, houve uma redução da massa dos testículos ($14,2 \pm 1,4g$) quando comparados a animais sem cálculos ($20,5 \pm 1,2g$). A concentração de testosterona no sangue também apresentou uma redução significativa em galos com cálculos ($0,9 \pm 0,3ng/ml$) quando comparados a galos sem cálculos ($2,6 \pm 0,4ng/ml$). Nos galos da mesma idade a produção de espermatozoides também caiu, sendo que, em galos normais, observou-se $12,3 \pm 0,8 \times 10^8$ espermatozoides/testículo/dia (ETD) e em galos que apresentavam a doença os valores eram de $8,1 \pm 1,3 \times 10^8$ ETD. Segundo Janssen et al. (2000), todos esses dados sugerem redução da fertilidade.

A inflamação encontrada no interstício epididimário pode ser uma condição para a formação de cálculos de cálcio no epidídimo uma vez que elas bloqueiam a saída de esperma dos testículos. Isso resulta em acúmulo de fluido nos túbulos seminíferos, aumentando a pressão nos testículos e a conseqüente interrupção da espermatogênese. Janssen et al. (2000) apresentam duas hipóteses para explicar sua etiologia, uma vez que se trata de uma doença de origem desconhecida. A primeira é de uma possível

infecção pelo vírus da bronquite infecciosa com alta afinidade para o trato reprodutivo, que provoca inflamação crônica nos ductos eferentes e formação de cálculos. A segunda é que podem ser o resultado de altas concentrações de vitamina D3 nas dietas.

Galos das raças White Rock e Rhode Island têm sido estudadas no Japão e também apresentam LE, sugerindo que esse é um problema mundial.

2.3.2 – Descrições recentes

Em outro estudo, realizado por Mahecha et al. (2002), foram encontrados cálculos na região epididimária em 94,3% dos galos analisados. Esses animais eram provenientes de diferentes regiões do estado de Minas Gerais. O número de cálculos variou de 4 a 245 por ave. Não foram encontrados cálculos ou alterações morfológicas em outros órgãos examinados.

Nesse mesmo estudo (Mahecha et al., 2002), foram analisadas outras quatro espécies domésticas: pato doméstico (*Anas platyrhynchos*), codorna doméstica (*Coturnix coturnix*), pombo (*Columba livia*) e peru (*Meleagris gallopavo*). Além destas, vinte e uma espécies de aves silvestres também foram examinadas: perdiz (*Rhynchotus rufescens*), codorna do campo (*Nothura maculosa*), ema (*Rhea americana*), mergulhão (*Podilymbus podiceps*), biguá (*Phalacrocorax olivaceus*), garça-branca (*Egretta thula*), urubu (*Coragyps atratus*), gavião cará-cará (*Polyborus plancus*), gavião carijó (*Buteo magnirostris*), jacu (*Penelope supercilialis*), rolinha cascavel (*Scardafella squamata*), papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), guanau preto (*Crotophaga ani*), coruja da igreja (*Tyto alba*), corujinha-do-mato (*Otus choliva*), coruja buraqueira (*Speotyto cunicularia*), mãe-da-lua (*Nictibius griseus*), curiango (*Nyctidromus albicollis*), martin-pescador (*Chloroceryle amazona*), tucano (*Rhamphastus toco*) e pica-pau (*Chrysoptilus melanochlorus*). Em nenhuma dessas espécies foram encontrados cálculos no epidídimo.

Os cálculos encontrados apresentavam formato irregular e diâmetro variando de 100 a 3000µm. A coloração variou entre marfim, amarelo e rosa claro. Os cálculos tinham consistência firme e eram facilmente detectados pelo toque. A microanálise mostrou que os cálculos eram formados por 43,5% de cálcio, 28% de oxigênio, 23,5% de carbono, 1% de enxofre, 0,3% de magnésio, 0,3% de sódio e 0,2% de fósforo.

Em todos os animais com LE, os ductulos eferentes apresentaram alterações intercalando áreas de aparência normal. Nas áreas afetadas, o epitélio mostrou um excesso de vacúolos supranucleares nas células não ciliadas. Esses vacúolos foram negativos para PAS e para coloração para lipídios (Sudam III e Sudam Black). Em áreas com degeneração epitelial mais intensa, os vacúolos ocuparam quase todo o citoplasma. Em estágios mais avançados de degeneração havia atrofia dos ductulos eferentes. Infiltrados mononucleares foram observados em extensões variáveis.

A coloração com alizarina revelou finas inclusões intracelulares vermelhas nas células epiteliais dos ductulos eferentes, indicando presença de calcificação. As células ciliadas não apresentaram evidências de alterações morfológicas.

No lúmen de alguns ductulos eferentes havia um variável número de espermatozoides e restos celulares em adição aos cálculos. Algumas massas compactas acidofílicas, metacromáticas e PAS positivas e de diferentes tamanhos foram encontradas e algumas vezes associadas a fragmentos espermáticos e debris celulares. A calcificação dessas massas era evidenciada pela coloração com alizarina. O centro dessas massas era calcificado com aparecimento de pequenos núcleos concêntricos alternados com material orgânico e mineralizado, sendo que a calcificação da periferia só foi observada em massas maiores.

O conteúdo luminal (cálculos e massas compactas) era rodeado por um envelope de células escamosas em continuidade com o epitélio dos ductos eferentes. Nesses sítios de contato apareciam agregados de células inflamatórias e sinais de fibrose.

O peso e o tamanho dos testículos variaram muito e, independente disso, apareceram áreas com diferentes graus de alterações, sendo que, em áreas gravemente afetadas, ocorreu a perda da arquitetura testicular. Nessas áreas, apenas poucos túbulos seminíferos estavam presentes e o tecido conectivo intersticial estava completamente invadido por células mononucleares, e as células de Leydig eram de difícil observação. Os túbulos seminíferos remanescentes tinham diâmetro e o lúmen ocluído por restos celulares.

O teste de ELISA apresentou resultado negativo para anticorpos contra IBV, demonstrando que a sugestão de Janssen et al. (2000) não foi confirmada. Também foi rejeitada a hipótese de que a origem dos cálculos poderia ter como causa a suplementação com vitamina D₃, uma vez que um dos grupos estudados neste experimento era de galos caipiras que nunca receberam suplementação.

Não foi observada uma correlação entre o peso dos testículos e as concentrações de cálcio na água. Também não ocorreu correlação entre o número de cálculos e a concentração de cálcio na água.

Recentemente, um estudo realizado por Boltz et al. (2004) demonstrou que animais vacinados para a bronquite infecciosa apresentavam LE enquanto que animais não vacinados não apresentavam a doença.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Morfologia de Aves do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e as análises ultraestruturais foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica do ICB/UFMG (CEMEL).

3.2 – Os animais

Foram analisados cinquenta e oito galos domésticos de diferentes regiões do estado de Minas Gerais que apresentavam LE. Os animais eram todos adultos, porém de diferentes idades e raças. As aves foram sacrificadas com overdose de pentobarbital intravenosa (50 mg/kg), perfundidas com solução salina para aves (NaCl 0,75%, Lucas, A. M., 1972) e fixadas também por perfusão com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 a 4°C. Os testículos foram retirados da cavidade e os epidídimos foram separados com auxílio de microscópio estereoscópio. O diagnóstico da LE foi feito por palpação dos epidídimos e os que continham cálculos foram, em seguida, submetidos a processamento para estudos em Microscópio Óptico de Luz ou para Microscopia Eletrônica de Transmissão. Os animais controle sem LE foram igualmente processados para descrição dos epidídimos normais.

3.3 – Microscopia óptica de luz

Os fragmentos preparados para microscopia óptica de luz foram descalcificados em líquido de Perenji, desidratados em séries crescentes de etanol, incluídos em glicolmetacrilato e cortados em seções de 5 µm de espessura com navalha de vidro, em micrótomo Reichert. Essas seções foram coradas em azul de toluidina 1% em borato de sódio 0,5% durante 30 segundos. As preparações obtidas foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus com filme Kodak de 100 ASA.

3.4 – Microscopia eletrônica de transmissão

Primeiramente, os fragmentos de ductulos eferentes selecionados foram imersos em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 a 4°C por 1h e posteriormente lavados em três banhos de 30 minutos cada apenas com tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 a 4°C. Em seguida foram pós-fixados com tetróxido de ósmio a 2,5%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 a 4°C, por 3h e novas lavagens nesse tampão foram efetuadas. O material foi desidratado em série crescente de etanol, seguida de três banhos de acetona e pré-infiltradas em resina composta de uma mistura de Araldite e Epon 812 com acetona, em iguais proporções. A infiltração foi feita com resina pura e a inclusão orientada das peças em cápsulas de plástico. Cortes semifinos (0,5 a 1,5µm) semi-seriados foram obtidos com navalha de vidro de 6 mm de espessura, adaptada a ultramicrótomo.

Os cortes foram montados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina 1% em borato de sódio 0,5% para se estudar a orientação dos cortes ultrafinos (60 a 100 nm). Esses foram obtidos usando navalha de diamante, acoplada ao ultramicrótomo, montados em tela de cobre de 200 ou 300 aberturas / polegada e contrastados pelo acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo. O material foi analisado em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM 10 A. Foram feitas fotomicrografias dos preparados e realizadas cópias em papel F3 da Kodak.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Lesões observadas no epitélio

Na análise dos preparados para microscopia ótica, o epitélio dos ductulos eferentes de galos, acometidos pela LE, apresentou áreas de aspecto normal, nas quais as dimensões das células ciliadas e não ciliadas, assim como suas características tintoriais, permaneceram aparentemente inalteradas. Entretanto, em outras áreas observaram-se alterações

variadas, que não dependeram da presença de cálculos no seu lúmen.

As alterações eram de diferentes frequências e intensidades, sendo que todos os galos com LE apresentaram algum grau de alteração. A distribuição espacial das alterações não se apresentou de forma contínua ou seqüencial, o que dificultou a interpretação da possível seqüência dos eventos cronológicos das alterações. A análise de preparados histológicos de cortes semi-seriados permitiu estabelecer algumas relações entre as alterações do epitélio dos ductulos eferentes com a formação dos cálculos em seu lúmen.

Resultados similares foram encontrados na análise das fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão (MET), nas quais são bem perceptíveis as alterações das estruturas celulares, assim como as mudanças das densidades eletrônicas das organelas.

Considerando-se a evolução da patogenia da LE, a análise seqüencial das alterações permitiu concluir que, inicialmente, elas são simples, com alterações leves em poucas células e estruturas do epidídimo e que, à medida que avança o processo, tornam-se mais complexas, evoluindo de alterações na membrana celular até a destruição epitelial. A primeira modificação detectada no epitélio dos ductulos eferentes é o aumento no número de lisossomas na região supranuclear das células não ciliadas (Figura IIIa). Apesar de não ter sido feita a análise quantitativa das organelas, o aumento dos lisossomas é visualizável em microscopia óptica de luz. Em cada corte histológico longitudinal do epitélio dos ductulos eferentes de galos não afetados pela LE, são observados, em média, até 8 lisossomas, enquanto que, nos animais afetados pela doença, o número de lisossomas é visivelmente maior (n>20). Além da quantidade, também foi identificado o aumento no tamanho dos lisossomas (Figura IIIb).

A análise das fotomicrografias, além de confirmar o aumento no número de lisossomas, determinou que o aumento no volume dos lisossomas é por fusão dessas organelas, e pela formação de lisossomas secundários, que possuem, no seu interior corpos vesiculares com diferentes densidades eletrônicas (Figura IIIa). Nas regiões onde os ductos eferentes se apresentaram dilatados e com perda do pregueamento, foi detectada a presença de vacúolos basais, que se iniciavam discretamente e atingiam níveis extremos, chegando a ocupar todo o citoplasma celular (Figura IVa, b, c e d), em concordância com o descrito por Mahecha et al. (2002).

A análise das microfotografias mostrou que a vacuolização basal das células ciliadas e não ciliadas do epitélio dos ductos eferentes é ocasionada por um processo que envolve ruptura das membranas celulares, que se inicia com tumefação das camadas eletrondensas interna e externa da membrana plasmática das faces basais e laterais das células do epitélio dos ductos eferentes (Figura IIIc).

Essa tumefação é evidenciada pela perda da nitidez dos contornos das camadas eletrondensas. Logo após, as camadas sofrem ruptura parcial ou total, desaparecendo ou permanecendo apenas imagens unilaminares (Figura Va, b, c e d). A perda de continuidade das membranas plasmáticas é seguida de formação de vacúolos que contêm organelas em processo de lise (Figura Va, b, c e d). Na fase final da formação, os vacúolos apresentam conteúdo claro com restos de organelas em sua região periférica. A formação de vacúolos contíguos leva à liquefação total das células comprometidas no processo.

As membranas dos retículos endoplasmáticos liso e rugoso também apresentam ruptura e desorganização similar à apresentada pelas membranas celulares. Assim como as membranas dos lisossomas. Com essa ruptura, ocorre saída do material enzimático para o citoplasma, com a conseqüente autólise das

organelas celulares (Figura IIIb). Esse fato mostra que a ruptura da membrana lisossômica também está envolvida no processo de vacuolização celular. Entretanto, a membrana mitocondrial e o envoltório nuclear aparentemente não apresentam o processo de fragmentação uma vez que, ainda nos estágios mais adiantados de degradação celular, essas organelas se mantêm íntegras.

Também foram encontradas lesões no ápice das células. As células ciliadas perderam seus cílios, ou os mesmos sofreram fragmentação (Figura III d). As microvilosidades das células ciliadas e não ciliadas também sofreram degradação. Com a ruptura das membranas apicais houve saída de conteúdo citoplasmático para a luz dos ductos (Figura VIa).

Neste estudo, processos que envolvem necrose das células epiteliais dos ductos eferentes também foram observados, além de edema, retração, liquefação e apoptose (Figura VIb).

Essas alterações celulares levam à perda do epitélio por descamação com ou sem lesão da membrana basal (Figura VIIa e b). As células, em processo de descamação, podem ser vistas com aparência normal, ou seja, com membranas celulares mantendo sua integridade trilaminar, núcleos e organelas preservados.

Entretanto, outras células que sofrem o processo de descamação podem ser encontradas com qualquer uma das alterações descritas anteriormente. A fragmentação e ruptura da membrana basal contribuem fundamentalmente para a descamação do epitélio dos ductos eferentes, e leva, também, a profundas alterações no tecido conjuntivo sub-epitelial (Figura VIIc e d).

A descamação epitelial não parece ser o evento final das alterações dos ductos eferentes, uma vez que processos de recanalização (Figura Xd) foram observados com certa frequência.

Massas de células descamadas foram vistas rodeadas diretamente por tecido conjuntivo (Figura Xe) devido à perda total do epitélio.

4.2- Lesões do tecido conjuntivo

A primeira lesão observada no tecido conjuntivo é a intensa infiltração de células inflamatórias mononucleares, predominantemente de macrófagos e linfócitos, assim como descrito por Janssen et al. (2000) e confirmado por Mahecha et al. (2002). Esse infiltrado apareceu tanto difuso quanto multifocal (Figura IXa e b). Além disso, observaram-se alterações no endotélio dos vasos, com formação de coágulos (Figura VIIIa) e desprendimento das células endoteliais. Edema no tecido sub-endotelial só foi verificado quando já havia um significativo comprometimento do epitélio adjacente (Figura VIIIb).

Em estágios avançados, o processo inflamatório já se cronicava, caracterizando-se inicialmente por fibroplasia, até a total substituição do epitélio dos ductos eferentes por tecido conjuntivo fibroso (Figura Xf).

Com a perda total do epitélio, os cálculos entram em contato diretamente com o tecido conjuntivo, que também pode sofrer descamação.

4.3- Formação dos cálculos

No lúmen dos ductos eferentes ocorreu um acúmulo de espermatozoides (Figura Xa), possivelmente relacionado às lesões das células epiteliais que perdem ou diminuem sua capacidade de reabsorção, resultando nesse acúmulo de fluido testicular. Houve, a partir daí, a dilatação dos ductos eferentes com diminuição do pregueamento do epitélio. Com a descamação das células epiteliais, elas se juntam aos espermatozoides e células que também se descamam dos testículos,

formando aglomerados celulares no lúmen do órgão (Figura Xb).

Posteriormente, esses aglomerados celulares começam a se organizar, formando as massas compactas encontradas por Mahecha et al. (2002). Após essa organização, elas sofrem calcificação, resultando nos cálculos nos ductos eferentes (Figura Xc).

Em alguns casos, os cálculos são envoltos por epitélio do ducto. E finalmente, ocorre o deslocamento desses cálculos para o ducto epididimário, ou a tentativa de reabsorção por células inflamatórias (Figura XIa, b, c e d).

5. CONCLUSÕES

A análise anátomo-histopatológica e com microscopia eletrônica de epidídimos de galos com LE, do presente trabalho permitiu concluir que a LE provoca alterações histológicas nos ductos eferentes de galos domésticos, tais como vacuolização das células epiteliais com rompimento das membranas celulares, o aumento do número de lisossomas e perda de cílios, lesões na membrana basal e perda do epitélio. Além disso, a LE também é capaz de induzir reações inflamatórias com infiltração de células mononucleares, edema dos tecidos envolvidos e lesões endoteliais.

Diante desse quadro, pode-se notar a severidade das lesões provocadas pela LE nos ductos eferentes de galos domésticos, por representarem alterações, em alguns casos irreversíveis, com grandes prejuízos à reprodução na avicultura industrial, tendo em vista as consequências negativas à fertilidade dos machos.

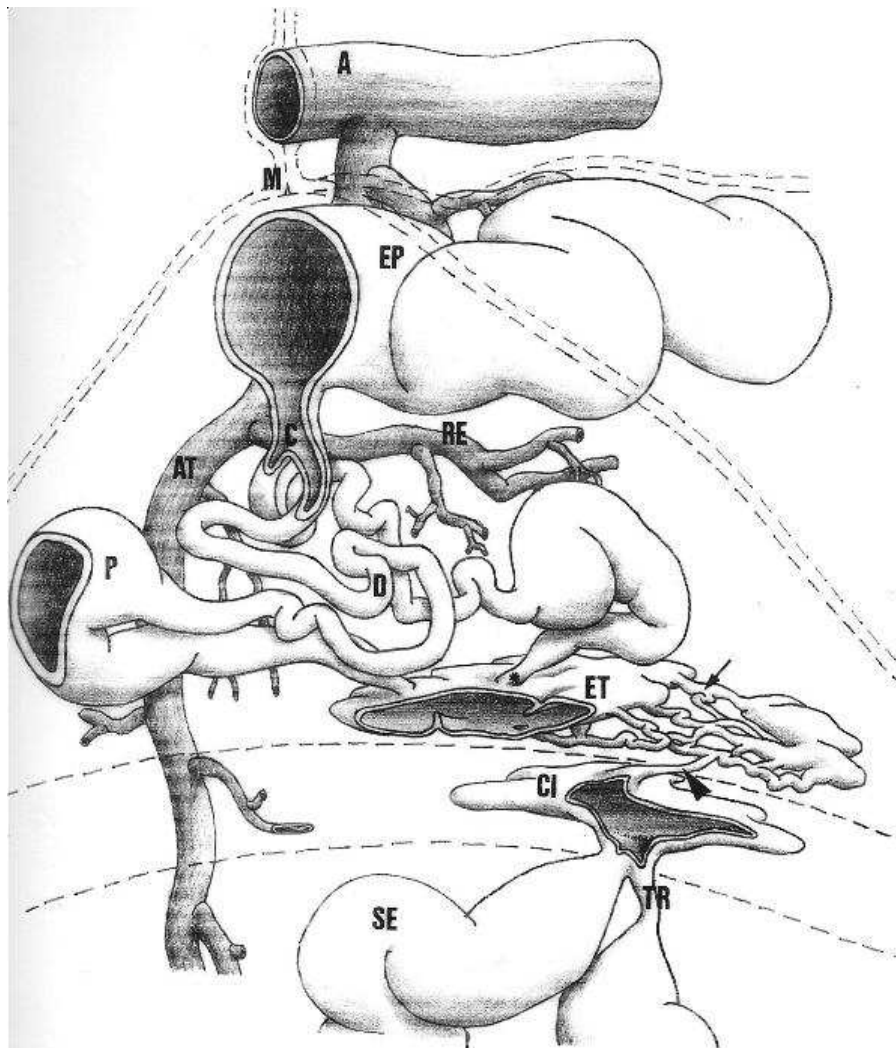


Figura I - Representação esquemática dos ductos da região epididimária

Representação esquemática dos ductos da região epididimária de aves em corte transversal destacando, túbulos seminíferos, SE; túbulos retos, TR; cisternas da rede testicular intracapsular, CI; ducto afluyente, cabeça de seta; rede de ductos intercomunicantes, seta; rede testicular extratesticular, ET; ducto efluente, asterisco; ductulo eferente proximal, P; ductulo eferente distal, D; ducto de junção, C; ducto do epidídimo, EP, aorta, A; artéria testicular, AT; ramo arterial para o epidídimo, RE; mesórquio, M. (modificado a partir de desenho de Oliveira Câmara B. G.)

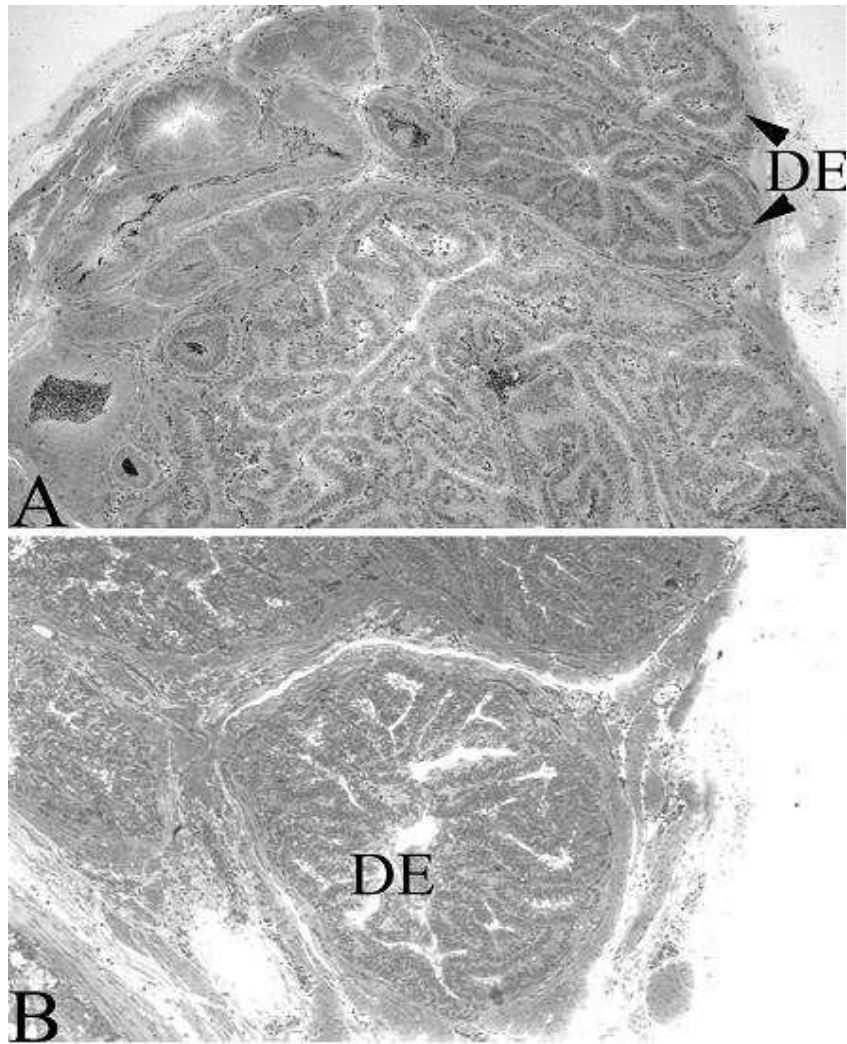


Figura II – Aspecto histológico da região epididimária de galo não acometido pela Litíase Epididimária

A – Vista panorâmica da região dos ductos eferentes (DE). Coloração histológica com azul de toluidina borato de sódio (300X).

B – Detalhe do corte transversal de um ducto eferente (DE) evidenciando seu intenso pregueamento e os lisossomas apicais nas células não ciliadas do epitélio. Coloração histológica com azul de toluidina borato de sódio (600X).

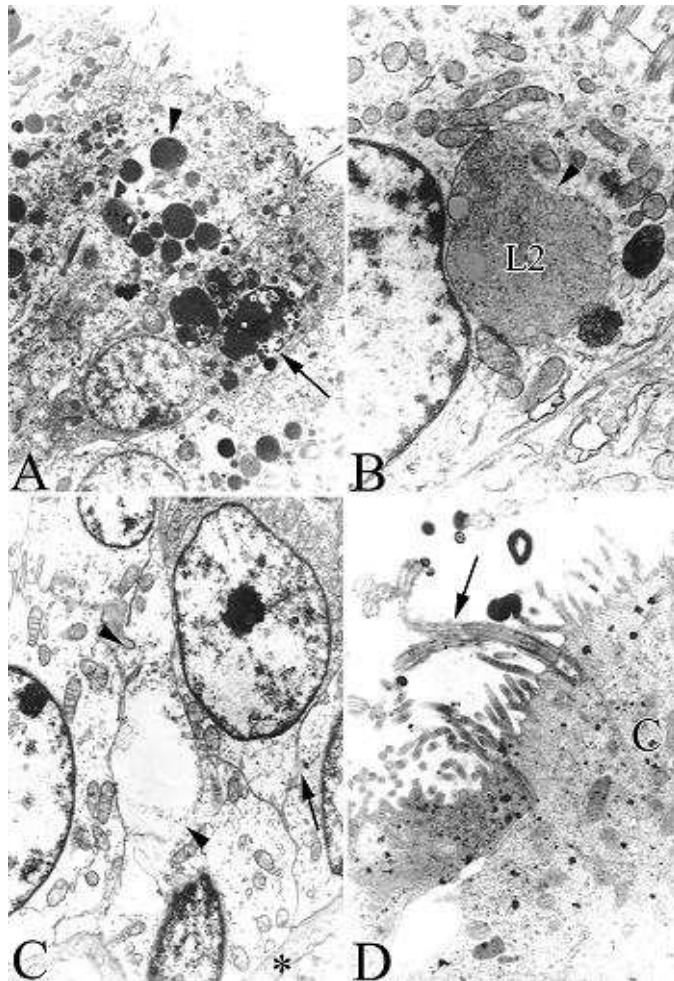


Figura III – Alterações ultraestruturais (MET) do epitélio dos ductulos eferentes de galos com Litíase Epidimária

A – Aumento do número de lisossomas primários (cabeça de seta) e secundários (seta) na região supranuclear das células. Os lisossomas secundários apresentam corpos vesiculares de diferentes densidades eletrônicas. (14.000X)

B – Aumento de tamanho do lisossoma secundário (L2) com ruptura de sua membrana e saída do material enzimático para o citoplasma da célula (cabeça de seta). (30.000X)

C – Vacuolização basal das células epiteliais iniciando-se por tumefação das camadas eletrônicas interna e externa da membrana plasmática (seta) e ruptura das membranas celulares (cabeças de setas) nas faces lateral e basal. A membrana basal (*) apresenta aspecto normal. (30.000X)

D – Célula ciliada (C) com perda de cílios. Cílio remanescente com fragmentação apical (seta). (30.000X)

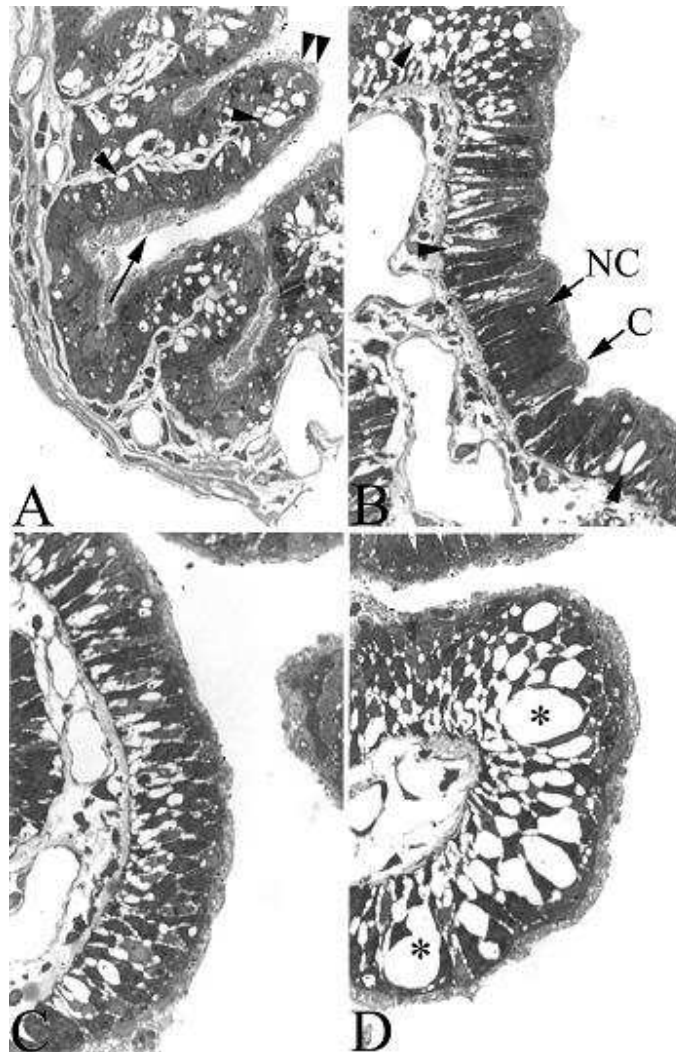


Figura IV – Aspectos histológicos do processo de vacuolização celular. Coloração histológica com azul de toluidina borato de sódio.

- A – Vacuolização celular iniciando-se na porção basal das células epiteliais (cabeças de seta). Segmentos do epitélio com células ciliadas íntegras (seta) e regiões com células com perda total dos cílios (dupla cabeça de seta). (3.000X)
- B – Diferentes graus de vacuolização celular (cabeças de setas). Tanto as células ciliadas (C) como as não ciliadas (NC) sofrem vacuolização. (3.000X)
- C – Células epiteliais dos ductos eferentes em diferentes estágios de vacuolização. (3.000X)
- D – Intensa e avançada vacuolização celular. Vacúolos ocupando quase todo o citoplasma das células (*). (3.000X)

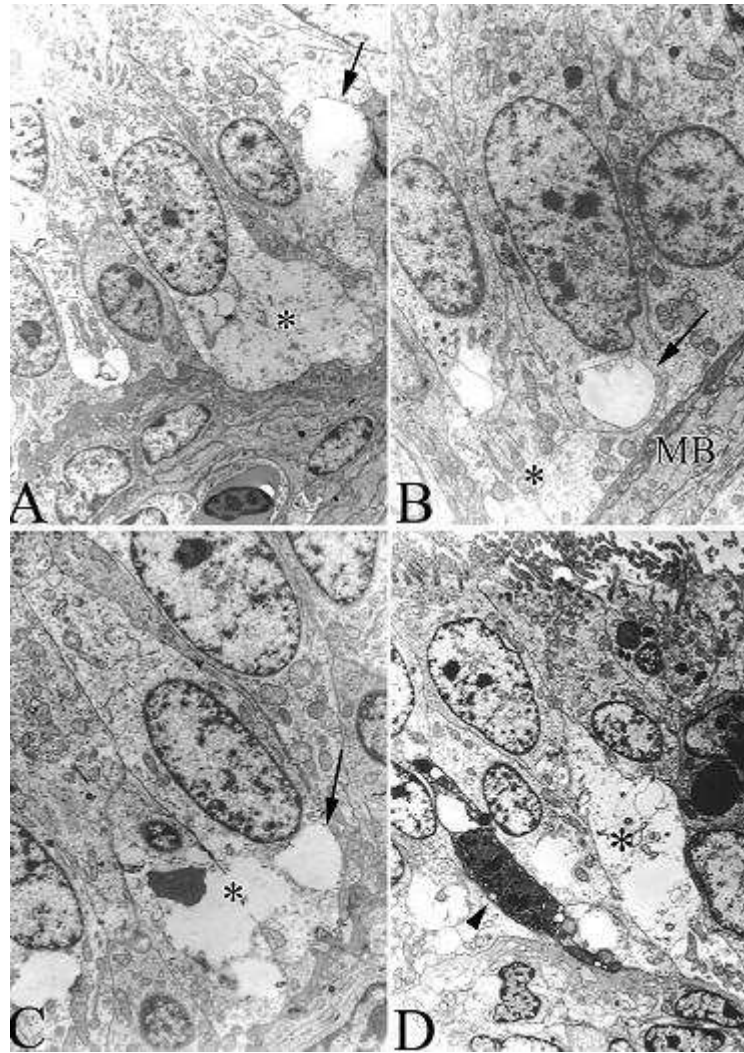


Figura V – Aspectos ultraestruturais da vacuolização celular (MET)

A, B, C e D - Vacúolos contendo restos de organelas em processo de lise (*). Ruptura da membrana celular e formação de vacúolo (seta). Vacuolização basal (seta) com membrana basal íntegra (MB). (14.000X)

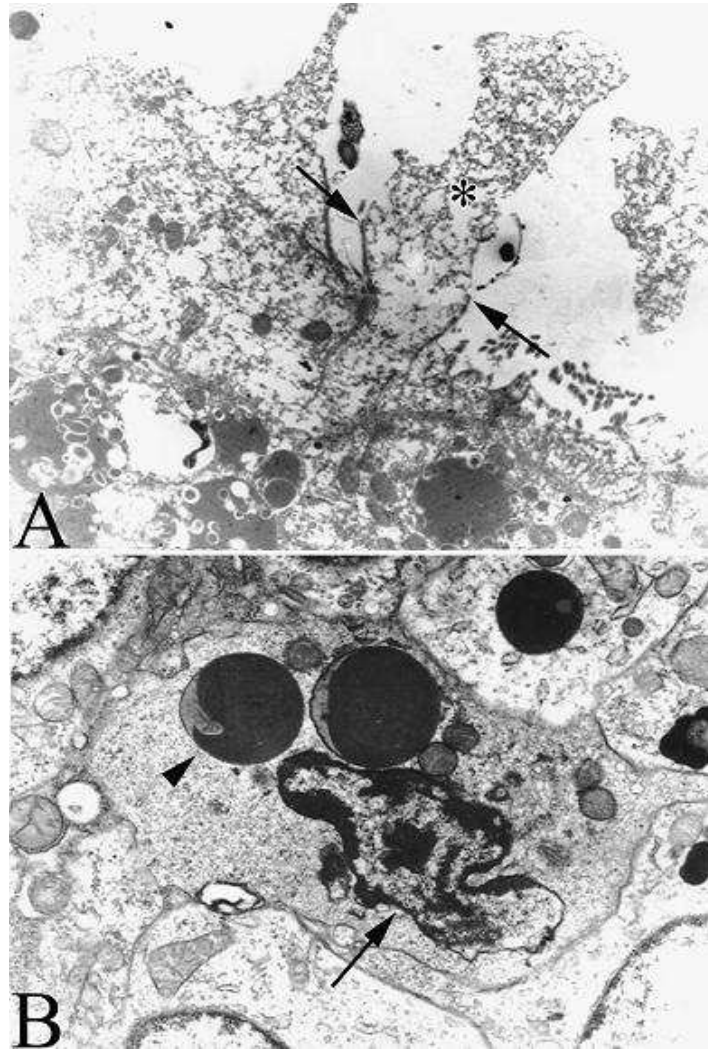


Figura VI – Aspectos ultraestruturais de outras alterações do epitélio dos ductulos eferentes (MET)

A – Ruptura da membrana apical da célula epitelial com saída do conteúdo citoplasmático para o lúmen do ductulo eferente. (30.000X)

B – Célula epitelial do ductulo eferente com corpos apoptóticos (cabeça de seta). O núcleo da célula encontra-se em processo de apoptose (seta). (30.000X)

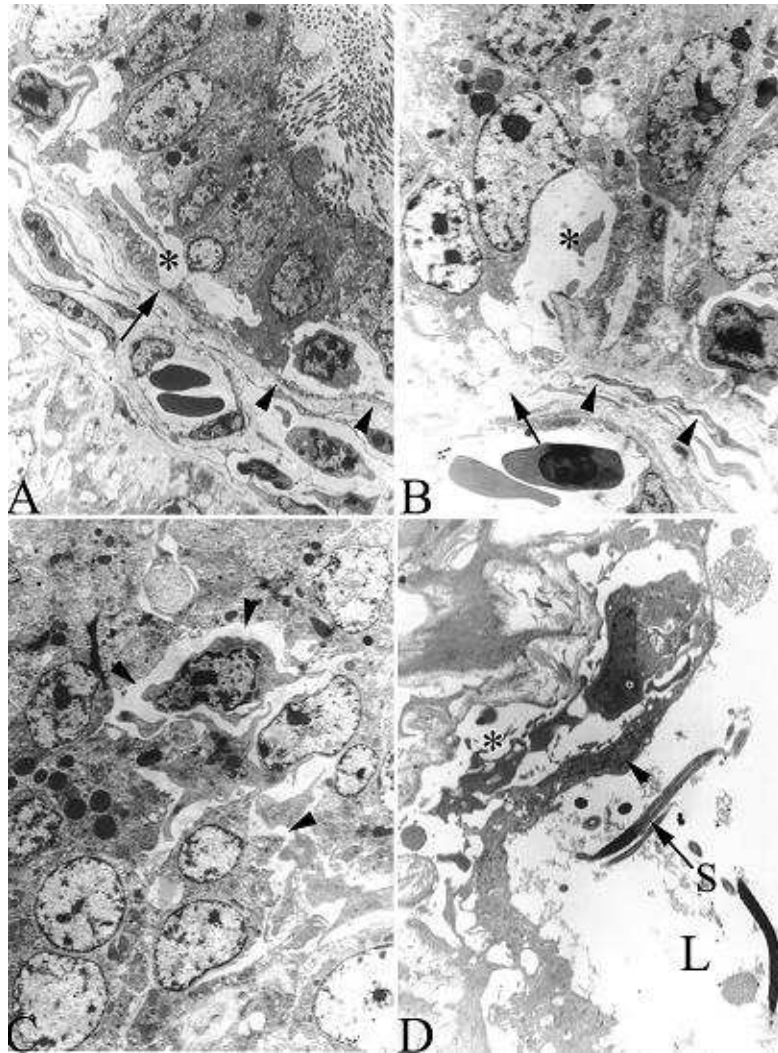


Figura VII - Aspectos ultraestruturais da descamação epitelial (MET)

A, B – Epitélio dos ductulos eferentes em processo de vacuolização (*). Membrana basal (cabeças de seta), com porção fragmentada (seta). (14.000X)

C – Corte tangencial do epitélio dos ductulos eferentes com edema epitelial evidenciado pelo aumento do espaço intercelular (cabeças de seta). Células apresentando condensação nuclear. (14.000X)

D - Perda do epitélio dos ductulos eferentes com fibroblasto (cabeça de seta) em contato direto com o lúmen. Edema do tecido conjuntivo sub-epitelial (*). Espermatozóide (S) no lúmen do ductulo (L). (14.000X)

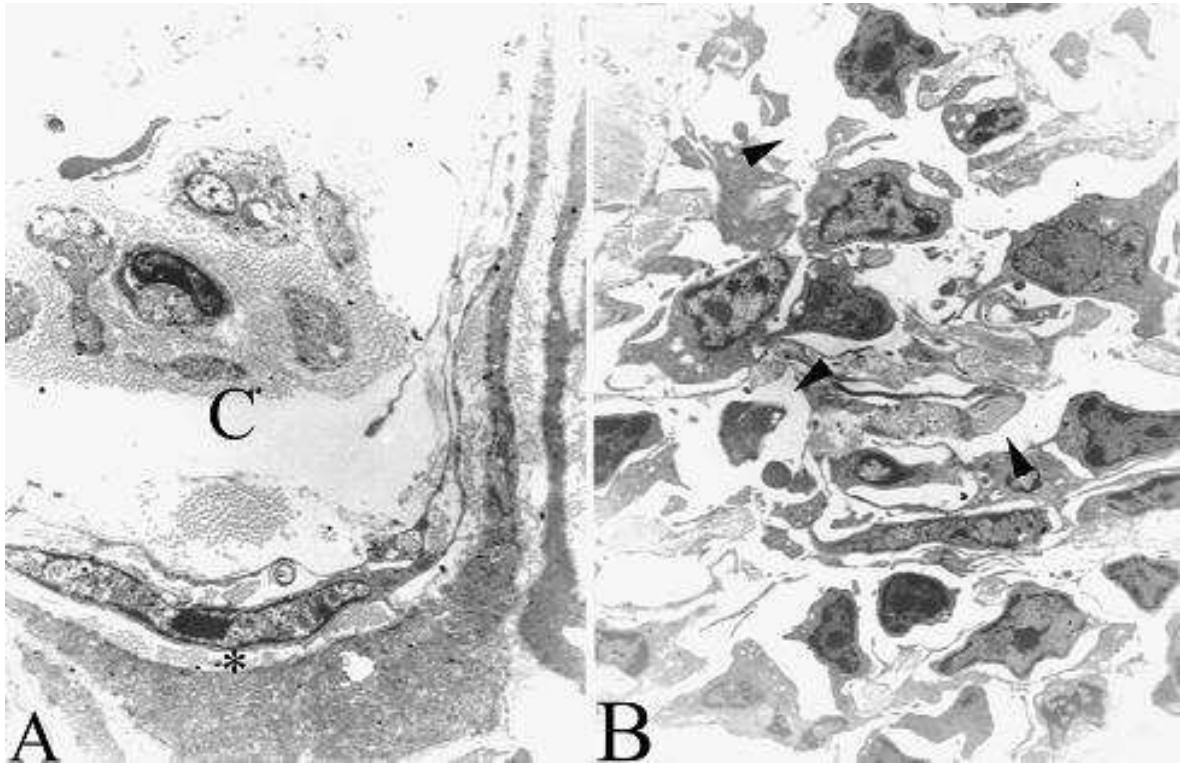


Figura VIII - Aspectos ultraestruturais das alterações do tecido conjuntivo sub-epitelial dos ductos eferentes (MET)

A - Lesões vasculares evidenciadas pelo edema sub-endothelial (*) e formação de coágulo no lúmen vascular (C). (30.000X)

B - Edema do tecido conjuntivo sub-epitelial evidenciado pelo aumento de líquido intercelular (cabeças de seta). (14.000X)

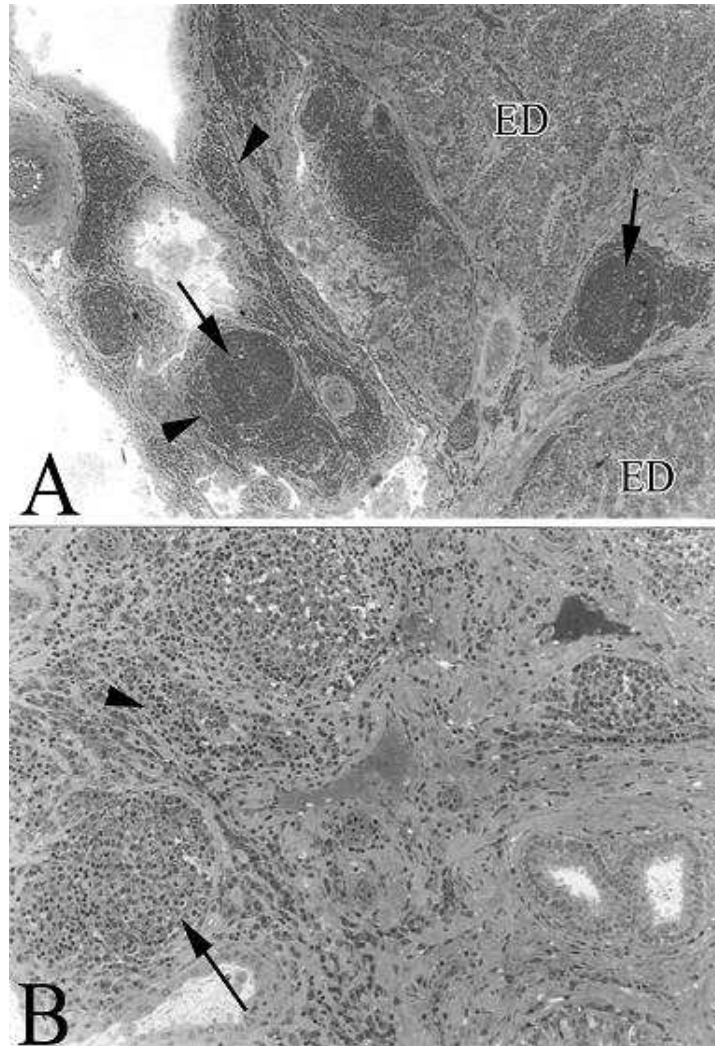


Figura IX – Aspectos histológicos da reação inflamatória do tecido conjuntivo sub-epitelial dos ductulos eferentes. Coloração histológica com azul de toluidina borato de sódio.

A – Acúmulo focalizado (seta) e difuso (cabeças de seta) de células inflamatórias mononucleares no tecido conjuntivo sub-epitelial e no interstício da região dos ductulos eferentes. (300X)

B – – Acúmulo focalizado (seta) e difuso (cabeças de seta) de células inflamatórias mononucleares no tecido conjuntivo sub-epitelial e no interstício da região dos ductulos eferentes. (600X)

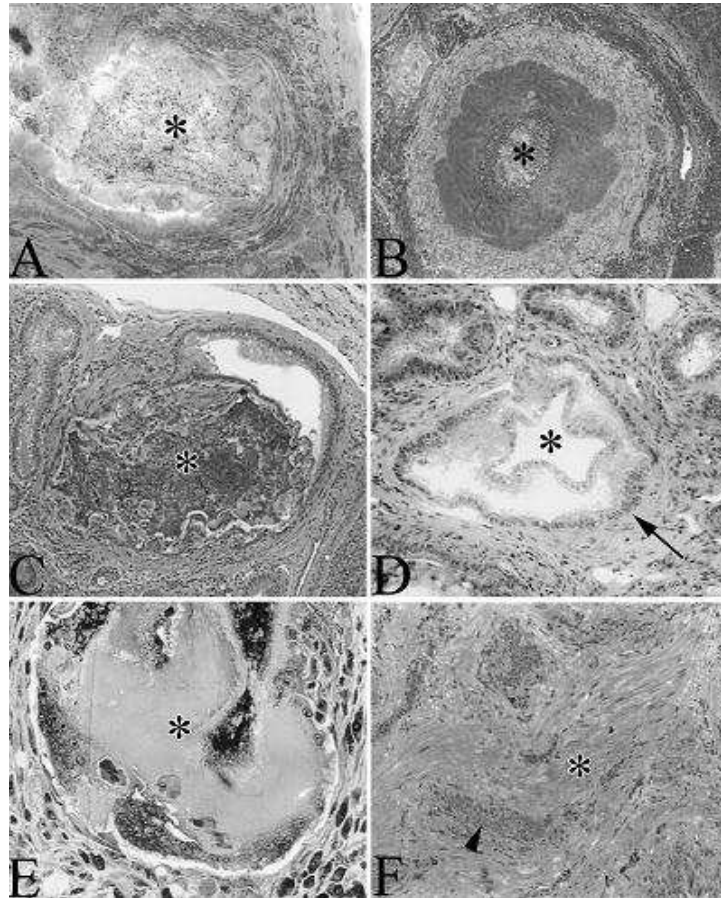


Figura X - Histologia das fases de formação dos cálculos epididimários .Coloração histológica com azul de toluidina borato de sódio.

- A - Acúmulo de espermatozóides no lúmen dos ductulos eferentes (*). (600X)
- B - Acúmulo de células descamadas e de espermatozóides organizadas em uma massa central no lúmen dos ductulos eferentes (*). (300X)
- C - Cálculo calcificado no lúmen do ductulo eferente (*). Coloração de cálcio pela alizarina. (300X)
- D - Recanalização de um ductulo eferente (seta). (600X)
- E - Cálculo epididimário envolvido, diretamente, por tecido conjuntivo (*), devido à perda do epitélio. (1000X)
- F - Substituição do epitélio dos ductulos por tecido conjuntivo fibroso (*). Resquícios de tecido epitelial (cabeça de seta) aparecem entre as áreas de fibrose. (600X)

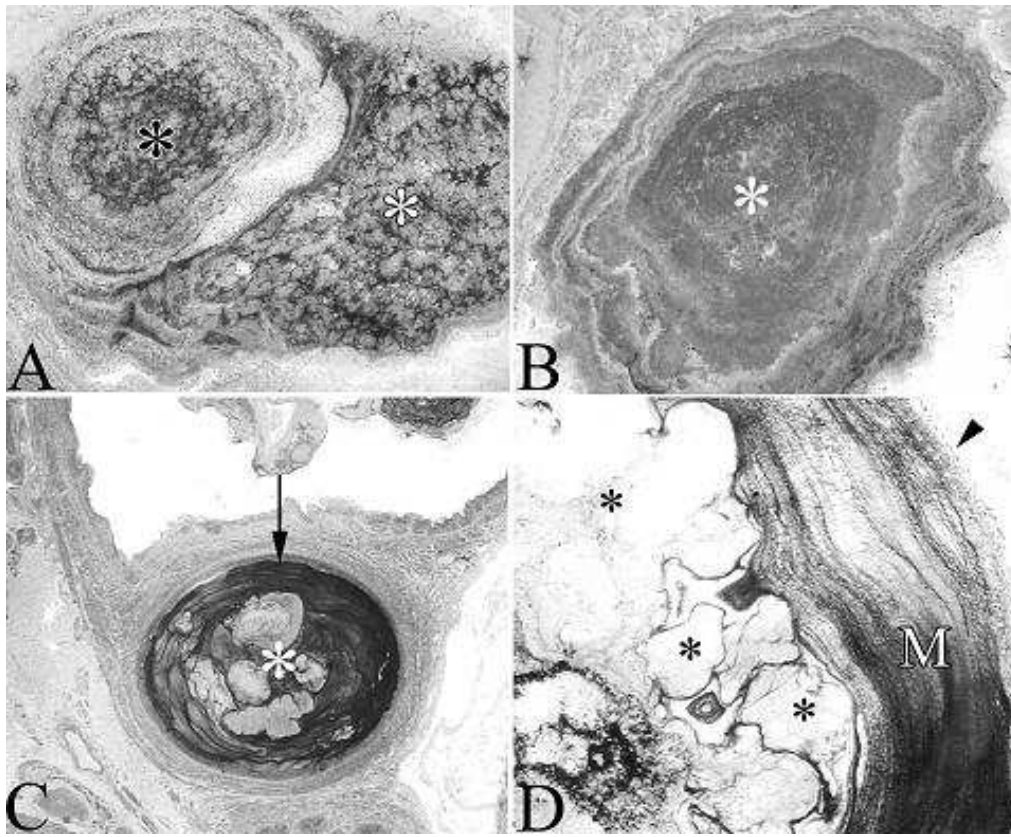


Figura XI - Aspectos de cálculos epididimários. Coloração histológica com azul de toluidina borato de sódio.

A,B,C e D - Cálculos (*) bem organizados e calcificados no lúmen do ductulo deferente (A e B), no ducto epididimário (C) e no ducto deferente (D). Os cálculos encontram-se envolvidos por várias camadas de muco (M). Epitélio do ducto epididimário (seta). Epitélio do ducto deferente (cabeça de seta) indicando a via de eliminação dos cálculos. (300X)

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRE, T. A. Micro-sterological study of the avian epididymal region. *J. Anat.*, v. 129, n. 4, p. 703-706, 1979.
- AIRE T. A.; AYENI, J. S.; OLOWO-OKORUN, M. O. The structure of the excurrent ducts of the testis of the guinea-fowl (Numida meleagris). *J. Anat.*, v. 129, n. 3, p. 633-643, 1979.
- AIRE, T. A. The ductuli efferents of the epididymal region of birds. *J. Anat.*, v. 130, n. 4, p. 707-723, 1980.
- AIRE, T. A. The rete testis of birds. *J. Anat.*, v. 135, n. 1, p. 97-110, 1982.
- AMER, F. I.; SHALIN, M. A. The post-hatching development of the gonade in the fowl, Gallus domesticus. *Ana. Zool. Índia*, v. 11, p. 1-25, 1975.
- BOLTZ, D. A.; NAKAI, M.; BAHRA, J. M. Avian infectious bronchitis vírus: a possible cause of reduced fertility in the rooster. *Avian Dis.*, v. 48, p. 909-915, 2004.
- BUDRAS, K. D.; SAUER, T. Morphology of the epididymis of the cock (Gallus domesticus) and its effect upon the steroid sex hormone synthesis: I. ontogenesis, morphology and distribution of the epididymis. *Anat. Embryol.*, v. 148, p. 175-196, 1975.
- BULL, O. M. L. Anatomia do aparelho reprodutor do macho e da fêmea. In:____. *Fisiologia da reprodução de aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1994. Cap. 1, p. 1-12.
- CLULOW, J.; JONES, R. C. Studies of fluid and spermatozoal transport in the extratesticular genital ducts of the Japanese quail. *J. Anat.*, v. 157, p. 1-11, 1988.
- GETTY, R. *Anatomia dos animais domésticos*. 5. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1981, 2 v.
- GRAY, J. C. The anatomy of the male genital ducts in the fowl. *J. Morf.*, v. 60, p. 393-05, 1937.
- HESS, R. A.; THURSTON, R. J.; BIELLIER, H. V. Morfology of the epididymal region and ducts deferens of the turkey (Meleagris gallopavo). *J. Anat.*, v. 122, p. 241-252, 1976.
- HESS, R. A.; THURSTON, R. J. Ultrastructure of epithelial cells in the epididymal region of the turkey (Meleagris gallopavo). *J. Anat.*, v. 124, p. 765-778, 1977.
- ILIO, K. Y.; HESS, R. A. Structure and function of the ductuli efferentes: a review. *Microsc. Res. Tech.*, v. 29, p. 432-467, 1994.
- JANSSEN, S. J.; KIRBY, J. D.; HESS, R. A.; et al. Identification of the epididymal stones diverse rooster populations. *Poultry Sci.*, v. 79, p. 568-574, 2000.
- KIRBY, J. D.; FROMAN, D. P.; ENGEL, H. N.; et al. Decreased spermatozoal survivability associated with aberrant morfology of the ductuli efferentes proximale of the chicken (Gallus domesticus). *Biol. Reprod.*, v. 42, p. 383-389, 1990.
- LAKE, P. E. The male reproductive tract of the fowl. *J. Anat.*, v. 91, p. 116-129, 1957.
- LUCAS, A.M.; STETTENHEIM, P.R. Avian Anatomy Integument (part II), cap.10, Agricultural Research Service. United States Departament of

Agriculture Washington D.C., p 637-668, 1972.

MAHECHA, G. A. B.; OLIVEIRA, C. A.; BALZUWEIT, K.; et al. Epididymal lithiasis in roosters and efferent ductule and testicular damage. *Reproduction*, v. 124, p. 821-834, 2002.

MUNCHER, Y.; SOD-MORIAH, U. A.; ROSENSTRAUCH, A. W.; et al. Intratesticular retention of sperm and premature decline in fertility in the domestic rooster, Gallus domesticus. *J. Exp. Zool.*, v. 273, p. 76-81, 1995.

NAKAI, M.; HASHIMOTO, Y.; KITAGAWA, H.; et al. Histological study on seminal plasma absorption and spermophagy in the epididymal region of domestic fowl. *Poultry Sci.*, v. 68, p. 582-589, 1989.

OLIVEIRA, C. B. G.; Morfologia do epidídimo de perdiz Rhynchotus rufescens, Temminck, 1815; (Aves

Tinamiformes). 2000. 58 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ROSENSTRAUCH, A.; DEGEN, A. A.; FRIEDLANDER, M. Spermatozoa retention by sertoli cells during the decline in fertility in aging roosters. *Biol. Reprod.*, v. 50, p. 129-136, 1994.

SCHWARZE, E.; SCHRODER, L. *Compêndio de anatomia veterinária*. Zaragoza: Acribia, 1970.

TINGARI, M. D. On the structure of the epididymal region and ducts deferens of the domestic fowl (Gallus domesticus). *J. Anat.*, v. 109, n. 3, p. 423-435, 1971.

TINGARI, M. The fine structure of the epithelial lining of the excurrent duct system of the testis of the domestic fowl (Gallus domesticus). *Q.J.Exp.Physiol.*, v. 57, p. 271-295, 1972.