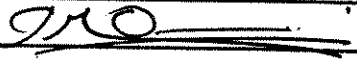


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Raquel Fantin Domeniconi

**Morfologia e Histoquímica do Epidídimo do Gerbilo,
*Meriones unguiculatus***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
RAQUEL FANTIN DOMENICONI

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural
na área de Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	II-UNICAMP
	D712m
V	EX
TOMBO BC	62030
PROG	16-P. 0086.05
	☐ ☒
PREÇO	11,00
DATA	10/02/05
Nº CPD	

ii

Bibid 342366

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

D712m

Domeniconi, Raquel Fantin

Morfologia e histoquímica do epidídimo do gerbilo, *Meriones unguiculatus* /

Raquel Fantin Domeniconi. --

Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientador: Antonio Marcos Orsi

Dissertação (mestrado) -- Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia.

1. Morfologia. 2. Histoquímica. I. Orsi, Antonio Marcos. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 06 de agosto de 2004.

Banca examinadora

Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi (orientador) ✓

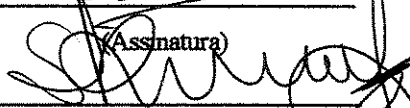
Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga ✓

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini ✓

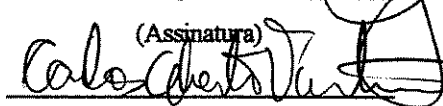
Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino ✓



(Assinatura)



(Assinatura)



(Assinatura)

(Assinatura)

200304599

*Ao meu amado pai, “minha fortaleza”,
pelo amor incondicional,
confiança e credibilidade.*

*À minha querida mãe, “meu espelho”,
que ao registrar sua forte presença
deixou saudades, fortalecendo a certeza
de que nunca nos separamos.*

*Aos tios Roberto e Sidlei,
Por terem me amparado e incentivado,
Pelo carinho e apoio desde o início.*

*Ao Leonardo,
Pelo amor, paciência e cumplicidade,
Por fazer parte da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Especialmente, ao Prof. Dr. **Antonio Marcos Orsi**, verdadeiro mestre, pela brilhante orientação e agradável convívio.

Aos Professores da análise prévia, Prof. Dr. **Sérgio Luís Felisbino**, Prof. Dr. **Sebastião Roberto Taboga**, Prof. Dr. **Carlos Alberto Vicentini**, pelas valiosas sugestões.

À **Líliam Alves Senne Panagio**, secretária do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, pela paciência e dedicação.

Aos **Professores do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** da UNICAMP, com os quais pude aprender muito durante as disciplinas.

Aos **Professores do Departamento de Anatomia** do Instituto de Biociências UNESP, Campus de Botucatu, por me disponibilizarem os laboratórios.

Aos Professores Dr. **Sérgio Luís Felisbino** e Dra. **Maeli Dal Pai Silva**, pela contribuição durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Adalberto Crossi**, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências UNESP, Campus de Botucatu.

À Amiga **Sueli Cruz Michelin** pela valiosa ajuda e amizade.

Ao **Claudinei da Cruz**, do setor de técnicas morfológicas do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias, da UNESP, Campus de Jaboticabal.

Aos **Funcionários do Departamento de Anatomia**.

Aos Amigos de Laboratório **Camila Contin Diniz de Almeida - Francia, Luiz Alberto Domingo Francia Farje, Gelson Rodrigues, Tânia Mara Segatelli, Kátia Aparecida da Silva Viegas, Karina Simões.**

Aos Companheiros **Luis Antonio Justulin Junior, Luciene Patrici Papa, Danilo Henrique Aguiar, Robson Francisco Carvalho** e todo o pessoal do “meeting” pelos momentos agradáveis e amizade.

Aos Grandes Amigos **Sérgio Pereira, Célia Beu, Patrícia Pinheiro e Angélica Spadella** pela colaboração em diversas etapas deste trabalho e sobretudo, pela amizade e companheirismo.

Às Irmãs de coração **Virgínia e Patrícia**, pelo respeito, incentivo e pelas boas gargalhadas.

À Fundação de Apoio a Pesquisa no Estado de São Paulo, **FAPESP**, pelo apoio financeiro.

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica** do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

Aos **Funcionários do Biotério Central** da UNESP, Campus de Botucatu.

Aos demais **amigos e colegas** do Curso de Pós-Graduação, e todos aqueles que de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	01
2. ABSTRACT.....	02
3. INTRODUÇÃO GERAL.....	03
4. OBJETIVOS.....	11
5. 1º ARTIGO: “Localização Histoquímica de Algumas Hidrolases no Epidídimo do Gerbilo”.....	12
6. 2º ARTIGO: “Histologia Regional do Epidídimo do Gerbilo: Observações em Microscopia de Luz”.....	29
7. 3º ARTIGO: “Ultrastructure of the epididymal epithelium of the gerbil (<i>Meriones unguiculatus</i>)”.....	44
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	63
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

RESUMO

No epitélio epididimário do gerbilo (*Meriones unguiculatus*) foram caracterizadas quatro regiões distintas: segmento inicial (SI), cabeça, corpo e cauda, os quais são formados pelas células principais, basais, apicais, halo e claras em todas estas regiões estudadas, exceto no corpo epididimário. Células claras são encontradas no SI do epidídimo do gerbilo, porém não são observadas na mesma região epididimária do rato. O epitélio epididimário mostrou-se alto desde o SI até o corpo epididimário, sem diferenças significativas de altura epitelial entre os três segmentos. O epitélio epididimário mostrou-se mais baixo na cauda como consequência do grande diâmetro luminal desta região de estocagem de espermatozóides. Marcante basofilia núcleo-citoplasmática das células P do corpo epididimário, delgado e retilíneo, foi observado nesta espécie. As enzimas estudadas em geral mostraram forte expressividade nas regiões mais proximais do epidídimo. As reatividades da fosfatase alcalina e da ATPase foram fortes também na cauda do ducto epididimário. A SDH revelou baixa atividade em todas as regiões do epitélio, exceto no lúmen epididimário. As enzimas foram correlacionadas com papéis histofisiológicos, como endocitose, secreção, absorção e transporte ativo caracterizados ultraestruturalmente. Células claras são encontradas predominantemente, na cauda do epidídimo, possuindo um rico aparelho endocitótico. Células principais também foram relacionadas a processos endocitóticos bem como com secreção protéica. Células colunares escuras do corpo epididimário mostraram um “sistema endocitoplasmático” de pequenos canais formados pela coalescência de vesículas, aparentemente relacionadas com a absorção de água e endocitose de fase fluida.

ABSTRACT

Epididymidis epithelium of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) was focused in four distinct regions e. g., initial segment, caput, corpus and cauda of the epididymis in which were characterized five cell types: principal, apical, basal, halo and clear cells. These cells were not will characterised only in the thin and straight epididymal corpus that showed columnar (principal) cells highly basophilic. Clear cells were viewed mainly in the initial segment and cauda epididymidis although they were not observed in rat's epididymidis initial segment. The epididymal epithelium since the caput until the corpus was high and showed low weight in the cauda epididymis. The lower epithelium at the caudal level probably compensate the great luminal diameter noted in this region. Concerning at the oxidative enzymes studied, such as the alkaline and acid phosphatases and ATPase, they showed intense reactivity in the proximal segments of the duct. Alkaline phosphatase and ATPase also revealed high activity in the cauda epididymidis, but SDH showed low reactivity throughout epididymal epithelium, in all the regions, except inside the tubular lumen at spermatozoa storage level. Enzymatic activities were correlated to functions of endocytosis, secretion, absorption and active transport of substances, characterised by ultrastructural observations and interpretations. Clear cells were the main cells related to phase fluid endocytosis a function also related to principal cells. Principal cells apparently were predominantly reported to proteic secretion. Columnar dark cells of the corpus seemed to be related to active and passive absorption of water.

INTRODUÇÃO GERAL

O gerbilo, *Meriones unguiculatus*, é um roedor da família Cricetidae, subfamília Gerbillinae, sendo nativo das regiões desérticas da Mongólia e do Nordeste da China. Trata-se de um animal relativamente dócil, caracterizado pelo comportamento monogâmico e por mecanismos fisiológicos de conservação da água corpórea. Apresenta ciclos alternados de vigília e repouso durante o dia e a noite, embora seja mais ativo no período noturno (RICH, 1968; HARKNESS & WAGNER, 1993). Tem sido crescentemente utilizado em pesquisas laboratoriais, desde que foi introduzido no Ocidente a partir da América do Norte. Assim sendo, tem se revelado um bom “modelo biológico”, em pesquisas biomédicas e biológicas (RICH, 1968; HARKNESS & WAGNER, 1993)

Estudos sobre a morfologia e histofisiologia do ducto epididimário do gerbilo não foram encontrados na literatura ao alcance. Todavia, alguns outros estudos sobre a via espermática deste roedor foram achados. Destacam-se a descrição do desenvolvimento pós-natal do testículo, com base na evolução do epitélio seminífero (NINOMIYA & NAKAMURA, 1987); estudos sobre algumas características estruturais e histoquímicas do ducto deferente (ORSI et al. 1999, 2000); e, descrição do ciclo do epitélio seminífero no gerbilo (SEGATELLI et al., 2000, 2002).

O epidídimo é um ducto único e grandemente enovelado, considerado um espaço para a maturação e estocagem de espermatozóides. Os espermatozóides permanecem no sistema de ductos excretores do testículo de mamíferos, com ênfase ao ducto epididimário, previamente à emissão e ejaculação, quando sofrem algumas pequenas modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas associadas com a sua maturação e aquisição da capacidade de fertilização. Assim sendo, se aceita que os ductos excretores do testículo não são meramente condutos passivos, mas representam um sistema dinâmico que influencia o microambiente luminal e os espermatozóides que nele se encontram estocados (ROBAIRE & HERMO, 1988; SETCHELL et al., 1994).

O epitélio epididimário regula a passagem de moléculas para dentro ou para fora do

lúmen epididimário, contribuindo assim com a formação do fluido luminal e com as alterações deste microambiente ao longo do epidídimo. Os espermatozóides ficam expostos a contínuas mudanças deste fluido, fator necessário para a sua sobrevivência e maturação (HINTON & PALLADINO, 1995).

A distribuição de substâncias, no epidídimo de mamíferos, varia consideravelmente nas diferentes espécies. Algumas destas substâncias são detectadas histoquimicamente no epidídimo de mamíferos (MONIEM, 1980). Estudos morfológicos aliados à histoquímica permitem correlacionar a estrutura com a função do epidídimo, possibilitando desta forma, a divisão descritiva do epidídimo em diferentes regiões (ADAMS, 1983).

Concernente aos estudos de reatividade enzimática foram observadas variações espécie-específicas e ainda, região-específicas na localização de diversas enzimas ao longo do epidídimo, em diferentes espécies (MONIEM & GLOVER, 1972; MONIEM, 1980; ADAMS, 1983).

A fosfatase ácida (FoAc) é uma enzima lisossomal associada com absorção e quebra de compostos sob condições ácidas (DE DUVE, 1963). Está envolvida no catabolismo de substâncias, previamente absorvidas do lúmen do ducto epididimário (NICANDER, 1965; MONIEM & GLOVER, 1972). Atualmente, se conhece que a função hidrolítica da FoAc está ligada aos processos de digestão autofágica e heterofágica dos lisossomas de ductulos eferentes (ORSI et al., 1998) e do ducto epididimário (HERMO et al., 1988).

A reatividade da fosfatase alcalina (FoAl) foi demonstrada em diferentes níveis do epitélio epididimário, variando entre as espécies já estudadas. Possivelmente, esta enzima esteja envolvida em processos de transporte de glicídeos e outras moléculas orgânicas, através de membranas. A localização da FoAl na membrana basal do ducto epididimário de cobaia, indica uma provável função desta enzima no transporte de moléculas entre as células principais e os capilares subepiteliais (ADAMS, 1983).

A atividade enzimática da ATPase no epidídimo de mamíferos está associada ao processo bioquímico de quebra do ATP, visando produção de energia para transporte ativo de substâncias entre a parte apical do epitélio e a luz epididimária, ou vice-versa (HOLT, 1980; MONIEM, 1980). Esta enzima através de estudos mais recentes foi imunolocalizada

na membrana plasmática ou na membrana de revestimento de vesículas apicais presentes em células do epitélio epididimário, sendo considerada transportadora de prótons H^+ para o lúmen tubular, que é acidificado visando a quiescência dos espermatozóides intraluminais (BROWN et al., 1997).

Segundo HOLT et al (1980), a succinato desidrogenase (SDH) estaria envolvida em considerável atividade metabólica, a qual pode estar associada com a produção de substratos para os espermatozóides. Por outro lado, no epidídimo de gato, de modo geral, a SDH deu atividade fraca ao longo do epidídimo (VIOTTO et al., 1986). Por ser uma enzima com papel relevante no ciclo de Krebs poderia se especular que a sua reatividade fraca no epitélio epididimário decorreria do predomínio de glicólise anaeróbica no epidídimo (FOUQUETT et al., 1969).

O ducto epididimário é dividido macroscopicamente em cabeça, corpo e cauda, porém diferenças histológicas regionais ou segmentares características, e talvez espécie-específicas, foram descritas na estrutura do epitélio epididimário em diferentes mamíferos (ROBAIRE & HERMO, 1988). BENOIT (1926) caracterizou, pela primeira vez, a parte inicial do ducto epididimário, seqüente aos dúctulos eferentes, como o segmento inicial, uma região histológica com características comuns a uma série de mamíferos; descrita nos trabalhos anteriormente citados e praticamente em todas as publicações mais recentes sobre o epidídimo de mamíferos.

Os termos cabeça, corpo e cauda usados, em anatomia macroscópica, para regiões diferenciadas do epidídimo de mamíferos, parecem ser inadequados para estudos comparativos de metabolismo; características bioquímicas e funcionais do ducto epididimário, uma vez que atividades específicas das células de revestimento tubular, tais como endocitose, transcitose, secreção e absorção, caracterizadas, por exemplo, nas células principais (HAMILTON, 1975; ROBAIRE & HERMO, 1988), parecem estar mais ou menos restritas a regiões ou segmentos definidos do ducto.

Várias publicações consideraram a histologia regional do epidídimo compreendendo o segmento inicial, e a cabeça como regiões envolvidas, predominantemente, com absorção de fase fluida do líquido seminífero; o corpo (segmento médio), relacionado com habilitação de

fertilização (maturação) dos espermatozóides, e, a cauda com suas partes proximal e distal, destinadas à estocagem dos espermatozóides no ducto epididimário (ROBAIRE & HERMO, 1988).

Anteriormente, GLOVER & NICANDER (1971) consideraram as áreas do epidídimo relacionadas com maturação dos espermatozóides nos segmentos inicial e médio (corpo), e estocagem dos espermatozóides no segmento terminal (cauda epididimária). Porém, ORGEBIN-CRIST & OLSON (1984), com base em trabalhos sobre diferentes mamíferos, caracterizaram a região de maturação dos espermatozóides epididimários indo da parte distal do corpo para a parte proximal da cauda epididimária, embora no sagüi a maturação ocorreria nos segmentos proximais do ducto (MOORE, 1981).

Tendo em vista estas considerações, os nossos estudos sobre a morfologia e histoquímica do epidídimo do gerbilo foram realizados utilizando-se o modelo histológico regional adotado por ROBAIRE & HERMO (1988).

No epitélio colunar e pseudoestratificado do epidídimo de mamíferos, geralmente, se observam 6 tipos celulares distintos, as células principais, basais, claras, halo, delgadas e apicais (HAMILTON, 1975; ROBAIRE & HERMO, 1988). O tipo celular mais abundante no epitélio epididimário é a célula principal estando envolvida em processos de absorção, secreção (NICANDER & MALMQVIST, 1977), endocitose e transcitose (ROBAIRE & HERMO, 1988). Absorção de fluido luminal; secreção de alguns produtos (proteínas; glicoproteínas; etc) e atividades endocitóticas parecem ser as principais funções atribuídas a este tipo celular (HAMILTON, 1975; FLICKINGER, 1983, 1985; COOPER et al., 1987; ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO et al., 1992, 1994).

A capacidade de síntese protéica, ou glicoprotéica, ativa das células principais do ducto epididimário, antes caracterizada, decorre de possuírem retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexo de Golgi bem desenvolvidos (LIU et al., 1991; HERMO et al., 1994). Além disso, os autores, mediante estudos em que fizeram marcação de moléculas, demonstraram que estas podem ser transportadas através das células, sugerindo que as células principais são capazes de incorporar aminoácidos (LIU et al., 1991).

As células basais têm sido encontradas em todas as regiões do epitélio epididimário,

atuando como possíveis elementos de estabilização do epitélio epididimário (HAMILTON, 1975), ou ainda foi sugerido que elas participariam de um processo de renovação celular do epitélio agindo possivelmente como “células tronco” (SHARMA et al., 1986). Segundo YEUNG & COOPER (1994), as células basais desempenham papel de proteção no epitélio epididimário, sendo comparadas a macrófagos.

As células halo têm sido consideradas como linfócitos intra-epiteliais ou macrófagos, proposta decorrente dos estudos ultra-estruturais e imunohistoquímicos de alguns autores (HOFFER et al., 1973; DYM & ROMRELL, 1975; WANG & HOLSTEIN, 1983; NASHAN et al., 1989).

As células claras localizam-se, principalmente, na cauda do epidídimo, ocorrendo também em menor quantidade nos outros segmentos tubulares (ROBAIRE & HERMO, 1988). Têm sido objeto de controvérsia quanto à sua função. Aparentemente, estariam envolvidas na secreção de glicerilfosforilcolina (MARTAN & RISLEY, 1963; MARTAN, 1969). Por outro lado, as células claras são ricas em anidrase carbônica, uma enzima relacionada com processos de absorção celular, em nível epitelial (FLICKINGER et al., 1978). As células claras, aparentemente, poderiam estar envolvidas, também, na absorção de íons e proteínas presentes no fluido da cauda do epidídimo, onde são mais numerosas. Por outro lado, as células principais são mais ativas na absorção de fluido e outras substâncias nele dissolvidas nas regiões proximais do epidídimo (FLINCKINGER et al., 1978).

As células apicais têm características morfológicas e citofisiológicas complexas, e até certo ponto confusas. Seriam células ricas em mitocôndrias segundo MARTINEZ-GARCIA et al. (1995), ou seriam células aparentadas às células principais, em termos morfofuncionais, segundo MOORE & BEDFORD (1979).

O termo “células apicais ricas em mitocôndrias” foi atribuído a outros tipos celulares, tais como as células claras e a um subgrupo de células principais. Além disso, algumas células apicais têm sido designadas com os termos de células holócrinas, células escuras e células “narrow” (delgadas escuras), especialmente quando apresentam citoplasma com elevada eletrondensidade. Assim foram apresentadas, também, como sendo talvez uma

população à parte das células usuais do revestimento epitelial epididimário (LÜDERS, 1976; VIOTO et al., 1996).

Apesar da grande confusão existente sobre este tipo celular, MARTINEZ-GARCIA et al. (1995) relataram que a célula apical rica em mitocôndrias é um tipo bem definido, presente no epidídimo da maioria dos mamíferos e com significado funcional não totalmente esclarecido. Entre suas possíveis funções, se citariam a capacidade de reabsorção e acidificação do fluido epididimário, segundo os autores.

Os tipos celulares podem variar regionalmente, sendo que algumas células aparecem com maior frequência em alguns segmentos do que nos outros. As variações ocorrem não só quanto ao tipo celular, mas também, em outras características como a altura epitelial que, geralmente, diminui da cabeça para a cauda epididimária, e os diâmetros tubular e luminal que freqüentemente mostram comportamento regional oposto ao da altura epitelial, de acordo com os diferentes estudos anteriormente citados.

Com base principalmente nas características ultraestruturais das células do epitélio de revestimento epididimário do rato albino (HAMILTON, 1975; ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO et al., 1992; HERMO et al., 1994), algumas características das regiões histológicas do epidídimo são sumariadas a seguir:

O segmento inicial tem epitélio muito alto e contém poucos espermatozóides no lúmen. As células principais mostram estereocílios apicais longos, gotas lipídicas, poucos túbulos e canálculos curtos invaginando o citoplasma apical. No citoplasma apical veem-se também vesículas e pequenos vacúolos, com conteúdo de baixa eletrondensidade. No citoplasma supranuclear o complexo de Golgi e estruturas associadas são bem característicos. Outros tipos de células presentes neste segmento incluem células basais, halo, células delgadas (*"narrow cells"*), possíveis precursoras das células claras, e algumas células apicais ricas em mitocôndrias (HAMILTON, 1975; ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO et al., 1994; SERRE & ROBAIRE, 1998).

Na cabeça do epidídimo, células principais altas revestem o lúmen, no qual se observam mais espermatozóides. Pequenas vesículas de superfície plana ou revestidas estão presentes. Nesta região é característica a presença de grandes vacúolos claros, vesículas

grandes e corpos multivesiculares apicais presentes no citoplasma das células principais. Células basais e halo são notadas, assim como células claras com um bem desenvolvido aparelho endocitótico no citoplasma apical (ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO et al., 1994; SERRE & ROBAIRE, 1998).

No corpo do epidídimo, na parte média do segmento médio, geralmente o epitélio tubular é mais baixo do que na cabeça epididimária. As organelas das células principais não têm grandes variações àquelas já descritas. Na cauda epididimária, ou segmento terminal, a altura epitelial é menor do que a dos segmentos anteriores, tendendo à forma cúbica. Células claras grandes são evidentes, e especialmente numerosas na porção distal da cauda. A superfície apical destas células contém poucos estereocílios, mas exibe longos processos sinuosos; sua extremidade apical é quase inteiramente ocupada por vesículas, vacúolos, túbulos e invaginações da membrana plasmática apical, notando-se também corpos multivesiculares pálidos e densos e lisossomas secundários (ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO et al., 1994).

As células epididimárias de mamíferos possuem complexo sistema de endomembranas para síntese protéica, necessária para a produção de enzimas lisossomais ou de outras substâncias (HAMILTON, 1975; ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO et al., 1994). A presença de complexos de Golgi bem desenvolvidos é característica do citoplasma supranuclear de células principais epididimárias de mamíferos, participando da formação de lisossomas e de atividades secretórias destas células (NICANDER & GLOVER, 1973; HERMO et al., 1994).

A presença de “vias intracitoplasmáticas” para endocitose, transcitose e secreção nas células principais epididimárias de mamíferos foi caracterizada, e ilustrados os mecanismos ultraestruturais e citofisiológicos de sua ocorrência (ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO et al., 1994).

Concernente à capacitação (habilitação de fertilização) dos espermatozóides no epidídimo de mamíferos, destacam-se algumas modificações na sua morfologia, durante o seu trânsito ao longo da luz tubular, bem como a sua interação com o citoplasma apical das células epiteliais epididimárias feita através de processos de endocitose, secreção e absorção

de fase fluida do líquido testicular. Modificações morfológicas dos espermatozóides epididimários podem estar associadas a alterações bioquímicas e fisiológicas intraluminais da membrana plasmática destas células, concernentes à natureza e à estrutura da própria membrana, bem como ao acréscimo ou supressão de substâncias (proteínas, íons salinos, etc.), na membrana plasmática, inter-relacionadas à fisiologia das células epiteliais epididimárias (ROBAIRE & HERMO, 1988).

A secreção é outra função atribuída ao epitélio epididimário de mamíferos. Especialmente, as células principais são capazes de secretar no lúmen epididimário alguns íons salinos, pequenas moléculas orgânicas, proteínas e glicoproteínas, sendo estas secreções necessárias para ocorrer a maturação espermática. O epidídimo é capaz de captar da circulação, transportar e secretar através de seu epitélio, substâncias tais como carnitina, inositol e açúcares. Outras substâncias, tais como a glicerilfosforilcolina (GPC) e glicoproteínas são sintetizadas e secretadas pelo epitélio epididimário (FLICKINGER, 1983; 1985; SETCHELL et al., 1994).

Algumas hipóteses foram propostas para explicar o movimento do material secretado no lúmen epididimário ou ducto-eferencial, pelas células epiteliais. Assim, poderia haver a existência de uma comunicação intermitente entre o RE apical e o compartimento luminal (HOFFER et al., 1973). Vesículas revestidas por membrana carreariam o produto secretório do complexo de Golgi para o citoplasma apical (FLICKINGER et al. 1978; ORSI et al., 1998). Grânulos citoplasmáticos apicais estariam envolvidos em processo merócrino de secreção (NICANDER & MALMQVIST, 1977).

Em vista destas informações, o objetivo do presente trabalho foi estudar e descrever a histologia, histoquímica e ultraestrutura do ducto epididimário do gerbilo, visando estabelecer as características fundamentais do seu epitélio de revestimento tubular. Os resultados obtidos foram confrontados com descrições anteriores da histologia regional do epidídimo de mamíferos, com ênfase no rato albino laboratorial (vide ROBAIRE & HERMO 1988, HERMO et al., 1994 para referências gerais).

OBJETIVOS

- Estudar em microscopia de luz as características histológicas segmentares e dos diferentes tipos de células do epitélio de revestimento do ducto epididimário, do gerbilo *Meriones unguiculatus*.
- Realizar estudos histomorfométricos do ducto epididimário, enfocando-se a altura do epitélio; diâmetro tubular e diâmetro luminal.
- Inferir os aspectos morfofuncionais do epidídimo do gerbilo, através de estudos histoquímicos de algumas enzimas, como a ATPase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina e succinato desidrogenase.
- Descrever a ultra-estrutura em microscopia eletrônica de transmissão, dos diferentes tipos celulares do epitélio de revestimento do ducto epididimário, dando maior ênfase às células principais, e às características diferenciais entre as regiões epididimárias do gerbilo.

1º Artigo (Submetido): Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science

“Localização Histoquímica de Algumas Hidrolases no Epidídimo do Gerbilo”

“Histochemical localization of some hydrolases in the epididymis of the gerbil”

Raquel Fantin Domeniconi¹, Antonio Marcos Orsi², Maeli Dal Pai Silva³, Célia Cristina Leme Beu¹, Kátia da Silva Aparecida Viegas⁴

¹Discente do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, UNICAMP, Campinas, SP

²Departamento de Anatomia, UNESP (Docente Voluntário), Botucatu, SP

³Departamento de Morfologia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

⁴Discente do Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, FMVZ/USP, São Paulo, SP

Correspondência para

Antonio Marcos Orsi

Docente Voluntário da UNESP

Departamento de Anatomia

UNESP, Botucatu, CP 510

18.618-000 Botucatu, SP

email: amorsi@ibb.unesp.br

Agradecimentos

Os autores agradecem Sueli Cruz Michelin pelo auxílio técnico. Este trabalho teve o apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Introdução

A fosfatase ácida (FoAc) e a fosfatase alcalina (FoAl) mostraram localizações distintas no epitélio epididimário de alguns mamíferos. Assim sendo, a FoAl reagia positivamente nos estereocílios de todo o epidídimo, enquanto que a FoAc reagia fortemente nos dois segmentos epididimários proximais, localizados na cabeça epididimária de alguns mamíferos, como o coelho, cavalo, touro e carneiro^{19,20}. Estes resultados foram similares às descrições feitas no epidídimo de outros mamíferos, destacando-se os roedores laboratoriais^{1, 18}.

A FoAc usualmente está associada à absorção e quebra de compostos sob condições ácidas, nos lisossomos³, estando também envolvida no catabolismo de substâncias, previamente absorvidas do lúmen do ducto epididimário^{12,21}. Atualmente, se conhece que a função hidrolítica da FoAc está ligada aos processos de digestão autofágica e heterofágica dos lisossomos, os quais estão presentes principalmente no citoplasma apical de células epiteliais dos ductulos eferentes²³ e do ducto epididimário^{11,12}, justificando a sua atividade enzimática na parte apical do epitélio tubular destes ductos da via espermática²³.

A sugestão proposta de que o segmento inicial é a principal região epididimária associada à reabsorção de fluido seminal¹² fora antes sugerida^{1, 2, 12} pelas reações distintas para adenosina trifosfatase (ATPase) e fosfatase alcalina na margem estereociliar do segmento inicial. Ademais, um ciclo ativo de ácido tricarboxílico poderia ser esperado para possibilitar a formação de quantidades significativas de ATP, para ser utilizado no transporte ativo de metabólitos e íons para dentro ou para fora do lúmen tubular epididimário. A presença de tal atividade de transporte é indicada por uma intensa reação ATPase positiva e moderada atividade fosfatase alcalina ao longo da margem luminal do epitélio no segmento inicial¹⁴.

A atividade histo-enzimática da ATPase no epidídimo de mamíferos também está associada ao processo bioquímico de quebra do ATP, visando produção de energia para transporte ativo de substâncias entre a parte apical do epitélio e a luz epididimária, ou vice-versa^{14, 18}. A ATPase, através de estudo mais recente foi imunolocalizada na membrana plasmática ou na membrana de revestimento de vesículas apicais presentes em células do

epitélio epididimário, sendo considerada transportadora de prótons H^+ para o lúmen tubular, visando acidificar o ambiente luminal e desta forma mantém a quiescência dos espermatozóides intraluminais⁵.

Reações enzimáticas intensas foram notadas para a succinato desidrogenase (SDH) e esterase não-específica, no segmento terminal epididimário do elefante, sendo indicativas de que a SDH estaria envolvida em considerável atividade metabólica, a qual poderia estar associada com a produção de substratos para os espermatozóides¹⁴. Por outro lado, no epidídimo de gato, de modo geral, a SDH deu reatividade fraca ao longo do epidídimo²⁷. Por ser a SDH uma hidrolase com papel relevante no ciclo de Krebs poderia se especular que a sua reatividade fraca no epitélio epididimário decorreria do predomínio de glicólise anaeróbica no epidídimo⁹.

Estudo de localização histoquímica das enzimas: fosfatase alcalina (FoAl), fosfatase ácida (FoAc), ATPase e SDH, relacionadas ao metabolismo epididimário, foi aqui realizado com o objetivo de precisar a distribuição destas enzimas nas diferentes regiões do epidídimo do gerbilo⁸ e inferir os possíveis aspectos morfofuncionais dos diferentes segmentos epididimários.

Material e Método

Para estudos histoquímicos de atividades enzimáticas no epidídimo de gerbilo (*Meriones unguiculatus*), foram obtidos fragmentos adequados do segmento inicial (SI), cabeça, corpo e cauda de ambos os epidídimos de 7 gerbilos adultos e sexualmente maduros, com idade de 90 dias. As regiões foram coletadas a fresco e congeladas em n-hexana, previamente resfriada em nitrogênio líquido. Estes materiais foram acondicionados em freezer à -80°C. Cortes histológicos de 9µm foram obtidos em micrótomo criostato (Jung-Leica CM 1800, Alemanha) à temperatura de -20°C e submetidos às reações enzimáticas para pesquisas de localização e reatividade das enzimas: ATPase, fosfatases ácida e alcalina (FoAc e FoAl, respectivamente) e succinato desidrogenase (SDH)²⁵. Os parâmetros de coloração tissular (intensidade de reações), utilizados para documentar as respectivas reatividades enzimáticas foram convencionados como sendo de atividades: intensa (4), forte

(3), moderada (2), fraca (1) e negativa (0).

Resultados

As localizações histoquímicas e as reatividades do ápice e da base do epitélio epididimário e da membrana basal (MB) do ducto epididimário do gerbilo são sumariadas na tab. 1, sendo as reatividades analisadas nas regiões histológicas pré-estabelecidas⁸.

A enzima FoAl mostrou reatividades intensa no SI (Fig.1A) e forte na cabeça epididimária (Fig.2A). No SI a reação foi intensa na porção mais apical do epitélio epididimário e englobando o citoplasma supranuclear e apical das células principais (P) e talvez também das células apicais. A margem estereocílica apical mostrou reatividade entre fraca e negativa. A membrana basal exibiu reatividade forte; e o conteúdo luminal apresentou reatividade heterogênea, notando-se atividade enzimática forte em alguns pontos dispersos do conteúdo presente na luz tubular (Fig.1A).

No epitélio de revestimento da cabeça epididimária a atividade da FoAl foi forte também na porção apical, aparentemente tendo a mesma localização histoquímica observada no SI, porém a margem apical de estereocílios na cabeça apresentou reatividade igualmente forte, diferentemente do SI, onde os estereocílios tiveram reatividade negativa. O conteúdo luminal, com características mais homogêneas, mostrou reatividade média e a membrana basal tubular exibiu uma reatividade forte (Fig.2A).

A atividade da FoAl no corpo epididimário foi de fraca a negativa no epitélio tubular, sendo negativa no conteúdo luminal e na membrana basal. Na cauda epididimária a reatividade da FoAl, de modo geral, foi negativa, exceto em nível da membrana basal tubular em que foi média (Fig.3A). Logo, se pôde observar que a atividade da FoAl diminuiu gradualmente do SI em direção ao corpo e cauda epididimários. Verificou-se que a atividade enzimática da FoAl estava concentrada na porção proximal do ducto epididimário do gerbilo, englobando o SI e a cabeça epididimária.

Na porção proximal do epididimo do gerbilo a enzima FoAc mostrou atividades intensa no citoplasma supranuclear e apical e moderada no citoplasma basal das células do epitélio epididimário, tanto no SI (Fig.1B) como na cabeça epididimária (Fig.2B).

Possivelmente a reatividade intensa ocorreu preponderantemente no citoplasma das células P. Porém não se pôde descartar as células apicais e claras impossíveis de se caracterizar histoquímicamente nos preparados enzimológicos. Os núcleos celulares não apresentaram reação enzimática e a evidenciação de atividade moderada basalmente foi retratada por alguns pontos dispersos de reatividades forte ou intensa. A reatividade da membrana basal à FoAc foi negativa em ambas as regiões analisadas assim como o conteúdo luminal da cabeça epididimária, e o conteúdo luminal do SI mostraram pontos focais de reatividade moderada à FoAc.

A atividade da FoAc no corpo epididimário observou-se, novamente, ser de fraca a negativa. Na cauda epididimária a FoAc voltou a mostrar reatividade intensa na porção apical e entre forte e moderada na porção basal do epitélio tubular (Fig.3B). A membrana basal tubular deu reação negativa à FoAc, a qual mostrou atividades entre fraca e negativa no conteúdo intraluminal da cauda epididimária (Fig.3B). Observou-se que a atividade da FoAc foi intensa em praticamente toda a margem apical do epitélio epididimário do gerbilo, desde o SI até a cauda, exceto no corpo epididimário onde se observou reação entre fraca e negativa.

A enzima ATPase deu reatividades intensa na porção apical e fraca na porção basal do epitélio epididimário do SI, não mostrando atividade no terço médio basal do epitélio tubular, no qual os núcleos das células P foram observados, conforme as observações preliminares que se fez de histologia epididimária regional no gerbilo⁸. A membrana basal tubular assim como o conteúdo luminal mostraram reatividades fracas ou negativas (Fig.1C). Na cabeça epididimária a reatividade tubular geral à ATPase foi forte na parte apical do epitélio tubular, e, também na estreita faixa do citoplasma basal das células epiteliais. A membrana basal exibiu reação forte e o conteúdo luminal não apresentou reação à ATPase (Fig.2C).

O corpo epididimário do gerbilo teve atividade enzimática entre fraca e negativa em todas as regiões analisadas. Na cauda, a atividade da ATPase mostrou-se forte em nível apical e também no estroma peritubular do epitélio de revestimento tubular. A membrana basal tubular mostrou reatividade forte e no conteúdo luminal viu-se atividade entre fraca e

negativa para à ATPase (Fig.3C). Notou-se que a região apical do epitélio epididimário mostrou reatividade de ATPase em todos os segmentos epididimários, exceto no corpo, onde a reatividade enzimática foi entre fraca e negativa. A intensidade da reação à ATPase diminuiu do SI para a cabeça e cauda epididimárias.

A enzima SDH, de modo geral, mostrou atividade predominantemente fraca no epitélio de revestimento do ducto epididimário do gerbilo em todas as regiões consideradas. No SI uma reação enzimática moderada foi vista basalmente (Fig.1D) e no corpo epididimário não houve reatividade à SDH. Tanto na cabeça (Fig.2D) como na cauda (Fig.3D) epididimárias, notaram-se reações entre fraca e negativa para a SDH. De modo mais específico no epitélio epididimário do SI foi observada reatividade moderada à SDH, sendo essa reação mais constante na região basal. Nas demais regiões histológicas esta reação diminuiu de intensidade tornando-se mais fraca e mais dispersa. Verificou-se reatividade intensa de SDH apenas no conteúdo luminal, formado predominantemente por espermatozóides (Fig.1D, 2D e 3D).

Tabela 1. Localizações histoquímicas e reatividades do ápice e da base do epitélio epididimário e da membrana basal (MB) do ducto epididimário do gerbilo, nas regiões histológicas pré-estabelecidas⁸. Botucatu, 2004.

Regiões Epididimo	segmento inicial			Cabeça			Corpo			Cauda		
	Epitélio			Epitélio			Epitélio			Epitélio		
Reações	ápice	base	MB	ápice	Base	MB	Apice	Base	MB	Apice	Base	MB
FoAl	4	0	3	3	0	3	1	1	0	0	0	2
FoAc	4	2	0	4	2	0	1	0	0	4	3	0
ATPase	4	1	1	3	3	3	1	1	1	3	1	1
SDH	1	2	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0

(FoAl) fosfatase alcalina; (FoAc) fosfatase ácida; (ATPase) adenosina trifosfatase; (SDH) succinato desidrogenase

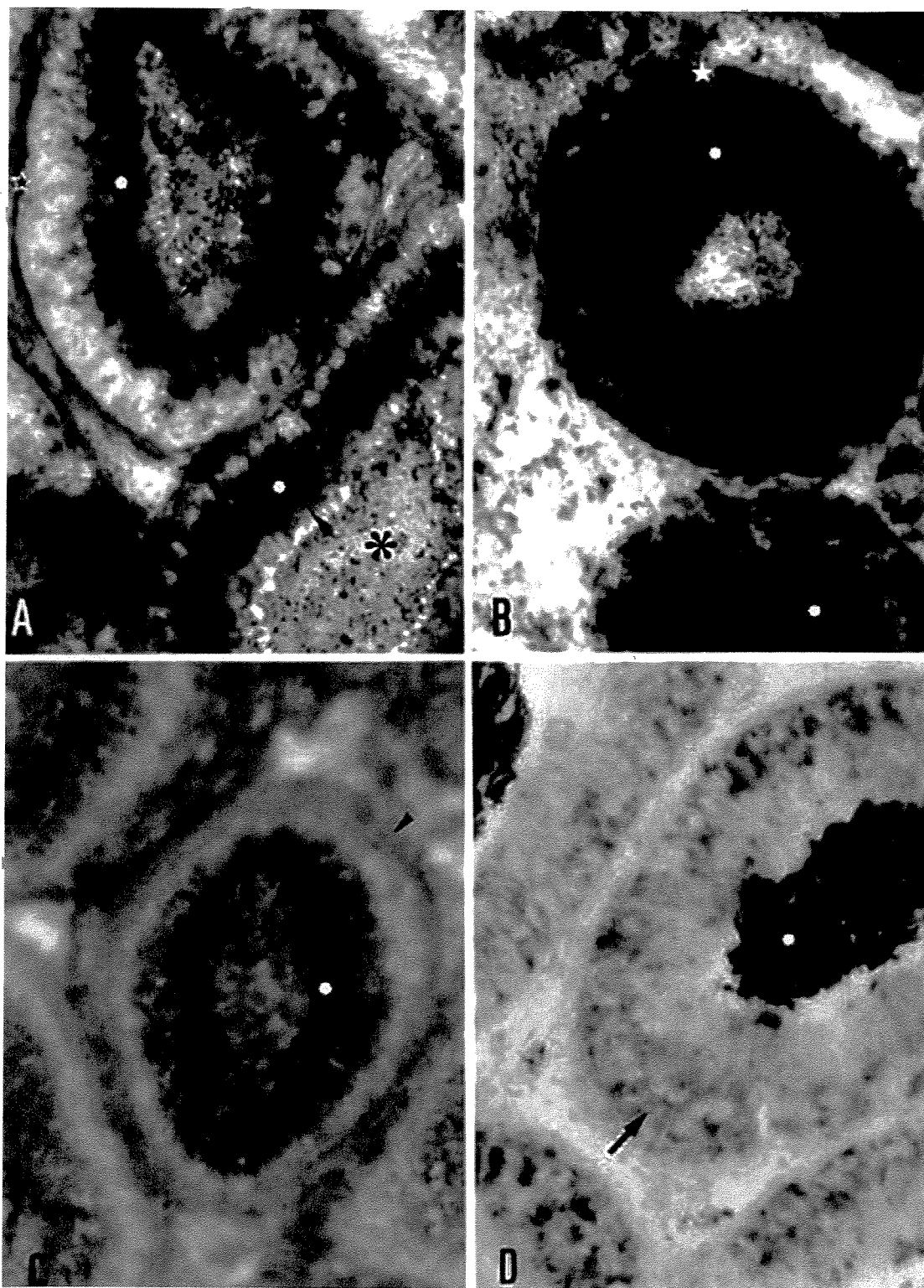
(4) reação intensa; (3) reação forte; (2) reação moderada; (1) reação fraca e (0) reação negativa

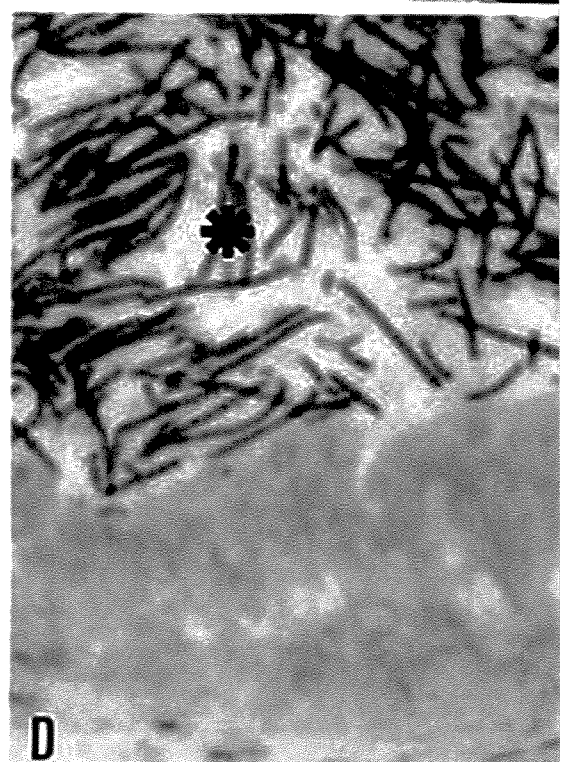
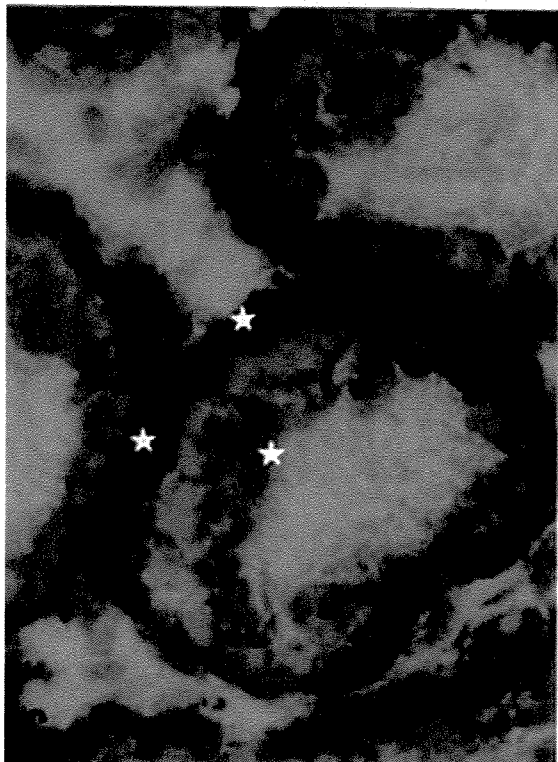
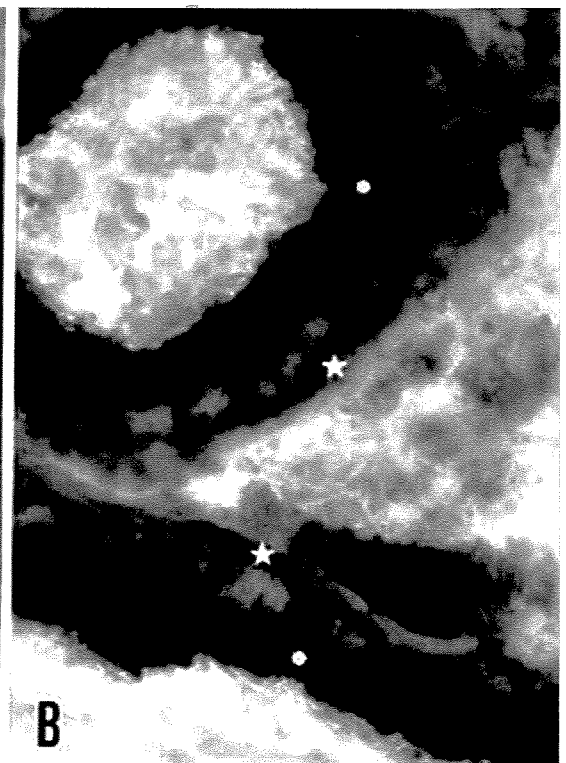
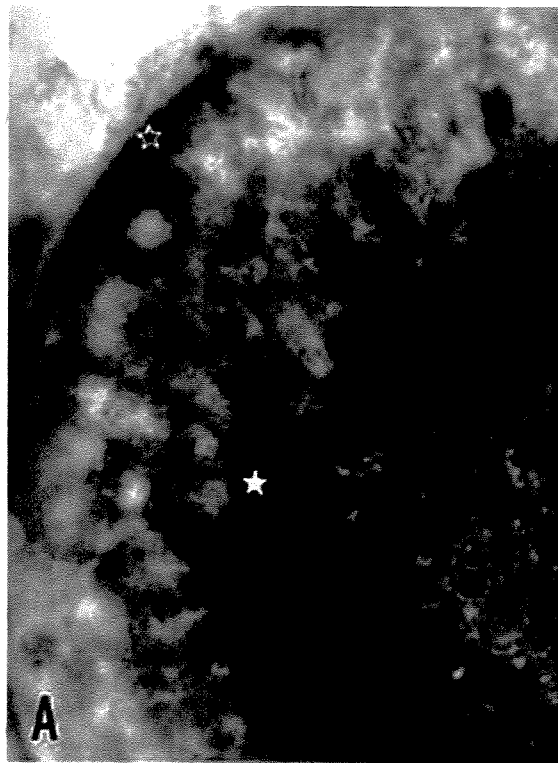
Legendas

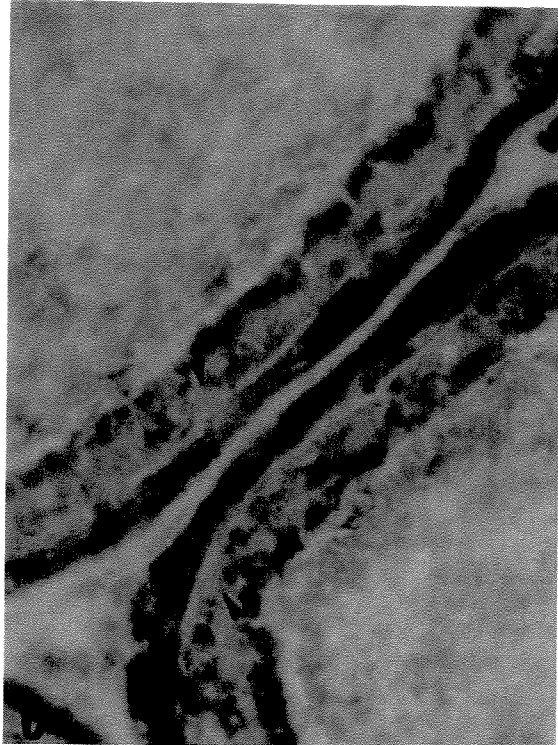
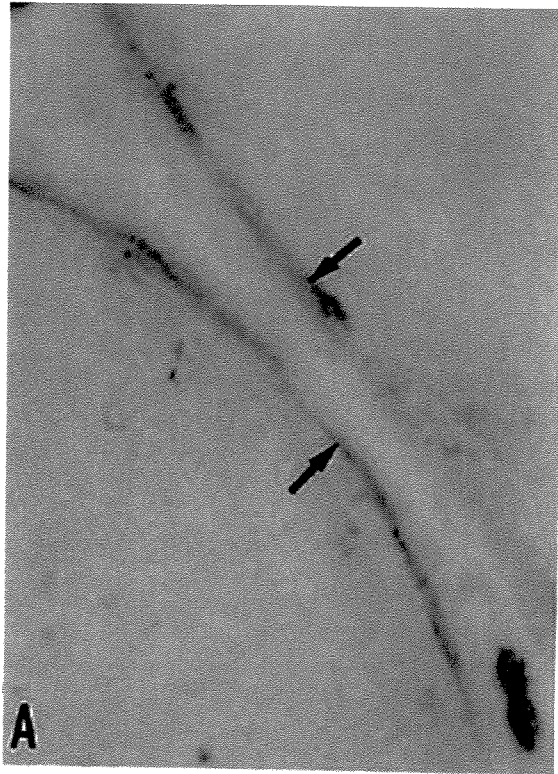
Figura 1 – Reatividades enzimáticas no SI do ducto epididimário do gerbilo às enzimas FoAl (A, 200x); FoAc (B, 200x); ATPase (C, 200x); e, SDH (D, 200x), sendo indicadas reações: intensa (rosáceas), forte (estrelas), heterogênea (*), fraca (cabeça de seta), moderada (seta).

Figura 2 – Reatividades enzimáticas, na cabeça do ducto epididimário do gerbilo às enzimas FoAl (A, 400x); FoAc (B, 200x); ATPase (C, 200x); e, SDH (D, 400x), sendo indicadas reações: forte (estrelas), homogênea (esfera), intensa (rosáceas).

Figura 3 – Reatividades enzimáticas na cauda do ducto epididimário do gerbilo às enzimas FoAl (A, 200x); FoAc (B, 200x); ATPase (C, 200x); e, SDH (D, 200x), sendo indicadas reações: moderada (seta), intensa (rosáceas), forte (estrelas), fraca (cabeça de seta).







Discussão

A reatividade da FoAl no epidídimo do gerbilo permitiu observar que esta enzima está concentrada na porção proximal do ducto epididimário deste roedor, a qual engloba o SI e a cabeça epididimária⁸. Foi observada principalmente na porção apical do epitélio de revestimento tubular, englobando o citoplasma supranuclear e apical das células P e apicais⁸. Estas observações são, até certo ponto, similares àquelas caracterizadas no epidídimo de algumas outras espécies de mamíferos, embora no rato e no cobaio as células P não mostraram reatividades para esta enzima^{1, 18}. Por outro lado, à semelhança das observações anteriores, feitas no rato e em outros mamíferos¹⁸ e no cobaio¹, a membrana basal tubular epididimária do gerbilo mostrou reatividade predominantemente forte à FoAl, cujo significado histofisiológico é a mediação enzimática que a FoAl exerce entre as células epiteliais e os capilares do estroma peritubular, no transporte de açúcares e outras moléculas orgânicas¹.

Por outro lado, tendo em vista que a FoAl catalisa e hidrolisa ésteres de monofosfato, sendo predominantemente uma enzima da membrana plasmática com localização em superfícies adsorptivas ou secretórias de células¹³, poder-se-ia inferir que os segmentos proximais do epidídimo do gerbilo estariam envolvidos ativamente com estes papéis funcionais marcantes. Inclusive apoiaria esta tese a observação de atividades enzimáticas fortes de outras enzimas hidrolíticas neste segmento, exceto a SDH. As atividades endocitóticas, secretórias e de absorção, se relacionam a atividades metabólicas dos compartimentos epitelial e luminal do epidídimo^{10, 11, 12, 26}. Como consequência, apoiariam também uma possível habilitação de fertilização dos espermatozóides epididimários do gerbilo nos segmentos proximais do ducto, embora esta tenda a ocorrer mais em nível do segmento distal (cauda) no epidídimo de roedores^{4; 7, 22, 26}.

A atividade da FoAl na cauda epididimária do gerbilo foi negativa, exceto ao nível da membrana basal, resultado que apoia, talvez, a tese proposta de habilitação de fertilização dos espermatozóides ao nível dos segmentos proximais do epidídimo nesta espécie. Estes segmentos proximais precedem o delgado corpo epididimário⁸. Comparativamente ao hamster em que se verifica a habilitação de fertilização dos espermatozóides na cauda

epididimária proximal^{6,15,22}, a reatividade da FoAl na cauda epididimária do hamster foi notada de forma intensa, sendo confirmada com recente investigação bioquímica de atividade da FoAl, intensa na região da cauda epididimária daquele roedor⁴.

Quanto à atividade da FoAc notou-se que foi intensa em praticamente toda a porção apical do epitélio epididimário do gerbilo, exceto no corpo epididimário uma região notoriamente com baixa reatividade histo-enzimática no gerbilo, conforme as observações aqui feitas. A intensa reação apical da FoAc está associada com atividade lisossômica^{7,10,11,23}, sendo esta uma observação que implica ocorrência de processos ativos de absorção e endocitose de fluido luminal^{10,11,12,26}. No citoplasma basal das células epiteliais epididimárias do gerbilo a reatividade da FoAc foi negativa, sendo este resultado similar ao observado em outros estudos sobre a atividade desta enzima no ducto epididimário de outros mamíferos¹⁸. Contudo, a distribuição de reatividade da FoAc nas células do epitélio epididimário, nos diferentes segmentos, mostrou características espécie específicas, como se pode verificar anteriormente^{2,14,18}.

Concernente à atividade da ATPase no epitélio epididimário do gerbilo esta foi verificada na porção apical do epitélio tubular em todos as regiões epididimais, exceto no corpo que mostrou atividade entre fraca e negativa. Esta reatividade, intensa no SI e forte na cabeça e cauda epididimários do gerbilo, expressa o papel enzimático da ATPase em termos de transporte ativo de hidrogênio livre do citoplasma apical das células epiteliais para o lúmen epididimário, visando a sua acidificação⁵. A acidificação intraluminal visa a manutenção da quiescência dos espermatozóides no ducto do epidídimo, prevenindo a ativação prematura das enzimas acrossomais^{5,6}.

Sabe-se que a ATPase transportadora de prótons H⁺ está localizada principalmente em células claras e delgadas⁵, sendo a quantidade de células claras prevalentes na cauda epididimária do gerbilo⁸, embora sejam notadas também em outros segmentos⁸. Por outro lado, de modo geral a ATPase através da quebra de ATP produz energia para transporte ativo entre a parte apical do epitélio e o lúmen epididimário, ou vice-versa^{12,18}, tese com a qual concordamos com base nas observações aqui feitas. Quanto à reatividade forte de ATPase notada na parte basal do epitélio epididimário do gerbilo e na membrana basal da

cabeça e cauda epididimais, talvez a ATPase esteja envolvida em transporte ativo entre o epitélio e o tecido conjuntivo subepitelial¹⁸.

A reatividade da SDH foi predominantemente fraca no epitélio de revestimento do ducto epididimário do gerbilo em todas as regiões analisadas, sendo este resultado similar ao descrito para o epidídimo do gato²⁷. Esta desidrogenase associada às mitocôndrias desempenha papel relevante no ciclo do ácido cítrico sendo a sua atividade caracterizada nas células do epitélio seminífero^{16, 17}. Assim sendo, esta enzima mostrou reatividade intensa no conteúdo luminal do epidídimo de gerbilo predominantemente formado por espermatozóides que possuem grande quantidade de mitocôndrias em nível das peças médias. Sugeriu-se ainda que a atividade da SDH poderia contribuir na marcação das células apicais ricas em mitocôndrias do epitélio epididimário²⁴.

Resumo

Neste estudo verificou-se, principalmente, que a expressão tissular da fosfatase alcalina esteve presente nas regiões proximais do epidídimo de gerbilo. As reatividades da fosfatase ácida e da ATPase foram intensas (fortes), na maioria das regiões do epidídimo caracterizadas, marcadamente ao nível do citoplasma apical das células do epitélio tubular, exceto no corpo epididimário um delgado ístmo de conexão da cabeça à cauda epididimárias nesta espécie, com notória hiporeatividade enzimática a praticamente todas as enzimas aqui estudadas. A succinato desidrogenase (SDH) mostrou também fraca atividade em todas as regiões, e estruturas do ducto epididimário do gerbilo, exceto no compartimento intraluminal onde se verificou atividade SDH-intensa nos espermatozóides estocados no lúmen. As reações enzimáticas caracterizadas foram correlacionadas com alguns papéis histofisiológicos tais como a mediação enzimática das fosfatases e ATPase em processos como endocitose, secreção, absorção e processo de transporte ativo das células do epitélio tubular. Uma possível marcação específica de mitocôndrias da peça média dos espermatozóides intraluminais pela SDH foi sugerida, com embasamento em processos metabólicos das mitocôndrias.

Palavras Chaves: Histoquímica. Hidrolases. Epidídimo. Gerbilo.

Summary

This study mainly showed that alkaline phosphatase expression had been present in the proximal regions of the epididymidis ductus of the gerbil which comprised the initial segment and proximal caput. The reactivities of acid phosphatase and ATPase were strong in the proximal and distal regions of the epididymidis ductus at the level of the apical cytoplasm and epithelium, except at the corpus level, a very thin isthmus located between the caput and cauda epididymidis, and as a general rule a low enzymatic reactive region of the epididymis of gerbil. SDH revealed also low activities in all the regions and regional structures of the duct, except into the luminal content formed by stored spermatozoa, prior on the cauda level. The enzymes presented in the epididymis were correlated to some histophysiological roles such as the enzymatic mediation of endocytosis, secretion, absorption and active transport concerning to phosphatases and ATPase and a possible mitochondrial role of SDH could occur at the spermatozoa level in which the middle pieces were formed by a great amount of mitochondria.

Key Words: Histochemistry. Hydrolasis. Epididymis. Gerbil

Referências Bibliográficas

1. ADAMS, C.S. Localization of alkaline phosphatase and NADH Diaphorase in the principal cells of guinea pig epididymis. **Acta Anatomica**, v.116, p.146-151, 1983.
2. ARIYARATNA, H.B.S.; GUNAWARDANA, V.K.; NAVARATNE, M.A. The epididymis of the prepubertal (*Bubalus bubalis*): histochemistry of phosphatases. **Anatomy, Histology and Embryology**, v.25, p.161-165, 1996.
3. BANTON, D.F. The discovery of lysosomes. **The Journal of Cell Biology**, v. 91, p. 66-76, 1981.
4. BEU, C.C.L.; ORSI, A.M.; BARBOSA-NOVELLI, E.L.; DOMENICONI, R.F.; BURNEIKO, R.C.; GALHARDI, C.M. Biochemical analysis of alkaline phosphatase in

regions of the epididymis of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Theriogenology**, sent to publish, 2004.

5. BROWN, D.; SMITH, P. J.S.; BRETON, S. Role of V-ATPase-rich cells in acidification of the male reproductive tract. **Journal of Experimental Biology**, v.200, p.257-262, 1997.

6. CARR, D.W.; USSELMAN, M.C.; ACOTT, T.S. Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: species comparison. **Biology of Reproduction**, v.33, p.588-595, 1985.

7. CUMMINS, J.M. Effects of epididymal occlusion on sperm maturation em the hamster. **Journal of Experimental Zoology**, v.197, p.187-190, 1976.

8. DOMENICONI, R.F.; ORSI, A.M.; CRUZ, C.; PINHEIRO, P.F.F.; BEU, C.C.L.; ARTONI, S.M.B. Características estruturais do ducto epididimário de gerbilo: histologia regional em microscopia óptica. In: XX Congresso Brasileiro de Anatomia, Maceió, 2002. **Anais**. Maceió: Centro de Convenções do Hotel Meliá 2002, p. 129.

9. FOUQUETT, J.P.; GUHA, S. Histochemical studies on the enzymes of glycogen metabolism in hamster epididymis. **Histochemie**, v.17, p.89-98, 1969.

10. HERMO, L.; DWORKIN, J.; OKO, R. The role of the epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. **American Journal of Anatomy**, v.183, p.107-124, 1988.

11. HERMO, L.; MORALES, C. Endocytosis in nonciliated cells of the ductuli efferents em the rat. **American Journal of Anatomy**, v.171, p.59-74, 1984.

12. HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. **International Review of Cytology**, v.154, p.105-19-89, 1994.
13. HOFFMANN, W.E.; KRAMER, J.; MAIN, A.R. Clinical enzymology. In: LOEB W.F.; GUIMBY F.W. (eds). **The clinical chemistry of laboratory animals**. New York, Pergamon Press, 1989, p.237-278.
14. HOLT, W.V.; JONES, R.C.; SKINNER, J.D. Studies of the deferent ducts from the testis of the African elephant, *Loxodonta africana*. histochemistry of the epididymis. **Journal of Anatomy**, v. 130, p. 367–379, 1980.
15. HORAN, A.H.; BEDFORD, J.M. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the syrian hamster. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.30, p.417-423, 1972.
16. LEHMANN, V.; BRANDAU, H. Verteilungsmuster von dehydrogenasen des glucose-und-fructose-sroffwechsels in sammenkanalchen des rattenhodes. **Acta Histochemica**, v.35, p.18-27, 1970.
17. MIRAGLIA, T.; MOURA, C.S.; GUEDES, M.L.C.; CHEZZI, L.A. Dados sobre a histoenzimologia dos testículos de saguis (*Callinthrix jacchus* e *Callinthrix penicillata*). **Ciência e Cultura**, v. 32, p.1253-1256, 1980.
18. MONIEM, K.A. Comparative histochemical localization of some hydrolytic enzymes in mammalian epididymides. **Acta Anatomica**, v.108, p.301-309, 1980.
19. NICANDER, L. On the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymis in rabbits. **Acta Morphologica Neerlando-Scandinavica**, v. 1, p. 99-108, 1957.

20. NICANDER, L. Studies on the regional histology and citochemistry of the ductus epididymis in mammals. *Acta Morphologica Neerlandico-Scandinavica*, v. 1, p. 337-362, 1958.
21. NICANDER, L. An electron microscopical study of absorbing cells in the posterior caput epididymis of rabbits. *Zeitschrift Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, v. 66, p. 829 – 847, 1965.
22. ORGEBIN-CRIST, M.C.; OLSON, G.E. Epididymal sperm maturation. In: COUROT, M. **The Male in Farm Animal Reproduction**, 1984, p.80-102.
23. ORSI, A.M., MTHEUS, S.M.M., GREGORIO, E.A., BEU, C.C.L. Morphological investigations of the surface epithelium of ductuli efferentes of black isogenic mice (*Mus musculus*). *Anatomy, Histology and Embryology*, v. 27, p. 215-218, 1998.
24. PALACIOS, J., REGADERA, J., NISTAL, M., PANIAGUA, R. Apical mitochondria-rich cells in the human epididymis: an ultrastructural, enzymohistochemical, and immunohistochemical study. *Anatomical Record*, v.231, p.82-88, 1991.
25. PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theoretical and applied**. Boston: Little Brown, 1972, v.1-2, p.180.
26. ROBAIRE, B., HERMO, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens structure, functions, and their regulation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 1. ed. New York: Raven Press, 1988. p. 999-1080.
27. VIOTTO, M.J.S., ORSI, A.M., DAL-PAI, V. Localização histoquímica da NADH-diaforase e succinato-desidrogenase no epidídimo do gato (*Felis domestica*, L.). **Ciência e Cultura**, v.38, p.2025-2027, 1986.

2º Artigo: Histologia Regional do Epidídimo do Gerbilo:

Observações em Microscopia de Luz

Resumo

Este estudo tem como objetivo descrever a histologia regional do epidídimo do gerbilo ao nível de microscopia de luz, com base nas observações morfológicas e morfométricas. Os principais resultados obtidos comparativamente com a histologia epididimária de outros roedores, principalmente o rato albino, foram presença de células epiteliais claras no segmento inicial (SI), as quais não foram observadas na mesma região do epidídimo do rato albino; ocorrência de todos os tipos celulares do epitélio epididimário na cabeça do epidídimo; marcante e total basofilia núcleo-citoplasmática das células principais (P) do corpo epididimário delgado e retilíneo nessa espécie; e, grande quantidade de células claras na cauda epididimária com intensa granulação PAS-positiva em seus citoplasmas. Aparentemente as células claras, assim como em outros roedores, estariam relacionadas principalmente com endocitose de materiais particulados (fagocitose), desde o lúmen tubular para o citoplasma das células P. O epitélio epididimário mostrou-se alto desde o SI até o corpo epididimário sem diferenças significativa entre os segmentos, ou seja, entre o SI, cabeça e corpo. O epitélio mostrou-se baixo na cauda epididimária como consequência do grande diâmetro luminal desta região, relacionando-se com estocagem de espermatozóides.

Abstract

This study aimed to describe the epididymidis regional histology of the gerbil at light microscope level, on the base morphological and morphometric observations. The main results obtained comparatively to the epididymidis histology of other rodents, mainly the albino rat, were presence of epithelium clear cells at the initial segment which were not observed in the same region of the albino rat epididymis, occurrence of all the epithelium cell types in the caput epididymidis, an over all basophilic pattern of the principal cells of the thin and straight corpus epididymidis and great amount of clear cells in the cauda epididymidis with intense PAS-positive granulation in their cytoplasm. Apparently clear cells as in other

rodents had been related mainly with endocytosis of particulate materials (phagocytosis) from the tubular lumen to the cytoplasm of principal cells. Epididymidis epithelium was high since the initial segment to the distal corpus epididymidis, without significant difference among the three segments, and lower in the cauda as a consequence of the great luminal diameter of this region related to spermatozoa storage.

Introdução

No epitélio colunar e pseudoestratificado, do epidídimo de mamíferos, geralmente, se observam 6 tipos celulares distintos, as células principais, basais, apicais, claras, halo e delgadas (HAMILTON, 1975; ROBAIRE & HERMO, 1988). Os tipos celulares podem variar regionalmente, sendo que algumas células aparecem com maior frequência relativa, em alguns segmentos do que nos outros, de acordo com os estudos citados. Diferenças regionais específicas foram notadas entre os diferentes tipos celulares principalmente para a síntese e secreção de proteínas (HERMO et al., 1992b; IGDOURA et al., 1995; MORALES et al., 1996). Na cauda epididimária como um todo (regiões proximal e distal) notam-se muitas células claras com função predominantemente endocitótica (ROBAIRE & HERMO, 1988, SERRE & ROBAIRE, 1998).

As variações regionais ocorrem não só quanto aos tipos celulares, mas também em outras características como o diâmetro luminal que, aumenta progressivamente das regiões proximais para as regiões mais distais do epidídimo. Da mesma forma que o diâmetro luminal torna-se maior, a altura do epitélio diminui da cabeça para a cauda epididimária, mostrando comportamento regional oposto entre os parâmetros (SERRE & ROBAIRE, 1998).

Face ao exposto o objetivo deste trabalho é caracterizar histologicamente as regiões epididimárias e os diferentes tipos de células epiteliais epididimárias no gerbilo, bem como caracterizar parâmetros morfológicos diferenciativos entre as regiões histológicas tais como: altura do epitélio, diâmetro tubular e diâmetro luminal epididimários nesta espécie.

Material e Métodos

Fragmentos do segmento inicial, cabeça, corpo e cauda epididimais de 2 gerbilos (*Meriones unguiculatus*), adultos (90 dias), foram fixados em solução de Bouin, seguindo-se rotina de inclusão histológica em Histosec (Leica, Alemanha). Cortes histológicos de 5µm foram corados com HE, tricrômico de Masson e PAS/H, para estudos histológicos e histoquímicos.

Pequenos fragmentos obtidos das 4 regiões epididimárias retirados de 10 outros gerbilos, foram fixados em McDowell "overnight" a 4°C. A rotina histológica foi feita com inclusão em resina histológica (Historesin, Leica, Alemanha). Cortes de 2µm obtidos foram corados com hematoxilina/floxina B, azul de toluidina a 0,5% e fucsina ácida a 1%. Este material foi destinado para estudos morfométricos, sendo as mensurações feitas nas 4 regiões histológicas de ambos os epidídimos, totalizando 10 antímeros. Utilizando-se 5 lâminas, com 3 cortes histológicos de cada região caracterizada, foram feitas 30 medidas aleatórias das variáveis: altura do epitélio epididimário desde a base até a extremidade apical de estereocílios das células principais; diâmetro tubular e diâmetro luminal das regiões epididimárias.

As mensurações foram feitas com auxílio de um Sistema de Análise de Imagens KS-300 (Zeiss, Alemanha). Os dados obtidos foram tratados estatisticamente pelo programa de estatística SIGMA (EUA). Para cada parâmetro avaliado, foi utilizada análise de variância com os tratamentos no esquema fatorial, onde foram comparadas as diferentes regiões. Também foi verificada a correlação linear de Pearson (ZAR, 1996) entre os parâmetros: altura de epitélio, diâmetro tubular e diâmetro luminal.

Resultados

O segmento inicial (SI), no epidídimo do gerbilo, mostrou contornos regulares do ducto e da luz tubular, a qual estava freqüentemente preenchida por espermatozóides. Os núcleos das células principais (P) colocaram-se no terço médio-basal do epitélio, sendo ovoidais, eucromáticos e com um a dois nucléolos evidentes (Fig.1). O citoplasma apical

aparece como uma faixa extensa e homogeneamente eosinófila em HE (Fig.1), verificando-se granulação fortemente PAS-positiva no citoplasma apical da maioria das células P (Fig.2).

Os núcleos das células basais e halo tendem a se dispor junto à parte basal de células P adjacentes. As células claras têm núcleos mais arredondados mostrando uma extensa faixa de citoplasma hipocorado, disposta ao redor do núcleo (Fig.1) e que pode se estender apicalmente até as adjacências da borda apical de estereocílios (detalhe Fig.1). Nesta borda o glicocálice das células P se faz evidente ao PAS. As células apicais têm núcleos dispostos apicalmente, relativamente aos núcleos das células P, tendo formatos entre arredondado e ovoidal e sendo morfologicamente similares às células P. Os grânulos PAS-positivos, antes caracterizados, podem se estender ao citoplasma apical, estando mais dispersos e também adjacentes aos núcleos de algumas células apicais (Fig.2).

Os núcleos de células basais e de células apicais aparecem com maior frequência na cabeça epididimária (Fig.3), relativamente ao SI. Preparações delgadas coradas com hematoxilina/fucsina, mostraram extensa área hipocorável no citoplasma apical das células P (Fig.4). A luz tubular desta região também apresentou espermatozóides em seu interior, em menor quantidade do que no SI (Fig.3 e 4). A reatividade ao PAS nesta região foi baixa, observando-se apenas alguns grânulos PAS-positivos esparsos no citoplasma apical (Fig.5).

O corpo epididimário do gerbilo não apresentou o enovelamento tubular típico das outras regiões tubulares (Fig.10). Os núcleos das células P eram mais irregulares, aparecendo alongados e basófilos relativamente às regiões precedentes, e dispondo-se na parte média do epitélio. A borda apical de estereocílios foi bastante evidente e na luz tubular se observaram fluido e núcleos de células descamadas provenientes provavelmente do próprio epitélio epididimário. Núcleos de células basais foram observados em grande quantidade em posição adbasal, assim como núcleos de células apicais com elevada basofilia foram também observados (Fig.6).

O epitélio da cauda epididimária do gerbilo mostrou células P baixas com núcleos basófilos e com formas irregulares e variadas, estando localizados adbasalmente. A estreita faixa de citoplasma supranuclear apareceu homogeneamente eosinófila com estereocílios curtos na borda apical (Fig.7). A luz tubular estava preenchida por grande quantidade de

material, predominando espermatozóides (Figs.7 e 8). Células claras foram evidentes nesta região, aparecendo intercaladas entre células P adjacentes, e tendo núcleos ovalados, hipocorados, dispostos basalmente e com nucléolo evidente. O citoplasma apical das células claras apareceu também palidamente corado, devido ao grande número de vacúolos supranucleares (Fig.8). A reação de PAS mostrou que as células claras apresentaram uma grande quantidade de material granular supranuclear fortemente PAS-positivo, que se dispunha circundando uniformemente o núcleo e avançando em direção ao citoplasma apical. A reação PAS-positiva marcou também o glicocálice das células P e a borda de estereocílios (Fig.9).

Os resultados da análise estatística foram mostrados nas tabelas a seguir, onde constam os parâmetros: altura epitelial, diâmetros tubular e luminal; para cada uma das quatro regiões estudadas e, ainda, a correlação existente entre os parâmetros considerados.

Tabela 1 - Médias aritméticas $\pm$ desvio padrão dos parâmetros avaliados, segundo as regiões preestabelecidas do epidídimo do gerbilo (*Meriones unguiculatus*):

Regiões	Parâmetros		
	Altura de epitélio (μm)	Diâmetro tubular (μm)	Diâmetro luminal (μm)
epididimárias			
Segmento inicial	40.5 ($\pm$ 3.5)a	130.4 ($\pm$ 7.2)a	66.1 ($\pm$ 6.4)a
Cabeça	35.5 ($\pm$ 2.7)a	141.7 ($\pm$ 9.7)a	89.4 ($\pm$ 8.3)a
Corpo	38.3 ($\pm$ 2.5)a	136.4 ($\pm$ 14.9)a	86.8 ($\pm$ 13.7)a
Cauda	15.3 ($\pm$ 1.9)b	367.6 ($\pm$ 33.3)b	330.4 ($\pm$ 35.2)b

Para cada parâmetro avaliado, médias aritméticas de regiões seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p < 0.05$).

Tabela 2. Correlação linear de Pearson (ZAR, 1996) entre os parâmetros avaliados:

	Diâmetro tubular	Diâmetro luminal
Altura do epitélio	-0.86	-0.89
Diâmetro tubular	—	0.997
P<0.01		

As regiões SI, cabeça e corpo do epidídimo do gerbilo, caracterizaram-se por apresentar epitélio pseudoestratificado colunar alto, mostrando valores médios estatisticamente semelhantes para cada um dos parâmetros considerados. Já a cauda do epidídimo apresentou diâmetros tubular e luminal significativamente maiores, e, altura epitelial significativamente menor, quando comparada às demais regiões (Tabela 1).

Com a análise da correlação linear de Pearson realizada entre os parâmetros: altura do epitélio e diâmetros tubular e luminal, foi possível afirmar que a altura do epitélio epididimário do gerbilo, apresentou-se inversamente proporcional aos diâmetros tubular e luminal. Ao contrário, os diâmetros tubular e luminal mostraram correlação diretamente proporcional entre si (Tabela 2).

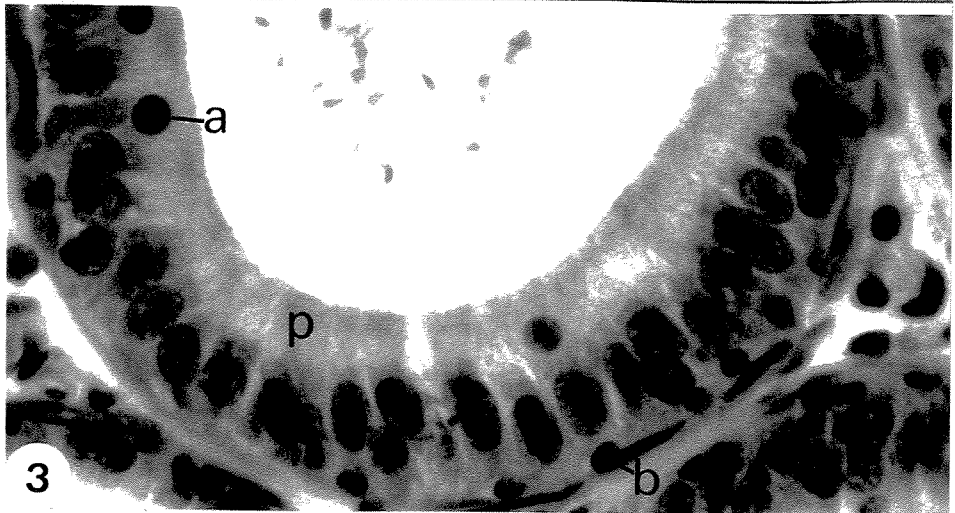
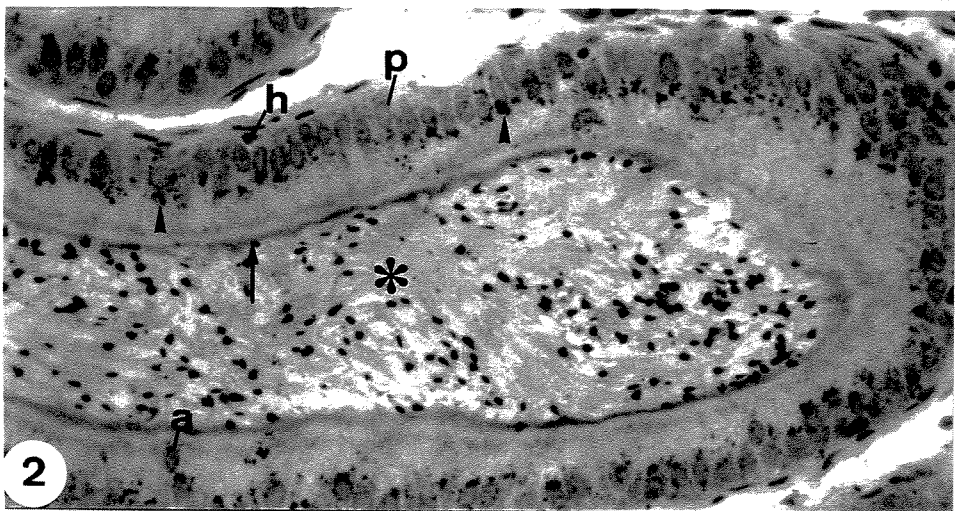
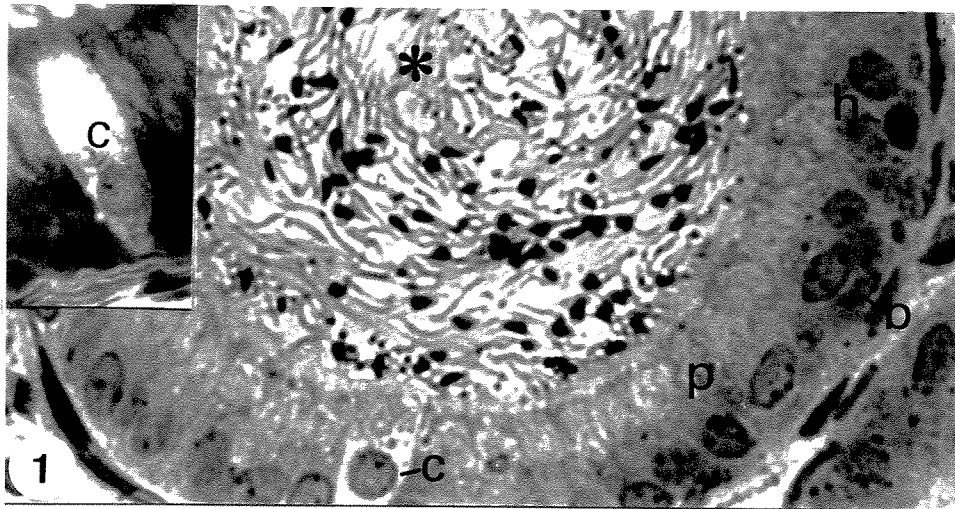
Legendas

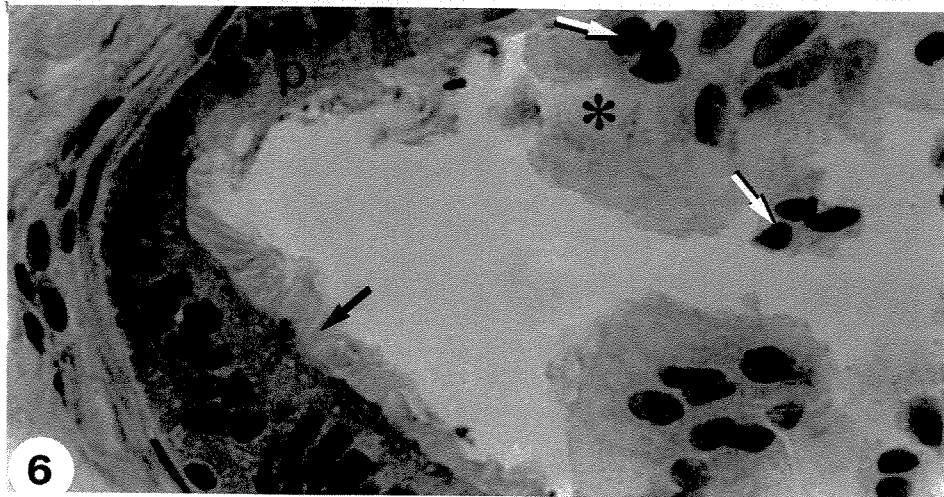
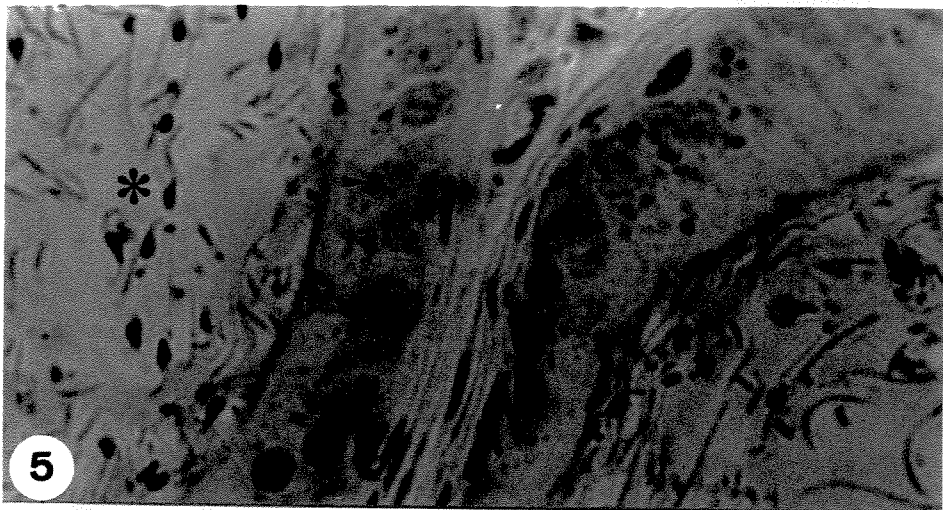
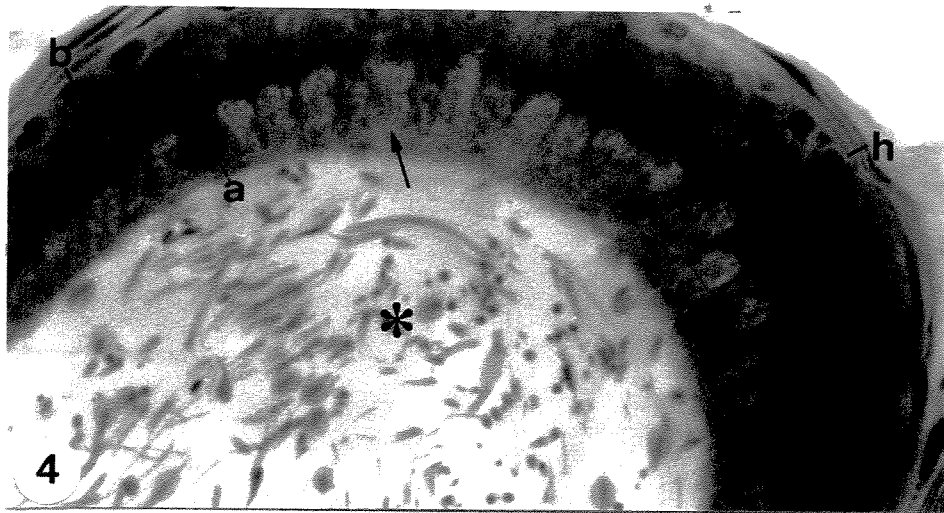
Fig.1-3: Fotomicrografias do segmento inicial (1 e 2) e da cabeça (3) do ducto epididimário do gerbilo, sendo indicados: conteúdo luminal (*); células basal (b), halo (h), principal (p), clara (c) e apical (a); glicocálice (seta); grânulos PAS-positivos (cabeça de seta). H/E em 1 e Hematoxilina/Fucsina, H/F, no detalhe; PAS em 2; e, H/E em 3, 400x em todas as fotos.

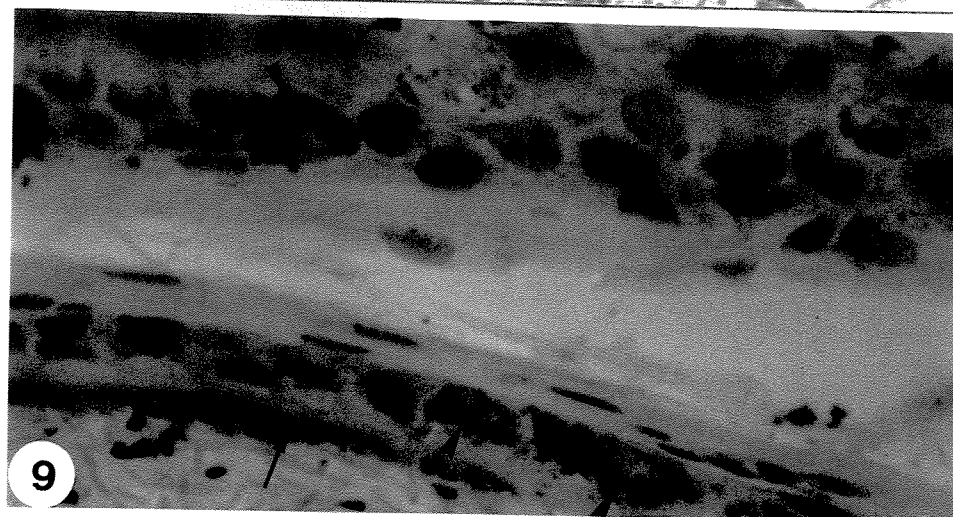
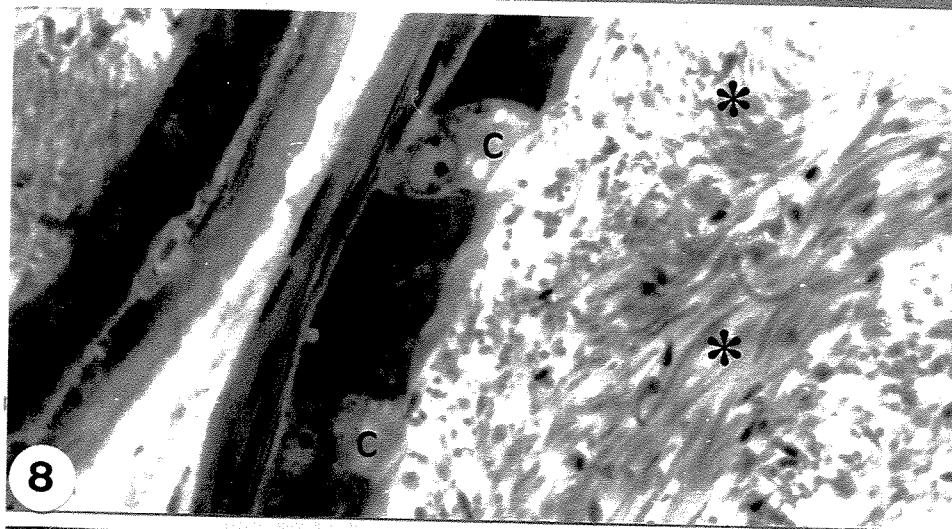
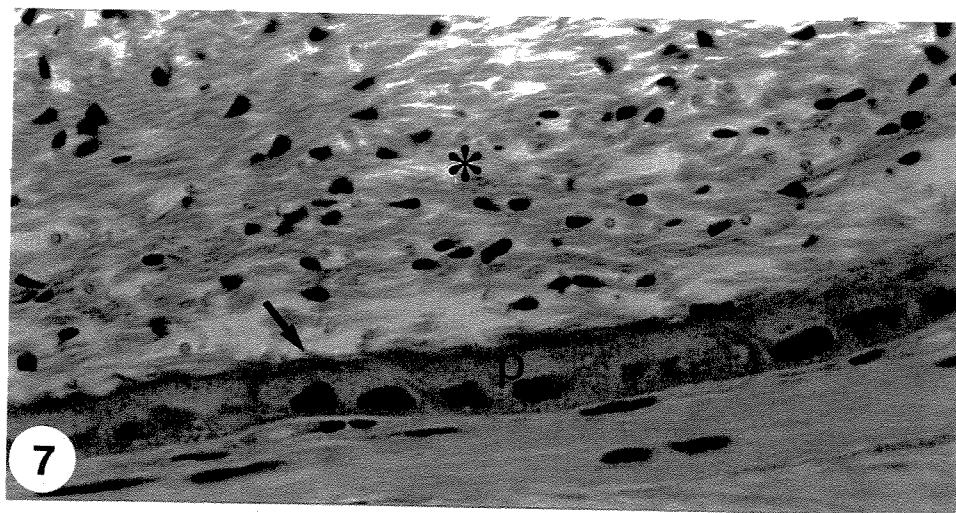
Figs.4-6: Fotomicrografias da cabeça (4, H/F e 5, PAS, 400x) e do corpo (6, H/F, 400x) do ducto epididimário do gerbilo, sendo indicados: conteúdo luminal (*), células basal (b), halo (h), principais (p) e apicais (a); área clara citoplasmática apical (seta delgada); grânulos PAS-positivos (cabeça de seta); borda apical de estereocílios (seta); esfoliações celulares (seta branca) no conteúdo luminal.

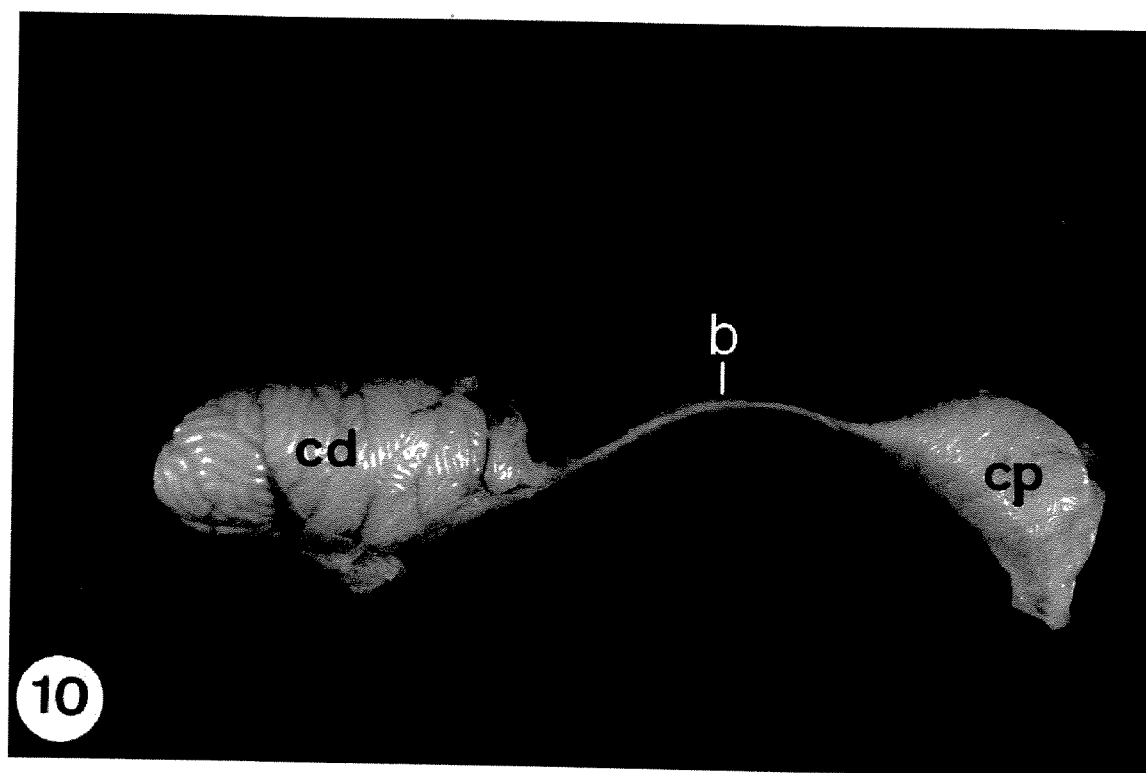
Figs.7-9: Cauda epididimária (7 e 8, H/F, 9, PAS, 400x), sendo indicados: conteúdo luminal (*); células principal (p), clara (c); borda apical de estereocílios (seta); glicocálice (seta delgada); grânulos PAS-positivos (cabeças de seta).

Fig.10: Preparação macroscópica do epidídimo do gerbilo, fixado em solução de Bouin, mostrando as regiões anatômicas de cabeça (cb), corpo (cp) extremamente delgado e cauda (cd), 4x.









Discussão

Em microscopia de luz, o SI epididimário do gerbilo apresentou os mesmos tipos celulares descritos para o rato albino compreendendo as células principais (P), basais, apicais e halo (REID & CLELAND, 1957; HAMILTON, 1975; ROBAIRE & HERMO, 1988; SERRE & ROBAIRE, 1998). O SI do gerbilo mostrou também células claras, que não foram caracterizadas no SI do rato pelos autores citados e que as identificaram apenas no corpo e na cauda epididimários. Células delgadas, identificadas por ROBAIRE & HERMO (1988), e SERRE & ROBAIRE (1998) no SI de ratos, não foram identificadas no ducto epididimário do gerbilo.

Na cabeça epididimária, assim como nas demais regiões do ducto epididimário do gerbilo as células P são as predominantes em número, o que tem sido uma característica própria do epitélio epididimário de mamíferos (ROBAIRE & HERMO, 1988). Todos os tipos celulares epiteliais epididimários foram observados na cabeça epididimária do gerbilo, aparentando haver maior frequência relativa de núcleos de células basais e apicais neste segmento, do que no SI. Esta observação difere da afirmativa anterior de HAMILTON (1975), de que a célula apical estaria presente apenas no SI do rato albino, embora células apicais tenham sido identificadas também em todas regiões epididimárias do rato marrom (SERRE & ROBAIRE, 1998).

As características morfológicas básicas observadas nos diferentes tipos celulares do epitélio epididimário do gerbilo não mostraram diferenças significativas daquelas descritas pelos autores anteriormente citados. De forma marcante, o delgado e retilíneo corpo epididimário do gerbilo (Fig.10), caracteristicamente diferente desta região em outros roedores (ROBAIRE & HERMO, 1988), mostrou elevada basofilia núcleo-citoplasmática das células P, não observada nas outras regiões epididimárias do próprio gerbilo e nem caracterizada em outros mamíferos (SETCHELL et al., 1994).

As células basais que foram consideradas elementos estabilizadores da estrutura epitelial epididimária (HAMILTON, 1975), parecem ter origem extratubular no epidídimo de camundongo considerando-se a hipótese de serem monócitos, recrutados a partir do

sangue que irriga o epidídimo (HOLSCHBACH & COOPER, 2002), e com possível papel imunológico (YEUNG et al., 1994). Porém as células halo, aqui também observadas, é que efetuariam este papel segundo diferentes autores (ROBAIRE & HERMO, 1988). Para FLICKINGER et al. (1997), os linfócitos T imuno-detectados no epitélio epididimário de ratos corresponderiam às células halo.

Na cauda se destacam as células claras, também presentes em outras regiões como o SI, as quais mostraram granulação apical intensamente PAS-positiva que poderia corresponder à absorção e endocitose de material particulado, talvez de natureza glicoprotéica, com apoio teórico em descrições anteriores (MOORE & BEDFORD, 1979; ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO et al., 1992 a).

O epitélio epididimário pseudoestratificado do gerbilo foi caracterizado como alto nas três primeiras regiões estudadas, tornando-se significativamente mais baixo na cauda do epidídimo. Estes dados concordam com as observações feitas no epidídimo do rato marrom jovem (SERRE & ROBAIRE, 1998). Segundo ROBAIRE & HERMO (1988) o diâmetro luminal epididimário se torna mais dilatado distalmente e a altura epitelial decresce, sendo esta uma peculiaridade da cauda epididimária que é o segmento de estocagem dos espermatozóides. O epitélio de revestimento da cauda epididimária no gerbilo, assim como nos outros roedores, mostrou-se baixo sugerindo um aspecto compensativo para a dilatação luminal e tubular nesta região de estocagem dos espermatozóides.

Referências Bibliográficas

FLICKINGER, C.J., BUSH, L.A., HOWARDS, S.S., HERR, J.C. Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anat. Rec.*, v.248, p.380-390, 1997.

HAMILTON, D.W. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis, and ductus deferens in the rat. In: GREEP, R.O., ASTWOOD, E.B., eds., *Handbook of Physiology*. Sect. 7, Endocrinology, Male Reproductive System. American Physiology Society, Washington, v. 5, p. 259-301, 1975.

HERMO, L., BARIN, K., ROBAIRE, B. Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats, during postnatal development. *Anat. Rec.*, v. 233, p. 205-228, 1992a.

HERMO, L., OKO, R. ROBAIRE, B. Epithelial cells of the epididymis show regional variations with respect to the secretion or endocytosis of immobilin as revealed by light and electron microscope immunocytochemistry. *Anat. Rec.*, v.232, p.202-220, 1992b.

HOLSCHBACH, C., COOPER, T.G. A possible extratubular origin of epididymal basal cells in mice. *Reproduction*, v.123, p.517-525, 2002.

IGDOURA, S.A., MORALES, C.R., HERMO, L. Differential expression of cathepsins B and D in testis and epididymis of adult rats. *J. Histochem. Cytochem.*, v.43, p.545-557, 1995.

MOORE, H.D.M., BEDFORD, J.M. Androgen-dependence of rat epididymal epithelial cells: changes in ultrastructure and protein uptake following short-term castration. *Anat. Rec.*, v. 187, p. 659-660, 1979

MORALES, C.R., IGDOURA, S.A., WOSU, U.A., BOMAN, J., AGRAVES, W.S. Low density lipoprotein receptor related protein-2 expression in efferent duct and epididymal epithelia: evidence in rats its *in vivo* role in endocytosis of apolipoprotein-J/clusterin. *Biol. Reprod.*, v.55, p.676-683, 1996.

REID, B.L., CLELAND, K.W. The structure and function of the epididymis. I. The histology of the rat epididymis. *Austr. J. Zool.*, v. 5, p. 223-256, 1957.

ROBAIRE, B., HERMO, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens structure, functions, and their regulation. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988. chap. 23, p. 999-1080.

SERRE, V., ROBAIRE, B. Segment-specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. *Biol. Rep.*, v.58, p.497-513, 1998.

SETCHELL, B.P., MADDOCKS, S., BROOKS, D.E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press, chap. 18, p. 1063-1175, 1994.

YEUNG, C.H., NASHAN, D., SORG, C., OBERPENNING, F., SCHULZE, H., NIESCHLAG, E., COOPER, T.G. Basal cells of the human epididymis – Antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol. Reprod.*, v.50, p.917-926, 1994.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey, 718p., 1996.

3º Artigo:

“Ultrastructure of the epididymal epithelium of the gerbil (*Meriones unguiculatus*)”

Introdução

O tipo celular proporcionalmente mais abundante no epitélio epididimário é a célula principal, estando envolvida em processos de absorção, secreção micromerócrina (NICANDER & MALMQVIST, 1977), endocitose, e transcitose (ROBAIRE & HERMO, 1988). Absorção de fluido luminal; secreção de alguns produtos como proteínas e glicoproteínas e atividades endocitóticas parecem ser as principais funções atribuídas a este tipo celular (FLICKINGER, 1983; 1985; ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO et al., 1992; HERMO et al., 1994).

A capacidade de síntese protéica, ou glicoprotéica, ativa das células principais do epitélio epididimário decorre de possuírem retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexo de Golgi bem desenvolvidos (LIU et al., 1991; HERMO et al., 1994). LIU et al. (1991) demonstraram que proteínas podem ser transportadas através das células epiteliais, sugerindo que as células principais são capazes de incorporar aminoácidos. De modo similar, fora caracterizada autoradiograficamente uma via secretória para glicoproteínas no epidídimo de camundongo albino (FLICKINGER, 1985).

As células epididimárias de mamíferos possuem complexo sistema de endomembranas para síntese protéica, necessária para a produção de enzimas lisossomais e de outras substâncias (HAMILTON, 1975; ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO et al., 1994). A presença de complexos de Golgi bem desenvolvidos é característica do citoplasma supranuclear de células principais epididimárias de mamíferos, participando da formação de lisossomos e de atividades secretórias destas células (NICANDER & GLOVER, 1973; HERMO et al., 1994). Assim sendo, a presença de “vias intracitoplasmáticas” para endocitose, transcitose e secreção nas células principais epididimárias foi caracterizada, e ilustrados os mecanismos ultraestruturais e morfofuncionais de sua ocorrência (ROBAIRE

& HERMO, 1988; HERMO et al., 1994).

Concernente à habilitação de fertilização dos espermatozóides no epidídimo destacam-se algumas modificações em sua morfologia, durante o trânsito ao longo da luz tubular, bem como a sua interação com o citoplasma apical das células epiteliais feita através de processos de endocitose, secreção e absorção de fase fluida do líquido seminal. Modificações morfológicas dos espermatozóides epididimários estariam associadas a alterações bioquímicas e fisiológicas intraluminais de suas membranas plasmáticas, concernentes à natureza e estrutura da própria membrana, bem como ao acréscimo ou supressão de substâncias como proteínas e íons salinos na membrana plasmática inter-relacionadas à fisiologia das células epiteliais epididimárias (ROBAIRE & HERMO, 1988).

A secreção é outra função atribuída ao epitélio epididimário de mamíferos. Especialmente as células principais são capazes de secretar no lúmen epididimário alguns íons salinos, pequenas moléculas orgânicas, proteínas e glicoproteínas, sendo estas secreções necessárias para ocorrer a maturação espermática. O epidídimo é capaz de captar da circulação, transportar e secretar através de seu epitélio, diferentes substâncias orgânicas (FLICKINGER, 1983; 1985; SETCHELL et al., 1994).

Algumas hipóteses foram propostas para explicar o movimento do material secretado no lúmen do epidídimo ou dos ductos eferentes, pelas células epiteliais. Assim, haveria existência de uma comunicação intermitente entre o RE apical e o compartimento luminal (HOFFER et al., 1973). Vesículas revestidas por membrana carrearão o produto secretório do complexo de Golgi para o citoplasma apical (FLICKINGER et al. 1978; ORSI et al., 1998). Grânulos citoplasmáticos apicais estariam envolvidos em processo merócrino de secreção (NICANDER & MALMQVIST, 1977).

A caracterização ultraestrutural do epitélio epididimário reflete suas principais funções exercidas no conteúdo luminal (ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO, et al., 1992; ARRIGHI et al., 1993). Em vista dessas informações o objetivo deste trabalho é descrever as características ultraestruturais do epitélio epididimário do gerbilo nas regiões do segmento inicial, cabeça, parte média do corpo e cauda distal, caracterizando os seus diferentes tipos celulares, com maior ênfase nas células principais e claras.

Materiais e Métodos

Estudos em microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram feitos nos epidídimos de 5 gerbilos (*Meriones unguiculatus*) adultos, com idade de 90 dias. Fragmentos do segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo foram coletados a fresco e fixados em Karnovsky, durante 3 horas a 4°C. Em seguida foram submetidos à rotina de MET. Os cortes ultrafinos obtidos (60 a 80nm) foram contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila e analisados em microscópio eletrônico de transmissão Philips CEM 100 (Holanda), junto ao Centro de Microscopia Eletrônica do Campus de Botucatu, UNESP.

Resultados

No segmento inicial (SI) do ducto epididimário do gerbilo, o citoplasma supranuclear das células P contém a maior parte das organelas citoplasmáticas, predominando mitocôndrias e estruturas lamelares e vesiculares do retículo endoplasmático rugoso (RER). As cisternas lamelares do RER aparecem longas e dilatadas coexistindo com cisternas vesiculares deste retículo, tendo grande quantidade de ribossomos aderidos e livres que formam polissomos (Fig.1). No citoplasma supranuclear observam-se alguns corpos eletrondensos, corpos multivesiculares com conteúdo variado e corpos mielínicos envoltos por endomembranas, os quais podem se fundir (Fig.2). O aparelho de Golgi das células P é pouco evidente, sendo os seus dictiossomos interrelacionados com abundantes cisternas adjacentes do RER. Nas adjacências do complexo de Golgi-RE se observam alguns corpos eletrondensos, corpos multivesiculares pálidos, mitocôndrias e vesículas revestidas e de superfície lisa (Fig.3).

Em algumas células P o citoplasma infranuclear mostrou o RER tendo características circunferenciais quando as lamelas adquirem um padrão espiralado. Na parte central das “espirais” (scroll), visualiza-se geralmente, uma formação vesicular do próprio RER. Estas lamelas circunferenciais estão associadas com mitocôndrias, observando-se também polissomos adjacentes e alguns grânulos eletrondensos presentes na estrutura lamelar. As lamelas e vesículas do RE se aproximam e aparentemente se inter-relacionam com as

membranas plasmáticas de células adjacentes (Fig.4). Em algumas observações, notam-se relações similares das lamelas com o envoltório nuclear e com interdigitações de membranas plasmáticas adjacentes.

Na cabeça epididimária do gerbilo as células P mostraram intensa reticulação e vesiculação do citoplasma supranuclear. Neste se fizeram evidentes lamelas alongadas e com extremidades dilatadas do RER (Fig.5), coexistindo com cisternas vesiculares deste retículo, observando-se também mitocôndrias e grande quantidade de polissomos adjacentes (Fig.6). Outras formações observadas são vesículas revestidas com diferentes dimensões, corpos multivesiculares e lisossomos (Figs.5 e 6). No citoplasma basal das células principais predomina o RER do tipo lamelar, havendo aposição das membranas plasmáticas laterais de células adjacentes que mostram acentuadas ondulações (Fig.7).

No citoplasma apical das células P observa-se também grande quantidade de vesículas claras de superfície plana, algumas com dupla membrana, possuindo diferentes dimensões e formas; coexistindo com vesículas pequenas e revestidas. Na luz tubular entre os estereocílios apicais se nota grande quantidade de vesículas e vacúolos, estando alguns muito próximos da membrana plasmática apical na qual aparentemente, se fundem, verificando-se também cavéolas neste nível vistas entre os estereocílios (Fig.8).

No epitélio da cabeça epididimária são visualizadas ainda, as células apical, basal e halo. As células apicais se colocam em posição elevada na estrutura epitelial tubular, localizando-se entre as células P circunjacentes. Apresentam núcleos grandes, ovoidais e o citoplasma mostra escassez de organelas, predominando mitocôndrias e lamelas não muito proeminentes do RER. As células basais fazem interdigitações de membranas plasmáticas com as células P suprajacentes, localizando-se junto à membrana basal tubular da qual se separam por estreita faixa de citoplasma infranuclear (Fig.9). A célula halo posiciona-se também basalmente na estrutura epitelial, mostrando núcleo arredondado com expressiva quantidade de heterocromatina, e citoplasma claro e com poucas organelas dentre as quais predominam lisossomos (Fig.10).

O epitélio do corpo epididimário ultraestruturalmente apresenta células colunares (principais) com citoplasma muito eletrondenso. As células têm grande quantidade de

vesículas e vacúolos citoplasmáticos, com um padrão coalescente, especialmente ao nível dos citoplasma perinuclear, aparentemente dificultando a visualização adequada dos limites intercelulares. Algumas destas células (tipo I), apresentam núcleos grandes e posicionados apicalmente, sendo preenchidos por matriz nuclear escura (Fig.11).

Outras células colunares (tipo II), têm núcleos menores, posicionados basalmente e com o mesmo padrão de matriz nuclear das células do tipo I. As células do tipo II aparentemente, sofrem uma significativa invaginação do citoplasma apical, formando uma extensa área clara supranuclear que arrasta para o seu interior a borda de estereocílios apicais. Os estereocílios apicais constituem uma borda extensa e contínua no citoplasma apical, proeminando na luz tubular (Fig.11).

Junto à borda apical de estereocílios de células do tipo I observam-se estruturas vesiculares e vacuolares, com formas complexas e dimensões variadas, que aparentemente, contêm partes da fase fluida do líquido seminal. Algumas destas vesículas de menor tamanho se aproximam muito da membrana citoplasmática apical, dotada de expressiva quantidade de cavéolas, aparentando ocorrência de processo de endocitose de fase fluida. Evidências de endocitose podem ser observadas pela presença de endossomos, e estruturas subcelulares relacionadas, presentes no citoplasma supranuclear (Fig.12). Ambos os tipos de células colunares (I e II), apresentam gotículas de lipídios em posição basal e presença de grande quantidade de vesículas e vacúolos coalescentes entre si, que se estendem ao longo do citoplasma perinuclear e alcançam o citoplasma infranuclear até os limites da membrana basal (Figs.11).

O epitélio epididimário na cauda é caracterizado pela presença de expressiva quantidade de células claras, que coexistem com as células P (Fig.13), e, também presença de células escuras. O núcleo das células escuras é irregularmente denteado e preenchido por matriz nuclear escura e homogênea. O citoplasma mostra complexa reticulação e vesiculação, notando-se expansões citoplasmáticas laterais delgadas. Essas são envoltas por membrana plasmática, sendo irregularmente digitiformes; posicionam-se látero-basalmente e avançam para o citoplasma da célula P (Fig.14). As células P têm características ultraestruturais similares às descritas no SI e cabeça epididimária.

O citoplasma das células claras é preenchido por grande quantidade de vesículas e corpos multivesiculares, com conteúdo heterogêneo, notados em posições supranuclear, perinuclear e infranuclear, sendo adjacentes a lisossomos. As membranas plasmáticas entre as células adjacentes têm grande interdigitação, havendo reforços apicais por junções íntimas (Fig.13).

A borda apical das células P e claras, na cauda epididimária, é circundada por grande quantidade de estereocílios longos, que se projetam na luz tubular fazendo contato com secções de espermatozóides intraluminais (Fig.15). No citoplasma supranuclear das células claras há evidências ultraestruturais marcantes de ocorrência de endocitose de fase fluida, e provavelmente também de endocitose adsortiva, caracterizando-se cavéolas na membrana plasmática apical junto aos estereocílios, presença de vesículas e corpo multivesicular pálido, fusão de estruturas vesiculares entre si e formação de grandes corpos multivesiculares pálidos (Fig.16).

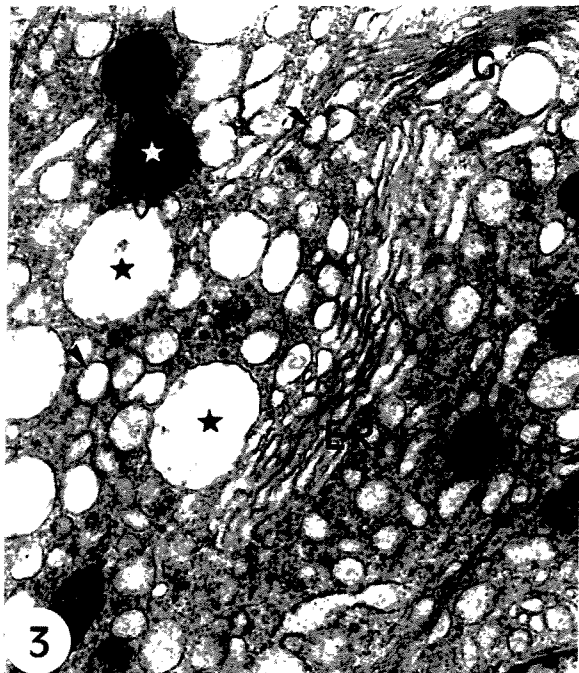
Legendas

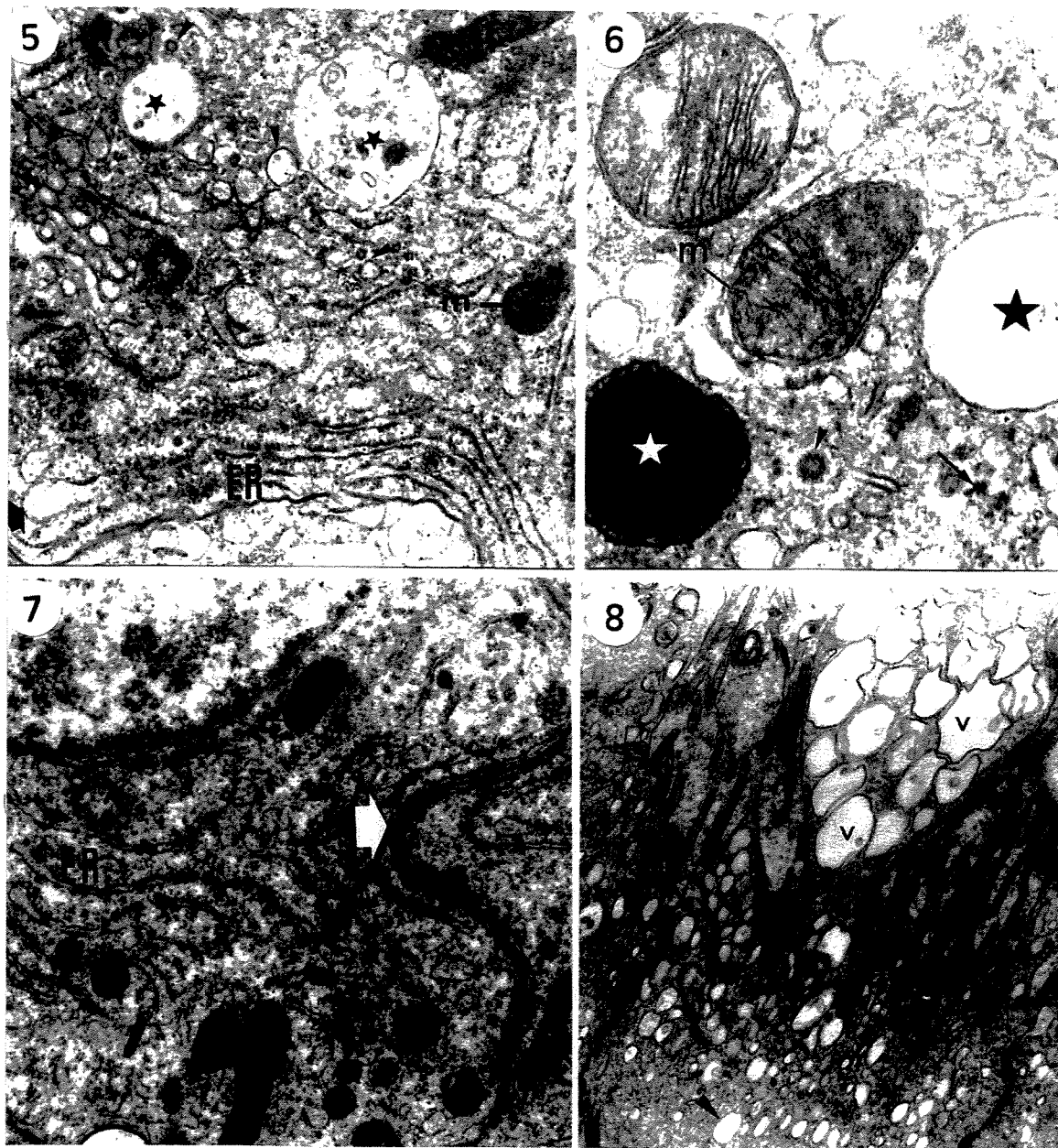
Figs.1-4: Ultraestrutura de células P do SI epididimário do gerbilo, com detalhes do citoplasma supranuclear, sendo apontadas cisternas lamelares e vesiculares dilatadas do RER (ER), mitocôndria (m) e polissomos (asterisco), em 1 (57.500x); corpos multivesiculares de conteúdo heterogêneo (estrela maior); corpo mielínico (seta espessa), em 2 (42.000x); Golgi (G), vesículas (cabeças de setas), corpos multivesiculares pálidos (estrela menor) e lisossomos (estrela branca) em 3 (23.000x). Detalhe do citoplasma infranuclear de células P, sendo indicados RER (ER) com lamelas circunferenciais (seta espessa), polissomos (seta), lisossomos (cabeças de seta), mitocôndrias (m), em 3 (17.000x).

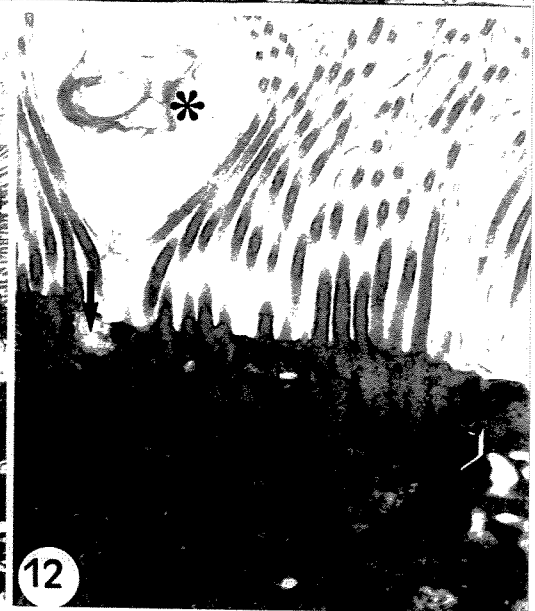
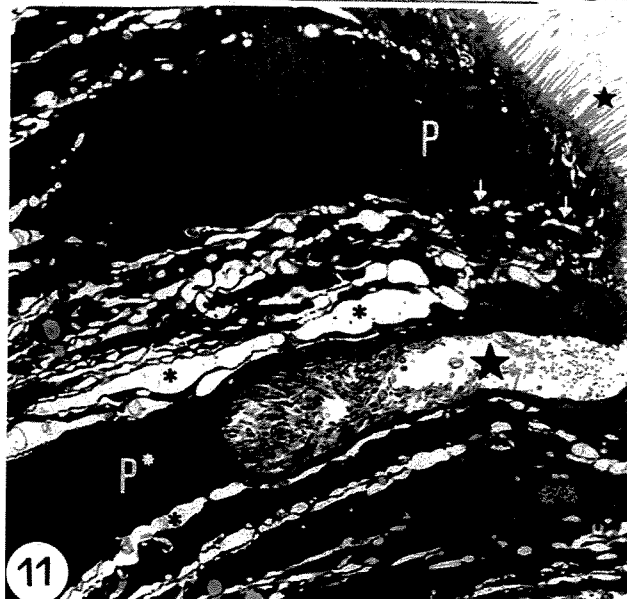
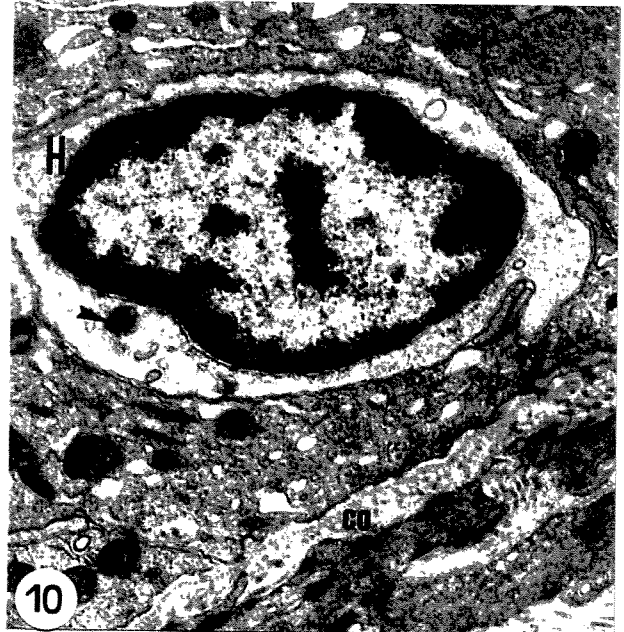
Figs.5-8: Ultraestrutura do citoplasma supranuclear de células P da cabeça epididimária, sendo apontados o RER (ER), com extremidade lamelar dilatada (seta espessa), polissomos (seta delgada), mitocôndrias (m), corpos multivesiculares denso (estrela menor) e pálido (estrela maior), vesículas variadas (cabeça de seta) e lisossomos (estrela branca), 31.500x em 5 e 57.500x em 6. Citoplasma basal de célula P, mostrando lamelas do RER (ER) e ondulação (seta espessa) da membrana plasmática de células adjacentes em 7 (23.000x). Citoplasma apical de células P evidenciando cavéolas (seta), vesículas variadas (cabeça de seta) e vacúolos intraluminais (v) em 8 (17.000x).

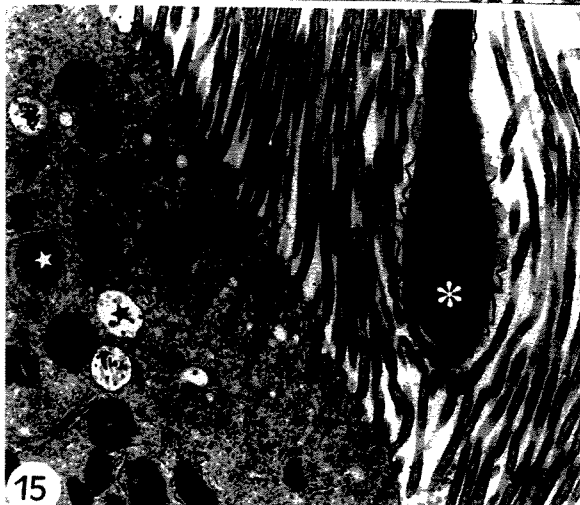
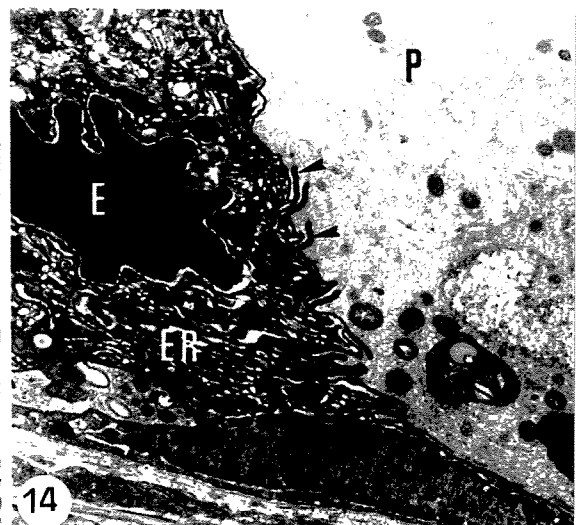
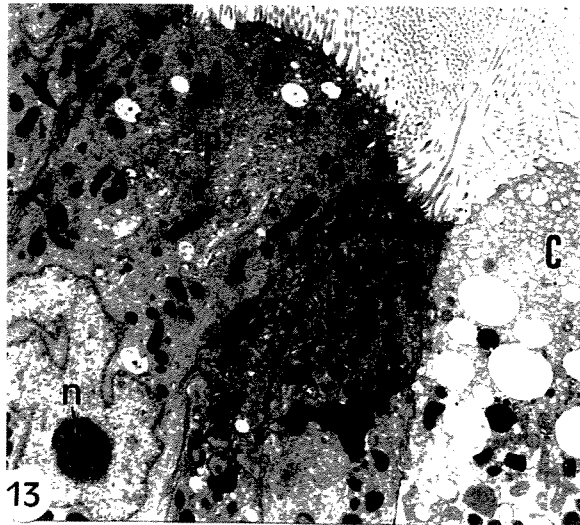
Figs.9-12: Ultraestrutura da célula basal (B), interdigitando sua membrana plasmática (seta delgada) com a membrana plasmática de uma célula principal (P) adjacente, em 9 (17.000x). Célula halo (H) subjacente à célula principal (P), sendo indicado um lisossomo (cabeça de seta), em 10 (23.000x). Ultraestrutura de células P do tipo I (P) e do tipo II (P*) do epitélio do corpo epididimário, mostrando a borda apical de estereocílios (estrela), vesículas apicais (seta branca), vesículas coalescentes no citoplasma perinuclear (asteriscos pequenos) e invaginação citoplasmática apical (estrela maior), em 11 (3.250x). Detalhes do lúmen e citoplasma apical de células P, evidenciando vacúolos (asteriscos grandes), cavéola (seta) e endossomo (seta espessa), em 12 (13.500x).

Figs.13-14: Ultraestrutura de células P da cauda epididimária do gerbilo, com nucléolo (n), interdigitação de membranas plasmáticas (seta), célula clara (C) com grande quantidade de vesículas, corpos multivesiculares e lisossomos (13, 5.750x). Célula escura (E) com retículo endoplasmático (ER), vesículas adjacentes e expansões citoplasmáticas (cabeça de seta); célula mióide sendo indicada na lâmina própria (my) (14, 9.750). Em 15 (17.000x), são apontados corpos eletrondensos (estrela branca), e corpos multivesiculares (estrela menor), vesículas (seta delgada), borda de estereocílios (estrela maior), em contato com um espermatozóide (asterisco) intraluminal. Detalhe do citoplasma apical de células claras, sendo indicadas cavéolas (seta espessa) e corpos multivesiculares pálidos (circunferência), em 16 (42.000x).









Discussão

O citoplasma supranuclear das células P do epidídimo do gerbilo foi caracterizado pelo marcante desenvolvimento do RER no segmento inicial (SI), apresentando cisternas lamelares e cisternas vesiculares. Cisternas vesiculares presentes nas células P do SI epididimário do rato, foram caracterizadas como cisternas dilatadas do RE que têm poucos ribossomos aderidos (HERMO et al., 1994), mas aparentemente teriam função similar às cisternas lamelares em termos de síntese protéica. Assim sendo, proteínas secretadas pelo RER de células epididimárias poderiam ser liberadas diretamente no lúmen epididimário (HOFFER et al., 1973), assim como há evidência de secreção protéica no epidídimo feita pela via normal de secreção (NICANDER & MALMIQVIST, 1977).

A secreção de proteínas talvez passasse diretamente através do complexo de Golgi, antes de ser liberada no lúmen tubular, mas estudos autoradiográficos, com isótopos marcados, mostraram os grãos de prata inicialmente sobre o RER e sucessivamente sobre o complexo de Golgi; superfície celular apical e lúmen tubular (FLICKINGER, 1979; 1981; HERMO et al., 1994). Aparentemente, nas células P do gerbilo, em decorrência das observações ultraestruturais aqui feitas, quanto à disposição e inter-relações do Golgi-RER, a passagem de proteínas (vesículas densas de secreção), se faz através do Golgi com exocitose na membrana citoplasmática apical.

A presença de lamelas circunferenciais e dilatadas do RER, observadas no citoplasma infranuclear de células P do SI, as quais estão associadas com mitocôndrias, polissomos adjacentes e grânulos eletrondensos presentes na estrutura lamelar, sugerem também síntese de material protéico. De modo comparativo, a ocorrência de RER circunferencial, com material eletrondenso inter-relacionado, fora caracterizada em células P do epidídimo do porco doméstico (BRIZ et al., 1993), e em células P do ducto deferente do próprio gerbilo (ORSI et al., 1999), demonstrando o seu papel na síntese e secreção de material protéico.

A presença de lisossomos, corpos multivesiculares com conteúdo variado e corpos mielínicos envoltos por endomembranas parece se relacionar às funções de absorção e de digestões autofágica e heterofágica, conforme foram descritas em outros estudos

epididimários (HAMILTON, 1975; ROBAIRE & HERMO, 1988). Os corpos mielínicos têm sido caracterizados como decorrência de processos autofágicos, heterofágicos e de origem secretora em outros tipos celulares (SANT'AGNESE & JENSEN, 1989).

As inter-relações observadas entre as lamelas do RER com o envoltório nuclear e membrana plasmática caracterizariam sítios privilegiados de translocação protéica (NISTAL et al., 1980). Além disso, as interdigitações de membranas plasmáticas laterais adjacentes sugeririam aumento de superfície de contato e de permuta de substâncias entre as células (STEFANINI et al., 1999). Notou-se junto às interdigitações, formadas entre algumas células P do SI, vesículas de transcitose, um processo também caracterizado por ROBAIRE & HERMO (1988) em células P do epidídimo do rato.

Observações ultraestruturais nas células P da cabeça epididimária do gerbilo foram similares às relatadas nas células P da mesma região do epidídimo de rato albino, correlacionando-as com atividade de secreção protéica (ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO et al., 1992; 1994). Atividade de endocitose, semelhante à descrita no rato (HERMO et al., 1994), foi observada também no citoplasma apical das células P da cabeça epididimária do gerbilo. As observações ultraestruturais descritas que suportam esta tese, sugerem um aparente predomínio do processo de endocitose de fase fluida (pinocitose), em detrimento da endocitose de material particulado (fagocitose), na cabeça epididimária do gerbilo.

A presença intraluminal de vacúolos e vesículas pálidos, dispostos entre os estereocílios apicais de algumas células, talvez significasse uma grande retenção de fluido nesta região que poderia ser removido por endocitose, ou absorção. Esta proposição é feita com base em afirmação de que a cabeça epididimária influenciaria a composição da fase fluida e do conteúdo luminal dos espermatozóides (ARRIGHI et al., 1993).

A célula apical, presente no epitélio da cabeça epididimária do gerbilo, mostrou-se ultraestruturalmente discreta, com predomínio citoplasmático de mitocôndrias e lamelas esparsas e pouco desenvolvidas do RER. Esta célula foi caracterizada no SI do epidídimo do rato (ADAMALI & HERMO, 1996), e em todas as regiões do epidídimo do cão (SCHIMMING & VICENTINI, 2001). A célula basal atuaria como um elemento de

estabilização da estrutura do epitélio epididimário (HAMILTON, 1975), tendo sido considerada também como uma possível fase de diferenciação da população celular epididimária, conforme discussão recente de BRIZ et al. (1993). A célula halo tem sido descrita como um leucócito intraepitelial, exercendo papel ativo na barreira imunológica dos ductos espermáticos (WANG & HOLSTEIN, 1983; SERRE & ROBAIRE, 1998).

O padrão celular do epitélio de revestimento do corpo epididimário do gerbilo é totalmente diferente daquele descrito para outros roedores, com ênfase no rato albino (HAMILTON, 1975; ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO et al., 1994; SERRE & ROBAIRE, 1998), tendo em vista a ocorrência de células colunares (principais) com citoplasmas e núcleos dotados de grande eletrondensidade. Ademais, dois tipos de células colunares (I e II) foram caracterizados no epitélio desta região com base na dimensão e posição nuclear. O tipo II caracterizou-se pela presença de invaginações apicais que arrastavam os estereocílios, representando absorção de grande volume de fluido intraluminal, ou ainda, poderiam representar cortes oblíquos de pregas epiteliais, semelhante às dobras encontradas no revestimento interno do estômago (fóveolas gástricas), vide YOUNG & HEATH (2001), ou na uretra peniana (PINHEIRO, et al., 2003). O citoplasma de ambos os tipos celulares mostrou abundante vesiculação e vacuolização, em todos os níveis, cujos vacúolos e vesículas assumem um padrão progressivo de coalescência, aparentando formar “corredores” para transporte de fase fluida entre o lúmen tubular e o interstício epididimário.

No epitélio da cauda epididimária do gerbilo, além das células P prevalentes em número, foram encontradas algumas células escuras e muitas células claras. As células escuras mostraram intensa osmiofilia e características ultraestruturais diferenciadas dos demais tipos celulares. Aparentemente, não correspondem às células delgadas escuras (“*narrow cells*”), caracterizadas principalmente no SI do epidídimo do rato (ROBAIRE & HERMO, 1988; SERRE & ROBAIRE, 1998), e que foram consideradas como possíveis precursoras das células claras (ADAMALI & HERMO, 1996).

As características ultraestruturais das células claras, observadas no epitélio da cauda epididimária do gerbilo, reafirmam a sua função primária de atividade endocitótica. Essa é

proporcionalmente maior do que o papel endocitótico também exercido pelas células P, conforme relatos anteriores (MOORE & BEDFORD, 1979; HERMO et al., 1994). A atividade endocitótica das células claras foi caracterizada pela presença marcante de grande quantidade de cavéolas, vesículas e vacúolos, com diferentes formas e dimensões, e corpos multivesiculares pálidos (grandes vacúolos), inicialmente observados no citoplasma apical.

Referências Bibliográficas

- ADAMALI, H.I., HERMO, L. Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J Androl.*, v. 17, p. 208-222, 1996.
- ARRIGHI, S., ROMANELLO, M.G., DOMENEGHINI, C. Ultrastructure of epididymal epithelium in *Equus caballus*. *Ann. Anat.*, v.175, p.1-9, 1993.
- BRIZ, M., BONET, S., FRADERA, A. A morphologic study of the ducts of the epididymis of *Sus domesticus*. *J. Morphol.*, v. 215, p.183-193, 1993.
- FLICKINGER, C.J. Synthesis, transport and secretion of protein in the initial segment of the mouse epididymis as studied by electron microscope radioautography. *Biol. Reprod.*, v. 20, p. 1015-1030, 1979.
- FLICKINGER, C.J. Regional differences in synthesis, intracellular transport, and secretion of protein in the mouse epididymis. *Biol. Reprod.*, v. 25, p. 871-883, 1981.
- FLICKINGER, C.J. Synthesis and secretion of glycoprotein by the epididymal epithelium. *Arch. Androl.*, v. 4, p. 157-161, 1983.

FLICKINGER, C.J. Autoradiographic analysis of the secretory pathway for glycoprotein in principal cells of the mouse epididymis exposed to H3-fucose. *Biol. Reprod.*, v. 32, p. 377-389, 1985.

FLICKINGER, C.J., HOWARDS, S.S., ENGLISH, H.P. Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. *Am. J. Anat.*, v. 15, p. 557- 586, 1978.

HAMILTON, D.W. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis, and ductus deferens in the rat. In: GREEP, R.O., ASTWOOD, E.B., eds., *Handbook of Physiology*. Sect. 7, Endocrinology, Male Reproductive System. American Physiology Society, Washington, v. 5, p. 259-301, 1975.

HERMO, L., BARIN, K., ROBAIRE, B. Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats, during postnatal development. *Anat. Rec.*, v. 233, p. 205-228, 1992.

HERMO, L., OKO, R., MORALES, C. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int. Ver. Cytol.*, v.154, p.105-19-89, 1994.

HOFFER, A.P., HAMILTON, D.W., FAWCETT, D.W. The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the unitial segment of the rat epididymis. *Anat. Rec.*, v, 175, p. 169 - 202, 1973.

LIU, H.-W., SHANG, S.-T., CHAO, C.-F., MULLER, C. The secretion of two sperm maturation-related glycoproteins in BALB/c mouse epididymis. *Cell Tiss. Res.*, v. 265, p. 409-14, 1991.

MOORE, H.D.M., BEDFORD, J.M. Androgen-dependence of rat epididymal epithelial cells: changes in ultrastructure and protein uptake following short-term castration. *Anat. Rec.*, v. 187, p. 659-660, 1979.

NICANDER, L., GLOVER, T.D. Regional histology and fine structure of the epididymal duct in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Anat.*, v. 114, p. 347 – 364, 1973.

NICANDER, L., MALMQVIST, M. Ultrastructural observations suggesting merocrine secretion in the initial segment of the mammalian epididymis. *Cell Tiss. Res.*, v. 184, p. 487-490, 1977.

NISTAL, M., PANIAGUA, R., ESPONDA, P. Development of the endoplasmic reticulum during human spermatogenesis. *Acta anat.*, v. 108, p.238-249, 1980.

ORSI, A.M., MATHEUS, S.M.M., GREGORIO, E.A., BEU, C.C.L. Morphological investigations of the surface epithelium of ductuli efferentes of black isogenic mice (*Mus musculus*). *Anat. Histol. Embryol.*, v. 27, p. 215-218, 1998.

ORSI, A.M., MATHEUS, S.M.M., STEFANINI, M.A., VICENTINI, C.A., RIBEIRO, A.A.C.M., MIGLINO, M.A. Fine structure of the lining epithelium of the ductus deferens in gerbil: a segmental study. *Braz. J. Morphol. Sci.*, São Paulo, v. 16, p. 189-195, 1999.

PINHEIRO P.F.F., ALMEIDA, C.C.D., SEGATELLI, T.M., MARTINEZ, M., PADOVANI, C.R., MARTINEZ, F.E. Ultrastructure of the urethra of the Mongolian gerbil. *World J Urol*, v.20, p.378-384, 2003.

ROBAIRE, B., HERMO, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens structure, functions, and their regulation. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, chap. 23, p. 999-1080, 1988.

SANT'AGNESE, P.A., DE MESY JENSEN, K.L. Myelinoid bodies in endocrine-paracrine (neuroendocrine, APUD) cells of the prostatourethral region. *Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 21, p. 557-564, 1989.

SERRE, V., ROBAIRE, B. Segment-specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. *Biol. Rep.*, v.58, p.497-513, 1998.

SETCHELL, B.P., MADDOCKS, S., BROOKS, D.E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press, chap. 18, p. 1063-1175, 1994.

SCHIMMING, B.C., VICENTINI, C.A. Ultrastructural features in the epididymis of the dog (*Canis familiaris*, L.). *Anat. Histol. Embryol.*, v. 30, p. 327-332, 2001.

STEFANINI, M., ORSI, A.M., GREGÓRIO, E.A., VIOTTO, M.J.S., BARALDI-ARTONI, S.M. Morphologic study of the efferent ductules of the pigeon (*Columba livia*). *J. morphol.*, v.242, p.247-255, 1999.

WANG, Y.KF., HOLSTEIN, A.F. Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human epididymis. *Cell Tissue Res*, v. 233, p. 517-521, 1983.

YOUNG, B., HEATH, J.W. *Wheather Histologia Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, cap.14, p.249-273.

CONCLUSÕES GERAIS

- O epitélio epididimário do gerbilo apresenta células principais, basais, apicais, claras, halo e escuras.
- Os resultados obtidos nos estudos de histoquímica e morfologia do epidídimo do gerbilo, sugerem que a capacitação dos espermatozóides inicialmente ocorre nos segmentos mais proximais do ducto epididimários deste roedor e se completa na cauda do epidídimo;
- O complexo sistema de endomembranas verificado nas células principais do segmento inicial, cabeça e cauda do epidídimo do gerbilo, evidencia um envolvimento destas regiões na síntese e secreção de proteínas;
- O segmento inicial epididimário está relacionado, ainda, com absorção e digestões autofágica e heterofágica;
- A cabeça epididimária é uma região de grande retenção de fluido, influenciando a composição da fase fluida e do conteúdo luminal do meio em que se encontram os espermatozóides;
- Há um aparente predomínio de endocitose de fase fluida nas células claras e principais da cauda epididimária do gerbilo. Nesta região há também estocagem de espermatozóides;
- O corpo epididimário do gerbilo mostrou-se como uma região enzimaticamente pouco ativa. Possivelmente, nesta região ocorram processos de endocitose de fase fluida e absorção passiva de fluido testicular;
- O epidídimo do gerbilo, portanto, apresenta diferenças regionais marcantes que podem ser consideradas espécie-específicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C.S. Localization of alkaline phosphatase and NADH Diaphorase in the principal cells of guinea pig epididymis. *Acta Anatomica*, v.116, p.146-151, 1983.
- BENOIT, J. Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule, chez les mammifères. *Arch. Anat. Micr.*, v. 5, p. 173 – 412, 1926.
- BROWN, D.; SMITH, P. J.S.; BRETON, S. Role of V-ATPase-rich cells in acidification of the male reproductive tract. *Journal of Experimental Biology*, v.200, p.257-262, 1997.
- COOPER, T.G., YEUNG, C.H., BERGMANN, M. Protein transport to the epididymal lumen. *Cell Tiss. Res.*, v. 248, p. 527-530, 1987.
- DE DUVE, C. *Lysosomes*. In: DE REUCK, A.V.S., CAMERON, M.P. J. (eds.), London, Churchill, p. 1, 1963.
- DYM, M., ROMRELL, L.J. Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. *J. Reprod. Fertil.*, v. 42, p. 1-7, 1975.
- FLICKINGER, C.J. Synthesis and secretion of glycoprotein by the epididymal epithelium. *Arch. Androl.*, v. 4, p. 157-161, 1983.
- FLICKINGER, C.J. Autoradiographic analysis of the secretory pathway for glycoprotein in principal cells of the mouse epididymis exposed to H3-fucose. *Biol. Reprod.*, v. 32, p. 377-389, 1985.

FLICKINGER, C.J., HOWARDS, S.S., ENGLISH, H.P. Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. *Am. J. Anat.*, v. 15, p. 557- 586, 1978.

FOUQUETT, J.P.; GUHA, S. Histochemical studies on the enzymes of glycogen metabolism in hamster epididymis. *Histochemie*, v.17, p.89-98, 1969.

GLOVER, T.D., NICANDER, L. Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl., v. 13, p. 39 - 50, 1971.

HAMILTON, D.W. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis, and ductus deferens in the rat. In: GREEP, R.O., ASTWOOD, E.B., eds., *Handbook of Physiology*. Sect. 7, Endocrinology, Male Reproductive System. American Physiology Society, Washington, v. 5, p. 259-301, 1975.

HARKNESS, J.I., WAGNER, J.H. *Biologia e clínica de coelho e roedores*. Roca, São Paulo, 1993, cap. 2, p. 35-40.

HERMO, L., BARIN, K., ROBAIRE, B. Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats, during postnatal development. *Anat. Rec.*, v. 233, p. 205-228, 1992.

HERMO, L., DWORKIN, J., OKO, R. The role of the epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am. J. Anat.*, v.183, p.107-124, 1988.

HERMO, L., OKO, R., MORALES, C. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int. Ver. Cytol.*, v.154, p.105-19-89, 1994.

HINTON, B.T., PALLADINO, M.A. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc. Res. Tech.*, v.30, p.67-81, 1995.

HOFFER, A.P., HAMILTON, D.W., FAWCETT, D.W. The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. *Anat. Rec.*, v, 175, p. 169 - 202, 1973.

HOLT, W.V.; JONES, R.C.; SKINNER, J.D. Studies of the deferent ducts from the testis of the African elephant, *Loxodonta africana*. histochemistry of the epididymis. *Journal of Anatomy*, v. 130, p. 367-379, 1980.

LIU, H.-W., SHANG, S.-T., CHAO, C.-F., MULLER, C. The secretion of two sperm maturation-related glycoproteins in BALB/c mouse epididymis. *Cell Tiss. Res.*, v. 265, p. 409-14, 1991.

LUDERS, G. Zur struktur und bedeutung der epithelien menschlichen ducts epididymidis. *Urologe A.*, v.15, p.192-196, 1976.

MARTAN, J. Epididymal histochemistry and physiology. *Biol. Reprod.*, Suppl., v. 1, 134-154, 1969.

MARTAN, J., RISLEY, P.L. Holocrine secretory cells of the rat epididymis. *Anat. Rec.*, v. 146, p. 173, 1963.

MARTINEZ-GARCÍA, F., REGADERA, J., COBO, P., PALACIOS, J., PANIAGUA, R., NISTAL, M. The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia*, v. 27, p. 195-206, 1995.

- MONIEM, K.A. Comparative histochemical localization of some hydrolytic enzymes in mammalian epididymides. *Acta Anatomica*, v.108, p.301-309, 1980.
- MONIEM, K.A., GLOVER, T.D. Alkaline phosphatase in the cytoplasmatic droplet of mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v. 29, p. 65 - 69, 1972.
- MOORE, H. D. M. An assessment of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Int. J. Androl.*, v.4, p.321-330, 1981.
- MOORE, H.D.M., BEDFORD, J.M. Androgen-dependence of rat epididymal epithelial cells: changes in ultrastructure and protein uptake following short-term castration. *Anat. Rec.*, v. 187, p. 659-660, 1979.
- NASHAN, D., MALORNY, U., SORG, C., COOPER, T., NIESCHLAG, E. Immunocompetent cells in the murine epididymis. *Int. J. Androl.*, v. 12, p. 85-94, 1989.
- NICANDER, L. An electron microscopical study of absorbing dells in the posterior caput epididymis of rabbits. *Zeitschrift Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, v. 66, p. 829 – 847, 1965.
- NICANDER, L., GLOVER, T.D. Regional histology and fine structure of the epididymal duct in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Anat.*, v. 114, p. 347 – 364, 1973.
- NICANDER, L., MALMQVIST, M. Ultrastructural observations suggesting merocrine secretion in the initial segment of the mammalian epididymis. *Cell Tiss. Res.*, v. 184, p. 487-490, 1977.
- NINOMIYA, H., NAKAMURA, T. Postnatal development of the testis in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Exp. Anim.*, v. 36, p. 65-72, 1987.

ORGBIN-CRIST, M.C., OLSON, G.E. Epididymal sperm maturation. In : *The Male in Farm Animal Reproduction*, p.80-102, 1984.

ORSI, A.M., MATHEUS, S.M.M., GREGORIO, E.A., BEU, C.C.L. Morphological investigations of the surface epithelium of ductuli efferentes of black isogenic mice (*Mus musculus*). *Anat. Histol. Embryol.*, v. 27, p. 215-218, 1998.

ORSI, A.M., MATHEUS, S.M.M., STEFANINI, M.A., VICENTINI, C.A., RIBEIRO, A.A.C.M., MIGLINO, M.A. Fine structure of the lining epithelium of the ductus deferens in gerbil: a segmental study. *Braz. J. Morphol. Sci.*, São Paulo, v. 16, p. 189-195, 1999.

ORSI, A.M., STEFANINI, M.A., BEU, C.C.L., DUARTE, H.E., MATHEUS, S.M.M. Algumas observações histoquímicas no ducto deferente do gerbilo (*Meriones unguiculatus*). *Biotemas*, Florianópolis, v. 13, p. 89-101, 2000.

RICH, S.T. The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) in research. *Lab. Anim. Care*, v. 18, p. 235-242, 1968.

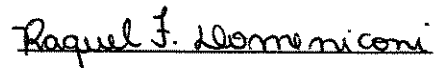
ROBAIRE, B., HERMO, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens structure, functions, and their regulation. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988. chap. 23, p. 999-1080.

SEGATELLI, T.M., ALMEIDA, C.C.D., PINHEIRO, P.F.F., MARTINEZ, M., PADOVANI, C.R., MARTINEZ, F.E. Kinetics of spermatogenesis in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tissue Cell*, v.34, p.7-13, 2002.

SEGATELLI, T.M., ALMEIDA, C.C.D., PINHEIRO, P.F.F., MARTINEZ, M., PADOVANI, C.R., MARTINEZ, F.E. Ultrastructural study of acrosome formation in mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tissue Cell*, v.32, p.508-517, 2000.

- SERRE, V., ROBAIRE, B. Segment-specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. *Biol. Rep.*, v.58, p.497-513, 1998.
- SETCHELL, B.P., MADDOCKS, S., BROOKS, D.E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1994. chap. 18, p. 1063-1175.
- SHARMA, S.K., RAMKRISHNA, V., TIWARI, G.P., CHAUHAN, R.A.S. Histomorphoenzymic studies on the epididymis and its content in goat. *Indian J. anim. Sci.*, v.56, p.849-53, 1986.
- VIOTTO, M.J.S., ORSI, A.M., DAL-PAI, V. Localização histoquímica da NADH-diaforase e succinato-desidrogenase no epidídimo do gato (*Felis domestica*, L.). *Ciência e Cultura*, v.38, p.2025-2027, 1986.
- VIOTTO, M.J.S., ORSI, A.M., GREGÓRIO, E.A. Ultrastructural characteristics of epididymal epithelium of the cat (*Felis domestica*, L.). *Braz. J. morphol. Sci.*, v. 13, p. 51-58, 1996.
- WANG, Y.P., HOLSTEIN, A.F. Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human epididymis. *Cell Tiss. Res.*, v. 233, p. 517-521, 1983.
- YEUNG, C.H., NASHAN, D., SORG, C., OBERPENNING, F., SCHULZE, H., NIESCHLAG, E., COOPER, T.G. Basal cells of the human epididymis – Antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol. Reprod.*, v.50, p.917-926, 1994.

Campinas, 06 de agosto de 2004.


Raquel Fantin Domeniconi


Antônio Marcos Orsi