

HISTOMORFOMETRIA DE TESTÍCULOS DE GATOS (*Felis domestica*) UTILIZANDO-SE TRÊS DIFERENTES FIXADORES

HISTOMORPHOMETRY OF CAT (*Felis domestica*) TESTIS USING THREE DIFERENT FIXATIVE SOLUTIONS

Jaqueline Melo SOARES¹; Marcelo Emílio BELETTI²; Evandro dos Reis MACHADO³; Marcos SILVA²

RESUMO: Sendo o gato doméstico (*Felis domestica*) um animal de companhia e base de estudos para outras espécies de felídeos selvagens, é interessante que saibamos mais sobre alguns aspectos, de sua morfologia, tal como a, reprodutiva. A caracterização histomorfométrica de qualquer órgão ou tecido deve ser feita em lâminas com o mínimo de artefatos criados durante o processamento histológico. No presente trabalho foi avaliada a eficiência de três diferentes fixadores (formol, solução de Davis e de Bouin) na preservação de testículos de gatos, bem como sua influência sobre os seguintes parâmetros histomorfométricos: altura do epitélio germinativo, diâmetro dos túbulos seminíferos e proporção volumétrica entre os compartimentos tubulares e intertubulares. Com o uso de solução de Bouin e de Davis, os túbulos seminíferos de gatos, adultos e sem raça definida tem uma proporção volumétrica de aproximadamente 80%, diâmetro em torno de 150 µm e a altura do epitélio germinativo em torno de 56 µm. De acordo com os resultados obtidos, o formol não é indicado como fixador para estudos histomorfométricos de testículo de felinos, por provocar artefatos que influenciam na morfologia do órgão.

UNITERMOS: Gatos; Histomorfometria; Testículo; Fixadores.

INTRODUÇÃO

Quando buscamos na literatura pesquisas sobre a reprodução dos gatos, percebemos a necessidade de estudos nessa área, principalmente quando comparados a outros animais domésticos e de laboratório (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Não há razão para essa escassez de dados, partindo do contingente de animais desta espécie que servem como companhia, animais de estimação e, também, de laboratório, utilizados em pesquisas experimentais para cerca de quarenta anormalidades fisiológicas do homem, como problemas imunológicos, toxicológicos, metabólicos e oncológicos, dentre outros (WILDT et al., 1986).

O gato doméstico é, ainda utilizado para estudos comparativos com outras espécies de felídeos (WILDT et al., 1986), como as trinta e seis espécies ameaçadas ou em processo de extinção (GODINHO, 1999). Estes

fatos reforçam ainda mais a necessidade de pesquisas a respeito da morfologia dos testículos de felinos.

O testículo apresenta estrutura similar para várias espécies de mamíferos, variando, em geral, a proporção volumétrica de seus componentes. Sendo um órgão de funções endócrinas e exócrinas, tem como estrutura uma cápsula conjuntiva que o envolve e envia septos para o seu interior, formando lóbulos. Estes são divididos em compartimentos tubulares e intertubulares. O primeiro é constituído pelos túbulos seminíferos, com suas células germinativas e de Sertoli, onde são produzidos os espermatozoides e fluidos. Já o segundo é constituído por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, tecido conjuntivo e células de Leydig, produtoras de andrógenos (BANKS, 1992).

Fawcett, Neaves e Flores (1973), descrevem que o arranjo e a proporção dos elementos constituintes do espaço intertubular, nas diferentes espécies de mamíferos

¹ Pós-Graduanda do Curso de Ciências Veterinárias da UFU.

² Professor Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720, Campus Umuarama, CEP: 38.405.320. E-mail: mebeletti@ufu.br

³ Graduando da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Received: 21/09/04

Accepted: 12/02/05

investigadas até o presente momento, seguem em geral, três padrões distintos: I – espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam uma área muito pequena no compartimento intertubular, contrastando com extensos sinusóides linfáticos (ex: rato, camundongo, hamster, “guinea pig”, e chinchila); II – espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhados em abundante tecido conjuntivo frouxo, drenado por vasos linfáticos localizados central ou excêntrica no espaço intertubular (ex: bovino, ovino, macaco e homem); III – espécies nas quais abundantes agrupamentos de células de Leydig ocupam praticamente todo o compartimento intertubular, restando muito pouco tecido conjuntivo e linfático (ex: suíno e zebra). Os mesmos autores especulam que a quantidade de células de Leydig, e a disposição de vasos linfáticos nos mamíferos está, provavelmente relacionada à habilidade dos linfáticos de mover para fora dos testículos materiais vascularmente secretados e manter concentrações adequadas de andrógenos no testículo e nos vasos sanguíneos. Estudos, correlacionados à estrutura e à função das células de Leydig em várias espécies de mamíferos, mostraram que variações na secreção de testosterona resultam mais da variação da capacidade individual desta célula em secretar testosterona do que de diferenças do volume total das mesmas no testículo (EWING *et al.*, 1979). Esta capacidade está altamente correlacionada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig. De acordo com alguns autores (FAWCET; NEAVES; FLORE, 1973; RUSSELL; BRINSTER, 1996), a maior quantidade de células de Leydig em algumas espécies pode estar relacionada com a síntese de outros esteróides que não a testosterona.

Para se avaliar a produção espermática, vários métodos tem sido utilizados, dentre os quais podem ser citados aqueles que se baseiam na histologia quantitativa e morfometria (FRANÇA, 1991). A caracterização histomorfométrica de qualquer órgão ou tecido deve ser feita em lâminas com o mínimo de artefatos criados durante o processamento histológico. Contudo, as técnicas histológicas sempre geram artefatos que interferem na histomorfometria, sendo necessário o uso de técnicas que minimizem estes artefatos (FRANÇA; RUSSEL, 1998; FRRANÇA *et al.*, 1998). Tendo como base os dados apresentados acima, esse trabalho tem como objetivo testar três diferentes fixadores, avaliando-se a eficiência de cada um na preservação da estrutura testicular e sua influência na morfometria do testículo do gato doméstico, considerando para tal a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos, o diâmetro destes túbulos e a altura do epitélio germinativo.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 5 gatos sexualmente maduros, sem raça definida, com peso aproximado de 3,5 Kg. Esses animais foram castrados durante campanha de controle de natalidade felina realizada pela Sociedade Protetora dos Animais do município de Uberlândia. Após a castração dos animais, os testículos foram seccionados em cortes de aproximadamente 3mm de espessura e fixados em três tipos diferentes de fixadores: solução de Bouin, de Davis e Formol a 10%. Após fixação, o material foi desidratado em álcool etílico e diafanizado em xilol, para inclusão em parafina. Depois de incluídos, foram feitos cortes semi-finos deste material, com aproximadamente 5 µm de espessura, os quais foram corados em H.E. (hematoxilina-eosina) e Tricrômio de Gomory, para serem observados e documentados.

Foram analisadas imagens digitalizadas obtidas em microscópio Olympus Triocular BH2, com objetiva de 4X, acoplado a câmera JVC TK-1085U, ligada a um computador PC por meio de placa digitalizadora Data Translation 3153. Utilizando o programa HL Image 97⁺⁺ foram mensurados a altura do epitélio germinativo e o diâmetro e a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos de seis diferentes lâminas de cada animal, sendo avaliadas cinco imagens de cada lâmina.

Para se verificar se a distribuição dos dados foi normal usou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Uma vez confirmada a distribuição normal utilizou-se o teste de Fisher ($\alpha=0,05$) para verificar diferenças entre médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O testículo de mamífero em termos funcionais, pode ser dividido em dois compartimentos: o tubular ou espermatogênico e o intertubular ou androgênico (Figura 03). A proporção entre estes compartimentos é bastante variável, sendo um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada na eficiência da produção espermática nas diversas espécies (RUSSELL *et al.* 1990; FRANÇA; RUSSELL, 1998). Nos gatos analisados, as proporções volumétricas variaram de acordo com o fixador utilizado (Tab.1). As proporções volumétricas tubulares encontradas quando utilizados líquidos de Bouin e de Davis ($80,7 \pm 4,3\%$ e $83,2 \pm 3,9\%$, respectivamente) não diferiram significativamente. Contudo, quando utilizada a solução de formol, a proporção volumétrica tubular ($72,3 \pm 2,0\%$) foi significativamente menor. Esta diferença é devido à má fixação promovida pelo formol, vista nos cortes histológicos como espaços vazios entre os tubos seminíferos. Isto demonstra que o uso do formol como

fixador para estudos histomorfométricos de testículos de gato é desaconselhado. Assim, considerando somente as medidas realizadas com solução de Bouin e de Davis, a proporção volumétrica tubular em gatos sem raça definida foi de 82% e a proporção ocupada pelo compartimento intertubular foi de 18%. Em capivaras e ratos, o compartimento intertubular ocupa em torno de 50% (FRANÇA *et al.*, 1998) e 10% (RUSSELL; FRANÇA, 1995; ROCHA; DEBELJUK; FRANÇA, 1999) do parênquima testicular, respectivamente. Nos mamíferos domésticos, o percentual ocupado pelo espaço intertubular pode variar de pouco mais de 10% no cão a quase 40% no camelo (FRANÇA; RUSSELL, 1998). No entanto, para as demais espécies de mamíferos domésticos investigados estes valores situam-se normalmente entre 15 a 25%. O compartimento tubular é o principal componente do testículo na grande maioria dos mamíferos, exercendo grande influência sobre o peso testicular e sobre a produção espermática (AMANN, 1970). O percentual citado na literatura para túbulo seminífero em mamíferos pode variar de cerca de 30% (marmota) até aproximadamente 90% (hamster dourado) (RUSSELL *et al.*, 1990). À semelhança do observado para o compartimento intertubular, grande variação no percentual de túbulos seminíferos é encontrada nas diferentes

espécies (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Nos mamíferos domésticos, com exceção do camelo e do equino, o percentual ocupado pelos túbulos seminíferos no parênquima testicular situa-se de maneira geral entre 75 e 85% (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Portanto, os valores obtidos estão de acordo com a literatura.

Como descrito na tabela 1, o diâmetro dos túbulos seminíferos (Figura 02) de gatos adultos está em torno de 150 μm para o material fixado com solução de Bouin e de Davis (Tabela 01). Já o material fixado com solução de formol mais uma vez foi diferente, sendo em torno de 180 μm . Segundo Paula (1999), o diâmetro tubular permanece relativamente constante em animais sexualmente maduros, não sazonais. No entanto, o mesmo pode apresentar variações expressivas nas diversas espécies e entre diferentes linhagens ou raças (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Embora, o valor citado para o diâmetro tubular médio possa chegar a 550 μm em algumas espécies de marsupiais (WOOLLEY, 1975), o valor tipicamente observado para a maioria dos amniotas varia de 180 a 300 μm (ROOSEN-RUNGE, 1977). O presente trabalho demonstrou que apesar da proporção volumétrica tubular ser semelhante a de outras espécies, o gato possui túbulos seminíferos delgados.

Tabela 1. Médias e desvio padrão das mensurações histomorfométricas de testículo de gato de acordo com o fixador utilizado no processamento histológico

	Solução de Bouin	Solução de Davis	Solução de Formol
Proporção volumétrica tubular (%)	80,7 ^a ±4,3	83,2 ^a ±3,9	72,3 ^b ±2,0
Diâmetro tubular (μm)	148,4 ^a ±39,7	150,6 ^a ±37,9	180,4 ^b ±38,5
Altura do epitélio (μm)	56,4 ^a ±25,8	56,8 ^a ±14,7	65,8 ^b ±16,6

Letras diferentes numa mesma linha indicam médias diferentes ($\alpha = 0,05$)

Já a altura média do epitélio germinativo dos gatos foi em torno de 56 μm (Figura 02) para solução de Bouin e de Davis e de 65 μm quando utilizada a solução de formol. França e Russell (1998), relatam uma amplitude de 60 a 100 μm nos estudos realizados em animais domésticos. Novamente existiu diferença significativa entre o material fixado em solução de Bouin e de Davis comparado com a solução de Formol (Figura 01). A maior altura do epitélio germinativo, quando utilizado o formol, é explicada pela retração testicular, que diminui a luz dos túbulos seminíferos, aumentando a altura do epitélio germinativo em relação ao tecido normal.

Segundo França e Russel (1998), a retração linear na inclusão de tecidos fica em torno de 15% quando os testículos são incluídos em parafina e de 3 a 5% (Figura 01) quando esse material é incluído em resina plástica. No presente trabalho ficou demonstrado que o tipo de fixador também influencia na retração do material histológico.

É oportuno salientar que foram observados sinais de leve degeneração testicular em todos os animais estudados. Os gatos utilizados foram provenientes de ambiente onde o contato era constante com animais da mesma espécie, sendo todos de origem desconhecida e

sofrendo com a presença de parasitas e outros patógenos. Estas condições seriam fatores de estresse, culminando com a na presença de grupamentos de células

germinativas no interior dos túbulos seminíferos e com a estrutura alterada, sugerindo degeneração testicular (Figura 02) (BELETTI, 1998).

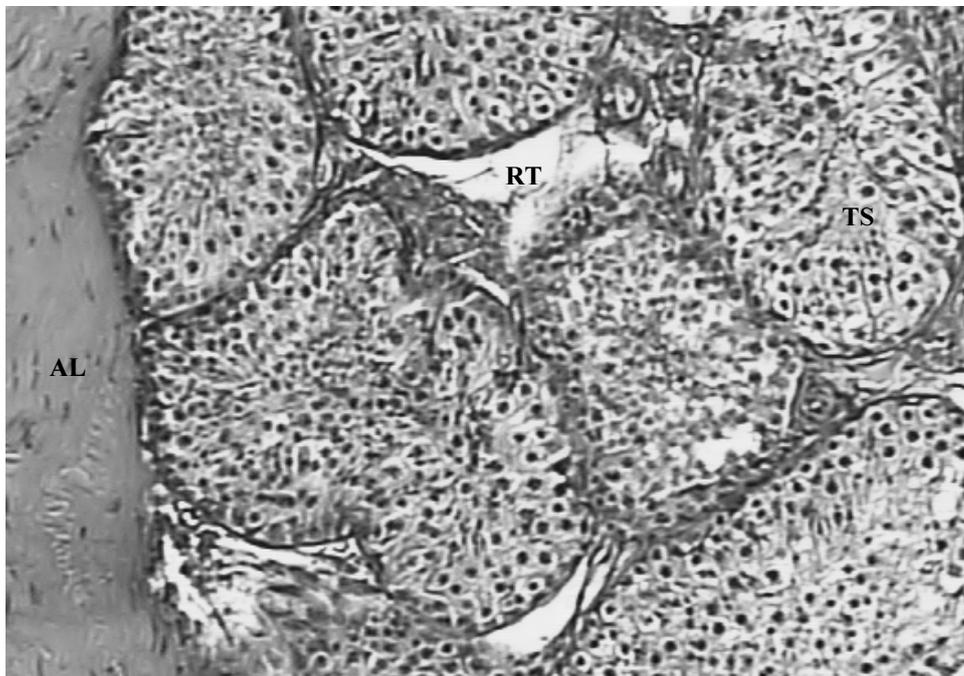


Figura 1. Testículo de gato doméstico, fixado com solução de formol e corado com H.E. Túnica albugínea (AL), túbulos seminíferos (TS) e retração testicular (RT). Aumento total 80X.

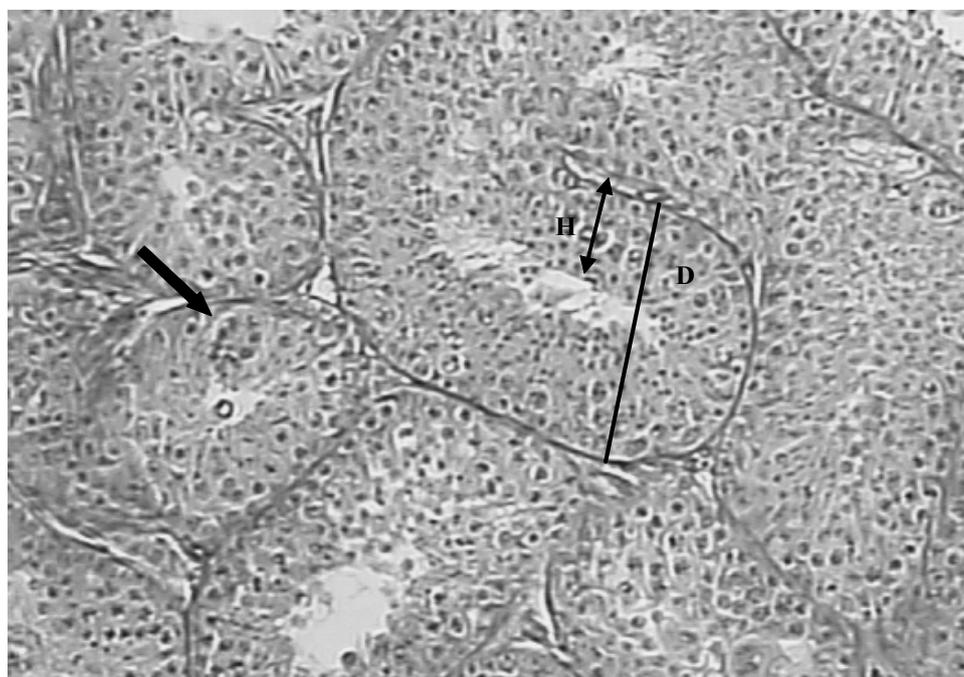


Figura 2. Testículo de gato doméstico, fixado com líquido de Davis e corado com H.E. Seta indicando presença de grupamento de células germinativas, indicativo de degeneração testicular; altura (H) e diâmetro (D) do epitélio seminífero. Aumento total 80X.

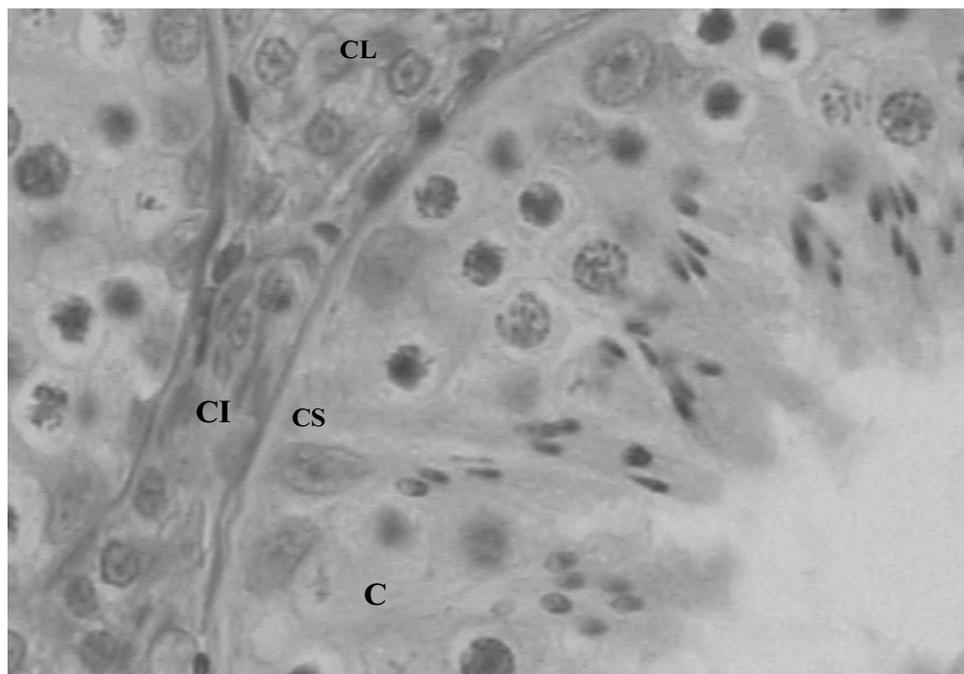


Figura 3. Testículo de gato doméstico, fixado co solução de Bouin e corado com H.E. Células de Leydig (CL), células de Sertoli (CS), compartimento tubular (CT) e compartimento intertubular (CI). Aumento total 320X.

CONCLUSÕES

A solução de formol pode ser utilizada com restrições como fixadora em estudos histomorfométricos de testículos de gatos.

As soluções de Bouin e de Davis são mais adequa-

das para análise histomorfométricas de testículo de gatos.

A proporção volumétrica dos túbulos seminíferos em testículos de gatos adultos sem raça definida está em torno de 80% do total, sendo que o diâmetro destes túbulos está em torno de 150 μm e a altura do epitélio germinativo em torno de 56 μm .

ABSTRACT: As the domestic cat (*Felis domestica*) is a company animal and basic species for the study of other wild felids, a better knowledge on its reproductive morphology becomes a very interesting and suitable matter. The histomorphometric characterization of any organ or tissue should be made in slides presenting the least possible of artifacts during the histological processing. In the present work the efficiency of three different fixative solutions (formol, Davis and Bouin) on the preservation of cat testis tissues as well as its influence on the some histomorphometric parameters, such as the height of germ epithelium, the diameter of seminiferous tubules, and the volumetric proportion between the tubular and intertubular compartments were evaluated. By using Bouin and Davis solutions, the seminiferous tubules of male, adult, crossbred cats showed a volumetric proportion of approximately 80%, diameter around 150 μm , and height of the germ epithelium around 56 μm . Based on the obtained results, the formol is not indicated as fixative solution for histomorphometric studies of cat testis, because it causes artifacts that influence the morphology of the organ.

UNITERMS: Cats; Histomorphometry; Testis; Fixative solutions.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R. P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (Ed). **The testis**. New York: Academic, 1970, v. 1, cap. 7, p. 433-482.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.

BELETTI, M. E. **Influência da elevação da temperatura testicular sobre o complexo DNA-proteína e outras características de espermatozóides de coelho (*Oryctolagus cuniculus*)**. 126 f. Tese (Doutorado em Morfologia) - Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

EWING, L. L.; ZIRKIN, B. R.; COCHRAN, R. C.; KROMANN, N.; PETERS, C.; RUIZ-BRAVO, N. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. **Endocrinology**, Baltimore, v 105, n 5, p 1135-1142, Nov., 1979.

FAWCET, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M. N. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 9, n. 5, p. 500-532, Dec., 1973.

FRANÇA, L. R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências – Morfologia). Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1991.

FRANÇA, L. R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L.; RUSSEL, L. D. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 59, n. 6, p. 1371-1377, 1998.

FRANÇA, L. R., RUSSEL, L. D. The testis of domestic animals. In: MARTÍNEZ, F.; REGADERA, J. (Ed.). **Male Reproduction**. Madrid: Churchill Livingstone, 1998, v. 1, p. 197-219.

GODINHO, CL. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

PAULA, T. A. R. **Avaliações histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**. 84 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

ROCHA, D. C. M.; DEBELJUK, L.; FRANÇA, L. R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult wistar rats. **Tissue and Cell**, Essex e/ou Longman, v. 31, n. 3, p. 197-219, Jun., 1999.

RUSSELL, L. D.; BRINSTER, R. L. Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. **Journal Andrology**, Philadelphia, v. 17, n. 6, p. 615-627, Dec., 1996.

RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. Building a testis. **Tissue and Cell**, Essex e/ou Longman, v. 27, n. 2, p. 129-147, Apr., 1995.

RUSSELL, L. D.; REN, H. P.; SINHA-HIKIM, I.; SCHULZE, W.; SINHA-HIKIM, A. P. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. **American Journal Anatomy**, Philadelphia, v. 188, n. 1, p. 21-30, May, 1990.

WILDT, D. E.; SCHIEWE, M. C.; SCHMIDT, P. M.; GOODDROWE, K. L.; HOWARD, J. G.; O'BRIEN, S. J.; BUSH, M. Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wildlife. **Theriogenology**, Los Altos, v. 25, n.1 , p. 33-51, Jan., 1986.

WOOLEY, P. The seminiferous tubules in dasyurid marsupialis. **Journal Reproduction Fertility**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 255-261, Oct., 1975.