

OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS NO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO DA REDE TESTICULAR (RT) DE CODORNA (*Coturnix coturnix*) DA VARIEDADE ITALIANA

MORPHOLOGICAL FEATURES ON THE SURFACE EPITHELIUM OF THE RETE TESTIS (RT) OF QUAIL (*Coturnix coturnix*) FROM THE ITALIAN VARIETY

Antonio Marcos ORSI^{1,2}; Raquel Fantin DOMINICONI³; Domingos Donizeti ROQUE²; Claudinei da CRUZ⁴

1. Professor, Doutor, Departamento de Anatomia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP, Brasil. amorsi@ibb.unesp.br; 2. Professor, Doutor, Setor de Morfofisiologia Humana, Universidade de Marília, Marília, SP, Brasil; 3. Professora, Doutora, Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina de Marília, Marília, SP, Brasil; 4. Bolsista, ao nível de Pós-doutoramento da Área de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil

RESUMO: A rede testicular (RT) de codorna é predominantemente do tipo intra-albugínica e constituída por canais tortuosos, revestidos por células epiteliais, estendendo-se pela túnica albugínea do testículo e a seguir penetram na estrutura microscópica da região epididimária (RE), pelo seu tecido matricial. Os canais da RT são contínuos com os ductos eferentes proximais da RE. A ultraestrutura do epitélio de revestimento da RT mostra diferenças marcantes na primavera - a fase proliferativa do ciclo reprodutivo, e em meados do outono - a fase quiescente do ciclo reprodutivo nesta ave. As características ultraestruturais marcantes dos epitelíócitos da RT, nestas duas fases, foram a baixa eletrodensidade citoplasmática e ocorrência de poucas vesículas e lisossomos no outono, que aparecem com maior frequência na RT primaveril. Aspectos degenerativos de organelas, e presença de extrusões citoplasmáticas apicais, apareceram em número expressivo no outono, não se observando aspectos ultraestruturais marcantes nas estações de inverno e verão, relativamente às observações de primavera.

PALAVRAS-CHAVE: Rede testicular. Epitélio de revestimento. Morfologia. Histofisiologia. Codorna.

INTRODUÇÃO

A rede testicular (RT), de aves é formada por uma porção intratesticular, também nomeada como túbulos retos do testículo; uma rede intra-albugínica que consiste de câmaras, ou canais, epiteliais inter-anastomóticos, e uma rede extratesticular disposta externamente à túnica albugínea. Essa é perpassada pelas passagens epiteliais da RT, formando-se predominantemente canais longitudinais com um número médio de vinte, em aves ratitas (BUDRAS; MEIER, 1981). De modo geral, a rede extratesticular de aves se seguem os ductos eferentes proximais, aos quais se seguem, seqüencialmente, os ductos eferentes distais; ducto epididimal e ducto deferente (BUDRAS; SAUER, 1975; BUDRAS; MEYER, 1981; STEFANINI; ORSI, 1999; STEFANINI et al., 1999a).

Embora a estrutura histológica da rede testicular (RT) de codorna da variedade japonesa e da galinha de angola fosse conhecida (AIRE, 1979a), pouco se conhecia, até então, sobre a extensão microtopográfica da RT de aves (AIRE, 1982). Assim, tendo em vista estudos micro-estereológicos do próprio autor (AIRE, 1979b), a RT de aves, predominantemente em seu segmento extra-albugínico, parece formar uma expressiva

proporção volumétrica na região epididimária. As características ultraestruturais do epitélio da RT de aves, mostraram as suas células aparentemente mais ativas, principalmente no galo, do que nos mamíferos (TINGARI, 1972). Contudo, nenhuma característica ultraestrutural da RT de aves tem provido evidência conclusiva sobre o papel secretório dos seus epitelíócitos de revestimento tubular (AIRE, 1982).

Aire (1982) também considerou que embora a RT de aves garanta a produção de mais ou menos 65% do fluido seminal, não se saberia até então se o processo seria por transporte passivo ou por mecanismo de secreção ativa. Com base em estudos realizados, Hermo et al. (1994) consideraram a ocorrência de endocitose adsorptiva e mecanismos de balanceamento de fase fluida, do líquido intratubular, nas células da RT de mamíferos. Assim, se observou uma internalização de traçadores adsorptivos, carregados pelas vesículas pequenas e não revestidas, em direção à membrana plasmática lateral de células da RT (MORALES et al., 1984). Ademais, se verificou endocitose de transferrina e de outras proteínas nas células epiteliais da RT de mamíferos (HERMO et al., 1994).

Em vista destas informações, considerou-se neste estudo analisar características histológicas e

ultraestruturais da RT de codorna (*Coturnix coturnix*) da variedade italiana, enfocadas sob aspectos sazonais do ciclo reprodutivo anual, antes descrito nesta ave (ORSI et al., 2005), discutindo-se considerações gerais sobre a histofisiologia da RT de codorna, com base principalmente nos achados de microscopia eletrônica de transmissão de seu segmento extratesticular.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e quatro codornas (*Coturnix coturnix*) da variedade italiana (codornas, “italiana”), machos e sexualmente maduras, ficaram confinadas em criatório de pesquisa, junto à Fazenda de Experimentação Biológica “Edgardia”, da UNESP em Botucatu, durante um ano. Permaneceram no cativeiro experimental recebendo dieta sólida normal para aves (PurinaTM, Brasil) e água, administradas “*ad libitum*”, e sob condições de iluminação predominantemente natural. Assim sendo, foram submetidas a aproximadamente 12 horas de claro e 12 horas de escuro, permanecendo em gaiolas vazadas de criatório, separadas, porém próximas, de plantéis similares de fêmeas da mesma espécie e variedade, igualmente confinadas. Portanto, as aves de ambos os sexos ficaram em contato visual e sonoro, neste período, porém sem ocorrência de acasalamento.

Posteriormente, no decorrer do ano seguinte, os machos foram transportados em grupos de 6 (seis) codornas “italiana”, durante os meses mais expressivos de verão (janeiro e meados de fevereiro); outono (meados de março e abril); inverno (junho e meados de julho), e primavera (meados de outubro e primeira quinzena de novembro), para os laboratórios de Anatomia e Morfologia Microscópica do Instituto de Biociências da UNESP em Botucatu, onde se obteve eutanásia das aves por meio de saturação anestésica com a mistura de Xylazina-Ketamina[®].

A seguir foram feitas laparotomia; retirada do trato gastrointestinal e coleta bilateral dos testículos e região epididimária (RE) das codornas “italiana”. Fragmentos dos materiais coletados foram fixados em formalina tamponada, em tampão fosfato, pH 7,2, 0.1 M; líquido de Bouin e soluções de Karnovsky e de McDowell. Os dois primeiros fixadores histológicos foram utilizados para os fragmentos de tecidos destinadas para estudos de microscopia de luz de materiais processados em *paraplast*TM (Oxford Labware, EUA). Os dois últimos fixadores foram usados para materiais destinados à rotina de historesina (*Historesin*[®], Leica, Alemanha), sendo o material fixado em

solução de Karnovsky destinado também, a partir de coletas concomitantes de materiais feitas em todas as aves, respectivamente nas 4 estações do ano, para a rotina de microscopia eletrônica de transmissão (MET), objetivando prosseguimentos subseqüentes dos estudos.

As rotinas de microscopia de luz foram as habituais, com inclusões dos materiais em *paraplast*TM e/ou em *historesin*[®]; microtomia (cortes de 1,5 a 5µm) e colorações com HE, tricrômico de Masson-Goldner, PAS/H, hematoxilina/floxina e solução de azul de toluidina a 0,5 % destinando-se estes materiais para estudos em microscópio de pesquisa Olympus BX-40[®] (Olympus, Japão). Nos fragmentos da região epididimária de codorna “italiana” destinados para os estudos de microscopia eletrônica de transmissão da RT, foi realizada após a fixação dos tecidos em OsO₄ a 1%, em tampão fosfato de sódio pH 7.2, 0.1 M, durante 1 hora a 4°C. Os fragmentos teciduais foram desidratados em série crescente de acetona, incluídos em Araldite[®] (Merck, Alemanha) e submetidos à ultramicrotomia (cortes de 80 nm). Os cortes ultrafinos foram montados em grades de cobre; contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, analisados e documentados fotograficamente em ME Philips CEM 100[®] (Philips, Holanda).

RESULTADOS

A rede testicular (RT) de codorna “italiana” é inicialmente intralbugínica, sendo representada por uma série de canais, ou túbulos, epiteliais longos, mais ou menos largos e tortuosos, sendo revestidos por epitélio predominantemente cúbico simples (Figura 1a). Estes canais são sustentados pela matriz densa da túnica albugínea do testículo (Figura 1a), atravessando-a nas adjacências da região epididimária (RE), e perpassam a albugínea testicular através do tecido mioconjuntivo matricial (Figura 1b). Cada canal epitelial da RT se prolonga e se continua diretamente com a parte proximal de um dos ductos eferentes proximais (DEP), da RE (Figura 1c). A transição entre o epitélio de revestimento predominantemente cúbico da RT e o epitélio cilíndrico, com tendências a pseudoestratificação dos DEP é, geralmente, abrupta (Figura 1b). Em algumas observações os condutos da RT podem aparecer revestidos por epitélio cúbico e aparentemente pseudoestratificado (Figura 1d). Pôde-se verificar ainda a coexistência dos epitélios cúbico da RT e cilíndrico de um DEP, numa das paredes seqüenciais dos dois condutos, onde a transição RT-DEP pode aparecer afunilada

ou alargada (Figura 1b). A transição RT-DEP é feita, mais freqüentemente, mediante um alargamento intertubular uma vez que os DEP

aparecem, predominantemente, como túbulos alargados (Figura 1c).

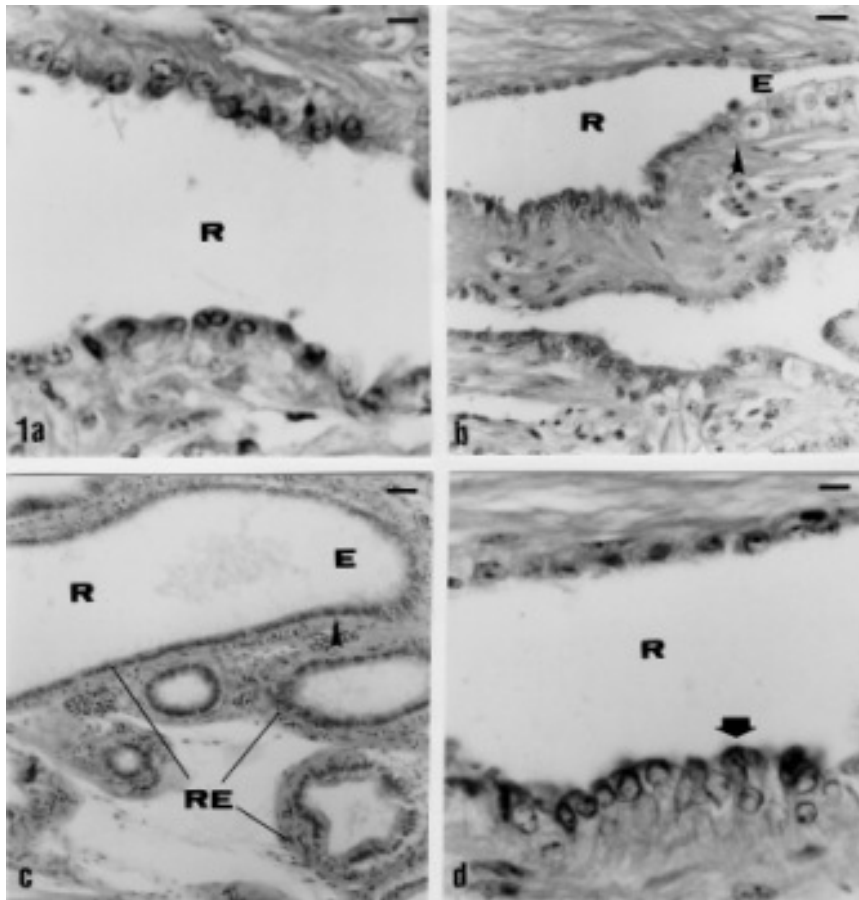


Figura 1 (a – d). Fotomicrografias da rede testicular (R) de codorna “italiana” sendo mostrados os canais epiteliais revestidos por epitélio cúbico simples; transição entre rede testicular-ducto eferente proximal (E - cabeças de setas) em **b**, e em **c** (ao nível da região epididimária – RE)*, e característica de pseudoestratificação epitelial (seta) em **d**. Coloração: HE, barras = 5 μ m em **a** e **d**, 12,5 μ m em **b** e 25 μ m em **c**.

Ultraestruturalmente, os canais da RT de codorna são revestidos por epitélio predominantemente cúbico no qual a margem luminal das células epiteliais (epiteliócitos) aparece irregular, sendo a membrana plasmática apical desprovida de cílios e microvilos (Figuras 2 e 3). Na fase ativa (primaveril) do ciclo reprodutivo anual de codorna “italiana”, nos epiteliócitos da RT, ao nível do citoplasma supranuclear, foram observadas muitas vesículas com formas, dimensões e conteúdos variados, e também cavéolas estavam presentes na membrana plasmática apical. Microtúbulos e canalículos do sistema T apical; microvesículas revestidas e eletrodensas foram

também visualizadas, coexistindo com formações lamelares e vesiculares do RE granular; polissomos e mitocôndrias, porém sem haver uma clara evidência de dictiossomos do complexo de Golgi (Figura 2). No citoplasma de alguns epiteliócitos da RT, ainda na fase primaveril, foram vistas muitas vesículas com formas e dimensões variadas e conteúdo predominantemente eletrolucente (claro), sendo observados também endossomos; lisossomos com diferentes graus de compactação, e formações vesiculares e lamelares do RE-granular. Reforços das membranas plasmáticas intercelulares feitos por junções íntimas foram observados apicalmente (Figura 3).

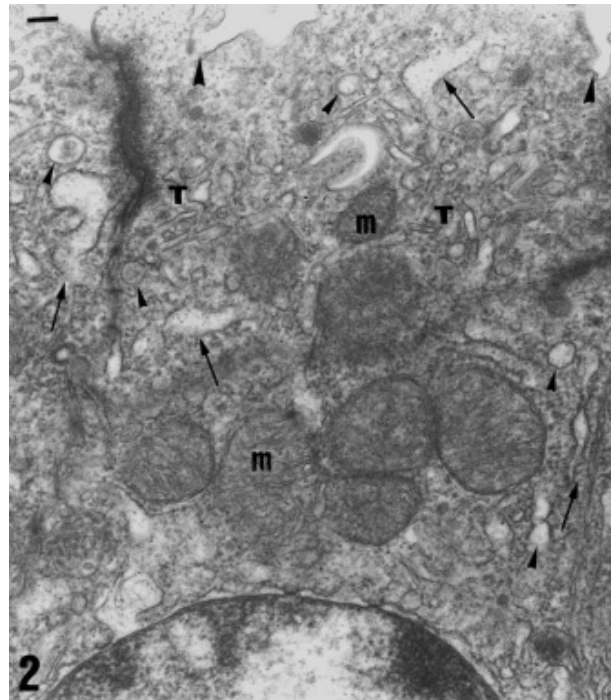


Figura 2. Ultraestrutura do citoplasma supranuclear de um epitelíocito da rede testicular (RT) de codorna “italiana”, na fase primaveril do ciclo reprodutivo, sendo indicados mitocôndrias (m), vesículas variadas em forma, dimensão e conteúdo (cabeças de setas pequenas), formações saculares e lamelares do RE granular (setas), microtúbulos e canaliculos do sistema T (T) apical, e cavéolas (cabeças de setas grandes), na membrana plasmática apical. Barra = 0,15 μm

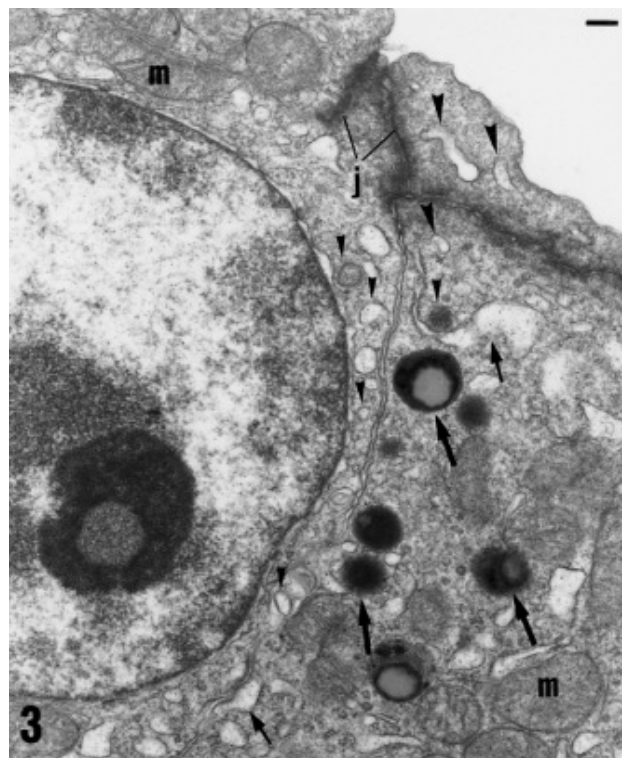


Figura 3. Epitelíocitos da RT de codorna “italiana” na fase primaveril, sendo indicados mitocôndria (m), vesículas variadas em forma, dimensão e conteúdo (cabeças de setas pequenas), endossomos (cabeças de setas grandes), lisossomos (setas), formações saculares e lamelares do RE granular (setas curtas) e junção íntima de membranas (j). Barra = 0,21 μm .

Durante a fase quiescente (outonal), ou inativa do ciclo reprodutivo de codorna “italiana”, as células epiteliais da RT mostraram menor eletrodensidade citoplasmática, especialmente notada no citoplasma basal e presença de recortes no envelope nuclear. Ocorreram ainda diminuição numérica de vesículas citoplasmáticas e de mitocôndrias, e presença de poucos lisossomos e lamelas do RE, sendo que algumas lamelas

aparentavam estar em degeneração ao nível citoplasmático apical. Nesse foram observadas também aparentes extrusões citoplasmáticas apicais, notando-se alguns fragmentos celulares destacados na luz tubular (Figura 4). Nas demais estações do ano, ou seja, no inverno e verão, não foram notadas modificações expressivas na ultraestrutura do epitélio da RT, relativamente às observações marcantes de primavera.

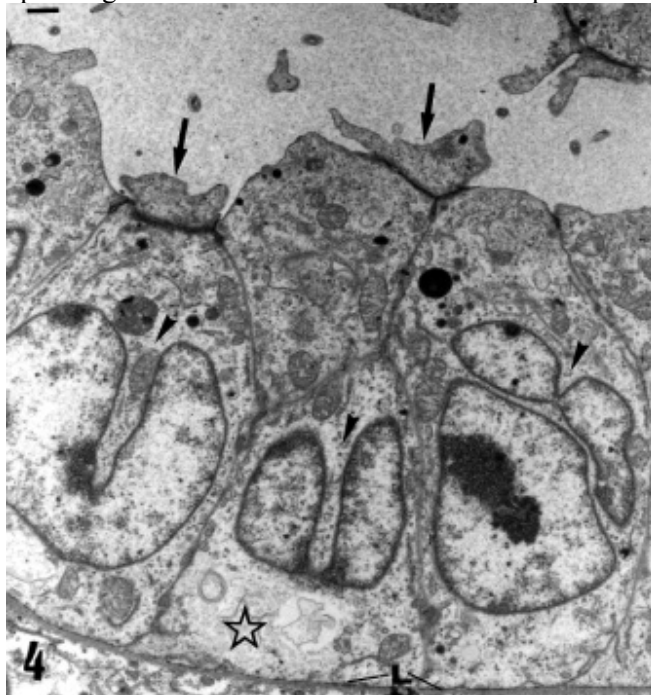


Figura 4. Epitélio de um túbulo da RT de codorna “italiana”, na fase outonal, sendo indicados lâmina basal (L), área clara no citoplasma basal (estrela), recortes na membrana nuclear (cabeças de setas pequenas), em epitelíócitos, e extrusões citoplasmáticas apicais (setas). Barra = 0,66 μ m.

DISCUSSÃO

Os aspectos morfológicos gerais da RT e de sua transição aos DEP, foram de modo geral relatados em outras aves (BUDRAS; MEIER, 1981; STEFANINI; ORSI, 1999; STEFANINI et al., 1999a), inclusive na própria codorna da variedade japonesa (AIRE, 1982), porém a característica histológica de transição epitelial entre os canais da RT e aqueles dos DEP, já na intimidade da região epididimária (RE), não foi bem destacada. Comparativamente com mamífero, a ocorrência de uma rede testicular tendo marcante segmento intralbugínico foi verificada na cobaia (BEU et al., 2003).

Ao longo das estações do ano, no entanto, não se notaram variabilidades apreciáveis na morfologia da RT da codorna “italiana”, na dimensão de microscopia de luz, não tendo sido, portanto, considerada para efeitos de análises morfométricas. Porém, Aire(2002), observou

pequenas variações na forma das células epiteliais da RT em outras aves. Foi observada a ocorrência de células mais altas, variando de cúbicas a cilíndricas, em aves sexualmente imaturas, e outras mais baixas, com formas entre aplanadas e cúbicas, em aves sexualmente ativas. Na codorna “italiana” predominou a forma celular epitelial cúbica, ao longo de todas as estações do ano, ocorrendo no epitélio primaveril da RT, em poucas regiões dos canais, uma certa característica de pseudoestratificação epitelial.

Concernente às características ultraestruturais do epitélio de revestimento do segmento extralbugínico da RT de codorna “italiana”, notou-se a ocorrência de variações epiteliais sazonais, especialmente marcantes nas fases proliferativa (primaveril) e quiescente (outonal) do ciclo reprodutivo desta ave (ORSI et al., 2005). Assim sendo, na fase ativa do ciclo (primaveril), as células epiteliais, desprovidas de microvilos, presentes na RT de codorna italiana,

apareceram predominantemente cúbicas, nas proximidades de junção aos DEP.

Os epitelíócitos da RT mostraram como organelas citoplasmáticas principais a presença de mitocôndrias, lamelas e vesículas do RE granular, endossomos, lisossomos com diferentes graus de compactação, e muitas vesículas variáveis em forma, dimensões e conteúdos, havendo um aparente predomínio de vesículas eletrolucentes (claras). Essas observações depõem favoravelmente à ocorrência de intensa absorção de fluidos na RT, como ressaltara Aire (1982). A ocorrência de endocitose, tanto de fase fluida (pinocitose) como adsortiva, segundo Clermont (1993), também ocorre, nos ductos eferentes do pombo doméstico (STEFANINI et al., 1999b) e de avestruz (OZEGBE et al., 2006), e no ducto epididimário da própria codorna doméstica (ORSI et al., 2007). Contudo, a ocorrência de secreção talvez tivesse pouco embasamento em decorrência de uma difícil caracterização do aparelho de Golgi nos epitelíócitos da RT de codorna, reforçando conceito emitido anteriormente por Aire (1982).

Durante a fase quiescente (outonal), do ciclo reprodutivo de codorna "italiana" verificou-se uma diminuição do número relativo de organelas citoplasmáticas, observando-se características de processos degenerativos celulares, a exemplo de recortes presentes na membrana nuclear, presença de extrusões citoplasmáticas apicais e baixa eletrondensidade citoplasmática. Eventos semelhantes a esses foram relatados em epitelíócitos

dos ductos eferentes do esquilo *Citellus lateralis*, em fase inativa do seu ciclo reprodutivo (PUDNEY; FAWCETT, 1984).

Por outro lado, há estudos prévios, em codorna (*Coturnix coturnix japonica*), relatando que o desenvolvimento testicular, e talvez o próprio ciclo testicular, ocorreriam também em dias curtos, principalmente durante o inverno setentrional, sempre na ausência constante de luz (SHARP; STERLING, 1985; GUYOMARC'H; GUYOMARC'H, 1992). Tais achados diferem bastante daqueles encontrados, e descritos, aqui, na condição climática entre tropical e subtropical úmida, no hemisfério sul.

Ademais, visando re-enfatizar as argumentações discutidas, achados similares aos verificados nos "epitelíócitos" da RT de codorna foram descritos para as células principais do ducto epididimário, em fase outonal, nesta mesma espécie (ORSI et al., 2007). Logo, na RT de codorna também haveria uma redução marcante de atividades de seus epitelíócitos, na fase outonal de repouso da cinética testicular (ORSI et al., 2005).

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP em Botucatu, pelo excelente trabalho técnico executado em microscopia eletrônica de transmissão. Ao CNPq e à FAPESP pelos auxílios financeiros e projetos financiados, os autores agradecem.

ABSTRACT: The RT of domestic quail from Italian variety showed mainly an albuginic pattern being represented by tortuous channels lined predominately by a simple cubic epithelium. RT channels extended along the testicular albuginea and penetrates into the epididymal region (ER) through its myoconnective matrix. Passageways were continuous to proximal efferent ducts of the ER. Epithelium lining ultrastructure of RT passageways showed some differences between the spring and the inactive phase at middle fall, concerning the quail testicular reproductive cycle. The features observed in RT epitheliocytes in fall were the low cytoplasmic electrodensity, paucity of supranuclear vesicles, which were abundant and variable in form and shape in spring, and some degenerative aspects of cell organelles mainly in ER lamellae. Moreover, presence of apical cytoplasmic extrusions were verified in the fall. No marked features were seen in the RT ultrastructure during the winter and summer comparatively to the active phase of spring.

KEYWORDS: Rete testis. Surface epithelium. Morphological features. Histophysiology. Quail.

REFERÊNCIAS

- AIRE, T. A. The epididymal region of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Acta Anat.*, Basel, v. 103, n. 3, p. 305-312, 1979a.
- AIRE, T. A. Microstereological study of the avian epididymal region. *J. Anat.*, London, v. 129, n. 4, p. 703-706, 1979b.
- AIRE, T. A. The Rete testis of birds. *J. Anat.*, London, v. 135, n. 1, p. 97-110, 1982.

- AIRE, T. A. Cyclical reproductive changes in the non-ciliated epithelia of the epididymis of birds. **Anat. Histol. Embryol.**, Berlin, v. 31, n. 2, p. 113-118, 2002.
- BEU, C. C. L.; ORSI, A. M.; STEFANINI, M. A.; MORENO, M. H. The ultrastructure of the guinea pig Rete testis. **J. Submicr. Cytol. Pathol.**, Siena, v. 35, n. 2, p. 141-146, 2003..
- BUDRAS, K. D.; MEIER, U. The epididymis and its development in ratite birds (Ostrich, Emu, Rhea). **Anat. Embryol.**, Heidelberg, v. 162, n. 3, p. 281-299, 1981.
- BUDRAS, K. D.; SAUER, T. Morphology of the epididymis of the cock (*Gallus domesticus*) and its effect upon the steroid sex hormone synthesis. Ontogenesis, morphology, and distribution of the epididymis. **Anat. Embryol.**, Heidelberg, v. 148, n. 2, p. 175-196, 1975.
- CLERMONT, Y. Introduction to the Sertoli Cell. In: RUSSEL; GRISWOOD, M.D. (Ed.). **The Sertoli Cell**. Clearwater, USA: Cache River Press, 1993. 899 p.
- GUYOMARC'H, C.; GUYOMARC'H, J.C. Sexual development and free-running period in quail kept in constant darkness. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Birmingham, v. 86, n. 1, p. 103-110, 1992.
- HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. **Int. Rev. Cytol.**, New York, v. 154, p. 106-189, 1994.
- MORALES, C. R.; HERMO L.; CLERMONT, Y. Endocytosis in epithelial cells lining the rete testis of the rat. **Anat. Rec.**, New York, v. 209, n. 2, p. 185-195, 1984.
- ORSI, A. M.; STEFANINI, M. A.; VIEGAS, K. A. S.; SIMÕES, K.; ARTONI, S. M. B. Aspectos morfológicos do ciclo testicular anual de codorna doméstica (*Coturnix coturnix*) da variedade italiana. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 163-170, 2005.
- ORSI, A. M.; DOMENICONI, R. F.; STEFANINI, M. A.; ARTONI, S. M. B. Variabilidade sazonal no ducto epididimário de codorna doméstica. Observações morfológicas. **Pesq. Vet. Brasil.**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 12, p. 495-500, 2007.
- OZEGBE, P. C.; AIRE, T. A.; SOLEY, J. T. The morphology of the efferent ducts of the ostrich, a primitive bird. **Anat. Embryol.**, Heidelberg, v. 211, n. 5, p. 559-565, 2006.
- PUDNEY, J; FAWCETT, D. W. Seasonal changes in fine structure of the ductuli efferentes of the ground squirrel, *Citellus lateralis* (Say). **Anat. Rec.**, New York, v. 208, n. 3, p. 383-399, 1984.
- SHARP, P.J.; STERLING, R.J. Photoperiodic requirement for the dissipation of scotorefractoriness in Japanese quail. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Birmingham, v. 58, n. 1, p. 169-173, 1985.
- STEFANINI, M. A.; ORSI, A. M. Características morfológicas da região epididimária do pombo doméstico (*Columba livia*). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 36, n. 1/3, p. 66-71, 1999.
- STEFANINI, M. A.; ORSI, A. M.; CROCCI, A. J.; PADOVANI, C. R.; VICENTINI, C. A.; AIRES, E. D. La región epididimaria de la paloma (*Columba livia*): análisis morfológico y morfométrico. **Rev Chil. Anat.**, Santiago, v. 17, n. 1, p. 21-25, 1999a.
- STEFANINI, M. A.; ORSI, A. M.; GREGORIO, E. A.; VIOTTO, M. J. S.; ARTONI, S. M. B. Morphologic study of the efferent ductules of the pigeon (*Columba livia*). **J. Morphol.**, New York, v. 242, n. 3, p. 247-255, 1999b.
- TINGARI, M. D. The fine structure of the epithelial lining of the excurrent duct system of the testis of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Qt. J. Exp. Physiol.**, Cambridge, v. 57, n. 3, p. 271-295, 1972.