

Algumas observações histoquímicas
no ducto deferente do gerbilo
(*Meriones unguiculatus*)

Antonio Marcos Orsi¹,
Maíra Aparecida Stefanini²,
Célia Cristina Leme Beu^{1,3},
Hamilton Emídio Duarte³,
Selma Maria Michelin Matheus¹

¹ Departamento de Anatomia – Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu
– Cep: 18618000 – SP

² Departamento de Morfologia e Patologia – Centro de Ciências Biológicas e
da Saúde – UFSCar – São Carlos – SP

³ Departamento de Ciências Morfológicas – Centro de Ciências Biológicas –
UFSC – Florianópolis – SC

Aceito para publicação em 26/11/99

Resumo

O ducto deferente do gerbilo foi estudado histoquimicamente visando analisar, ou complementar, algumas características histofisiológicas observadas, principalmente em seu epitélio, tais como a ocorrência de secreção de substâncias, provavelmente de glicoproteínas, absorção de parte do líquido seminal e para verificar a presença de pancitoqueratinas, como elementos de ancoramento das células epiteliais entre si por meio de suas membranas plasmáticas.

Unitermos: Ducto deferente, Histoquímica, Microscopia Óptica, Gerbilo.

Summary

The vas deferens of the gerbil was histochemically studied in order to analyse or to complement some histophysiological features observed mainly in its epithelium such as the occurrence of cellular secretion probably of glycoproteins, partial absorption of the seminal fluid and to verify presence of pancytokeratines which support the epithelial cells by anchorage of their plasmalemmas.

Key words: Vas deferens, Histochemistry, Light microscopy, Gerbil.

Introdução

No epitélio de revestimento dos túbulos da via espermática extratesticular existem alguns relatos histoquímicos; histoenzimológicos e ultraestruturais, os quais dão embasamento para as interpretações citofisiológicas ou histofisiológicas concernentes à ocorrência de processos de absorção de fluidos e solutos e de secreção celular micromerócrina (protéica), ou apócrina (Nicander e Malmqvist, 1977; Ali et al., 1978; Hoffer, 1976; Paniagua et al., 1981; Hermo e Morales, 1984; Hermo et al., 1988; Vicentini e Orsi, 1989, Viotto et al., 1996; Parillo et al., 1997; Orsi et al., 1998; 1999).

Tendo em vista as observações antes feitas, principalmente, sobre a ultraestrutura epitelial do ducto deferente do gerbilo (Orsi et al. 1999), e as informações comparativas, antes citadas na literatura especializada, neste trabalho foram procedidas análises de algumas características histológicas e histoquímicas no epitélio ducto-deferencial deste roedor visando prover conhecimentos básicos para a biologia da reprodução nesta espécie, para a qual há poucos trabalhos especializados (Pinheiro, 1997). Assim, o objetivo fundamental deste trabalho foi analisar, com base

histoquímica, a presença de mucossubstâncias e de pancitoqueratinas que estruturam o epitélio vaso-deferencial do gerbilo.

Material e Métodos

Os estudos histoquímicos para pesquisas de mucossubstâncias e de expressão de pancitoqueratinas na estrutura do ducto deferente do gerbilo, foram feitos em material histológico (secções de 5 a 7 μm), coletado de três animais adultos, previamente fixado em formalina neutra tamponada (tampão fosfato, pH 7,3; 0,1 M), a 10%, processado para inclusão em "paraplast", e analisado em microscopia de luz. Os estudos histoenzimológicos, no epitélio do ducto deferente, foram feitos em material coletado de dois gerbilos adultos, após técnica de congelamento (em n-hexana), e criotomia dos tecidos (secções de 10 μm).

As reações histoquímicas para pesquisas de mucossubstâncias foram as de PAS, alfa amilase + PAS, metilação e/ou acetilação + PAS; AB em pH 0,5 e 2,5 (Pearse, 1972). Para pesquisa de pancitoqueratinas foram seguidos os procedimentos gerais descritos por Palacios et al. (1993), com emprego do método ABC ("avidin-biotin-peroxidase complex"), para estudos imunohistoquímicos (Hsu et al., 1981). Os anticorpos utilizados, em concentração e diluição de 1/100, foram clones de anticorpos anti-pan-citoqueratinas ("mouse IgG1 and IgG2 isotypes"). Esses anticorpos são uma mistura de diferentes clones: C-11, PCK-26, CY-90, Ks-1A3, M20 e A53-B/A2 ("Sigma Immuno Chemicals", EUA). De modo teórico, segundo o catálogo do laboratório ("Sigma"), estes anticorpos primários reconhecem as citoqueratinas 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18, e 19.

A pesquisa de reatividade histoenzimática de fosfatase ácida (FoAc) foi feita no material de criotomia, seguindo as técnicas preconizadas por Pearse (1972). As análises das reatividades histoquímicas e histoenzimática se basearam na intensidade cromática (de cor), dos tecidos, nas diferentes reações, utilizando-se a convenção de reatividades: forte (intensa), média, fraca, muito fraca e negativa.

Para fundamentar esta convenção, de natureza qualitativa, foram observadas 3 lâminas histológicas de cada grupo de estudos (histoquímica de mucossubstâncias; histoenzimologia e histoquímica de pancitoqueratinas), antes caracterizados, em nível de um sistema de análise de imagens Zeiss KS-300, no qual foram analisadas, com dupla observação concomitante (dois observadores), as áreas relativas dos tecidos em termos de intensidades cromáticas.

Resultados

No epitélio do ducto deferente do gerbilo, de modo geral, observou-se PAS-positividade entre fraca e média no epitélio tubular, ao longo do ducto, a não ser em certos locais específicos, onde a expressão desta positividade foi forte nos três segmentos tubulares enfocados (proximal, intermediário e distal, Figuras 1A-C). As reatividades ao AB em pH 0,5 e 2,5 foram entre negativas e muito fracas, respectivamente. O material ducto-deferencial do gerbilo se mostrou diastase-resistente.

No segmento ducto-deferencial proximal (adepididimário), notou-se PAS-positividade forte no glicocálice (Figura 1A), sendo a PAS-positividade entre fraca e média nos demais segmentos tubulares. No segmento intermediário (funicular), uma PAS-positividade forte foi vista, principalmente, nos grânulos pequenos, presentes difusamente no citoplasma das células principais; no material intranuclear destas células; no citoplasma das células

delgadas, que mostra reatividade forte, e, na lâmina própria tubular (Figura 1B).

O epitélio do segmento distal (adprostático), no ducto deferente do gerbilo, mostrou material PAS-positivo forte no citoplasma basal das células principais, o qual apareceu de forma condensada, ou grosseiramente granular (Figura 1C). Nos núcleos celulares não se observou material PAS-positivo evidente, como foi visto no segmento anterior.

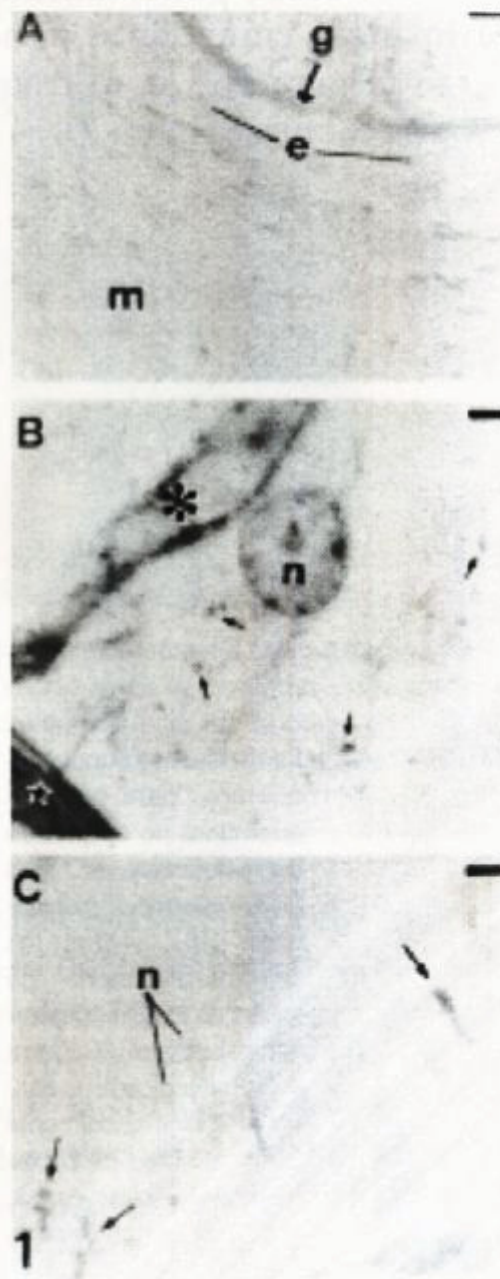


FIGURA 1(A-C): PAS-reatividades da parede do ducto deferente do gerbilo nos segmentos tubulares proximal (1A, barra = 25 mm), médio (1B, barra = 2,5 mm), e distal (1C, barra = 5 mm). São indicados: glicocálice (g), epitélio (e) e a túnica muscular (m em 1A); um núcleo (n) e grânulos PAS-positivos (setas menores) em uma célula principal, uma célula delgada (*) e a lâmina própria (estrela em 1B); núcleos (n) e material PAS-positivo (setas longas em 1C).

A expressão de pancitoqueratinas observada imunohistoquimicamente nas células principais do epitélio tubular, em todos os segmentos do ducto deferente do gerbilo foi média, e mais ou menos constante (Figuras 2A-C). Notou-se reatividade imunohistoquímica predominante no citoplasma apical das células principais, próximo à margem apical de microvilos (Figura 2B). Observou-se, também, expressão forte de pancitoqueratinas em nível basal, possivelmente nas interrelações de membranas plasmáticas, entre células principais; entre as células principais e basais (Figura 1C), e, na delimitação entre o epitélio e a lâmina própria tubular (Figura 2B).

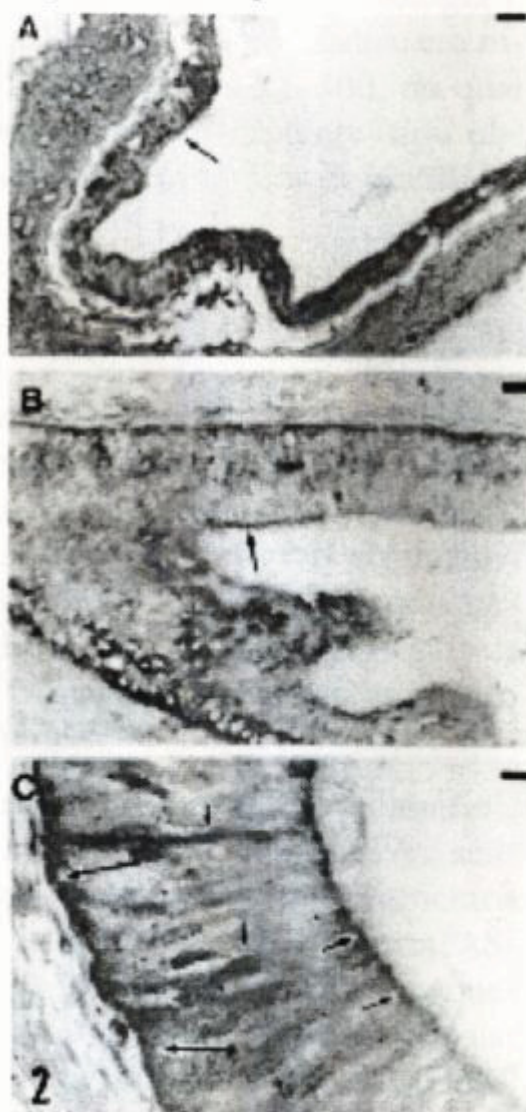


FIGURA 2 (A-C): Reatividades imunohistoquímicas para pancitoqueratinas no epitélio do ducto deferente, em níveis do citoplasma e plasmalema nos segmentos proximal (2A, barra = 65 μ m), médio (2B, barra = 25 μ m) e distal (2C, barra = 5 μ m). Indicadas reatividades fortes: apicalmente (setas médias, 2A-C); lateralmente (setas curtas, 2C) e basalmente (setas longas, 2C).

A túnica muscular do ducto deferente, no gerbilo, que assegura a histofisiologia deste órgão, em termos de emissão e ejaculação dos espermatozoides (Hib et al., 1982), apresentou PAS-positividade fraca no segmento proximal (Figura 1A) e nos outros dois segmentos analisados.

A enzima lisosômica fosfatase ácida (FoAc), teve expressão forte em níveis basal e apical, no citoplasma de células principais do epitélio tubular (Figuras 3A,B).

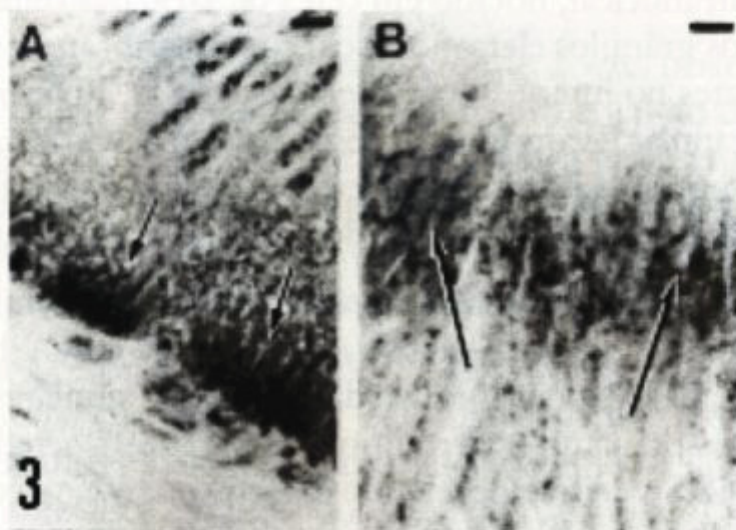


Figura 3(A-B): Reatividades histoenzimáticas do ducto deferente à enzima fosfatase ácida (3A, B, barra = 5 μ m), observando-se as reatividades epiteliais fortes basalmente (setas curtas em 3A) e apicalmente (setas longas em 3B).

Discussão

O material PAS-positivo, diastase-resistente, observado no citoplasma das células principais do ducto deferente do gerbilo, provavelmente é formado por complexos de carboidratos e proteínas (glicoproteínas), conforme Ali et al. (1978) discutiram, com base em observações similares, feitas na parte ampular do ducto deferente do camelo. À observação de material epitelial ducto-deferencial PAS-positivo, no deferente do camelo, foram atribuídos possíveis papéis de estocagem e secreção do material

(de glicosaminoglicanas neutras), do epitélio para a luz tubular (Ali et al., 1978). Relato parecido, com observação semelhante, foi feito no citoplasma de células principais, na cauda do epididímo do hamster (Vicentini e Orsi, 1989).

Segundo Paniagua et al. (1981) há, no epitélio vaso-deferencial humano, apreciável número de células principais com material PAS-positivo, sendo observado no citoplasma e intranuclearmente. Os autores correlacionaram o material PAS-positivo intranuclear, notado em cerca de 10% das células principais, com os grânulos eletrondensos, com membrana circundante lisa, presentes no interior do núcleo das células. Referiram que o material granular PAS-positivo, presente tanto no citoplasma como dentro do núcleo das células principais ducto-deferenciais humanas seria formado, basicamente, por glicoproteínas neutras.

Com base nas observações atuais, feitas nas células principais do ducto deferente do gerbilo (vide Figuras 1B,C), bem como em vista de análises prévias realizadas em células similares do ducto epididimário do hamster (Vicentini e Orsi, 1989), acredita-se que o material PAS-positivo observado é, efetivamente, glicoprotéico. Existe suporte para se crer que o material de secreção das células da via espermática de mamíferos é protéico, ou glicoprotéico (Nicander e Malmqvist, 1977; Flickinger, 1983 e 1985; Viotto et al., 1996; Orsi et al., 1998). Por outro lado, Paniagua et al. (1981), com base em considerações de Hoffer (1976), comentaram que, talvez, a deportação de grânulos ao lúmen deferencial humano não seria observada, prejudicando assim a confirmação de função secretória (possivelmente merócrina), nas células epiteliais da via espermática.

A despeito das últimas considerações, mais recentemente, como o uso de técnicas atuais de pesquisa em eletromicroscopia de transmissão e de varredura, Manin et al. (1995) foram hábeis em detectar secreção protéica, segundo um modelo secretor apócrino, em células principais do ducto deferente do camun-

dongo suíço. Outrossim, um processo secretor similar foi descrito no epitélio do ducto deferente do gerbilo (Orsi et al., 1999).

Anteriormente, Flickinger (1983 e 1985) havia descrito, inclusive com análise autoradiográfica, processos de síntese e secreção glicoprotéica no epididímo do camundongo. Logo, um papel secretor se efetuará, seguindo, talvez, os modelos de biossíntese e secreção glicoprotéica, antes descritos de modo geral (Benett et al., 1974), e na via espermática (Gupta et al., 1974; Flickinger, 1983 e 1985).

Concernente à PAS-positividade forte observada no glicocálice, mais marcante no segmento proximal do ducto deferente do gerbilo, esta estrutura microscópica representa a cobertura da superfície celular em epitélios; é adjacente à margem de microvilos, nos epitélios como os da via espermática, e é constituído por glicoproteínas e ácido siálico (Leeson e Leeson, 1977).

Para Leeson e Leeson (1977), provavelmente o glicocálice tem os seus componentes estruturais constituídos por glicoconjugados e sialoglicoconjugados complexos (Parillo et al., 1997), sintetizados em nível do complexo de Golgi. Esta foi uma tese que, com base imunohistoquímica, reafirmaram Parillo et al. Talvez, no epitélio vaso-deferencial do gerbilo, o glicocálice tenha origem e constituição similares às antes enfatizadas, especialmente no ducto epididimário (Parillo et al., 1997), reforçando a superfície epitelial apical.

A expressividade de pancitoqueratinas no ducto deferente do gerbilo, com observação de maiores reatividades na parte supranuclear do epitélio, junto à margem apical de microvilos, e na parte basal do epitélio, entre células principais adjacentes, é indicativa do reforço que os diferentes tipos de citoqueratinas fazem na estrutura da membrana plasmática epitelial. Logo, o reforço estrutural, feito por pancitoqueratinas, notado no ducto deferente do gerbilo, teria correlações com as atividades fisiológicas observadas no ducto, como o aumento da pressão intraluminal,

em face da emissão do líquido seminal ou durante a ejaculação dos espermatozoides, que são diretamente dependentes da estrutura funcional da túnica muscular lisa (Hib et al., 1982).

O aumento da pressão intraluminal ducto-deferencial seria compensado pelas características arquiteturais dos estratos de músculo liso (Hib et al., 1982), presentes em sua túnica muscular, e também decorreria dos reforços estruturais que as citoqueratinas conferem ao epitélio tubular. Essa observação é concordante com o suporte teórico proposto por Palacios et al. (1993), para o ducto epididimário humano.

A enzima fosfatase ácida teve reatividade forte nas porções apical e basal do citoplasma das células principais, no epitélio ducto-deferencial do gerbilo, onde as observações ultraestruturais permitiram evidenciar lisosomas (Orsi et al., 1999). Efetivamente, esta enzima está diretamente relacionada aos processos de digestão enzimática (talvez autofágica ou heterofágica), observados nos lisosomas (De Duve e Wattiaux, 1966; Hermo et al., 1988), atuando, em consequência, nas etapas de absorção e endocitose de fluidos presentes na luz da via espermática (Hermo e Morales, 1984; Orsi et al., 1998).

Agradecimentos

Aos apoios do CNPq (Proc. 30.1242/80-1) e FAPESP (Proc. 96/09979-2), e à Sra. Maria Luiza Nogueira Rossetto Rodrigues pela formatação e revisão do manuscrito.

Referências Bibliográficas

- Ali, H.A.; Tingari, M.D.; Moniem, K.A. 1978. On the morphology of the accessory male glands and histochemistry of the ampulla ductus deferentis of the camel (*Camellus dromedarius*). *J. Anat.*, **125**: 277-292.

- Benett, G.; Leblond, C.P.; Haddad, A. 1974. Migration of glycoprotein from the Golgi apparatus to the surface of various cell types as shown by autoradiography after labelled fucose injection into rats. **J. Cell. Biol.**, **60**: 258-284.
- De Duve, C., Wattiaux, R. 1966. Functions of lysosomes. **Ann. Rev. Physiol.**, **28**: 445-492.
- Flickinger, C.J. 1983. Synthesis and secretion of glycoprotein by the epididymal epithelium. **J. Androl.**, **4**:157-161.
- Flickinger, C.J. 1985. Autoradiographic analysis of the secretory pathway for glycoprotein in principal cells of the mouse epididymis exposed to H³-fucose. **Biol. Reprod.**, **32**: 377-389.
- Gupta, G.; Rajalakshmi, N.; Prasad, M.R.N.; Moudgal, N.R. 1974. Alteration of epididymal function and its relation to maturation of spermatozoa. **Andrologia**, **6**: 35-44.
- Hermo, L.; Morales, C. 1984. Endocytosis in nonciliated epithelial cells of the ductuli efferentes of the rat. **Am. J. Anat.**, **171**: 59-74.
- Hermo, L.; Spier, N.; Nadler, N.J. 1988. Role of apical tubules in endocytosis in non ciliated cells of the ductuli efferentes of the rat: a kinetic analysis. **Am. J. Anat.**, **182**: 107-119.
- Hib, J.; Ponzio, R.; Vilar, O. 1982. Contractility of the rat cauda epididymidis and vas deferens during seminal emission. **J. Reprod. Fert.**, **66**: 47-50.
- Hoffer, A.P. 1976. The ultrastructure of the ductus deferens in man. **Biol. Reprod.**, **14**: 425-443.
- Hsu, S.M.; Raine, L.; Fanger, H. 1981. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC), in immunoperoxidase technique. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, **29**: 577-80.
- Leeson, C.R.; Leeson, T.S. 1977. A Célula. **Histologia. Interamericana**, Rio de Janeiro, 533p.

- Manin, M.; Lecher, P.; Martinez, A.; Tournadre, S.; Jean, CL. 1995. Exportation of mouse vas deferens protein, a protein without a signal peptide, from mouse vas deferens epithelium: a model of apocrine secretion. **Biol. Reprod.**, **52**: 50-62.
- Nicander, M.; Malmqvist, M. 1977. Ultrastructural observations suggesting merocrine secretion in the initial segment of the mammalian epididymis. **Cell Tiss. Res.**, **184**: 487-490.
- Orsi, A. M.; Matheus, S.M.M.; Gregório, E.A.; Beu, C.C.L. 1998. Morphological investigations of the surface epithelium of ductuli efferentes of black isogenic mice (*Mus musculus*). **Anat. Histol. Embryol.**, **27**: 215-218.
- Orsi, A.M.; Matheus, S.M.M.; Stefainini, M.A.; Vicentini, C.A.; Ribeiro, A.A.C. and Miglino, M.A. 1999. Fine structure of the lining epithelium of the ductus deferens in gerbil: a segmental study. **Braz. J. Morphol. Sci.**, (in press).
- Palacios, J.; Regadera, J.; Paniagua, R.; Gamallo, C.; Nistal, M. 1993. Immunohistochemistry of the human ductus epididymis. **Anat. Rec.**, **235**: 560-566.
- Paniagua, R.; Regadera, J.; Nistal, M.; Abaurrea, M.A. 1981. Histological, histochemical and ultrastructural variations along the length of the human vas deferens, before and after puberty. **Acta Anat.**, **111**: 190-203.
- Parillo, F.; Stradaoli, G.; Supplizi, A.V.; Monaci, M. 1997. Detection of glycoconjugates in the *ductus epididymidis* of the prepubertal and adult horse by lectin histochemistry. **Histol. Histopathol.**, **12**: 691-700.
- Pearse, A.G.E. 1972. **Histochemistry: theoretical and applied**. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1518p.
- Pinheiro, P.F.F. 1997. **Anatomia e histologia da vesícula seminal, da glândula de coagulação, da glândula do ducto deferente e dos lobos ventral e dorsolateral da próstata do gerbil da Mongólia**

(*Meriones unguiculatus*). Dissertação inaugural (Monografia de graduação). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil, 60 pp.

Vicentini, C.A.; Orsi, A.M. 1989. Características citoquímicas e ultraestruturais do epitélio de revestimento na parte distal do epididímo do hamster (*Mesocricetus auratus*). **Rev. Bras. Biol.**, 49: 291-301.

Viotto, M.J.S.; Orsi, A.M.; Gregório, E.A. 1996. Ultrastructural characteristics of epididymal epithelium of the cat (*Felis domestica*, L.). **Braz. J. Morphol. Sci.**, 13: 51-58.