

## PATOGÊNESE DAS LESÕES TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIAS EM COBAIOS INFETADOS EXPERIMENTALMENTE COM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Affonso Luiz FERREIRA (1)

### RESUMO

O Autor estuda a patogênese das lesões do testículo e do epidídimo em cobaios infetados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*. Com base no conceito patogênético proposto por KÖBERLE fez-se a avaliação quantitativa dos neurônios do gânglio pélvico justaprostático do plexo hipogástrico inferior, demonstrando-se que, nos cobaios inoculados, houve uma diminuição significativa do número de neurônios. A pesagem dos testículos e dos epidídimos e a determinação do valor médio da área dos túbulos seminíferos demonstraram uma significativa atrofia desses órgãos nos animais inoculados. As alterações encontradas no epitélio germinativo dos testículos dos cobaios chagásicos permitiram distinguir modificações características na espermatogênese que se traduzem por diminuição da taxa normal do desenvolvimento de certos tipos celulares (dano cinético), e alterações morfológicas, especialmente freqüentes nos espermátocitos de 1.<sup>a</sup> ordem nos estágios leptotênico e paquitênico. Os danos eram restritos a áreas focais das glândulas.

Com o emprêgo da técnica da ósmio-iodofilia fez-se o estudo comparativo das terminações e das fibras autônomas no epidídimo, cujas características, nos animais inoculados, são sugestivas de degeneração, as quais decorreriam da lesão de neurônios do gânglio pélvico justaprostático.

As alterações tróficas e do epitélio germinativo são comparáveis àquelas obtidas por COUJARD<sup>10</sup> através de lesão mecânica, química ou irritativa do "gânglio prostato-vesícula-deferencial" no cobaio.

Os fatos apresentados se coadunam com a hipótese de que a destruição neuronal observada no gânglio pélvico justaprostático é o principal fator responsável por essas alterações morfológicas e tróficas, que convencionamos chamar de "orquiopatia e epididimopatia pós-chagásicas".

### INTRODUÇÃO

O primeiro pesquisador a demonstrar que a infecção experimental de cobaios com *Trypanosoma cruzi*, provocava lesões testiculares, foi VIANNA<sup>34</sup>. Além desse trabalho pioneiro, não encontramos na literatura outras referências específicas sobre lesões testiculares ou do epidídimo na Moléstia de Chagas, quer no homem, quer em animais

de experimentação. Entretanto, vários trabalhos deixam a impressão de que alterações morfológicas e funcionais possam ocorrer para o lado da esfera genital em animais de experimentação ou em indivíduos com megaesôfago ou megacolon adquiridos: VASCONCELOS & BOTELHO<sup>33</sup>; HADDAD & col.<sup>17</sup>; FERREIRA & MEIRA DE OLIVEIRA<sup>14</sup>. Nos tra-

(1) Assistente Docente do Departamento de Morfologia Humana, Funcional e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

balhos acima assinalados não se encontram, todavia, explicações para as alterações morfológicas ou funcionais assinaladas. No presente trabalho procuramos estudar as alterações morfológicas do testículo e do epidídimo, que ocorrem na fase tardia da infecção experimental, em cobaios. Além disso, apoiados no conceito patogênico proposto, por KÖBERLE & col.<sup>20</sup> e enfatizado por inúmeros trabalhos de KÖBERLE<sup>21, 22, 23 e 24</sup> procuramos investigar a patogênese dessas lesões, estudando quantitativamente os neurônios do gânglio pélvico justaprostático e através da técnica de CHAMPY<sup>2</sup> (ósmio-iodofilia), as fibras e terminações do sistema nervoso autônomo do epidídimo.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Na presente pesquisa utilizamos 30 cobaios (*cavia porcellus*, L.), machos, cujos pêsos, no momento do sacrifício variavam para o grupo inoculado (15 animais), de 335 g a 538 g e para o grupo controle (15 animais), de 460 g a 618 g. Os 15 animais inoculados eram os remanescentes de um lote inicial de 40, que à época da inoculação tinham 40 dias de idade e pêsos variando entre 180 g a 210 g. Os controles, de idade e pêsos equivalentes foram mantidos nas mesmas condições ambientais e de alimentação.

A inoculação dos animais foi realizada pela via intraperitoneal, recebendo, cada animal, um inóculo de 0,4 ml de sangue obtido por punção cardíaca de camundongos mantidos para repicagem da cepa, na seção de Patologia Experimental do Departamento de Patologia. A cepa de *Trypanosoma cruzi* empregada na inoculação foi a "cepa Y", isolada, através de xenodiagnóstico de um caso agudo de Moléstia de Chagas, por FREITAS & col.<sup>16</sup>. O número de tripanosomas contido no inóculo, calculado pela técnica de PIZZI<sup>31</sup>, modificada por BRENER<sup>1</sup>, foi estimado em 500.000.

Durante o período subsequente à inoculação, além da observação clínica dos animais, foi feito o controle parasitêmico da infecção. O exame para controle da parasitemia foi realizado a fresco em sangue colhido da orelha dos animais. No 9.º dia após a inoculação, a parasitemia foi de 14 tripanosomas, em média, por 100 campos

microscópicos (objetiva 45 × e ocular 10 ×), e de 15 no 14.º dia, quando foi repetido o controle parasitêmico.

Os animais foram sacrificados, por luxação da coluna cervical, três meses após a inoculação.

Foram retirados os testículos, os epidídimos D e E e pesados a fresco, em balança de torsão. Acharmos conveniente não incluir a cabeça do epidídimo porque esta, no cobaio, acha-se incluída em uma massa de gordura, sendo de difícil dissecação, o que poderia falsear nos resultados. O epidídimo era separado dos testículos por dissecação a partir da cauda até junto à cabeça, ponto onde se observa a penetração de vasos do epidídimo e aí era seccionado. Os valores considerados como pêsos dos epidídimos representam assim o pêso da cauda e do corpo do epidídimo.

Os epidídimos foram cortados longitudinalmente, em duas metades e dos testículos, retirou-se uma fatia transversal média de mais ou menos 4 mm de espessura.

Os órgãos genitais internos (próstata e vesículas seminais), retirados em um único bloco foram a seguir reduzidos em três partes, para padronizar os cortes seriados e a identificação do gânglio justaprostático nos cortes. Esse material foi fixado na seguinte mistura fixadora: álcool 80º, 85 ml; formol a 40%, 10 ml; ácido acético glacial, 5 ml, durante 24 horas.

Para o estudo das terminações e fibras autônomas, metade do epidídimo E e de cinco animais controles e de cinco animais chagásicos, escolhidos ao acaso, foi colocada na mistura de CHAMPY (solução aquosa de ácido ósmico a 2%, 1 parte; iodeto de sódio em solução aquosa a 3%, 3 partes), durante 31 horas (CHAMPY<sup>2</sup>).

Após a fixação, o material foi submetido aos tratamentos habituais para inclusão em parafina, executados em aparelho de inclusão automático. O estudo histológico do testículo e do epidídimo foi feito em cortes de 7 µ de espessura, submetidos à reação do P.A.S. (ácido peródico — Reativo de Schiff) segundo MAC MANUS (LISON<sup>26</sup>) e corados pelo hemalumen de EHRlich. Do bloco dos órgãos genitais internos, compreendendo a próstata e as porções justaprostática das vesículas seminais e deferentes foram feitos cortes seriados com 8 microns de espessura e corados pelo hemalumen e

eosina. O estudo das fibras e terminações autônomas foi efetuado em cortes de 10 microns de espessura dos epidídimos fixados no Champy, após desparafinização e montagem.

A contagem de neurônios foi efetuada em 19 animais (10 controles e 9 chagásicos) em cortes seriados de 8 microns de espessura, sendo contados os neurônios de um corte, desprezando-se os dois cortes subseqüentes e assim sucessivamente até esgotar o bloco. Para evitar-se a repetição da contagem de neurônios do mesmo campo a ocular do microscópio foi equipada com um retículo. O aumento foi de 400 X.

As áreas dos túbulos seminíferos foram determinadas à partir das imagens das preparações projetadas em um "ecran" e a seguir, desenhados em papel, o contorno de 20 túbulos de cada animal (aumento final de 104 vezes). Foram medidos apenas túbulos cortados transversalmente, de luz regular e com espermatogênese normal e cujas características histológicas não evidenciavam sinais de retração ou deformações devidas ao tratamento histológico. Com o auxílio de um planímetro polar de disco de precisão (K. Murbach), mediram-se as áreas dos

túbulos desenhados, exprimindo-se os valores em  $\mu^2$ .

Para a análise estatística dos valores obtidos na contagem de neurônios do gânglio pélvico justaprostático e das áreas dos túbulos seminíferos dos animais inoculados e dos animais controles, aplicamos o teste do chorrilho, segundo WALD & WOLFWITZ<sup>35</sup>. Este tipo de análise leva em conta o número de vezes que uma seqüência de valores correspondente a animais tratados igualmente, ocorre. Cada seqüência denomina-se de chorrilho. O teste permite fazer distinção no que diz respeito às medianas das populações amostradas. Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 5%.

#### RESULTADOS

*Número de neurônios* — A média de neurônios contados no gânglio justaprostático do plexo hipogástrico inferior foi de aproximadamente  $17.925 \pm 1.649$  neurônios, nos animais controles. Nos animais chagásicos a média de neurônios do gânglio foi de  $10.179 \pm 975$  neurônios, o que representa uma diminuição de cerca de 43,22% (Tabela I).

TABELA I

Número de neurônios contados no gânglio pélvico justaprostático do plexo hipogástrico inferior de cobaios controles e chagásicos

Cobaios controles	Número de neurônios	Cobaios Chagásicos	Número de neurônios
T <sub>3</sub>	24.852	Ch <sub>8</sub>	14.547
T <sub>14</sub>	22.959	Ch <sub>4</sub>	13.473
T <sub>12</sub>	22.473	Ch <sub>9</sub>	11.252
T <sub>1</sub>	20.683	Ch <sub>11</sub>	10.926
T <sub>9</sub>	19.088	Ch <sub>10</sub>	9.941
T <sub>13</sub>	18.133	Ch <sub>15</sub>	9.935
T <sub>11</sub>	15.544	Ch <sub>2</sub>	9.737
T <sub>6</sub>	14.909	Ch <sub>1</sub>	6.203
T <sub>7</sub>	10.833	Ch <sub>5</sub>	5.597
T <sub>10</sub>	9.788		
$\bar{M} \pm Sm$	$17.926 \pm 1.649$	$\bar{M} \pm Sm$	$10.179 \pm 974.6$

$\bar{M}$  = média      Sm = erro padrão da média

A comparação dos valores das contagens de neurônios do gânglio pélvico justaprostático do plexo hipogástrico inferior entre animais do grupo controle e do grupo inoculado foi feita num total de 19 animais (Fig. 1).

O valor de  $M$  (correspondente à amostra de menor número de animais tratados igualmente), é 9 e o valor de  $N$  (correspondente à amostra de maior número de animais tratados igualmente) é 10.

Como pode ser visto na tabela de valores críticos, para este tipo de análise (OWEN<sup>29</sup>), para  $M = 9$  e  $N = 10$ , o ponto crítico é igual a 6 ao nível de significância de 5%. O valor observado foi de 6, portanto, significativo.

Este resultado revela que o número de neurônios contados em um gânglio pélvico

justaprostático dos animais chagásicos apresenta uma redução estatisticamente significativa.

*Aspectos histológicos dos neurônios do gânglio pélvico justaprostático do plexo hipogástrico inferior* — Nos animais controles, os neurônios ganglionares apresentam limites celulares nítidos, núcleo grande, arredondado: no citoplasma a substância cromófila de Nissl se acha distribuída em grupos na periferia das células. As células satélites dispõem-se ordenadamente em torno dos neurônios (Fig. 2).

Nos animais chagásicos, porém, é freqüente observar-se neurônios deformados e com núcleos hiper cromáticos. O limite citoplasmático não é nítido na maioria dos neurônios e a substância cromófila de Nissl não se apresenta, caracteristicamente sob a for-

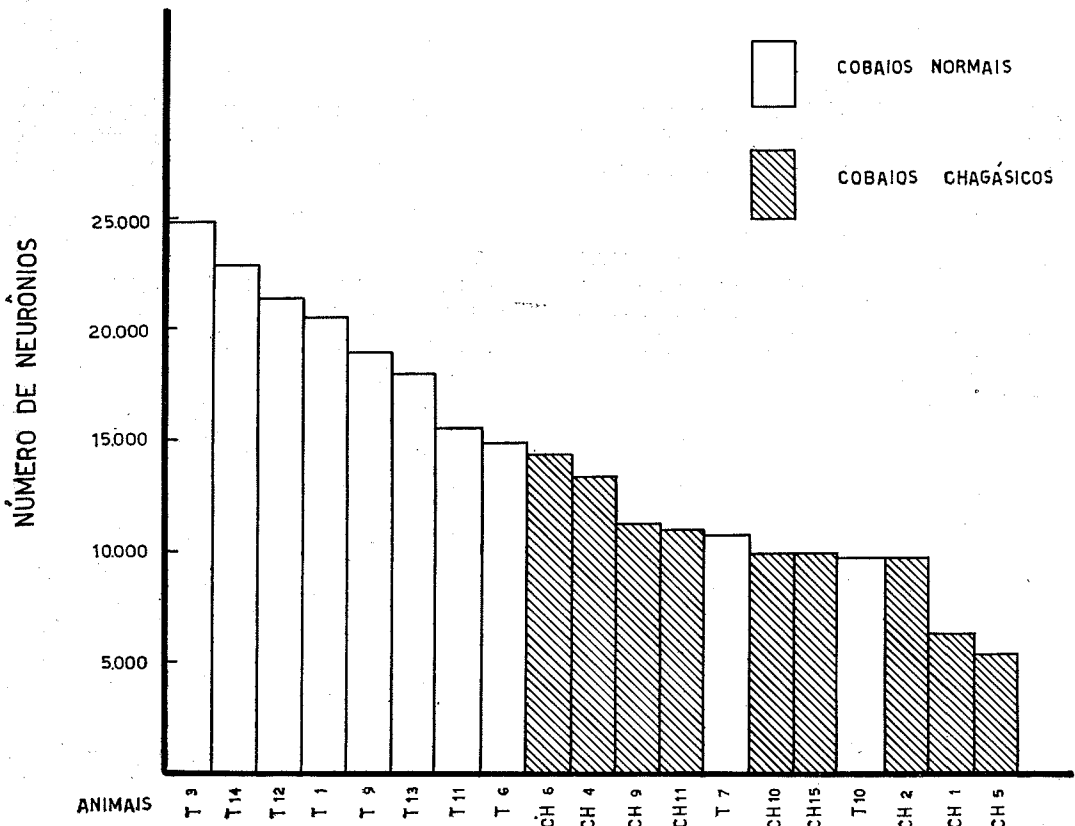


Fig. 1 — Ordenação dos valores das contagens de neurônios do gânglio pélvico justaprostático do plexo hipogástrico inferior, em animais controles e de animais chagásicos. ( $M = 9$  e  $N = 10$ )

ma de grumos condensados na periferia da célula, mas ora sob a forma pulverulenta ou mesmo não sendo observada sob a forma de grumos, mas substituída por uma basofilia homogênea do citoplasma.

As células satélites mostram-se desorganizadas e exibindo núcleos hiper cromáticos (Fig. 3).

*Pêso dos testículos* — Na Tabela II estão os valores dos pêsos dos testículos D e E dos animais contrôles e dos animais chagásicos.

Cotejando os valores dos pêsos dos testículos D e E dos cobaios contrôles, com os dos chagásicos, verifica-se uma diminuição de cerca de 44,48% e 43,63% respectivamente para os testículos D e E.

*Valôres em  $\mu^2$  das áreas de túbulos seminíferos com espermatogênese normal* — Nas

preparações histológicas dos testículos dos animais contrôles e dos animais chagásicos, efetuamos a medida da área de 20 túbulos cortados transversalmente, com luz regular e apresentando espermatogênese normal. Algumas preparações, ao exame microscópico, apresentaram sinais de retração e por tal razão, foram rejeitadas.

A Fig. 4 mostra os valôres em  $\mu^2$  das áreas de secções de túbulos seminíferos, obtidas através da planimetria. Cada barra, no gráfico, representa o valor médio da área de 20 túbulos de um animal.

Pelo teste do chorrilho, entre os valôres das médias das áreas dos túbulos seminíferos dos animais chagásicos e dos animais contrôles, obtem-se os valôres de  $M = 12$  e  $N = 14$ . O ponto crítico para  $M = 12$  e  $N = 14$  é 9, ao nível da significância de 5%. O valor observado na tabela, foi 6, portanto, significativo. Este resultado re-

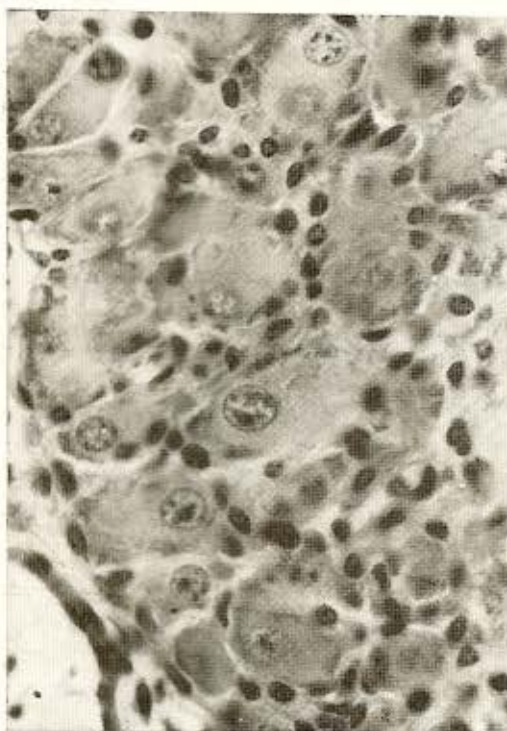


Fig. 2 — Neurônios do gânglio pélvico justaprostático do plexo hipogástrico inferior de um animal controle, corados pela hemalumen e eosina. 457 x

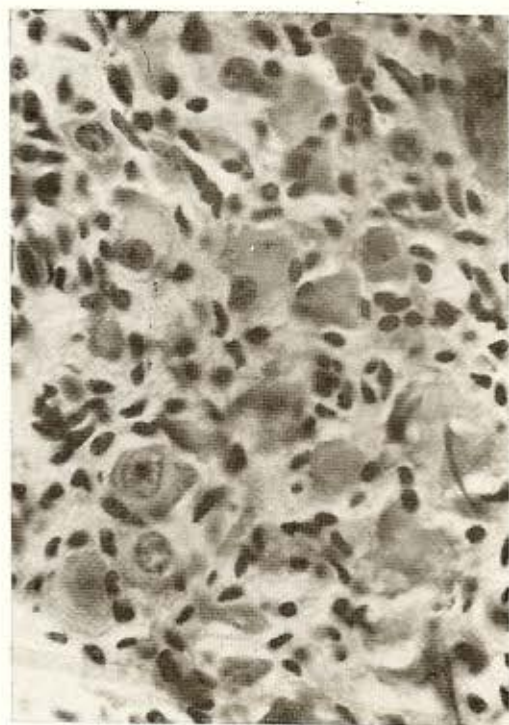


Fig. 3 — Neurônios do gânglio pélvico justaprostático do plexo hipogástrico inferior de um animal chagásico, corados pela hemalumen e eosina. 457 x

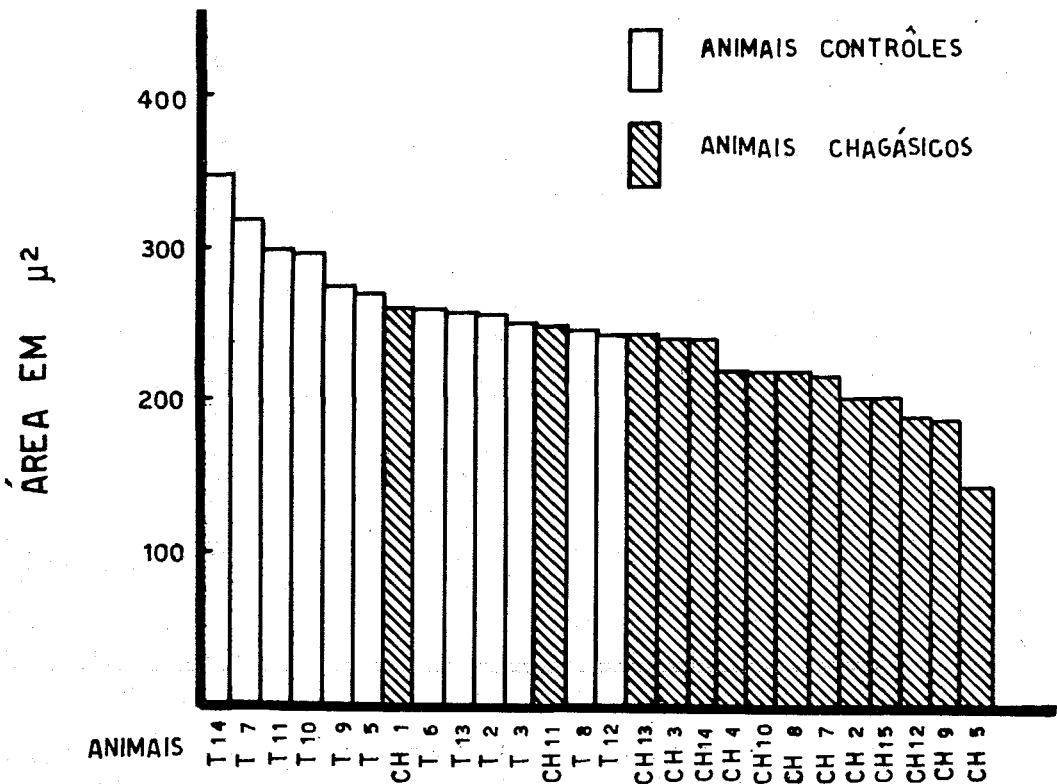


Fig. 4 — Ordenação dos valores das áreas da secção transversal de túbulos seminíferos com espermatogênese normal, de animais contrôles e animais chagásicos (M = 12 e N = 14). Cada barra do gráfico representa o valor médio expresso em  $\mu^2$  da área planimétrica de 20 túbulos seminíferos.

TABELA II

Pêso, em miligramas, dos testículos dos cobaios contrôles e dos cobaios chagásicos

Cobaios contrôles	Testículos		Cobaios Chagásicos	Testículos	
	D	E		D	E
T <sub>1</sub>	1295	1357	Ch <sub>1</sub>	677	732
T <sub>2</sub>	1160	1219	Ch <sub>2</sub>	844	877
T <sub>3</sub>	985	1209	Ch <sub>3</sub>	944	1023
T <sub>4</sub>	1347	1344	Ch <sub>4</sub>	925	741
T <sub>5</sub>	1279	1279	Ch <sub>5</sub>	489	925
T <sub>6</sub>	1424	1522	Ch <sub>6</sub>	860	872
T <sub>7</sub>	1231	1223	Ch <sub>7</sub>	799	796
T <sub>8</sub>	1452	1459	Ch <sub>8</sub>	964	670
T <sub>9</sub>	971	1017	Ch <sub>9</sub>	534	330
T <sub>10</sub>	1256	1272	Ch <sub>10</sub>	592	646
T <sub>11</sub>	1915	1915	Ch <sub>11</sub>	474	549
T <sub>12</sub>	1482	1465	Ch <sub>12</sub>	846	999
T <sub>13</sub>	1104	1090	Ch <sub>13</sub>	720	930
T <sub>14</sub>	1095	1143	Ch <sub>14</sub>	847	867
T <sub>15</sub>	1455	1496	Ch <sub>15</sub>	260	288
$\bar{M}$	1293	1334	$\bar{M}$	718	752
Sm	196	179	Sm	169	183

$\bar{M}$  = média      Sm = erro padrão da média



Fig. 6 — Cortes de testículo de cobaio chagásico, com 7  $\mu$  corados pelo P.A.S. + Hemalumen (aumento cêrca de 5  $\times$ ).  
A) Lesão focal periférica. B) Lesão focal, em cunha.

microscópio, chama a atenção o fato de que as alterações do epitélio germinativo apresentavam um caráter nitidamente focal, ora abrangendo secções de túbulos da periferia da preparação, ora abrangendo secções de túbulos desde a periferia até o centro da preparação, com uma nítida disposição em forma de cunha (Fig. 6).

Ao lado dos túbulos lesados encontram-se túbulos nos quais a espermatogênese é normal, tornando-se fácil identificar os diferen-

tes estádios do ciclo espermatogênético. Outras vêzes, o túbulo se apresenta com número de células francamente reduzido, embora estejam presentes as várias gerações de células (Fig. 7).

Um exame mais detalhado permite identificar dois tipos de lesões do epitélio germinativo:

1) Secções tubulares nas quais as alterações do epitélio germinativo se caracteri-

za pela ausência de uma ou mais gerações de células.

2) Secções tubulares nas quais o epitélio germinativo desaparece, restando junto à membrana tubular apenas células de Sertoli e células com características de células "epitelióides".

A despovoação celular é de graus variados e as secções tubulares apresentam-se com um ou vários dos seguintes aspectos:

a) Secções de túbulos nas quais encontram-se ora uma geração de espermatogônias de tipo A, ora espermatogônias de tipo B;

b) Secções, cuja geração de células mais evoluída é o espermátócito de 1.<sup>o</sup> ordem,

tipo "Resting" (pré-leptotênico), associado a poucos espermátócitos de 1.<sup>o</sup> ordem no estágio paquíteno;

c) Secções cuja célula mais evoluída é o espermátócito de 1.<sup>o</sup> ordem no estágio paquíteno;

d) Secções nas quais, além da geração de espermatogônias só existem células de Sertoli. É característica dos túbulos lesados a ausência completa de espermiogênese. Como consequência, da ausência de uma ou mais gerações de células e da espermiogênese, torna-se impossível a identificação do estágio do ciclo espermatogênético.

São frequentes alterações morfológicas que se traduzem por: aumento de reatividade do material P.A.S. positivo no citoplasma

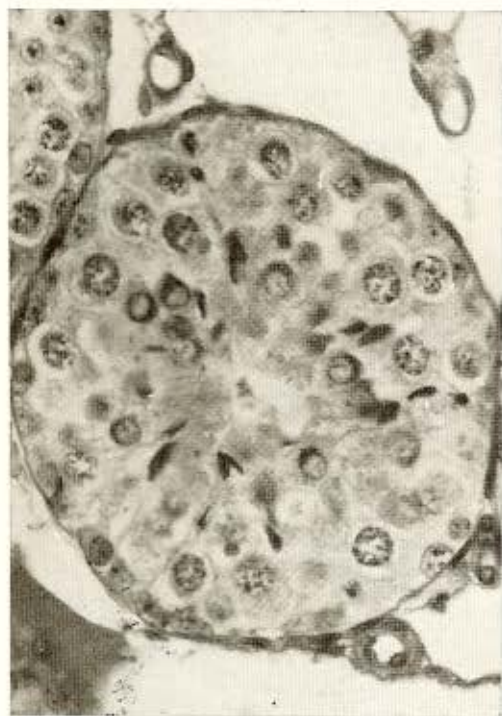


Fig. 7 — Corte de testículo de cobaio chagásico. Secção de um túbulo no qual se observa um número reduzido de espermátides, algumas deformadas. Duas gerações de espermátócitos e espermatogônias junto à membrana tubular. Corte de 7  $\mu$  corado pelo P.A.S. + Hemalumen. 520  $\times$

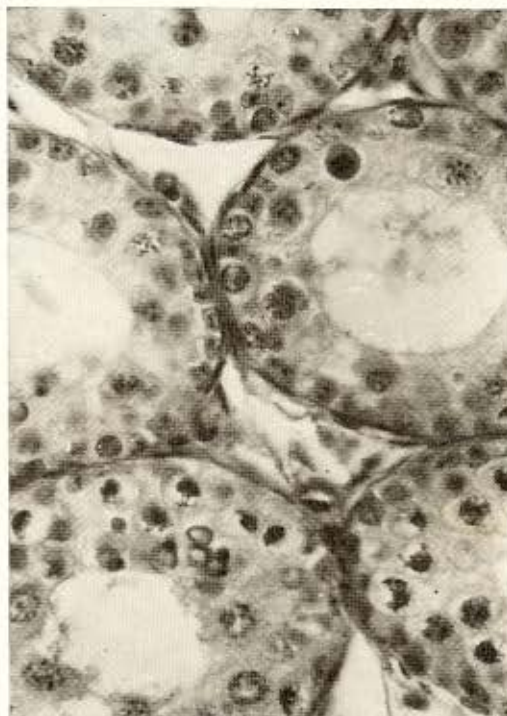


Fig. 8 — Corte de testículo de cobaio chagásico. A pobreza celular e a ausência de espermátides, não permite a identificação do estágio tubular do ciclo. Pode-se observar alterações morfológicas, especialmente nos núcleos dos espermátócitos I no estágio paquíteno e Leptoteno. Corte de 7  $\mu$  corado pelo P.A.S. + Hemalumen. 560  $\times$





Fig. 9 — Corte de testículo de cobaio chagásico. Epitélio germinativo reduzido à presença de espermatogônias e células de Sertoli. Corte de 7  $\mu$  corado pelo P.A.S. + Hemalum. 560  $\times$

do espermátocito de 1.<sup>o</sup> ordem paquíteno (Fig. 8). Cariopícnose e cariólise em núcleos dos espermátocitos de 1.<sup>o</sup> ordem no estágio leptóteno. As gerações de espermatogônias quase sempre presentes apresentavam-se sem alterações, exibindo figuras de mitoses bem conservadas. Mesmo nas secções de túbulos em que há o desaparecimento dos espermátocitos, as espermatogônias de tipo A, estão sempre presentes, bem como as espermatogônias tipo intermediário e tipo B. Em muitos túbulos pode-se evidenciar também deformações do núcleo das espermátides e alterações do acrosoma.

Em vários animais, as lesões são caracterizadas pela ausência completa do epitélio germinativo em várias secções tubulares, apresentando apenas o epitélio Sertoliano e raras espermatogônias. Em alguns túbulos o epitélio germinativo desaparece e é substituído por grandes vacúolos que ocupam

área correspondente junto à membrana tubular (Fig. 9).

*Pêso dos epidídimos* — Na Tabela III estão os valores em miligramas, do pêso dos epidídimos D e E dos coelhos controles e dos cobaios chagásicos.

Os epidídimos D e E dos cobaios controles pesam cerca de 48,6% e 45,3% mais que os correspondentes dos animais chagásicos.

*Aspectos histológicos do epidídimo* — O estudo histológico comparativo nas preparações do epidídimo, permite evidenciar dois aspectos que estão presentes em todos os epidídimos dos cobaios chagásicos:

a) uma atrofia geral do epidídimo evidenciada por uma acentuada diminuição do tamanho das secções do ducto dos epidídimos;

b) uma reduzida quantidade de espermatozóides, na luz do epidídimo.

Esses aspectos estão evidentes nas Figs. 10 e 11.

Em alguns animais chagásicos o epitélio epididimário mostrava-se mais baixo (Fig. 12). O material corável pelo P.A.S. mostra-se, no epitélio dos cobaios normais, sob a forma finamente granulosa, enquanto que nos cobaios chagásicos o material P.A.S. positivo se dispõe quase sempre sob a forma de grumos grosseiros.

*Aspectos das fibras e terminações do sistema nervoso autônomo no epidídimo* — A técnica de Champy (ósmio-iodofilia) foi proposta inicialmente para a visualização das fibras nervosas autônomas e consideradas como específica para a demonstração de fibras adrenérgicas. Entretanto, HILLARP<sup>18</sup> demonstrou que em animais reserpinizados, nos quais há o desaparecimento do mediador adrenérgico, as fibras adrenérgicas ainda eram evidenciadas pela ósmio-iodofilia, não sendo a noradrenalina a substância responsável pela ósmio-iodofilia das fibras adrenérgicas. Posteriormente, CRUZ<sup>12</sup>, após simpatectomia cervical em coelhos, demonstrou a presença de fibras coradas pela

FERREIRA, A. L. — Patogênese das lesões testiculares e epididimárias em cobaios infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:69-87, 1970.

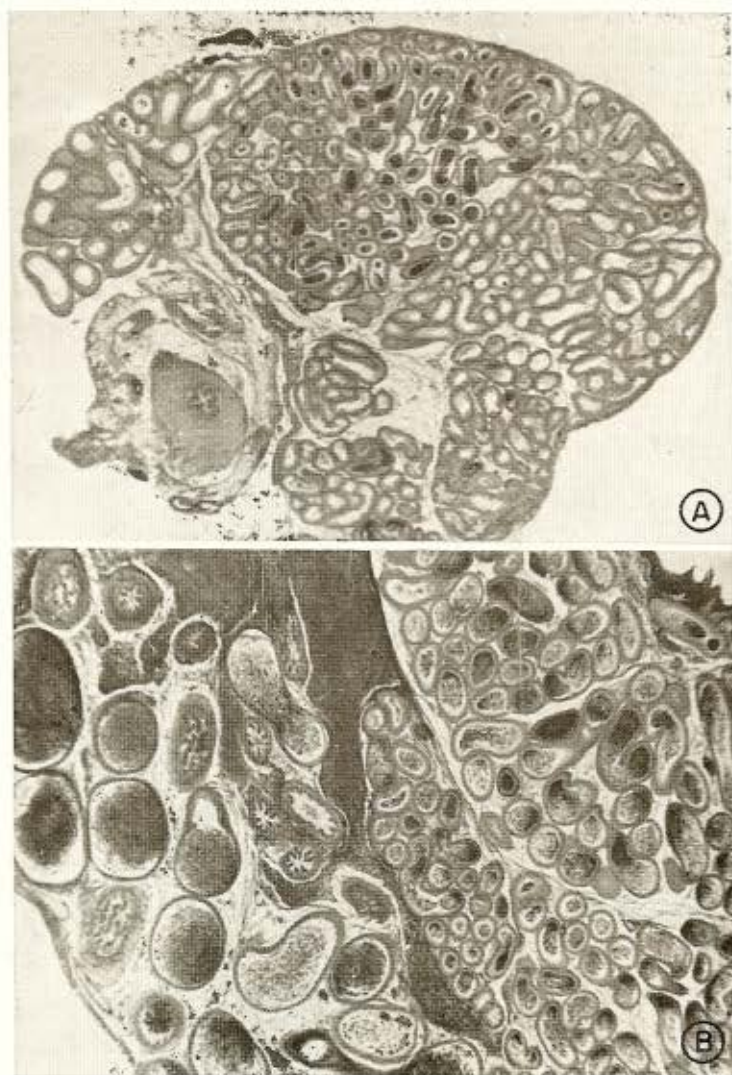


Fig. 10 — Cortes de epididimo com  $7 \mu$  corados pelo P.A.S. + Hemalumen. A) Coboio chagásico. B) Coboio contróle. (Aumento cêrca de  $14 \times$ )

técnica de Champy, na glândula submaxilar, concluindo que a técnica da ósmio-iodofilia cora fibras simpáticas e parassimpáticas.

Com o emprêgo dessa técnica, pudemos estudar comparativamente as fibras e terminações autônomas do epidídimo em cobaios normais e chagásicos.

Nos cobaios normais as fibras e terminações, evidenciadas através da técnica de Champy, dão a impressão de continuidade,

podendo ser seguidas por longos trajetos. Não apresentam engrossamentos mas uma tortuosidade contínua ao longo da fibra. As terminações justaepiteliais são finas e não apresentam dilatações (Fig. 13).

Nos cobaios chagásicos as fibras e terminações da parede do ducto do epidídimo ou justaepiteliais, mostram-se hiperconradas e grossas. Algumas vêzes, o material ósmio-iodofílico parece se acumular ao longo da fibra, conferindo o aspecto em "rosário" à

mesma. Não se observa o aspecto de tortuosidade e continuidade das fibras. As terminações justaepiteliais são grosseiras, com dilatações em “clavas” e hipercoradás (Fig. 14).

#### DISCUSSÃO

*Número de neurônios do gânglio pélvico justaprostático* — O número médio de neurônios do gânglio pélvico justaprostático do plexo hipogástrico inferior apresenta-se re-

duzido nos cobaios chagásicos. Essa redução é de cerca de 43,22% quando comparado com o número médio de neurônios do gânglio dos cobaios contróles.

Paralelamente a essa redução do número médio de neurônios associam-se alterações tróficas dos testículos e dos epidídimos e alterações da espermatogênese. Essa massa ganglionar na qual efetuamos as contagens de neurônios foi denominada por COUJARD<sup>5</sup>, “Gânglio próstato-vesículo-deferen-



Fig. 11 — Cortes de epidídimo com 7  $\mu$  corados pelo P.A.S. + Hemalumen. A) Cobalo chagásico. B) Cobalo contróle. 82,5  $\times$

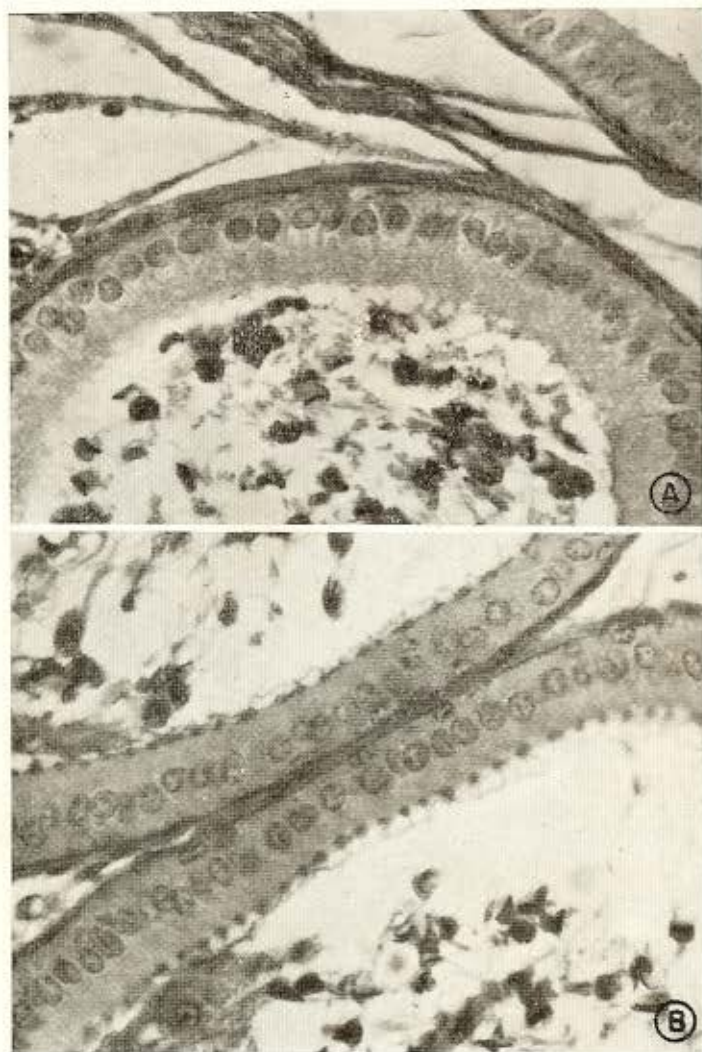


Fig. 12 — Cortes de epidídimo com 7  $\mu$  corados pelo P.A.S. + Hemalumen. A) Cobaio normal. B) Cobaio chagásico. 500 X

cial” e corresponderia no homem à porção prostática do plexo hipogástrico inferior.

A participação do plexo hipogástrico inferior na inervação do testículo e do epidídimo ainda é contestada por alguns Autores.

Assim, segundo DELMAS & LAUX<sup>13</sup> considerando “*a priori*”, o desenvolvimento embriológico da gônada impõe-se para a sua inervação, uma origem alta, através do plexo espermático. Para êsses Autores, o plexo deferencial não deveria intervir na inerva-

ção do testículo. Entretanto, LAUX & BOURGUET<sup>25</sup> (em DELMAS<sup>13</sup>), em estudos efetuados sobre a inervação do testículo do touro e sobre a inervação do testículo humano, demonstraram que na face interna da cauda do epidídimo e no polo posterior do testículo a inervação é suprida por ramos terminais do plexo deferencial. COUJARD<sup>10</sup>, após uma série de experiências em cobaios, admite que além da via deferencial demonstrada por LAUX & BOURGUET, o sistema gânglio-plexo perideferencial, embora em-

biologicamente secundário, representa a parte essencial da inervação testicular, não obstante, uma parte das fibras deste sistema chegue ao gânglio através do ureter, originadas de neurônios situados em níveis mais altos.

A literatura a respeito do plexo hipogástrico inferior embora numerosa, relaciona apenas o contingente e a origem das fibras que participam da constituição do plexo,

sem mencionar, entretanto, se os gânglios incluídos no plexo são constituídos de neurônios simpáticos ou parassimpáticos. Apenas PEELE<sup>30</sup> e TARDIEU & TARDIEU<sup>32</sup> assinalam o fato de que tanto fibras simpáticas pré-ganglionares, como fibras parassimpáticas encontram dentro do plexo hipogástrico inferior neurônios simpáticos pós-ganglionares ou justaviscerais estabelecendo aí "relês" (sinapses) de onde partem fibras pós-gan-

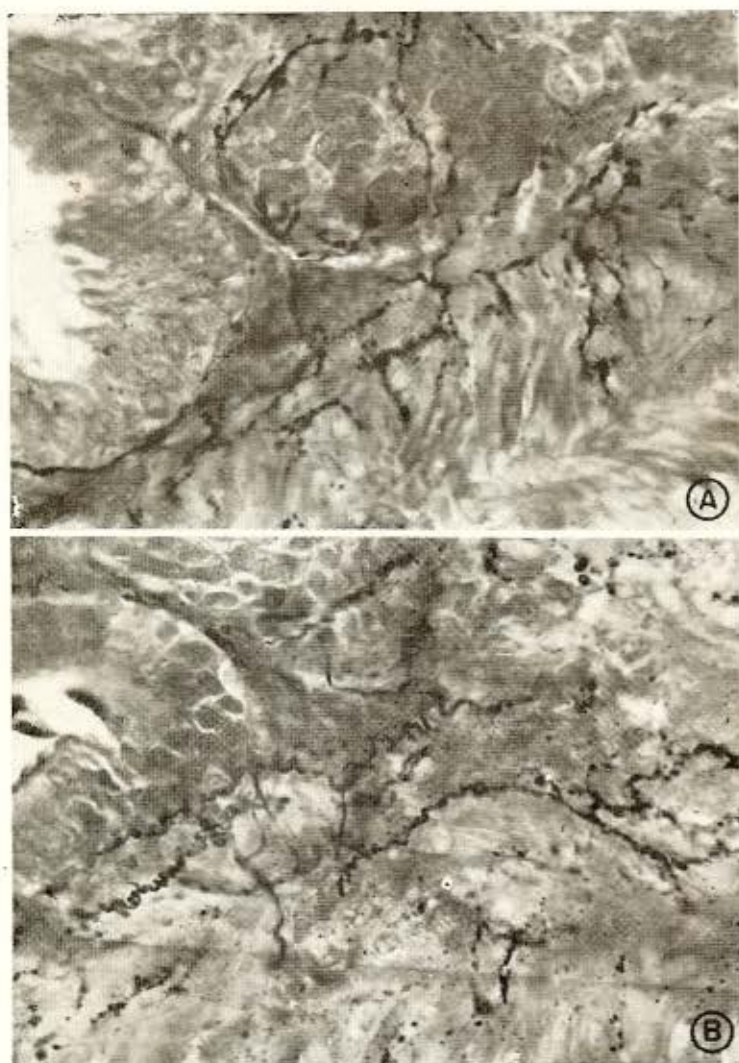


Fig. 13 — A e B) Fibras e terminações autônomas do epidídimo em cobaios normais. Corte de 10  $\mu$  corados pela técnica de Champy. 560  $\times$

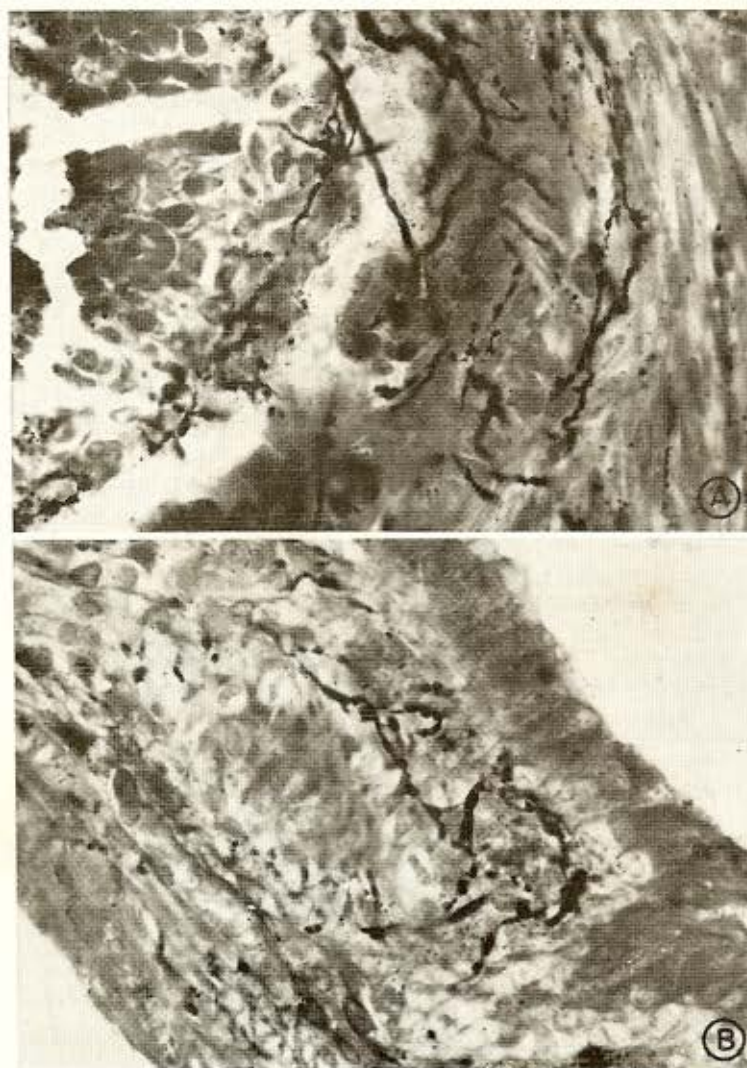


Fig. 14 — A e B) Fibras e terminações autônomas do epididimo de cobaios chagásicos. Cortes de 10  $\mu$  corados pela técnica de Champy. 560  $\times$

glionares para as vísceras pélvicas. Tudo leva a crer, portanto, que no cobaio, como no homem, dentro da massa ganglionar justaprostática existem neurônios simpáticos e parassimpáticos.

Desta maneira, a destruição com consequente redução do número de neurônios do gânglio pélvico justaprostático dos cobaios chagásicos, deve ter incluído neurônios simpáticos, e neurônios parassimpáticos.

*Lesões testiculares e epididimárias* — Os cobaios inoculados apresentaram três meses após, lesões testiculares e epididimárias, caracterizadas por uma acentuada atrofia desses órgãos e alterações da espermatogênese. A atrofia dos testículos foi demonstrada, em primeiro lugar, pela redução do peso dos testículos D e E dos cobaios chagásicos, de respectivamente 44,48% e 43,63% quando comparados com os pesos dos testículos dos animais controles. Evidenciamos ainda a

atrofia testicular, pela medida da área dos túbulos seminíferos cortados transversalmente e com espermatogênese normal. Em 14 cobaios chagásicos apenas dois, apresentaram secções tubulares com áreas equivalentes às dos cobaios contrôles. A explicação para êste fato deve estar na redução geral do número de células nos túbulos, embora com seqüência espermatogenética normal.

A atrofia dos epidídimos, avaliada pelo pêso dos epidídimos dos cobaios chagásicos comparados aos dos cobaios contrôles, mostrou uma redução do pêso dos epidídimos D e E dos animais chagásicos de 48,7% e 45,3%, respectivamente. Parte desta redução do pêso deve estar relacionada com uma diminuição da produção de espermatozóides visto que, ao exame microscópico dos epidídimos dos cobaios chagásicos, êstes mostravam-se sempre com pequena quantidade de espermatozóides acumulados. No coelho, KIRTON & col.<sup>19</sup>, admitem que na cauda do epidídimo acumula-se  $79 \pm 3\%$  do esperma extra-gonadal.

As lesões testiculares apresentam sempre o caráter de focais e compreendem alterações da espermatogênese que se traduzem por danos cinéticos e morfológicos. A intensidade do dano celular, em alguns cobaios chagásicos, leva ao desaparecimento do epitélio germinativo e os túbulos adquirem o aspecto de túbulos pré-púberes. O desaparecimento de uma ou de várias gerações de células em muitos túbulos, caracteriza o "dano cinético", FOX & MARGARET FOX<sup>15</sup>. Em ambos os casos a redução do epitélio germinativo pode ser mais ou menos intensa, restando porém as células de Sertoli e as espermatogônias tipo A. A presença de espermatogônias tipo A (que são as células que garantem a perpetuação da espermatogênese enquanto existam), mesmo em secções tubulares que exibem acentuado dano celular, leva-nos a admitir sejam estas células, dificilmente lesadas; conseqüentemente, as outras gerações de células são mais suscetíveis à destruição.

A espermiogênese (que se inicia com o aparecimento da espermátide e vai até a expulsão do espermatozóide maduro, na luz dos túbulos), está abolida em muitos túbulos embora os espermatozócitos da 1.<sup>a</sup> ordem atinjam o estágio paquíteno. É freqüente nos

animais chagásicos o encontro de alterações morfológicas. Essas são mais evidentes nos espermatozócitos de primeira ordem nos estágios de leptóteno até paquíteno e nas espermátides.

O único trabalho a respeito de lesões testiculares é o de VIANNA<sup>34</sup>, que estudou as alterações testiculares na fase aguda da Moléstia de Chagas, em cobaios inoculados experimentalmente. Êsse Autor descreve, na fase aguda, a presença de células carregadas de parasitas, "geralmente redondo", mas, por vezes, "já flagelados". Admite que êsse parasitismo é o responsável pela lesão parcial ou total dos túbulos. Refere, ainda, a presença de um infiltrado leucocitário no "tecido de sustentáculo" da glândula e que a reação inflamatória pericanalicular afeta não somente "tubos" parasitados como também "tubos" íntegros. Entretanto, a pobreza de detalhes relacionados com a identificação dos tipos celulares do epitélio germinativo parasitado ou lesado e a ausência de elementos que nos permitam avaliar os danos causados pelo parasitismo da fase aguda, não permite cotejar os nossos achados com os daquele Autor.

Quer nos parecer que, na fase aguda, o parasitismo e os efeitos tóxicos da destruição do parasita e a conseqüente inflamação e o edema, sejam suficientes para explicar as lesões em diferentes áreas da glândula.

Entretanto, uma vez que o organismo parasitado tenha possibilidades de desenvolver uma defesa imunobiológica, há o desaparecimento do parasitismo e da inflamação. Isto possibilitaria, conseqüentemente, a reparação ou cicatrização dos túbulos. A cicatrização nos túbulos muito lesados, tenderia a se fazer através de hialinizações e fibrose. Por outro lado, a regeneração do epitélio germinativo poderia se fazer a partir das espermatogônias tipo A, que estão sempre presentes, mesmo em túbulos lesados. É fato provado a regeneração do epitélio germinativo quando lesado por diversos agentes nocivos (radiação, calor), a partir das espermatogônias A não lesadas, OAKBERG<sup>27, 28</sup>, CHOWDHURY & STEINBERGER<sup>3</sup>.

Os testículos dos cobaios chagásicos, não mostram fibrose ou hialinizações. Torna-se, portanto, difícil conciliar a atrofia e as al-

terações cinéticas da espermatogênese, e o caráter focal das lesões nesta fase, como conseqüentes a um parasitismo e inflamação.

A explicação para êsses achados só poderia estar relacionada com a destruição de neurônios observada no gânglio pélvico justaprostático. Essa suposição está apoiada em uma extensa série de experiências realizadas por COUJARD<sup>5, 6, 7, 8, 9 e 10</sup>. Esse Autor obtinha, através da destruição unilateral do gânglio próstato-vesículo-deferencial de cobaios (por cauterização, nicotinização ou irritação implantando corpos estranhos no gânglio), assimetrias do desenvolvimento da próstata, das vesículas seminais e do ducto deferente; perturbações da espermatogênese, e, em um terço dos casos, anomalias da migração do testículo. A cauterização unilateral do gânglio, praticada em cobaios de 200 g de peso, dava resultados variáveis segundo a precisão e a extensão da lesão ganglionar. Com grande freqüência obtinha, com a destruição do gânglio de animais impúberes, distúrbios da espermatogênese. A nicotinização unilateral do gânglio de cobaios impúberes, provocava após 3 ou 4 meses, alterações ou mesmo supressão da espermatogênese em túbulos do polo epididimário do testículo ou, às vezes, essas alterações eram representadas por uma atrofia de túbulos da periferia do órgão. Lesões semelhantes foram constatadas após a implantação de "espinhos" de roseira no gânglio. A cauterização unilateral do gânglio próstato-vesículo-deferencial do cobaio, segundo COUJARD, provoca, com uma grande constância, azoospermia do testículo homolateral. O testículo contra lateral apresenta-se com espermatogênese normal.

Uma lesão incompleta do gânglio provocava apenas lesões localizadas da espermatogênese. Resultados semelhantes foram obtidos com a fenolização do cordão espermático de um só lado. As diferenças de peso obtidas com a fenolização do cordão eram equivalentes às obtidas através da cauterização do gânglio, sendo a relação do peso 1:8, estando atrofiado o testículo do mesmo lado da lesão. Essas experiências de COUJARD nos fornecem elementos necessários para admitirmos a destruição neuronal como um dos fatores responsáveis pelas alterações da espermatogênese no cobaio chagá-

sico, visto que as características das lesões testiculares obtidas por COUJARD são superponíveis às que encontramos nos testículos dos animais inoculados com *Trypanosoma cruzi*.

Não existe, entretanto, uma relação entre a intensidade de destruição dos neurônios do gânglio e o grau de atrofia, avaliada através do peso dos testículos e dos epidídimos.

Segundo COUJARD, existem dentro do gânglio próstato-vesículo-deferencial, grupos de neurônios funcionalmente diferentes. Um grupo de neurônios se relaciona com o estado funcional do testículo, cuja destruição leva à uma inibição de espermatogênese; e outro grupo de neurônios está relacionado com o trofismo do tracto genital. Através de experiências nas quais realizava ora a criptorquidia experimental ora a orquidopexia unilateral em cobaios pré-púberes, COUJARD pôde demonstrar que as alterações se restringiam a um grupo de células dentro do gânglio, enquanto outras células permaneciam sem alterações. Estas, representariam o contingente de células relacionadas com o trofismo da gônada. Admitindo-se que a destruição neuronal provocada pela Moléstia de Chagas se faça indistintamente, destruindo neurônios relacionados com o trofismo da gônada e neurônios relacionados com o estado funcional da gônada, poderíamos admitir a não relação entre o grau de destruição neuronal e o grau de atrofia. Concluimos pois, que a destruição de neurônios do gânglio pélvico justaprostático do plexo hipogástrico inferior dos cobaios, é o fator responsável pelas alterações da espermatogênese, e pela atrofia testicular e epididimária. Essas alterações tróficas dos testículos e dos epidídimos e mais as características das lesões do epitélio germinativo, caracterizam uma "orquiopatia" e uma "epididimopatia" pós-chagásicas.

Constatamos ainda, através da técnica de Champy, que as fibras e terminações autonomas do epidídimo dos cobaios chagásicos apresentam alterações sugestivas de degeneração. Essa mesma técnica empregada por COUJARD & PERIE<sup>11</sup>, para estudo da degeneração de fibras autonomas pós-ganglionares após secção do deferente, evidenciou certos aspectos degenerativos das fibras que se as-



semelham aos encontrados em nosso material. A única interpretação possível para explicar essas alterações é a de que sejam fibras pós-ganglionares de neurônios que se localizam no gânglio pélvico juxtaprostático e foram lesados ou destruídos.

#### SUMMARY

*Pathogenesis of the lesions of the testis and epididymis of guinea-pigs experimentally infected with Trypanosoma cruzi*

This is a study on the pathogenesis of the lesions which occur in testis and in the epididymis of guinea-pigs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. It is demonstrated that the number of neurons in the juxtaprostatic pelvic ganglion of the inferior hypogastric plexus is significantly lowered in the infected animals, a finding consistent with Koberle's pathogenetic concepts on Chagas disease<sup>20</sup>. The measurements of the weight of the organs studied and of the areas of sectioned seminiferous tubules indicate an intense atrophy of these organs in the inoculated animals.

Characteristic alterations are exhibited by the seminiferous epithelium after infection, involving inhibition of the process of spermatogenesis beyond certain stages (kinetic data) and morphological changes mainly in the first order spermatocytes at leptoteme and pachyneme. The disturbances are restricted to focal areas in the testes.

The application of the technique of osmium-iodophylia<sup>2</sup> allowed observations on the autonomic fibers and their endings in the epididymis which are suggestive of degeneration, ascribable to the lesion of the neurons of the juxtaprostatic pelvic ganglion.

The trophic alterations of the seminiferous epithelium are comparable to those obtained by COUJARD<sup>19</sup> through mechanical, chemical and irritative lesions of the deferential prostatic-vesicular ganglion in guinea-pigs.

The results are consistent with the hypothesis according to which the destruction of the neurons of the juxtaprostatic pelvic gan-

glion in the main factor of the morphological and trophic alterations which may be put under the name "post-chagasic orchio-pathy and epididymopathy".

#### AGRADECIMENTOS

O Autor consigna agradecimentos ao Dr. HENI SAUAIA e aos técnicos HÉLIO ROMUALDO ROCHA e EURIPEDES NEVES pela valiosa colaboração prestada à execução da presente investigação.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRENER, Z. — *Contribuição ao estudo da terapêutica experimental de Doença de Chagas*. Tese. Faculdade de Odontologia de Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 1961.
2. CHAMPY, G. — Granules et substance réduisant l'iodure d'osmium. *J. Anat. (Paris)* 49:323-343, 1913 (citado por CRUZ, 1962).
3. CHOWDHURY, A. K. & STEINBERGER, E. — A quantitative study of the effect of head germinal epithelium of rat testes. *Amer. J. Anat.* 115:506-524, 1964.
4. CLERMONT, Y. — Cycle of the seminiferous epithelium of guinea-pig. A method for identification of the stages. *Fert. Steril.* 11:563-573, 1960.
5. COUJARD, R. — (Em COUJARD, R., 1954).
6. COUJARD, R. — Retentissement de lésions ganglionnaires sympathique sur le réceptivité aux hormones sexuelles. *C. R. Soc. Biol.* 144:1360, 1950a.
7. COUJARD, R. — Action du sympathique terminal sur le sensibilité aux hormones gonadotropes. *C. R. Soc. Biol.* 145:1492, 1951b.
8. COUJARD, R. — Asymétrie du tractor genital male après destruction d'un ganglion prostatico-vésiculo-déferential. *C. R. Soc. Biol.* 145:1470-1472, 1951.
9. COUJARD, R. — Effects sur le testicule et l'épididyme de la phenolisation des fibres nerveuses. *C. R. Soc. Biol.* 145:704-706, 1951.
10. COUJARD, R. — Contribution à l'étude des voies nerveuses sympathiques du testicule. *Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exp.* 43:321-364, 1954.

11. COUJARD, R. & PÉRIE, G. — Etapes de la dégénérescence des fibres végétatives et du réseau terminal, avec  $O_3$ ,  $O_4$ ,  $I_2$ , Zn. *C. R. Ass. Anat.*, 134:253-256, 1966.
12. CRUZ, A. R. — Histochemical significance of the osmium-iodide method for autonomic nerves. *Acta Anat.* 49:232-235, 1962.
13. DELMAS, J. & LAUX, G. — *Système nerveux sympathique*. Paris, Masson, 1952.
14. FERREIRA, A. L. & OLIVEIRA, J. S. M. — Volume do sêmem obtido por eletro-ejaculação de ratos chagásicos (inoculados experimentalmente). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:127-150, 1965.
15. FOX, B. W. & FOX, M. — Biochemical aspects of the actions of drugs on spermatogenesis. *Pharmac. Reviews* 19:21-57, 1967.
16. FREITAS, J. L. P.; LION, M. F. & TARTARI, J. — Resultados de uma investigação sobre Moléstia de Chagas realizada no Município de Marília e outros, com estudo clínico de dois casos de doença. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. Univ. São Paulo* 8: 81-92, 1953.
17. HADDAD, J.; RAIA, A. & ERHARDT, E. A. — Estudo das atividades sexuais nos pacientes portadores de megacôlon, antes e após a retossigmoidectomia abdominopereineal. *Rev. Paul. Med.* 55:343-354, 1959.
18. HILLARP, N. A. — On the histochemical demonstration of adrenergic nerves with osmic acid-sodium iodide technique. *Acta Anat.* 38:379-384, 1959.
19. KIRTON, K. T.; DESJARDINS, C. & HAGS, F. D. — Distribution of sperm in male rabbits after various ejaculation frequencies. *Anat. Rec.* 158:287-292, 1967.
20. KÖBERLE, F. & NADOR, E. — Etiologia e patogenia do megacôlon no Brasil. *Rev. Paul. Med.* 47:643-661, 1955.
21. KÖBERLE, F. — Patogenia da Moléstia de Chagas: estudo dos órgãos musculares ócos. *Rev. Goiana Med.* 3:155-180, 1957.
22. KÖBERLE, F. — Moléstia de Chagas. Enfermidade do sistema nervoso. An. Cong. Intern. Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Oficina Gráfica Univ. Brasil 2:691-716, 1961.
23. KÖBERLE, F. — Patologia da Moléstia de Chagas. *Medicina Rev. do Centro Acadêmico Rocha Lima, da Faculdade de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo* 1: 73-98, 1962.
24. KÖBERLE, F. — Fisiopatologia da Moléstia de Chagas. *VII Congresso Internacional de Medicina Tropical*. Rio de Janeiro, 1963.
25. LAUX, G. & BOURGUET, F. — Les nerfs de l'appareil testiculaire épididymaire du taureau. *Ann. Anat. Path.* (t. XI), n.º 2, 1934. (DELMAS & LAUX, 1952).
26. LISON, L. — *Histochimie et Cytochimie Animales. Principes et Méthodes*. 3<sup>me</sup> Ed. Paris, Gauthiers-Villars, 1960.
27. OAKBERG, E. F. — Degeneration of spermatogonia of the mouse following exposure to X Rays, and stages in the mitotic cycle at which cell death occurs. *J. Morph.* 97:30-54, 1955.
28. OAKBERG, E. F. — Gamma-Ray sensitivity of spermatogonia of the mouse. *J. Exp. Zool.* 134:343-356, 1957.
29. OWEN, D. B. — *Handbook of Statistical Tables*. London, Addison-Wesley, Publishing Co., 1962.
30. PEELE, L. T. — *The Neuroanatomical Basis for Clinical Neurology*. New York, Mc Graw-Hill Book Company, 1954.
31. PIZZI, T. — *Inmonologia de la Enfermedad de Chagas*. Santiago, Universidad de Chile, pág. 187, 1957 (citado por BRENER).
32. TARDIEU, G. & TARDIEU, G. — *Le Systeme Nerveus Vegetatif*. Paris, Masson, 1948.
33. VASCONCELOS, E. & BOTELHO, G. — *Cirurgia do Megacôlon*. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1937.
34. VIANNA, G. — Contribuição para o Estudo da Anatomia Patológica da "Molestia de Carlos Chagas". Esquizotripanoze Humana ou Tireoidite Parasitária. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3:276-294, 1911.
35. WALD, A. & WOLFOWITZ, J. — On a test whether two samples are from the same population. *Ann. Math. Stat.* 11:147-162, 1940.

Recebido para publicação em 23/6/1969.