

**KAMILLA DIAS PAES SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS DÚCTULOS EFERENTES DE  
MURINOS, BOVINOS, EQUINOS E SUÍNOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Mariana Machado Neves

Coorientadora: Mônica Morais Santos

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586c  
2022  
Silva, Kamilla Dias Paes, 1996-  
Caracterização morfológica dos ductulos eferentes de  
murinos, bovinos, equinos e suínos / Kamilla Dias Paes Silva. –  
Viçosa, MG, 2022.  
1 dissertação eletrônica (48 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Mariana Machado Neves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Veterinária, 2022.

Referências bibliográficas: f. 45-48.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.505>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Reprodução animal. 2. Fecundidade. 3. Histologia  
veterinária. I. Neves, Mariana Machado, 1977-. II. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.082


**KAMILLA DIAS PAES SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS DÚCTULOS EFERENTES DE  
MURINOS, BOVINOS, EQUINOS E SUÍNOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 27 de julho de 2022.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 **KAMILLA DIAS PAES SILVA**  
Data: 25/08/2024 10:26:41-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Kamilla Dias Paes Silva**  
Autora

Documento assinado digitalmente  
 **MARIANA MACHADO NEVES**  
Data: 25/08/2024 15:46:05-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Mariana Machado Neves**  
Orientadora

*Com imenso amor, dedico este trabalho aos grandes pilares da minha vida: Deus, minha família e meus amigos. Vocês me inspiram e me dão forças para conquistar meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e proteção sublime. A fé tem sido meu maior bem, sendo fonte de fortaleza nas tribulações, sabedoria nas decisões e luz nos momentos de incerteza. *“Alguns passam pela vida como por um túnel, e não compreendem o esplendor, a segurança e o calor do sol da fé”* (São Josemaria Escrivá).

Aos meus pais, Elson e Luciana, e meus irmãos, Jéssica e Gabriel, por me amarem incondicionalmente, sempre me apoiando na busca por meus sonhos. Obrigada por me ensinarem o que verdadeiramente é valioso nesta vida. Amo vocês!

À Laura e Isabel que constantemente me ensinam inúmeras maneiras de amar. Vocês são minha alegria e minha saudade contínua. Amo vocês!

À minha família, sempre presente oferecendo suporte e aconchego em cada passo dado, comemorando todas as conquistas que tenho alcançado até aqui.

Aos inestimáveis amigos, sou eternamente grata por toda cumplicidade. Com especial carinho, recordo: Natalie, Alice, lasminzinha, Thaynara, Douglas, Amanda, Taynara, Diocélio, Sammy, Mateus, Fernanda, Thomás, Gustavo, Betânia, Chico, Daniel, Ana Gediél, Carlos, Thaís, Thayná e aos amigos do ASC e JSC. Obrigada por tudo e contem sempre comigo.

Aos amigos de Caetité, que me acolheram calorosamente num grande momento da minha vida, recordo: Karla e sua família, Ana Lívia, Joice, Keicy, Jéssica Maria, Maria Gabriela e Isis. Bem disse São Maximiliano Kobe, *“na companhia de amigos encontramos forças para alcançar nosso sublime ideal”*. A vocês, minha eterna gratidão por tudo o que fazem por mim.

À UFV por todas as oportunidades e apoio nestes 8 anos de dedicação acadêmica. Aos departamentos de Medicina Veterinária, Zootecnia e Biologia Geral, por toda estrutura e colaboração para a execução deste trabalho, bem como aos funcionários, técnicos e professores: Rosi, Tati, Mônica, Bruna, JD, Marcelo e Renata.

Com grande carinho, agradeço à professora Mariana Machado, por me orientar no desenvolvimento e conclusão desta pesquisa com paciência e sabedoria. Muito obrigada por todo apoio e conselhos.

À Mônica Morais por abraçar este projeto com entusiasmo e contribuição técnico-científica imprescindível para a realização do mesmo.

Ao LARAT expresso minha eterna gratidão. Com extrema competência e dedicação esta equipe esteve comigo em todas as etapas, sendo fundamental para a execução desta pesquisa. Em especial, ressalvo meu carinho e agradecimento aos pesquisadores e amigos Luiz, Renner, Thainá, Arabela, Mírian, Camila, Lara, Carlos, Isadora e demais estagiários que auxiliaram nesta pesquisa. Obrigada pela amizade, risadas, leveza e momentos de descontração. Sem vocês eu não teria conseguido.

As parcerias estabelecidas com o Laboratório de Biologia Estrutural - DBG, o hospital de Clínica e Cirurgia de Grandes Animais - DVT, a UEPE em Melhoramento de Suínos- DZO e o Centro Veterinário Ipê Branco.

Ao apoio e parceria dos colegas de profissão Domingos Netto, Leonardo Toledo, Guilherme Fausto, Betânia Barreiros e Francisco Franco.

Ao PROEX-Capes pela concessão da bolsa de estudos, imprescindível para o desenvolvimento desta pesquisa.

Por fim agradeço aos animais, que em sua bela essência me revelam a grandiosidade e da criação Divina.

*“Que a tua vida não seja uma vida estéril  
– Sê útil. – Deixa rastro. – Ilumina com o  
resplendor da tua fé e do teu amor”*

(São Josemaria Escrivá)

## RESUMO

SILVA, Kamilla D.P., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Caracterização morfológica dos ductos eferentes de murinos, bovinos, equinos e suínos.** Orientadora: Mariana Machado Neves. Coorientadora: Mônica Morais Santos.

Os ductos eferentes (DE) contribuem ativamente para as funções reprodutivas masculinas. Contudo, alterações em sua estrutura histológica têm sido correlacionados a causas de subfertilidade masculinas. Contudo, estudos que apontam as similaridades e diferenças histológicas e funcionais entre as espécies domésticas são escassos. O objetivo deste estudo foi caracterizar os aspectos morfológicos dos DE das espécies murina, bovina, equina e suína. Para tanto, cinco animais de cada espécie tiveram seus DE coletados, dissecados e divididos em três regiões (proximal, média e distal) para processamento histológico em resina. As amostras processadas foram coradas em azul de toluidina para análise descritiva microscópica. Na dissecação manual dos DE foi observada maior facilidade de dissecação em murinos e equinos do que em bovinos e suínos. Histologicamente, o epitélio dos DE foi identificado como pseudoestratificado colunar ciliado em todas as espécies, com variações na predominância dos tipos celulares entre as regiões. As células não ciliadas foram mais abundantes em todas as regiões, enquanto as células ciliadas eram mais numerosas na região distal. A composição do tecido intersticial também variou entre as espécies: em roedores, o tecido conjuntivo frouxo predominava, enquanto nos grandes mamíferos, o tecido conjuntivo denso substituíu o tecido conjuntivo frouxo à medida que se aproximava da região distal, envolvendo os DE em feixes. Os achados deste estudo fornecem informações valiosas sobre as características morfológicas dos DE nas diferentes regiões dos ductos em roedores, bovinos, equinos e suínos. Essas informações são fundamentais para avançar na compreensão dos mecanismos fisiológicos e patológicos relacionados aos DE e podem orientar futuras pesquisas na área.

Palavras-chave: fertilidade, histologia, mamíferos, reprodução e roedores.

## ABSTRACT

SILVA, Kamilla D.P., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2022. **Morphological comparison of the efferent ducts of rodents, bovines, equines, and swines.** Adviser: Mariana Machado Neves. Co-adviser: Mônica Morais Santos.

Efferent ductules (EDs) actively contribute to male reproductive functions. However, alterations in their histological structure have been correlated with causes of male subfertility. However, studies that point out histological and functional similarities and differences among domestic species are scarce. The aim of this study was to characterize the morphological aspects of the EDs of murine, bovine, equine and swine species. For this purpose, five animals of each species had their EDs collected, dissected and divided into three regions (proximal, middle and distal) for histological processing in resin. The processed samples were stained with toluidine blue for descriptive microscopic analysis. During manual dissection of the EDs, it was observed that dissection was easier in murine and equine animals than in bovine and swine animals. Histologically, the ED epithelium was identified as pseudostratified ciliated columnar in all species, with variations in the predominance of cell types between regions. Non-ciliated cells were more abundant in all regions, while ciliated cells were more numerous in the distal region. The composition of the interstitial tissue also varied among species: in rodents, loose connective tissue predominated, while in large mammals, dense connective tissue replaced loose connective tissue as it approached the distal region, surrounding the ED in bundles. The findings of this study provide valuable information on the morphological characteristics of the ED in the different regions of the ducts in rodents, cattle, horses and pigs. This information is fundamental to advance the understanding of the physiological and pathological mechanisms related to ED and may guide future research in the area.

Keywords: fertility, histology, mammals, reproduction and rodents.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Microdissecação de dúctulos eferentes.....	14
<b>Figura 2.</b> Representação das variações de inserção dos DE no epidídimo .....	15
<b>Figura 3.</b> Regionalização macroscópica dos dúctulos eferentes de roedores, bovinos, equinos e suínos para processamento histológico .....	23
<b>Figura 4.</b> Microscopia dos dúctulos eferentes de roedores .....	28
<b>Figura 5.</b> Macroscopia dos dúctulos eferentes de bovinos.....	29
<b>Figura 6.</b> Microscopia dos dúctulos eferentes de bovinos .....	33
<b>Figura 7.</b> Microscopia dos dúctulos eferentes em bovinos .....	34
<b>Figura 8.</b> Macroscopia dos dúctulos eferentes de equinos.....	35
<b>Figura 9.</b> Microscopia dos dúctulos eferentes de equinos .....	38
<b>Figura 10.</b> Macroscopia dos dúctulos eferentes de suínos.....	40
<b>Figura 11.</b> Microscopida dos dúctulos eferentes de suínos .....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número de ductulos eferentes em diferentes espécies. ....	15
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros morfométricos e proporção de células epiteliais dos ductulos eferentes em ratos Wistar. ....	26
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros morfométricos e proporção de células epiteliais dos ductulos eferentes em bovinos. ....	32
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros morfométricos e proporção de células epiteliais dos ductulos eferentes em equinos. ....	36
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros morfométricos e proporção de células epiteliais dos ductulos eferentes em suínos. ....	41

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Características macroscópicas dos ductulos eferentes.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Características microscópicas dos ductulos eferentes.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Funções dos ductulos eferentes .....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Técnicas de caracterização dos ductulos eferentes.....</b>	<b>18</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Objetivo geral .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Animais .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.1 Roedores.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.2 Bovinos .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.3 Equinos .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.4 Suínos .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Dissecção e segmentação dos ductulos eferentes para processamento histológico .....</b>	<b>22</b>
<b>4.3 Análises histológicas.....</b>	<b>23</b>
<b>4.4 Análises morfométricas e proporção de células no ductulos eferentes .....</b>	<b>24</b>
<b>4.5 Análise estatística .....</b>	<b>24</b>

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>5.1 Caracterização dos ductulos eferentes em roedores .....</b>	<b>24</b>
<b>5.2 Caracterização dos ductulos eferentes em bovinos .....</b>	<b>29</b>
<b>5.3 Caracterização dos ductulos eferentes em equinos .....</b>	<b>34</b>
<b>5.4 Caracterização dos ductulos eferentes em suínos .....</b>	<b>39</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

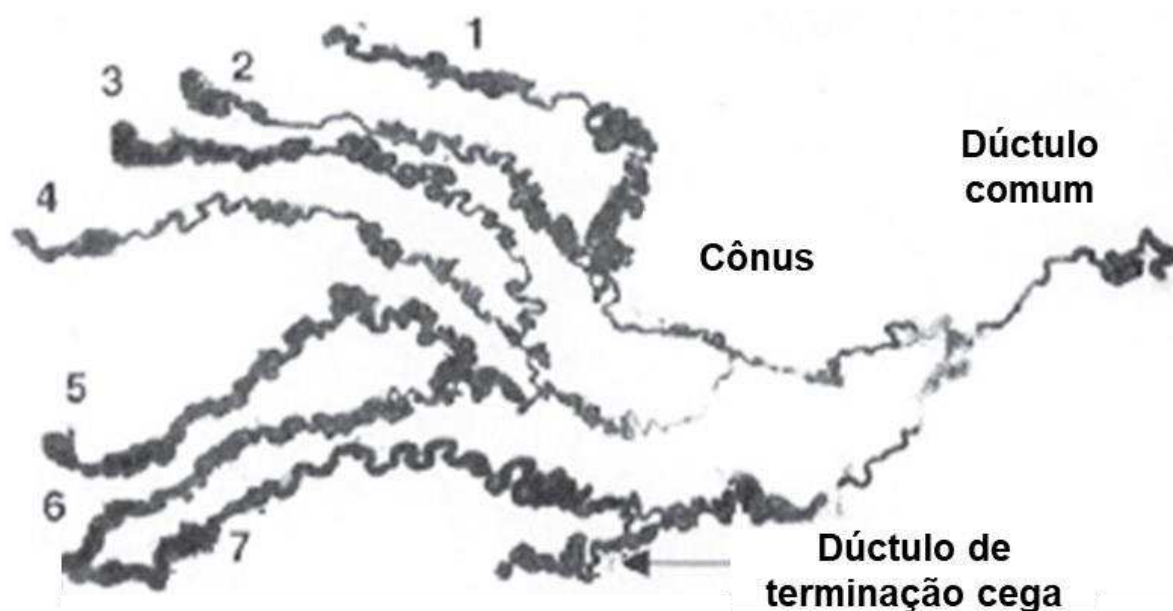
Também identificados como canais eferentes, ductos eferentes, túbulos eferentes e vasos eferentes, os ductulos eferentes (DE) são assim denominados pela Nomina Anatômica e por isso, essa terminologia foi adotada no presente trabalho. Os DE foram primariamente descritos em 1668 por De Graaf como pequenos túbulos convolutos responsáveis por transportar o fluido testicular da rete testis ao epidídimo. Entretanto, apenas em 1856 os DE obtiveram maior relevância científica, quando Becker identificou a presença de células ciliadas no epitélio dos DE, contribuindo para o transporte dos espermatozoides até o epidídimo. Contudo, novas atividades epiteliais foram atribuídas aos DE com o avanço das técnicas laboratoriais, tais como reabsorção do fluido testicular, secreção de substâncias e espermiófagia. Apesar disso, pouco se sabe quanto as similaridades e diferenças histológicas dos DE entre as espécies domésticas. Assim, a caracterização dos aspectos morfológicos dos DE se torna necessária para auxiliar na melhor compreensão da participação dos DE no aparelho reprodutivo.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo caracterizando a histologia dos DE de reprodutores das espécies murina, bovina, equina e suína.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características macroscópicas dos ductulos eferentes

Macroscopicamente, os DE emergem separadamente da *rete testis*, situada centralmente no testículo de ungulados e carnívoros e marginalmente no testículo de primatas e roedores (Cunningham, 1928). Geralmente, os DE são separados uns dos outros por porções de tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo, envoltos por uma camada de tecido conjuntivo denso (Cunningham, 1928). Ao transpor a túnica albugínea, estes ductulos são divididos em três segmentos: proximal, medial (ou côneus) e distal (ductulo comum) (Figura 1).



**Figura 1.** Microdissecção de ductulos eferentes evidenciando sete ductulos proximais que se anastomosam na região média e formam um ductulo comum distal. Um ductulo de terminação cega é visto emergindo da região medial. (Adaptado de Hess, 2002).

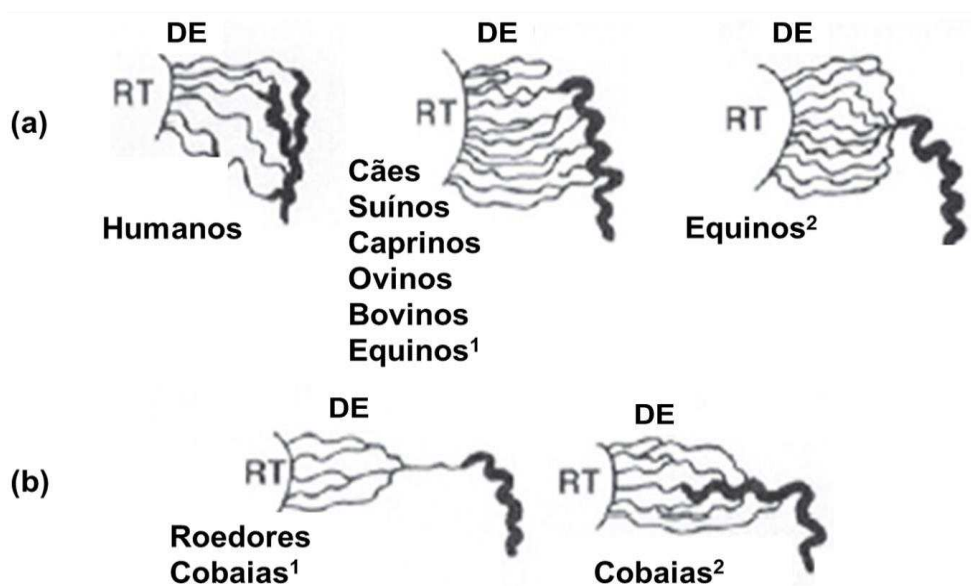
O primeiro segmento é conhecido como segmento proximal, constituído por ductulos ligeiramente convolutos que variam em número entre espécies (Tabela 1) e dentro da mesma espécie (Hemeida et al., 1978). O segundo segmento é o medial, também conhecido como côneus. Este é formado por ductulos altamente tortuosos que sofrem anastomoses entre si. O terceiro segmento é o distal ou ductulo comum. Nesta região os DE adentram na cápsula de tecido conjuntivo do epidídimo e sofrem transição epitelial para o segmento inicial do epidídimo.

**Tabela 1.** Número de dúctulos eferentes em diferentes espécies.

Espécie	Nº de dúctulos
Rato	2-20
Camundongo	3-5
Homem	6-15
Touro	10-20
Garanhão	12-23
Jumento	20-33
Burro	16-33
Varrão	14-21
Bode	14-21
Carneiro	8-21
Cão	10-16
Gato	13-18

Fonte: Ílio e Hess (1994).

A união dos DE com o epidídimo pode acontecer de duas maneiras: a primeira ocorre paralelamente de modo que os dúctulos se inserem no epidídimo separadamente (como acontece em algumas cobaias e mamíferos, inclusive o homem) ou em pares (como em mamíferos domésticos). A segunda maneira acontece através da formação de funil, em que os DE sofrem anastomose em um único dúctulo, característico de roedores e algumas cobaias (Figura 2; Hemeida et al., 1978; Ílio e Hess, 1994).



**Figura 2.** Representação das variações de inserção dos dúctulos eferentes (DE) no epidídimo. (a) Inserção paralela em humanos e animais domésticos e (b) inserção em formato de funil em roedores e cobaias (Adaptado de Hess, 2002).

## 2.2 Características microscópicas dos ductulos eferentes

Em sua maioria, os DE são separados por tecido conjuntivo frouxo e agrupados em feixes por tecido conjuntivo denso. Vasos sanguíneos e alguns tipos celulares, como fibroblastos, linfócitos e macrófagos podem estar presentes no espaço intersticial (Cunningham, 1928). O epitélio dos DE é classificado como simples colunar ou pseudoestratificado colunar, sendo facilmente distinguível do epitélio da rede testicular (simples cúbico) e do epidídimo (pseudoestratificado colunar com estereocílios), pois a transição entre eles ocorre abruptamente, exceto na espécie humana em que a transição ocorre de forma gradual (Stoffel et al., 1991; Ílio e Hess, 1994).

O epitélio dos DE é composto por dois tipos celulares: células ciliadas e células não ciliadas (ou principais) (Cunningham, 1928; Ílio e Hess, 1994). As células ciliadas são caracterizadas pela presença de cílios projetados para o lúmen dos DE e posição nuclear próxima ao polo apical das células. Já as células não ciliadas são as mais importantes, responsáveis por funções absorptivas e secretórias dos DE. O núcleo destas células está localizado próximo a membrana basal. As células não ciliadas sofrem três tipos de variações ao longo dos DE quanto a presença de vacuolizações. Assim, o Tipo I é caracterizado pela ausência de grânulos ou vacúolos, o Tipo II pelo predomínio de grânulos, e o Tipo III pelo predomínio de vacúolos (Gray et al., 1983). A presença dos vacúolos indica maior atividade celular em detrimento daquelas que não o possuem ou possuem menor quantidade (Hess, 2018a). De modo geral, observou-se que quanto mais próximo da *rete testis*, mais numerosas são as células não ciliadas, enquanto ao se aproximar do epidídimo mais abundantes são as células ciliadas, podendo haver variações entre espécies (Ílio e Hess, 1994).

## 2.3 Funções dos ductulos eferentes

Além de efetuar a condução dos espermatozoides do testículo para o epidídimo, os DE são responsáveis pela reabsorção de fluidos intraluminais, promovendo a concentração espermática. Além disso, atividades endocíticas, espermiófágicas e secretórias também foram relatadas nos DE.

A princípio, pensava-se que as células ciliadas eram responsáveis somente pelo transporte espermático devido à movimentação unidirecional dos seus cílios.

Contudo, foi observado que estes cílios se movimentam aleatoriamente desempenhando função homogeneizadora do conteúdo luminal. Isto contribui para reabsorção do fluido, minimizando ocorrências de obstrução luminal dos DE (Ílio e Hess, 1994; Yuan et al., 2019). Hess (2002) aponta em sua revisão, que o transporte espermático através dos DE é mediado por quatro fatores: (1) secreção contínua de fluido do epitélio seminífero, (2) contração mioepitelial do túbulo seminífero, (3) formação de um vácuo através da ejeção em conjunto com a absorção de fluido pelo epitélio do DE e (4) aumento da pressão intraluminal devido as ramificações e junções dos DE. Em contraposição, Aprea et al. (2021) verificaram que camundongos knockout DNAH5 (proteína motora axonemal dos DE), apresentaram oligozoospermia e acúmulo de espermatozoides nos DE. Estes dados propõem que o batimento ciliar dos DE é essencial para a passagem dos espermatozoides para o epidídimo, visto que esse defeito causa dismotilidade nos cílios, mas não afeta a ultraestrutura e motilidade espermática. Dessa forma, a disfunção dos cílios dos DE está incluída no espectro da doença das ciliopatias móveis, relevante para causas de infertilidade masculinas.

Ademais, os DE demonstram alta capacidade endocítica, reduzindo cerca de 50-90% das proteínas totais do fluido testicular (Olson e Hinton, 1985; Jones, 1987; Clulow et al., 1994). Veeramachaneni e Amann (1991) verificaram através da técnica de eletroforese, a ausência de algumas bandas de proteínas no segmento inicial do epidídimo, quando comparado com o fluido da rete testis. Estudos conduzidos com camundongos knockout para AQP1 mostraram infertilidade nestes animais, evidenciando a importância da via paracelular e endocítica em manter o equilíbrio osmótico e evitar acúmulo de fluido intraluminal dos DE (Hess, 2000). Atividades espermiofágicas também foram descritas tanto em epitélios normais, quanto em condições patológicas, como obstrução epididimária e presença de espermatozoides anormais. Apesar disso, ainda não se sabe exatamente quais fatores estão relacionados ao potencial espermiofágico dos DE (Orgebin-Crist, 1969; Crabo et al., 1971; Hoffer e Hamilton, 1975; Arrighi et al., 1994).

Segundo Hess (2018b), a função secretora dos DE ainda é negligenciada. Contudo, foi observado em mamíferos e aves a presença de atividade secretória apócrina em células não ciliadas (Hess, 2018b). Alguns estudos relatam que essas estruturas apócrinas resultam de artefatos provenientes da técnica de fixação

utilizada. Entretanto, diversos estudos empregaram a técnica de fixação por perfusão vascular, a fim de minimizar a ocorrência de artefatos histológicos, e identificaram bolhas de secreções apócrinas no citoplasma apical dos DE (Gray et al., 1983; Goyal e Hrudka, 1980; Ílio e Hess, 1994). Além disso, por meio da eletroforese foram observados o aparecimento de bandas proteicas no fluído do segmento inicial do epidídimo, inexistentes no fluído testicular na rete testis, reforçando a função secretora dos DE (Olson e Hinton, 1985).

#### **2.4 Técnicas de caracterização dos ductulos eferentes**

A literatura pouco descreve técnicas de dissecação específicas para os DE em animais domésticos como bovinos, equinos e suínos, sendo predominante as técnicas de microdissecação e corrosão vascular. Em 1978, Hemeida et al. conduziram um estudo básico morfológico dos DE em varrões, bodes, carneiros, touros e garanhões utilizando a técnica de microdissecação tridimensional a fim de identificar terminações cegas dos DE. Para tanto, as amostras foram colocadas em ácido acético glacial por 24h a temperatura ambiente (20°C) para maceração do tecido conjuntivo - observou-se que os DE eram afetados quando o período ultrapassava 24h. Em seguida, as amostras eram submersas em ácido acético 50% por um ou dois dias (prolongando-se o tempo em ácido acético 50% tanto quanto o tecido conjuntivo permanecesse duro). Depois, os espécimes foram armazenados por tempo ilimitado em geladeira em conservante isotônico de Klotz. Para microscopia de luz, amostras bovinas foram fixadas em solução de Bouin, contudo a metodologia de fixação não foi descrita.

Stoffel e Friess (1994) aplicaram o método de corrosão vascular para caracterização morfológica dos DE em varrões da raça Large White. Desta forma, dentro de cinco minutos após a castração, o polo cranial do testículo foi cortado e o parênquima testicular desprezado. Realizou-se a canulação da rete testis próxima à túnica albugínea para perfusão de solução morna de Ringer, acrescida de 1000 UI heparina/L e 0,5% de procaína, até que todo o sangue fosse limpo. Em seguida, perfundiu-se brevemente a mesma solução gelada e imergiu o órgão no gelo para transporte. Após cinco horas, uma nova solução de Ringer contendo metil-metacrilato de baixa viscosidade foi injetada conforme descrito por Kohler e Leiser (1983), realizando a polimerização da resina em banho-maria, a 40°C por 30 minutos e completada a 80°C por quatro horas. Por fim, para a corrosão do tecido, as amostras

foram submetidas à solução de KOH 40% a 60°C por 2 semanas com enxagues intermitentes em água destilada.

No mesmo trabalho, Stoffel e Friess realizaram a fixação do epidídimo por perfusão. Para microscopia de luz, Stoffel e Friess canularam um ramo da artéria epididimal e perfundiram solução de Ringer e fixador de Bouin com uma seringa de 20 ml. Já para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi utilizado um aparelho especialmente projetado para trabalhar com ar comprimido, com pressão abaixo de 250 mbar. Assim, os epidídimos foram perfundidos com 40mL da mesma solução de Ringer anteriormente descrita ou com solução salina tamponada de Hank (HBSS) com bicarbonato de sódio 75mM. Imediatamente após, foi realizada a perfusão do fixador por 15-30 minutos, utilizando solução Karnovsky (1% de paraformaldeído e 1,25% de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4) ou glutaraldeído 2,5% (em tampão cacodilato 0,1M com dextrano 40 2% (p/v), pH 7,4), para amostras de tecido para MEV.

Em modelos murinos, a dissecação dos DE é realizada com o auxílio de pinças de dissecação e lupa estereoscópica, conforme descreveu Heuser et al. (2013). Primeiramente, o ligamento da cauda do epidídimo deve ser incisado, separando também o corpo do epidídimo do testículo. Em seguida, a gordura que circunda a cabeça do epidídimo deve ser cuidadosamente removida. Então os DE são dissecados, mantendo sua ligação com a rete testis e a cabeça do epidídimo, para evitar que se perca o sentido anatômico da amostra ao imergi-la no fixador. Para processamento histológico, os DE foram fixados em solução de Davidson modificada, por dois dias.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Analisar aspectos morfológicos dos DE de ratos, bovinos, equinos e suínos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Descrever os aspectos macroscópicos observados durante a dissecação manual;

- Analisar aspectos histológicos dos DE nas espécies citadas, considerando as regiões identificadas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

O uso experimental dos animais selecionados para a realização deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa – CEUA/UFV, através dos protocolos 1064/2021 e 1076/2021, aprovados no dia 26/04/2021. O critério de seleção para coleta das amostras baseou-se na higidez e idade à maturidade sexual referente a cada espécie. Desta maneira, as idades mínimas consideradas para indivíduos sexualmente maduros foram de 76 dias para ratos (Picut et al., 2016), 15 meses para bovinos (Gregory, 2012), 24 meses para equinos (Brito et al., 2004) e 7 meses para suínos (Pinto et al., 2011). Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Biologia Estrutural, do Departamento de Biologia Geral da UFV. No caso dos suínos, o processamento do material ocorreu no Setor de Melhoramento Genético de Suínos do Departamento de Zootecnia da UFV, local de onde vieram as amostras suínas utilizadas.

#### **4.1.1 Roedores**

Cinco ratos Wistar machos (70 dias de idade; 230–250 g) foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Eles foram alojados individualmente em gaiolas de polipropileno sob fotoperíodo controlado (ciclo claro/escuro de 12-12 horas) e temperatura (21 °C). Os animais tiveram livre acesso a ração peletizada e água potável. O estudo foi conduzido em estrita conformidade com as diretrizes éticas do Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. Após 138 dias de idade, os ratos foram pesados e eutanasiados por anestesia profunda (cetamina 150 mg kg<sup>-1</sup> ip. e xilazina 10 mg kg<sup>-1</sup> ip.) seguida de punção cardíaca. Os testículos, DE e epidídimos foram removidos, e a fixação dos DE já dissecados foi realizada por imersão em formalina 10% tamponada com PBS (pH 7,4), por 24 horas.

#### **4.1.2 Bovinos**

Conjuntos de órgãos reprodutivos (testículos, DE e epidídimos) foram obtidos de cinco bovinos mestiços machos (idade acima de 30 meses) provenientes de um frigorífico comercial localizado em Muriaé – MG. Os testículos, DE e epidídimos foram fixados usando a técnica da perfusão periférica testicular, seguida de imersão total. Para isso, dois frascos acoplados a um equipo macro gotas cada, foram suspensos à cerca de 1,5 metros de altura da bancada para se obter um bom fluxo da solução durante a perfusão. Um frasco continha solução salina 9% acrescida de 1.000 UI de heparina/litro (Stoffel e Friess, 1994) e no outro formalina 10% tamponada com PBS (pH 7,4). Com o auxílio de um catéter de 22G, canulou-se a maior veia periférica do testículo para início da perfusão de solução salina 9% e limpeza dos vasos sanguíneos, para facilitar a perfusão do fixador pelo órgão. O fluxo foi mantido por cerca de 10 minutos, quando se observou a saída límpida da solução pelo plexo pampiniforme. Em seguida foi iniciada a perfusão da solução fixadora (formalina 10% tamponada com PBS, pH 7,4) por aproximadamente 20 minutos. Finalizada a perfusão, a amostra foi reduzida por meio da secção transversal do polo dorsal testicular e da cabeça do epidídimo, de forma que os DE foram mantidos ligados à uma pequena porção testicular e à cabeça do epidídimo, para preservar a orientação anatômica da amostra, a qual foi imersa na solução fixadora (formalina 10% tamponada com PBS, pH 7,4) por 24 horas. Após este período de imersão, as amostras foram armazenadas em álcool 70% até sua completa dissecação e processamento histológico.

#### **4.1.3 Equinos**

Conjuntos de órgãos reprodutivos (testículos, DE e epidídimos) foram obtidos de cinco garanhões manga larga machos (idade entre 5 e 7 anos) provenientes da rotina clínica-cirúrgica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa e de médicos veterinários que atendem particularmente em Viçosa – MG e cidades vizinhas. Assim, a orquiectomia dos animais foi realizada pelos veterinários da propriedade, sendo acompanhada por nossa equipe. Após a remoção cirúrgica dos testículos, DE e epidídimos, procedeu-se o processamento imediato das amostras de maneira semelhante à realizada com bovinos.

#### **4.1.4 Suínos**

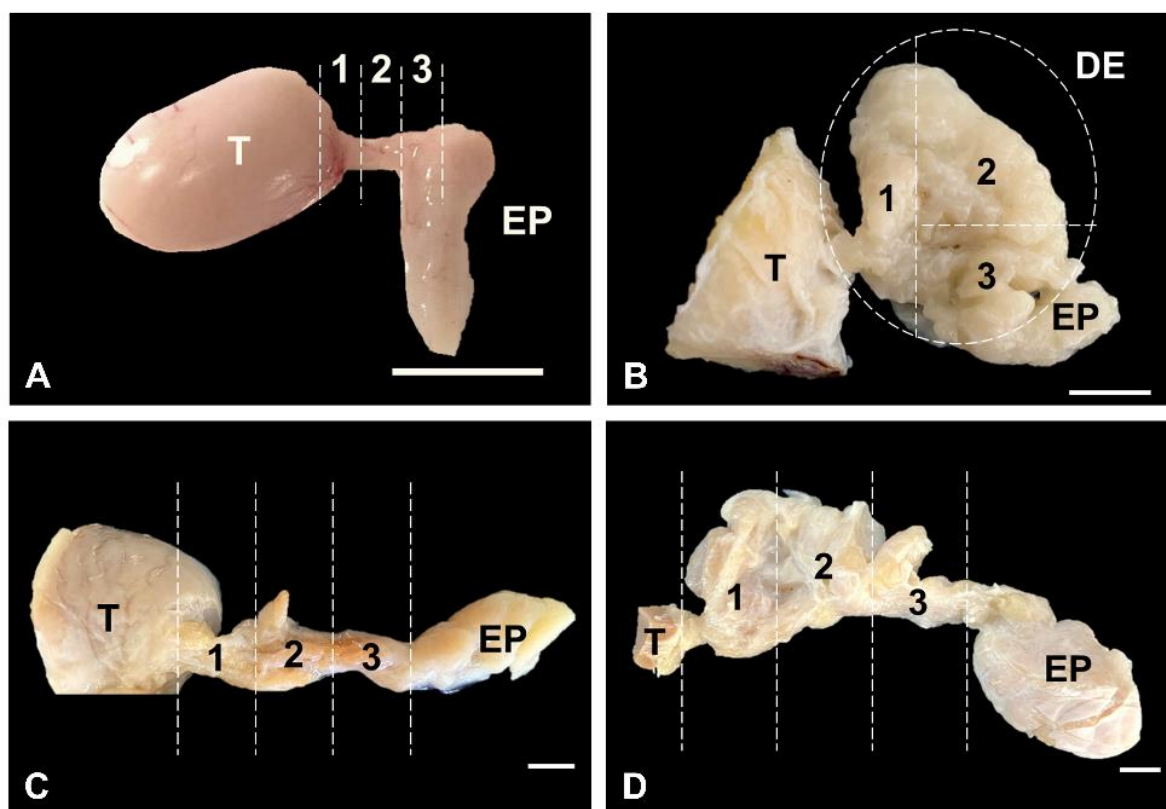
Conjuntos de órgãos reprodutivos (testículos, DE e epidídimos) foram obtidos de cinco suínos das raças Piau e Cruzamento Comercial (idade entre 2 a 5 anos) provenientes do setor de Melhoramento Genético de Suínos da Universidade Federal de Viçosa. Estes animais foram submetidos à orquiectomia convencional, realizada como atividade rotineira de manejo do setor. Portanto, o procedimento cirúrgico foi realizado por veterinário do setor e acompanhado pela nossa equipe. Imediatamente após a remoção cirúrgica, o conjunto de órgãos reprodutores masculinos foi processado, utilizando a mesma técnica descrita para os bovinos e equinos.

#### **4.2 Dissecção e segmentação dos dúctulos eferentes para processamento histológico**

Em murinos, a dissecção foi realizada imediatamente após sua obtenção, segundo a metodologia descrita por Heuser et al. (2013). Resumidamente, o ligamento da cauda do epidídimo foi incisado com auxílio de lâmina de bisturi, permitindo que o corpo do epidídimo fosse separado do testículo. Em seguida o coxim adiposo que circunda a cabeça do epidídimo foi cuidadosamente removido, com auxílio de pinças de dissecção e lupa estereoscópica. Enquanto uma pinça era mantida no plexo pampiniforme como ponto de apoio para manter a amostra posicionada, outra pinça era utilizada para remoção do tecido adiposo. Sempre que necessário a lupa estereoscópica foi utilizada para auxiliar na delimitação e identificação dos DE. Finalizada a dissecção, os DE foram subdivididos em três regiões: proximal, média e distal, conforme apresentado na Figura 3A. Na região proximal manteve-se parte do testículo para manter a ligação dos DE à rete testis, preservando a orientação anatômica do órgão. Com o mesmo intuito, a região distal foi seccionada mantendo parte do segmento inicial do epidídimo.

A dissecção dos DE em bovinos, equinos e suínos foi realizada com o auxílio de pinças de dissecção de ponta romba-romba para remoção do tecido adiposo e da capsula de tecido conjuntivo. Em seguida, com auxílio de bisturi, foi realizada uma incisão longitudinal na túnica que recobre os DE e a cabeça do epidídimo, removendo-a completamente pela técnica de divulsão. Com o auxílio das pinças de dissecção de ponta fina e lupa estereoscópica, iniciou-se a remoção do tecido conjuntivo e adiposo que envolvem os DE, promovendo sua completa exposição. De forma

semelhante ao que foi feito em murinos, os DE foram segmentados em três regiões, proximal, média e distal, a fim de facilitar a avaliação de toda a extensão do órgão, conforme evidenciado na Figura 3B, C e D.



**Figura 3.** Regionalização macroscópica dos ductos eferentes (DE) de roedores (A), bovinos (B), equinos (C) e suínos (D) para processamento histológico. Os DE foram subdivididos nas regiões proximal (1), média (2) e distal (3), e estão situados entre o testículo (T) à esquerda e o epidídimo (EP) à direita. Barra: 1 cm.

### 4.3 Análises histológicas

As amostras das regiões proximal, média e distal foram desidratadas em banhos de imersão, de uma hora de duração cada, em bateria de álcoois de concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95% e absoluto). Em seguida, estes fragmentos foram imersos em solução de glicol metacrilato (Historesin®, Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha) por duas horas para pré-infiltração, sendo transferidos para uma nova solução de glicol metacrilato para infiltração, onde permaneceram por 12 horas. Os fragmentos foram então incluídos por adição de catalisador (peróxido de benzoila) à solução de glicol metacrilato. Cortes transversais de 3  $\mu$ m de espessura foram obtidos utilizando navalha de vidro, em micrótomo rotativo (RM2155, Leica Biosystems, Nussoch, Alemanha). A cada dez cortes no

micrótomo, um foi selecionado para confecção da lâmina. Os cortes histológicos foram corados com azul de toluidina e posteriormente, montados entre lâmina e lamínula, utilizando-se resina de montagem (Entellan®).

#### **4.4 Análises morfométricas e proporção de células no ductulos eferentes**

Imagens digitais dos DE foram obtidas em fotomicroscópio (Olympus BX53, Tóquio, Japão) e analisadas no Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Em cada região, foram quantificados o diâmetro dos ductulos, diâmetro do lúmen, altura do epitélio e altura dos cílios em 30 cortes transversais de DE por animal. Além disso, a distribuição relativa dos tipos celulares epiteliais nas três regiões foi estimada pela contagem de células em diferentes seções por região. As células foram contadas em 30 seções por região e por animal. O resultado da contagem bruta de células foi corrigido pela aplicação da fórmula de Amann (Amann, 1962), conforme Beu et al. (2009).

#### **4.5 Análise estatística**

Os resultados obtidos nas avaliações quantitativas foram analisados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos a One-way ANOVA seguido do teste post hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism (versão 6.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP).

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 Caracterização dos ductulos eferentes em roedores**

Após a incisão do ligamento da cauda do epidídimo, iniciou-se a remoção dos tecidos conjuntivo frouxo e adiposo localizados na região proximal dos ductos epididimários (DE), que cobriam a região dos DE e a cabeça do epidídimo. A olho nu, o tecido adiposo se diferenciava dos DE pelo seu aspecto brilhante, translúcido e friável à tração, enquanto os DE apresentavam um aspecto opaco e uma consistência firme. Com o auxílio do estereoscópio, essas características foram identificadas com

maior clareza, facilitando a dissecação dos DE. Após a dissecação, foi possível identificar o côneus na região média, bem como a presença de pequenos vasos sanguíneos superficiais aos DE. A facilidade na aplicação desta técnica pode ser atribuída ao tamanho do órgão, que estava envolto apenas por um coxim de tecido adiposo. A coloração amarelo-esbranquiçada e o aspecto brilhante e friável do tecido adiposo permitiram sua clara distinção dos DE. O maior cuidado durante a dissecação foi evitar a compressão dos DE para não danificar sua estrutura, o que foi facilmente gerenciado com o uso de pinças de ponta fina e do estereoscópio. Essas características descritas também foram relatadas por La et al. (2012), Heuser et al. (2013) e Hess (2018b).

Na análise histológica, observou-se a presença de adipócitos uniloculares ao redor dos DE, principalmente localizados externamente à cápsula de tecido conjuntivo que circundava o feixe de DE (Figura 4A). A presença desses adipócitos sugere um ambiente metabolicamente ativo ao redor dos DE. A gordura pode fornecer uma fonte local de energia e estar envolvida na produção de hormônios e outros fatores que podem influenciar a função dos DE. Por exemplo, é bem estabelecido que a gordura epididimária desempenha um papel crucial na espermatogênese, mantendo nichos metabólicos e imunológicos locais (Chu et al., 2010; Yang et al., 2022). Embora o impacto da gordura na fisiologia testicular seja amplamente reconhecido, seu papel na fisiologia epididimária e nos DE ainda é pouco compreendido. Além disso, o espaço intersticial entre os DE apresentou tecido conjuntivo frouxo, agrupamentos de células adiposas e vasos sanguíneos, sublinhando a importância de um suporte estrutural e nutricional adequado para os DE. Também foram observados sucros epiteliais e projeções da cápsula formada por tecido conjuntivo.

Ao longo de toda a sua extensão (Figura 4B, C e D), os DE apresentaram epitélio pseudoestratificado colunar ciliado, composto por células principais e células ciliadas, repousando sobre uma delgada camada de células musculares (Figura 4E, F e G). As células principais apresentaram núcleo basal de formato ovoide ou esférico e citoplasma claro com pequenos vacúolos, enquanto as células ciliadas apresentam núcleo ápico-central de formato oval e são dotadas de cílios. A presença desses dois tipos celulares sugere uma especialização funcional para a absorção e movimentação do fluido secretado pelo epitélio germinativo. As células principais, que contêm a maioria das vesículas e vacúolos, são responsáveis pela absorção do fluido

proveniente do testículo. Por outro lado, as células ciliadas provavelmente auxiliam na movimentação e homogeneização do fluido e dos espermatozoides ao longo dos DE (Flickinger et al., 1978).

Neste contexto, em relação à proporção de células, observou-se o predomínio de células principais em ambas as regiões dos DE. No entanto, houve um aumento gradual na proporção de células ciliadas ao longo das regiões, com a maior proporção observada na região distal ( $p < 0,05$ ; Tabela 2). Outros estudos confirmam que as regiões proximais dos DE apresentam uma maior proporção de células principais, enquanto as regiões distais têm um aumento na proporção de células ciliadas (Jones e Jurd, 1987; Wang et al., 1994). Esse padrão pode ser crucial para o transporte, absorção e homogeneização do fluido e dos espermatozoides através da ação ciliar. É importante ressaltar que os cílios não se movem na mesma direção; sua principal função parece ser a agitação dos fluidos luminiais (Klinefelter e Hess, 1998; Talo, 1981). Além disso, grânulos foram observados com maior intensidade na região proximal em comparação com as outras regiões avaliadas (Figura 2E).

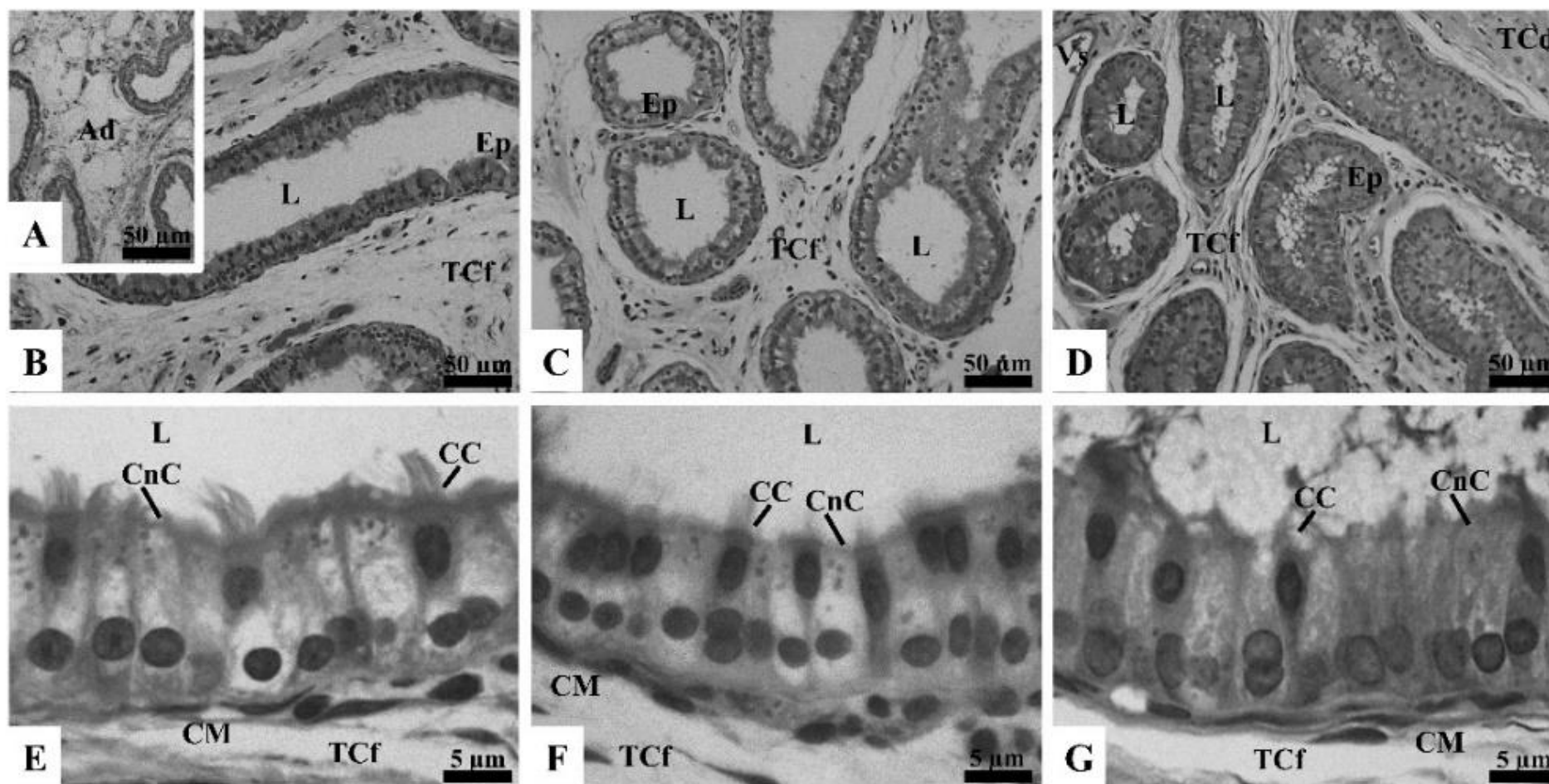
**Tabela 2.** Parâmetros morfométricos e proporção de células epiteliais dos ductulos eferentes (DE) em ratos Wistar.

Parâmetro	Região		
	Proximal	Medial	Distal
<i>Morfometria dos DE (<math>\mu\text{m}</math>)</i>			
Diâmetro dos ductulos	207.4 $\pm$ 13.87 <sup>a</sup>	157.2 $\pm$ 27.99 <sup>b</sup>	89.25 $\pm$ 14.98 <sup>c</sup>
Diâmetro do lúmen	191.2 $\pm$ 12.71 <sup>a</sup>	125.4 $\pm$ 27.18 <sup>b</sup>	47.40 $\pm$ 14.99 <sup>c</sup>
Altura do epitélio	16.13 $\pm$ 7.92 <sup>a</sup>	31.80 $\pm$ 1.92 <sup>b</sup>	41.85 $\pm$ 1.64 <sup>c</sup>
Altura dos cílios	4.99 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	8.09 $\pm$ 1.21 <sup>b</sup>	12.8 $\pm$ 0.83 <sup>c</sup>
<i>Proporção de células (%)</i>			
Células principais	86.34 $\pm$ 3.04 <sup>a</sup>	82.01 $\pm$ 2.84 <sup>ab</sup>	78.96 $\pm$ 4.33 <sup>b</sup>
Células ciliadas	13.66 $\pm$ 3.04 <sup>a</sup>	17.99 $\pm$ 2.82 <sup>ab</sup>	21.04 $\pm$ 4.33 <sup>b</sup>

Média  $\pm$  DP. Diferentes letras sobrescritas (<sup>a,b,c</sup>) na mesma linha indicam diferenças entre os grupos ( $p < 0,05$ ) pelo teste post hoc de Tukey ( $n = 5$  ratos).

Na região proximal, os DE apresentaram maior diâmetro e maior diâmetro do lúmen, além de menor altura do epitélio e dos cílios em comparação com as regiões medial e distal ( $p < 0,05$ ; Tabela 2). Da mesma forma, na região medial, esses parâmetros mostraram resultados estatisticamente semelhantes aos da região distal

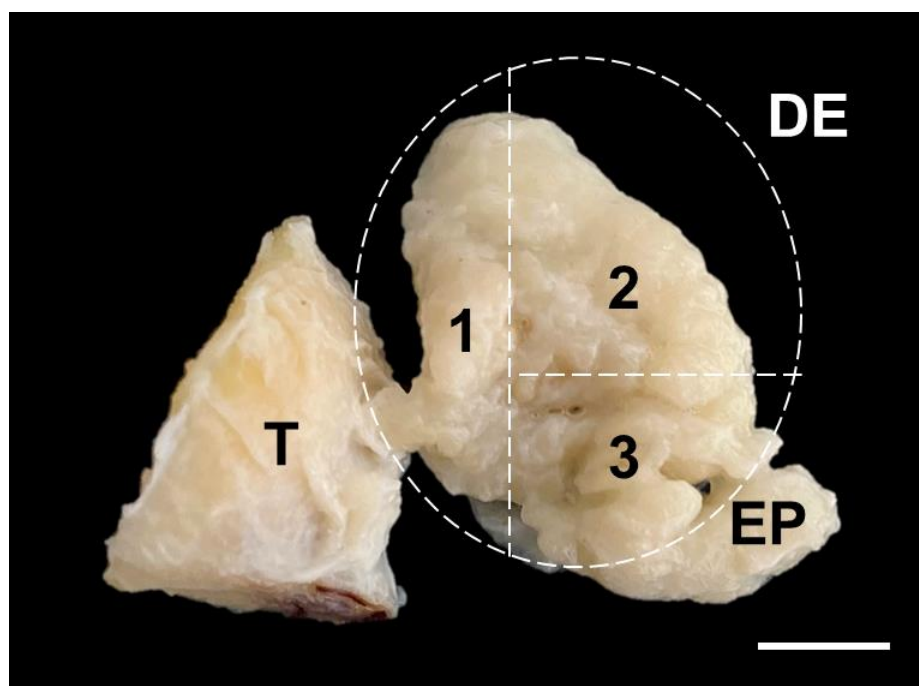
( $p < 0,05$ ; Tabela 2). Em roedores, é comum que os DE proximais sejam retos e tenham um lúmen mais largo do que os encontrados nas regiões mais distais, próximas ao epidídimo (Hess, 2018). Isso é particularmente relevante considerando que a produção de fluido testicular em ratos é estimada entre  $30-50 \mu\text{l h}^{-1}$ , com a taxa de fluxo reduzida para aproximadamente  $2 \mu\text{l h}^{-1}$  no fluido que entra no epidídimo (Clulow et al., 1994; Man et al., 1997). Portanto, grande parte do fluido testicular é reabsorvida nos DE à medida que os espermatozoides transitam pelos ductos. A maior parte da reabsorção ocorre nas regiões proximais, logo após a saída da rede testicular (Hess, 2002). Essas observações explicam as variações regionais encontradas, sugerindo uma adaptação funcional ao longo dos DE. Por exemplo, um maior diâmetro luminal e a maior proporção de células principais nas regiões proximais representam uma maior área para a reabsorção do fluido testicular. Além disso, o aumento da altura dos cílios e da proporção de células ciliadas nas regiões distais sugere um papel na homogeneização do fluido à medida que a concentração de espermatozoides aumenta. Essa função pode ser crucial para a reabsorção consistente de fluido na interface lúmen/célula não-ciliada, onde até 90% do fluido é movido através do epitélio e metabolizado, reciclado ou reabsorvido na vasculatura epididimal em um curto período (Hess, 2015).



**Figura 4.** Microscopia dos ductos eferentes de roedores. Regiões proximal (A, B, E), medial (C, F) e distal (D, G), evidenciando: células ciliadas (CC), células não ciliadas (CnC), células musculares (CM), adipócitos (Ad), tecido conjuntivo frouxo (Tcf), tecido conjuntivo denso não modelado (Tcd), vasos sanguíneos (Vs), lúmen (L), epitélio (Ep). Coloração: Azul de toluidina.

## 5.2 Caracterização dos ductos eferentes em bovinos

A remoção da túnica albugínea e a identificação dos DE foram extremamente difíceis devido à forte aderência dessas estruturas. Elas apresentavam uma consistência firme e um aspecto esbranquiçado, o que impossibilitou a individualização dos DE por meio da dissecação manual. Portanto, os ductos eferentes foram subdivididos em três seções (Figura 5), e as porções proximal, medial e distal foram identificadas somente após a observação microscópica. Diferente dos roedores, observou-se nas seções histológicas que os DE estavam agrupados em feixes por tecido conjuntivo denso (Figura 6A), enquanto o restante do espaço intersticial era composto por tecido conjuntivo frouxo, contendo vasos sanguíneos (Figura 6B, C e D). Nossa hipótese é que a dificuldade na dissecação se deve à composição intersticial observada nos DE desses touros. Esse aspecto fibroso, notado durante a dissecação, não foi descrito na literatura existente, possivelmente porque muitos estudos utilizam técnicas de microdissecação química. No entanto, as características intersticiais relatadas neste estudo corroboram com a análise de Hemeida et al. (1978), que também identificaram a presença de tecido conjuntivo denso ao redor dos DE de touros.



**Figura 5.** Macroscopia dos ductos eferentes (DE) de bovinos. Testículo (T); região dos DE delimitada pelo círculo, subdividido em seção 1, seção 2, seção 3, e encerrando no epidídimo (EP). Barra de escala: 1 cm.

Assim como em roedores, ao longo de toda a sua extensão, os DE apresentaram um epitélio pseudoestratificado colunar ciliado, composto por células principais e células ciliadas. Observamos que esse epitélio repousa sobre uma delgada camada de células musculares lisas, apoiadas em feixes de tecido conjuntivo frouxo (Figura 6E, F, G). Assim como observado em roedores, a presença desses dois tipos celulares sugere uma especialização funcional para a absorção, secreção e movimentação de fluidos e espermatozoides. Conforme relatado por Alkafafy (2005), a parede dos ductos bovinos é sustentada por uma fina lâmina própria e uma camada fina de células musculares lisas, e seus lúmens contêm poucos espermatozoides. Além disso, a espessura e o número de células musculares lisas aumentam em direção ao epidídimo. Achados semelhantes foram relatados na mesma espécie por Wrobel (1972), onde o tecido conjuntivo intersticial peritubular é descrito como rico em fibras de tecido conjuntivo e contém mastócitos relativamente frequentes.

Na região proximal, ao transpassar a túnica albugínea, a *rete testis* extra-testicular dá início aos DE, como ilustrado na Figura 7A. Essa transição é marcada pela mudança do epitélio simples cúbico da *rete testis* para o epitélio colunar pseudoestratificado ciliado dos DE (Figura 7B). As transições epiteliais entre os DE e a *rete testis*, bem como entre os DE e o epidídimo, são descritas como abruptas em várias espécies, podendo ser gradativas apenas em humanos. Além disso, o epitélio da *rete testis* pode ser simples pavimentoso ou cúbico, dependendo da espécie (Jonté e Holstein, 1987; Stoffel e Friess, 1994; Hess, 2002; Sousa, 2015). A mudança do epitélio simples cúbico para o colunar pseudoestratificado ciliado destaca uma zona de adaptação onde os espermatozoides iniciam seu transporte pelo sistema dos ductos eferentes. Essa mudança estrutural é crítica para o transporte e a modificação do fluido seminal nos DE. O epitélio da *rete testis* é conhecido por sua alta atividade de endocitose, absorvendo e degradando várias proteínas derivadas do lúmen dos túbulos seminíferos por meio de lisossomos. Algumas dessas proteínas são produtos secretoras das células de Sertoli, que podem interagir com os espermatozoides durante sua formação no testículo, mas têm importância funcional limitada à medida que se dirigem ao epidídimo. A *rete testis* também parece funcionar como uma estação de limpeza para algumas dessas proteínas derivadas do testículo. Portanto, embora a passagem através da *rete testis* possa parecer passiva, ela desempenha

papéis importantes no ajuste fino do lúmen para os espermatozoides à medida que estes entram nos DE (Hess, 2018).

Ainda na região proximal, medições morfométricas revelaram um menor diâmetro dos ductos, do lúmen, bem como menores valores para a altura do epitélio e a altura dos cílios, em comparação com as regiões medial e distal ( $p < 0,05$ ; Tabela 3). Da mesma forma, na região medial, esses parâmetros apresentaram valores menores em comparação com a região distal ( $p < 0,05$ ; Tabela 3). Não foram encontrados estudos descritivos que evidenciem as particularidades morfométricas dos DE em bovinos. Em humanos, observou-se que as regiões proximais dos DE são mais estreitas em diâmetro do que as porções mais distais, e há um aumento do diâmetro em direção ao epidídimo (Saitoh et al., 1990). Diferentemente da organização em forma de funil observada em mamíferos menores, como roedores, onde os DE proximais ou iniciais se fundem para formar um único ducto comum que entra na cabeça do epidídimo, mamíferos maiores e humanos apresentam uma formação de espirais paralelas. Nesse caso, a maioria dos ductos eferentes proximais conectados à *rete testis* tende a permanecer separados, formando várias entradas distintas para os DE enrolados na cabeça do epidídimo (Hess, 2018). Isso pode explicar a redução nos diâmetros dos ductos e do lúmen. No entanto, Hess (2018) relata que, mesmo em grandes animais, os ductos proximais têm um lúmen mais largo do que os ductos na região distal, próxima ao segmento inicial do epidídimo.

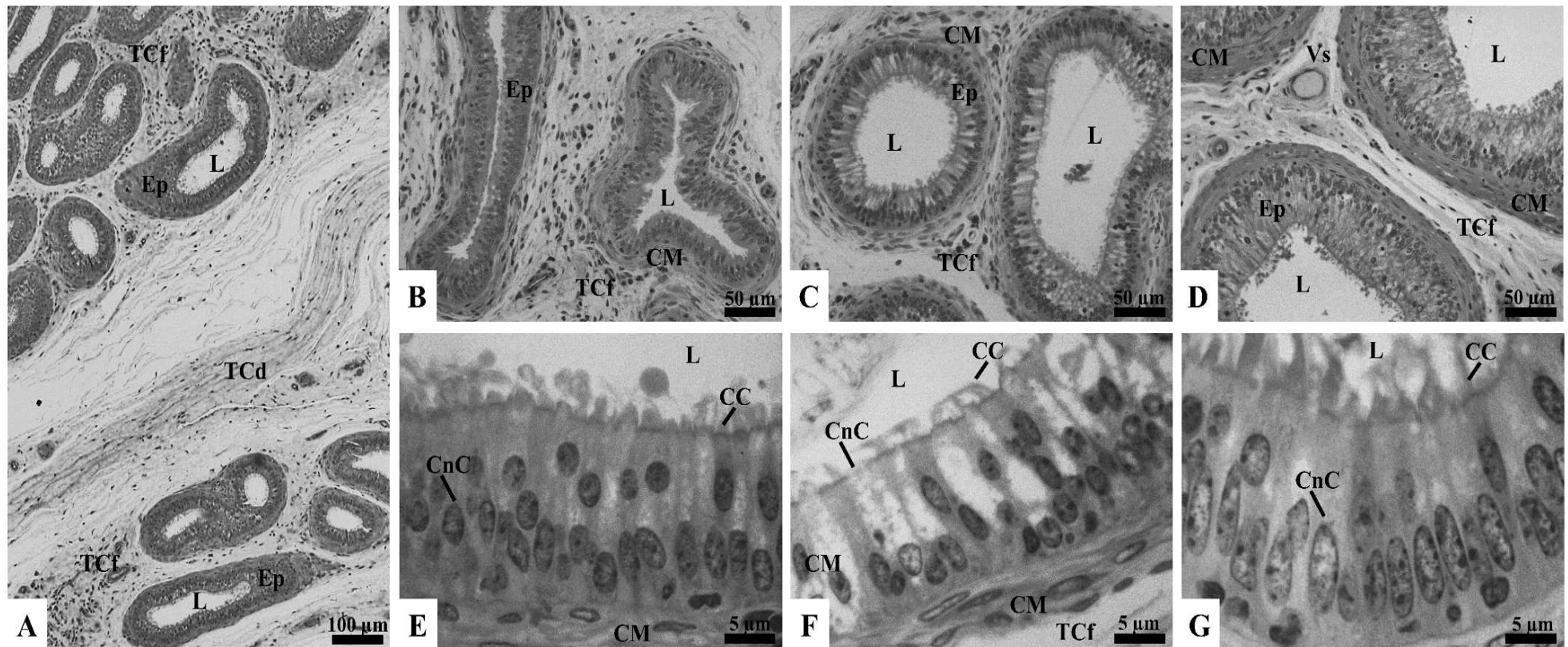
Em relação aos tipos celulares, não foram observadas diferenças nas proporções de células principais e ciliadas entre as regiões dos DE ( $p > 0,05$ ; Tabela 3). No entanto, grânulos foram observados com maior intensidade nas regiões medial e distal (Fig. 6F e G) em comparação com a região proximal (Fig. 6E). A variação no padrão regional sugere que a função dos DE se torna mais complexa e ativa à medida que os espermatozoides avançam para as regiões distais. A menor altura do epitélio e dos cílios na região proximal pode estar relacionada a uma menor necessidade de modificação do fluido testicular logo após a saída dos espermatozoides dos testículos, enquanto a maior altura nas regiões medial e distal reflete uma maior atividade de transporte e modificação. Apesar disso, a ausência de diferenças nas proporções de células principais e ciliadas entre as regiões indica uma distribuição relativamente uniforme desses tipos celulares ao longo dos DE, sugerindo uma funcionalidade básica consistente em todas as regiões.

**Tabela 3.** Parâmetros morfométricos e proporção de células epiteliais dos ductos eferentes (DE) em bovinos.

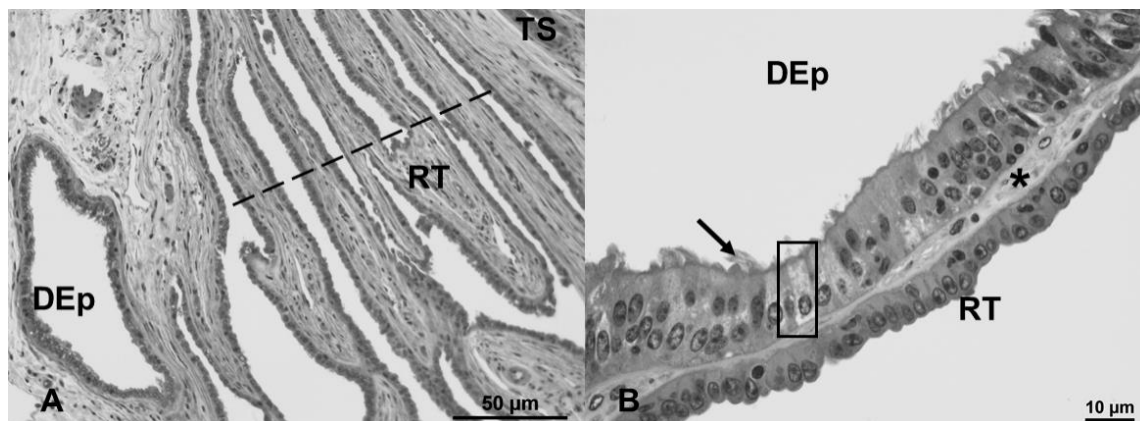
Parâmetro	Região		
	Proximal	Medial	Distal
<i>Morfometria dos DE (<math>\mu\text{m}</math>)</i>			
Diâmetro dos ductos	105.3 $\pm$ 21.46 <sup>a</sup>	203.7 $\pm$ 24.34 <sup>b</sup>	300.3 $\pm$ 20.50 <sup>c</sup>
Diâmetro do lúmen	75.87 $\pm$ 21.67 <sup>a</sup>	169.1 $\pm$ 24.83 <sup>b</sup>	260.4 $\pm$ 20.80 <sup>c</sup>
Altura do epitélio	29.47 $\pm$ 1.95 <sup>a</sup>	34.56 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup>	39.92 $\pm$ 0.94 <sup>c</sup>
Altura dos cílios	6.72 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	8.69 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup>	10.98 $\pm$ 1.36 <sup>c</sup>
<i>Proporção de células (%)</i>			
Células principais	77.11 $\pm$ 3.04 <sup>a</sup>	65.73 $\pm$ 2.84 <sup>a</sup>	66.06 $\pm$ 4.33 <sup>a</sup>
Células ciliadas	22.89 $\pm$ 3.87 <sup>a</sup>	34.27 $\pm$ 5.49 <sup>a</sup>	33.94 $\pm$ 7.22 <sup>a</sup>

Média  $\pm$  DP. Diferentes letras sobrescritas (<sup>a,b,c</sup>) na mesma linha indicam diferenças entre os grupos ( $p < 0,05$ ) pelo teste post hoc de Tukey ( $n = 5$  bovinos).

Embora essas hipóteses sejam levantadas com base nas observações, não há evidências na literatura que sustentem completamente essas suposições. São necessários mais estudos para estabelecer uma relação clara entre as características morfométricas e as funcionalidades das diferentes regiões dos DE em bovinos. Vale ressaltar que o conhecimento sobre os DE é predominantemente derivado de estudos realizados em roedores de laboratório, e há uma lacuna de informações comparáveis sobre os DE em grandes animais domésticos, como os bovinos.



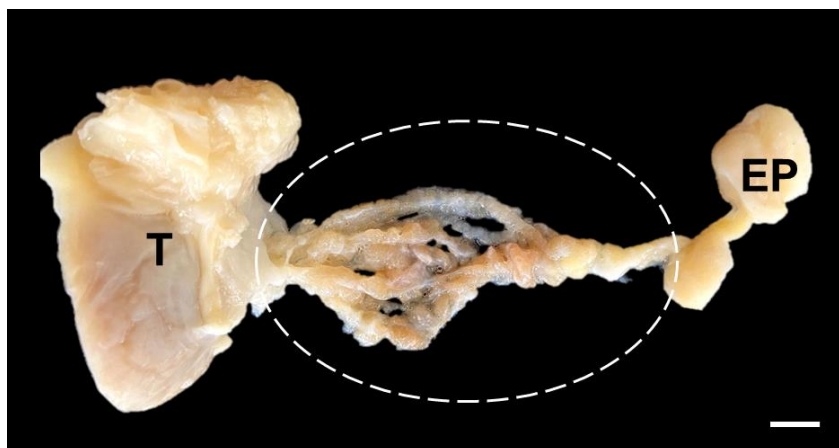
**Figura 6.** Microscopia dos ductulos eferentes (DE) de bovinos. Feixes de DE unidos por tecido conjuntivo denso (TCd; A). Regiões proximal (B, E), medial (C, F) e distal (D,G), evidenciando: células ciliadas (CC), células não ciliadas (CnC), células musculares (CM), tecido conjuntivo frouxo (Tcf), vasos sanguíneos (Vs), lúmen (L), epitélio (Ep). Coloração: Azul de toluidina.



**Figura 7.** Microscopia dos ductos eferentes (DE) em bovinos. A) Rete testis (RT) transpassando a túnica albugínea (linha tracejada), ligando os túbulos seminíferos (TS) aos ductos eferentes proximais (DEp). B) RT com epitélio simples cúbico adjacente aos DEp caracterizado pelo epitélio pseudoestratificado colunar ciliado. Em evidência as células não ciliadas (retângulo), células ciliadas (seta preta). Coloração: azul de toluidina.

### 5.3 Caracterização dos ductos eferentes em equinos

Em equinos, ao remover a túnica albugínea, observou-se a predominância de tecido conjuntivo frouxo envolvendo os DE, o que facilitou a individualização dos ductos desde sua origem até sua inserção no epidídimo, conforme ilustrado na Figura 8. Além disso, os DE apresentaram coloração róseo-amarronzada e consistência macia, contrastando com o epidídimo, que tinha coloração esbranquiçada e consistência firme. Amann (1981) descreve, em um exame detalhado dos testículos, DE e epidídimos de equinos, que os DE se projetam a partir da *rete testis* extratesticular e que a cabeça proximal do epidídimo contém as extremidades distais dos DE altamente enrolados. Dentro da cabeça do epidídimo, os DE se fundem em um único ducto, formando o ducto epididimal.



**Figura 8.** Macroscopia dos ductos eferentes (DE) de equinos. Evidencia-se a individualização dos DE (círculo tracejado) dissecados desde sua origem no testículo (T) até sua inserção no epidídimo (EP). Barra: 1 cm.

Em relação aos aspectos histológicos, os DE estavam envolvidos por delgadas camadas de músculo liso e circundados por tecido conjuntivo frouxo. No epidídimo dos equinos, o trânsito dos espermatozoides através do ducto epididimal ocorre principalmente por contrações peristálticas contínuas do músculo liso. O papel específico dessas células nos DE ainda não é totalmente claro. Com base em estudos de outras espécies, pode-se supor que a delgada camada de células musculares desempenha um papel contrátil no transporte dos espermatozoides ao longo dos DE. Embora inicialmente se acreditasse que os cílios dos ductos eferentes fossem responsáveis pelo transporte das células espermáticas para o epidídimo, pesquisas recentes sugerem que a contração do músculo liso nos DE auxilia na movimentação dos espermatozoides para fora, enquanto os cílios móveis criam um movimento giratório do fluido testicular, mantendo as células espermáticas em suspensão e prevenindo obstruções (Yuan et al., 2019).

O epitélio dos DE foi classificado como pseudoestratificado colunar ciliado. Assim como nas outras espécies aqui descritas (roedores e bovinos), este epitélio é composto por células não ciliadas e por células ciliadas (Fig. 9). A Tabela 4 apresenta os resultados dos parâmetros morfométricos e proporções dos diferentes tipos celulares dos DE em equinos. Na região proximal, os DE apresentaram maior diâmetro, tanto dos ductos quanto do lúmen, em comparação com as regiões medial e distal ( $p < 0,05$ ; Tabela 4). Observou-se uma diminuição gradual desses diâmetros ao longo das regiões medial e distal, com os menores diâmetros encontrados na região distal ( $p < 0,05$ ; Tabela 4). Não foram encontradas diferenças significativas na

altura do epitélio e dos cílios entre as regiões proximal, medial e distal ( $p > 0,05$ ; Tabela 4). Apesar das semelhanças histológicas observadas nos DE de roedores, onde os DE são envoltos por uma almofada de gordura, em mamíferos maiores eles ocupam uma maior porção do epidídimo, especialmente no seguimento inicial, o que pode explicar a ausência de diferenças significativas na altura do epitélio e dos cílios entre as regiões dos DE (Yeung et al., 1991; Hess, 2002).

Em relação à proporção celular, as células principais foram predominantes em ambas as regiões, mas observou-se uma maior proporção de células ciliadas nas regiões medial e distal em comparação com a região proximal ( $p < 0,05$ ; Tabela 4). Além disso, a avaliação qualitativa revelou uma variação na presença de grânulos, com maior intensidade na região proximal em comparação com as regiões medial e distal (Fig. 9). De modo geral, as regiões proximais apresentaram uma maior proporção de células não ciliadas, enquanto as regiões mais próximas do epidídimo exibiram um aumento no número de células ciliadas. A proporção de células ciliadas nos DE pode variar consideravelmente entre as espécies e regiões ductais, indo de 1:2 a 1:5 (Ilio e Hess, 1994), e em algumas espécies, as células ciliadas podem constituir até 80% do epitélio ductal (Hemeida et al., 1978). Embora não tenham sido encontrados estudos específicos sobre a proporção de células ciliadas nos DE de equinos, a maior proporção dessas células nas regiões medial e distal também sugere um papel na homogeneização do fluido testicular. Isso é consistente com a observação de que a maior concentração de espermatozoides nas regiões distais é resultado da reabsorção da maior parte do fluido testicular nas regiões proximais.

**Tabela 4.** Parâmetros morfométricos e proporção de células epiteliais dos ductulos eferentes (DE) em equinos.

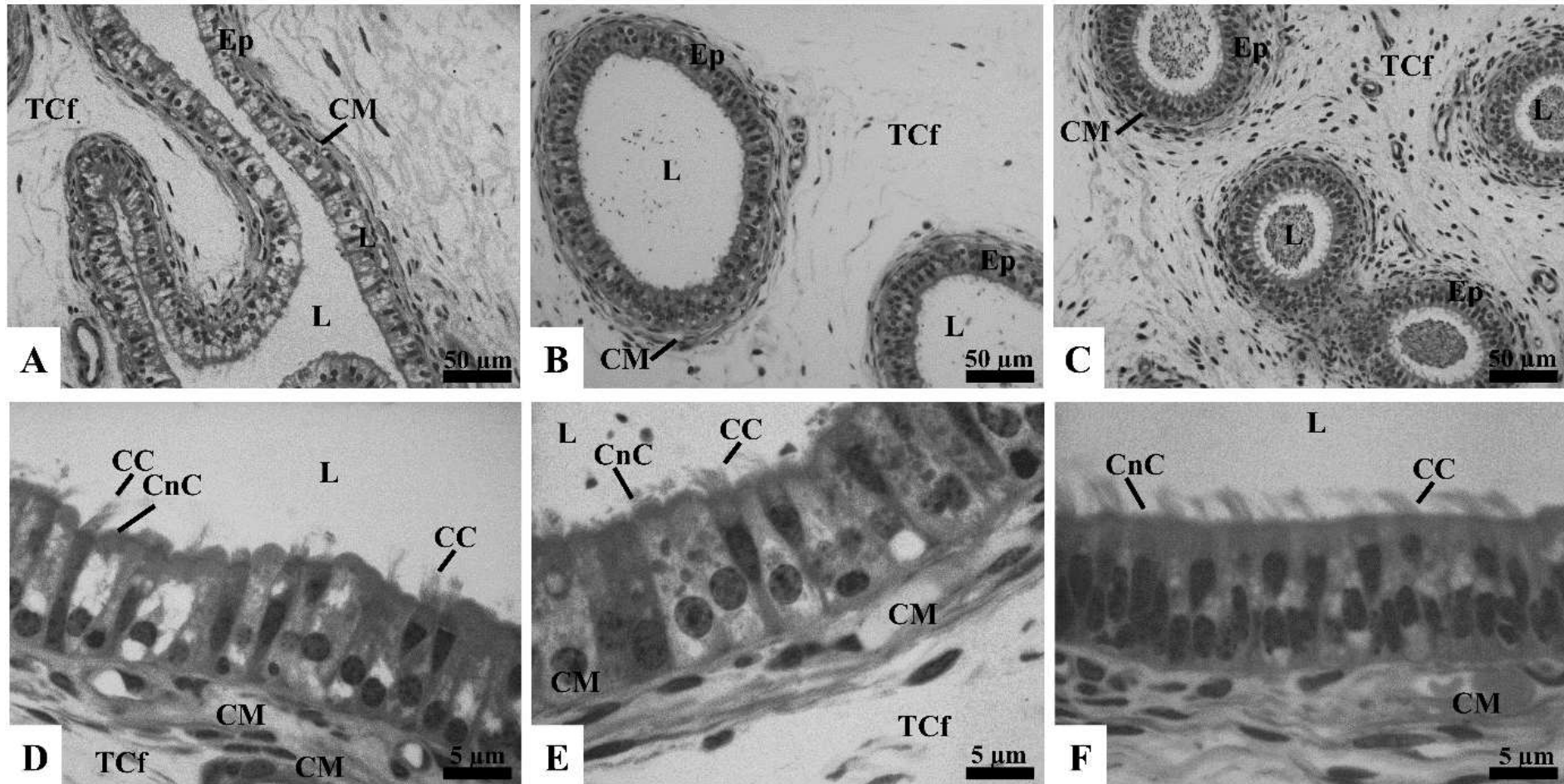
Parâmetro	Região		
	Proximal	Medial	Distal
<i>Morfometria dos DE (<math>\mu\text{m}</math>)</i>			
Diâmetro dos ductulos	284.3 $\pm$ 31.70 <sup>a</sup>	201.9 $\pm$ 17.43 <sup>b</sup>	147.1 $\pm$ 12.35 <sup>c</sup>
Diâmetro do lúmen	250.0 $\pm$ 17.77 <sup>a</sup>	163.7 $\pm$ 12.31 <sup>b</sup>	115.6 $\pm$ 9.97 <sup>c</sup>
Altura do epitélio	34.30 $\pm$ 6.74 <sup>a</sup>	38.17 $\pm$ 2.13 <sup>a</sup>	31.47 $\pm$ 1.91 <sup>a</sup>
Altura dos cílios	6.79 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	10.09 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>	9.58 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup>
<i>Proporção de células (%)</i>			

---

Células principais	74.31 ± 3.83 <sup>a</sup>	65.03 ± 6.08 <sup>b</sup>	65.18 ± 5.69 <sup>b</sup>
Células ciliadas	25.69 ± 3.40 <sup>a</sup>	34.97 ± 6.08 <sup>b</sup>	34.82 ± 5.69 <sup>b</sup>

---

Média ± DP. Diferentes letras sobrescritas (<sup>a,b,c</sup>) na mesma linha indicam diferenças entre os grupos ( $p < 0,05$ ) pelo teste post hoc de Tukey ( $n = 5$  equinos).



**Figura 9.** Microscopia dos ductulos eferentes de equinos. Regiões proximal (A, D), medial (B, E) e distal (C, F), evidenciando: células ciliadas (CC), células não ciliadas (CnC), células musculares (CM), tecido conjuntivo frouxo (Tcf), vasos sanguíneos (Vs), lúmen (L), epitélio (Ep). Coloração: Azul de toluidina.

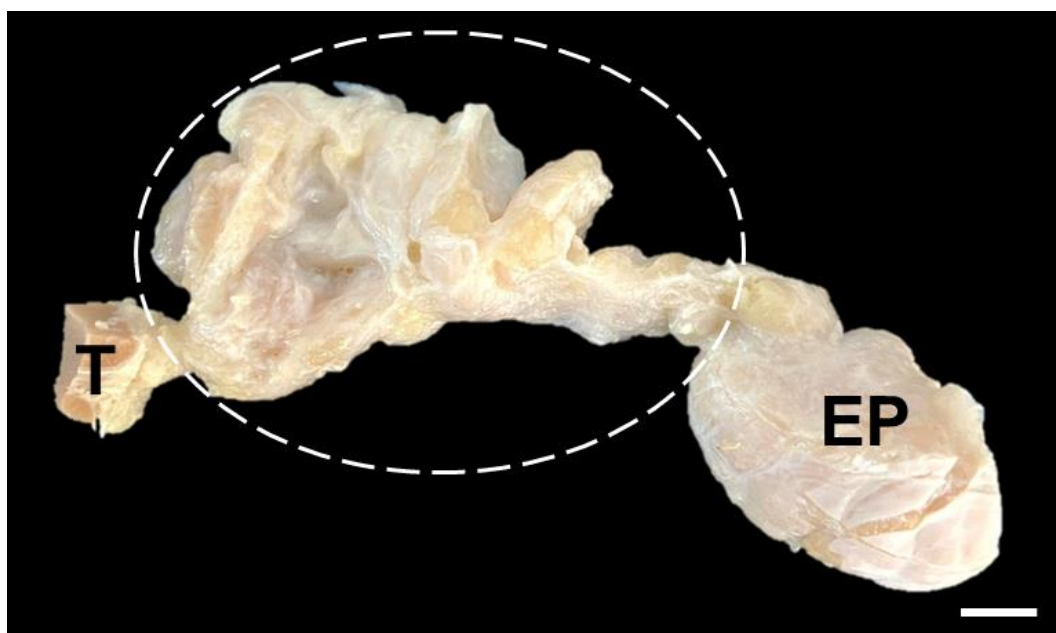
#### 5.4 Caracterização dos ductulos eferentes em suínos

Após a remoção da túnica albugínea, os DE foram encontrados envolvidos por uma camada densa e espessa de tecido adiposo, com aspecto amarelado, opaco e textura sebosa. A completa remoção deste tecido permitiu evidenciar a origem testicular dos DE e sua inserção epididimária. No entanto, a individualização dos ductulos por meio da dissecação mecânica foi impossibilitada devido à fragilidade do tecido (Figura 10). De acordo com Stoffel e Friess (1994), que realizaram moldes de corrosão, foram identificados entre 12 e 14 DE, que surgem da rede anastomosada extratesticular e se conectam ao segmento inicial do epidídimo.

Semelhante ao que foi relatado em roedores, bovinos e equinos, os DE apresentaram epitélio pseudoestratificado colunar com cílios, composto por células principais e células ciliadas (Figura 11). Imediatamente abaixo do tecido epitelial, uma espessa camada de músculo liso circundava os DE, enquanto o espaço intersticial era predominantemente formado por tecido conjuntivo frouxo, com diversos vasos sanguíneos dispersos (Figura 11A). Uma característica notável dos DE de suínos é a espessa camada de músculo liso imediatamente abaixo do tecido epitelial, a qual é significativamente mais desenvolvida em comparação com outras espécies estudadas. Considerando que as contrações rítmicas do músculo liso são um componente crucial para o transporte de espermatozoides através dos DE (Yuan et al., 2019), é fundamental compreender quais aspectos da fisiologia dos DE de suínos explicariam a necessidade de uma camada muscular mais espessa em relação às outras espécies.

Na região proximal e medial, os dutos eferentes (DE) apresentaram um diâmetro maior em comparação com a região distal. Além disso, o diâmetro do lúmen nas três regiões mostrou diferenças estatísticas significativas entre elas, sendo o maior diâmetro observado na região proximal, seguido pelas regiões medial e distal ( $p < 0,05$ ; Tabela 5). Stoffel e Friess (1994) relatam que a transição abrupta do epitélio da rete testis, com formato semelhante a paralelepípedos, para o epitélio ciliado colunar dos dutos eferentes ocorreu dentro da área de formato irregular da rede extratesticular. Essa transição resultou em um lúmen largo e irregular, revestido completa ou parcialmente pelo epitélio do duto eferente. De fato, os segmentos proximais dos DE possuem um diâmetro maior e um curso sinuoso. Assim como observado em roedores e equinos, a maior parte da reabsorção ocorre nas regiões

proximais, imediatamente após a saída da rede testicular (Hess, 2002). Além disso, nas regiões distais, o diâmetro do lúmen foi substancialmente reduzido (Stoffel e Friess, 1991). A redução gradual no diâmetro do lúmen ao longo das regiões pode refletir a progressiva reabsorção de fluido e concentração de espermatozoides à medida que se aproximam do epidídimo.



**Figura 10.** Macroscopia dos ductos eferentes de suínos. Os DE (circulados) estão situados entre o testículo (T) e o epidídimo (EP). Barra: 1 cm.

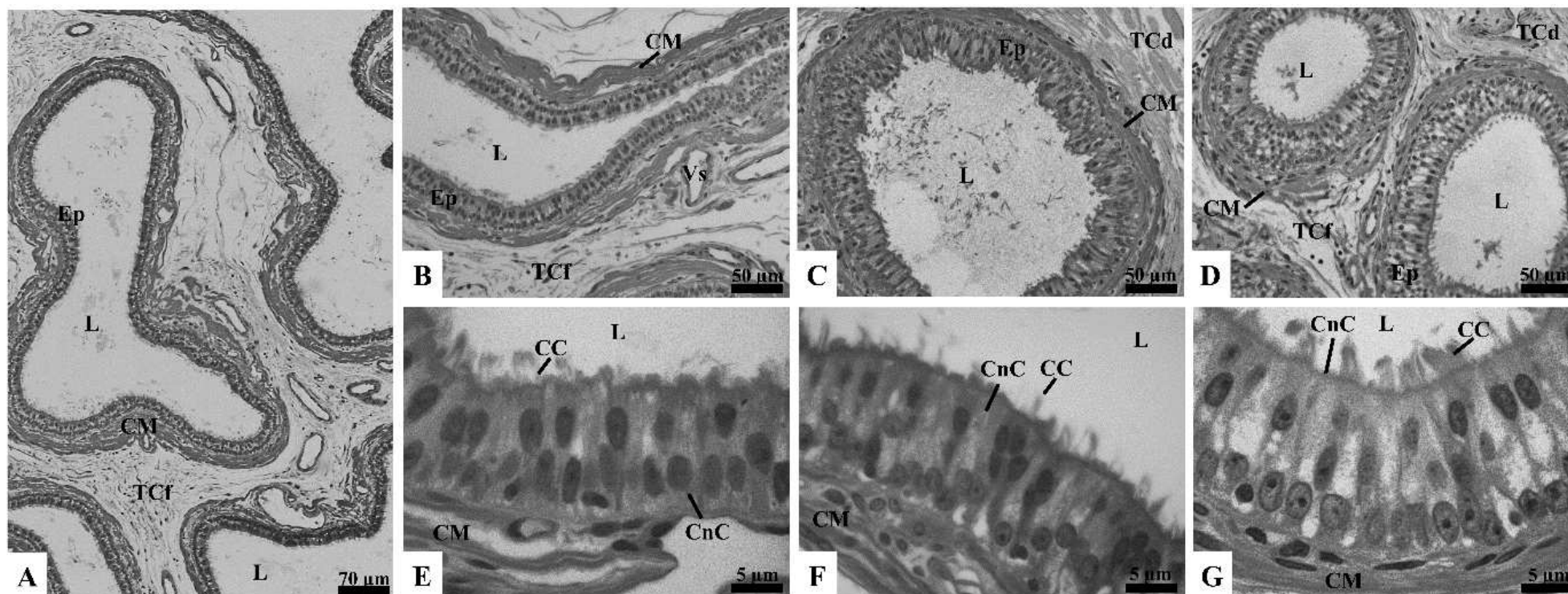
A altura do epitélio foi menor na região proximal ( $p < 0,05$ ; Tabela 5), enquanto entre as regiões medial e distal não foram observadas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ; Tabela 5). Observou-se, além disso, um aumento gradual na altura dos cílios na direção proximal-medial-distal ( $p < 0,05$ ; Tabela 5). Este padrão sugere uma adaptação funcional, onde cílios mais longos nas regiões mais distais podem auxiliar no movimento mais eficiente dos espermatozoides e do fluido ao longo dos ductos, compensando a diminuição do diâmetro do lúmen e a alta concentração de espermatozoides. Com relação à proporção de células, predominou a presença de células principais em ambas as regiões; no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre as proporções de células principais e ciliadas nas regiões proximal, medial e distal ( $p > 0,05$ ; Tabela 5). Grânulos foram observados em maior intensidade na região proximal em comparação com as outras regiões avaliadas (Figura 11G). A presença mais intensa de grânulos na região proximal pode indicar uma maior

atividade dessas células nesta parte dos ductos, contribuindo para a modificação do ambiente luminal logo após a saída dos espermatozoides dos testículos.

**Tabela 5.** Parâmetros morfométricos e proporção de células epiteliais dos ductos eferentes (DE) em suínos.

Parâmetro	Região		
	Proximal	Medial	Distal
<i>Morfometria dos DE (<math>\mu\text{m}</math>)</i>			
Diâmetro dos ductos	266.5 $\pm$ 14.07 <sup>a</sup>	244.9 $\pm$ 4.96 <sup>a</sup>	207.8 $\pm$ 5.31 <sup>b</sup>
Diâmetro do lúmen	244.6 $\pm$ 8.97 <sup>a</sup>	197.7 $\pm$ 8.66 <sup>b</sup>	153.0 $\pm$ 6.53 <sup>c</sup>
Altura do epitélio	21.91 $\pm$ 9.32 <sup>a</sup>	47.21 $\pm$ 4.37 <sup>b</sup>	54.73 $\pm$ 4.50 <sup>b</sup>
Altura dos cílios	7.16 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	9.20 $\pm$ 0.93 <sup>b</sup>	11.55 $\pm$ 0.69 <sup>c</sup>
<i>Proporção de células (%)</i>			
Células principais	71.35 $\pm$ 3.04 <sup>a</sup>	70.39 $\pm$ 7.33 <sup>a</sup>	65.19 $\pm$ 4.55 <sup>a</sup>
Células ciliadas	28.65 $\pm$ 3.04 <sup>a</sup>	29.61 $\pm$ 7.33 <sup>a</sup>	34.81 $\pm$ 4.55 <sup>a</sup>

Média  $\pm$  DP. Diferentes letras sobrescritas (<sup>a,b,c</sup>) na mesma linha indicam diferenças entre os grupos ( $p < 0,05$ ) pelo teste post hoc de Tukey ( $n = 5$  suínos).



**Figura 11.** Microscopia dos ductos eferentes (DE) de suínos. DE circundados por espessa camada muscular e unidos por tecido conjuntivo frouxo (TCf; A). Regiões proximal (B, E), medial (C, F) e distal (D,G), evidenciando: células ciliadas (CC), células não ciliadas (CnC), células musculares (CM), tecido conjuntivo frouxo (Tcf), vasos sanguíneos (Vs), lúmen (L), epitélio (Ep). Coloração: Azul de toluidina.

## 6. CONCLUSÃO

Este estudo revelou uma visão detalhada sobre a morfologia e estrutura dos DE em roedores, bovinos, equinos e suínos, destacando suas características distintas e especializações funcionais. Nos roedores, a dissecação facilitada pela distinção clara entre tecido adiposo e DE, bem como a observação detalhada com estereoscópio, permitiu uma caracterização precisa. As observações histológicas confirmaram que a estrutura dos DE é altamente especializada, com variações regionais significativas na proporção de células principais e ciliadas, refletindo a adaptação funcional para absorção e transporte de fluído e espermatozoides. As características morfométricas dos DE, como diâmetro e altura dos cílios, mostram uma clara adaptação à função de reabsorção e transporte, com uma maior proporção de células ciliadas nas regiões distais, alinhando-se com a literatura existente.

Nos bovinos, a dissecação revelou um agrupamento denso de DE, o que dificultou a individualização. Contudo, as características histológicas e morfométricas observadas, como a presença de tecido conjuntivo denso e a variação no diâmetro dos ductos e no lúmen, corroboram com a literatura, destacando a complexidade da estrutura dos DE bovinos e a necessidade de mais estudos para compreender as funções específicas dessas variações.

Nos equinos, a presença de tecido conjuntivo frouxo facilitou a dissecação, e os DE foram observados com um padrão morfológico consistente com o encontrado em outras espécies, porém com diferenças notáveis em diâmetro e proporção celular ao longo dos ductos. O padrão observado de aumento da proporção de células ciliadas nas regiões mais distais indica um papel importante na homogeneização do fluído testicular e na movimentação dos espermatozoides.

Já em suínos, a espessa camada de gordura e de músculo liso destacam a complexidade dos DE nesta espécie. As diferenças morfométricas observadas, como o diâmetro maior dos ductos e lúmen nas regiões proximais, bem como a maior altura dos cílios nas regiões mais distais, sugerem uma adaptação funcional distinta para a reabsorção e transporte de espermatozoides. A presença mais intensa de grânulos na região proximal pode refletir uma maior atividade celular nesta área.

Em geral, as características descritas para os DE refletem adaptações funcionais específicas que permitem o ajuste eficiente das funções dos ductos eferentes para o transporte e modificação do fluído testicular. Esses achados

contribuem para um entendimento mais aprofundado da estrutura e função dos DE, ressaltando a complexidade e a importância desses ductos na fisiologia reprodutiva. Estudos futuros poderão ampliar o conhecimento sobre as particularidades funcionais e estruturais dos DE, contribuindo para uma compreensão mais abrangente da fisiologia reprodutiva em diferentes contextos. De fato, alterações dos DE têm sido correlacionadas às importantes causas de subfertilidade e infertilidade em machos. No entanto, os mecanismos que regulam sua atividade ainda são pouco esclarecidos. Neste sentido, é importante que mais informações sobre os aspectos microscópicos e funcionais, como ultraestrutura das células e presença de receptores para hormônios esteroides, dos DE nas diferentes espécies sejam investigadas para auxiliar na condução de estudos mais avançados.

## REFERÊNCIAS

- Alkafafy, M. (2005). *Glycohistochemical, immunohistochemical and ultrastructural studies of the bovine epididymis* (Doctoral dissertation, Imu).
- Amann RP, Almquist JO. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J Dairy Sci.* 1962;45(6):774-81. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(62\)89487-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(62)89487-9).
- Amann, R. P. (1981). A review of anatomy and physiology of the stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, 1(3), 83-105.
- Apra, I., Nöthe-Menzen, T., Dougherty, G. W., Raidt, J., Loges, N. T., Kaiser, T., ... & Omran, H. (2021). Motility of efferent duct cilia aids passage of sperm cells through the male reproductive system. *Molecular human reproduction*, 27(3), gaab009.
- Arrighi, S., Romanello, M. G., & Domeneghini, C. (1994). Ultrastructure of the epithelium that lines the ductuli efferentes in domestic equidae, with particular reference to spermatophagy. *Cells Tissues Organs*, 149(3), 174-184.
- Beu, C. C. L., Orsi, A. M., & Domeniconi, R. F. (2009). Structure of the lining epithelium of the cauda epididymis of the golden hamster. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 38(1), 49-57.
- Brito, L. F., Silva, A. E., Unanian, M. M., Dode, M. A., Barbosa, R. T., & Kastelic, J. P. (2004). Sexual development in early-and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. *Theriogenology*, 62(7), 1198-1217.
- Chu, Y., Huddleston, G. G., Clancy, A. N., Harris, R. B., & Bartness, T. J. (2010). Epididymal fat is necessary for spermatogenesis, but not testosterone production or copulatory behavior. *Endocrinology*, 151(12), 5669-5679.
- Clulow, J., Jones, R. C., & Hansen, L. A. (1994). Micropuncture and cannulation studies of fluid composition and transport in the ductuli efferentes testis of the rat: comparisons with the homologous metanephric proximal tubule. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 79(6), 915-928.
- Crabo, B., Gustafsson, B., Nicander, L., & Rao, A. R. (1971). Subnormal testicular function in a bull concealed by phagocytosis of abnormal spermatozoa in the efferent ductules. *Reproduction*, 26(3), 393-NP.
- Cunningham, J. T. (1928). On ligation of the vas deferens in the cat and researches on the efferent ducts of the testis in cat, rat and mouse. *Journal of Experimental Biology*, 6(1), 12-25.
- Flickinger, C. J., Howards, S. S., & English, H. F. (1978). Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. *American Journal of Anatomy*, 152(4), 557-585.

Goyal, H. O., & Hrudka, F. (1980). The resorptive activity in the bull efferent ductules—a morphological and experimental study. *Andrologia*, 12(5), 401-414.

Gray, B. W., Brown, B. G., Ganjam, V. K., & Whitesides, J. F. (1983). Effect of deprival of rete testis fluid on the morphology of efferent ductules. *Biology of reproduction*, 29(2), 525-534.

Gregory, J. W. (2012). Avaliação do desenvolvimento testicular de equinos da raça crioula no período da peri-puberdade.

Hemeida, N. A., Sack, W. O., & McEntee, K. (1978). Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull, and stallion. *American Journal of Veterinary Research*, 39(12), 1892-1900.

Hess, R. (2015). Small tubules, surprising discoveries: from efferent ductules in the turkey to the discovery that estrogen receptor alpha is essential for fertility in the male. *Animal reproduction*, 12(1), 7.

Hess, R. A. (2000). Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Reviews of reproduction*, 5(2), 84-92.

Hess, R. A. (2002). The efferent ductules: structure and functions. *The epididymis: From molecules to clinical practice: A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens*, 49-80.

Hess, R.A. (2018) Endocrinology and pathology of *rete testis* and efferent ductules. In: JÉGOU, B.; SKINNER, M.K. Encyclopedia of Reproduction. 2.ed., v.1 Washington : Elsevier Inc, p.279-285.

Hess, R.A. (2018b) Efferent ductules: structure and function. In: Encyclopedia of Reproduction. 2.ed., v.1 Washington : Elsevier Inc, p.270-278.

Heuser, A., Mecklenburg, L., Ockert, D., Kohler, M., & Kemkowski, J. (2013). Selective inhibition of PDE4 in Wistar rats can lead to dilatation in testis, efferent ducts, and epididymis and subsequent formation of sperm granulomas. *Toxicologic pathology*, 41(4), 615-627.

Hoffer, A. P., Hamilton, D. W., & Fawcett, D. W. (1975). Phagocytosis of spermatozoa by the epithelial cells of the ductuli efferentes after epididymal obstruction in the rat. *Reproduction*, 44(1), 1-9.

Ilio, K. Y., & Hess, R. A. (1994). Structure and function of the ductuli efferentes. *Microsc Res Tech*, 29, 432-467.

Jones, R., & Jurd, K. M. (1987). Structural differentiation and fluid reabsorption in the ductuli efferentes testis of the rat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 40(1), 79-90.

Jonte, G., & Holstein, A. F. (1987). On the morphology of the transitional zones from the rete testis into the ductuli efferentes and from the ductuli efferentes into the ductus

epididymidis. Investigations on the human testis and epididymis. *Andrologia*, 19(3), 398-412.

Klinefelter, G. R., & Hess, R. A. (1998). Toxicology of the male excurrent ducts and accessory sex glands. *Reproductive and developmental toxicology*, 553-591.

Kohler, T., & Leiser, R. (1983). Blood Vessels of the Bovine Chorioidea: A Scanning Electron Microscopic Study. *Cells Tissues Organs*, 116(1), 55-61.

La, D. K., Creasy, D. M., Hess, R. A., Baxter, E., Pereira, M. E., Johnson, C. A., ... & Snook, S. S. (2012). Efferent duct toxicity with secondary testicular changes in rats following administration of a novel leukotriene A4 hydrolase inhibitor. *Toxicologic pathology*, 40(5), 705-714.

Olson, G. E., & Hinton, B. T. (1985). Regional differences in luminal fluid polypeptides of the rat testis and epididymis revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of andrology*, 6(1), 20-34.

Orgebin-Crist, M.C. (1969) Studies on the function of the epididymis. *Bioi Reprod (Suppl)*, v.1, p.155-75.

Picut, C. A., & Remick, A. K. (2017). Impact of age on the male reproductive system from the pathologist's perspective. *Toxicologic pathology*, 45(1), 195-205.

Pinto, L. C. F., Leão, K. M., do Carmo Silva, N., de Sousa Araújo, L., da Silva, R. P., & da Silva, M. A. P. (2011). Efeito dos níveis de proteína bruta da ração no comportamento e maturidade sexual de suínos machos. *Pubvet*, 5, Art-1124.

Saitoh, K., Terada, T., & Hatakeyama, S. (1990). A morphological study of the efferent ducts of the human epididymis. *International journal of andrology*, 13(5), 369-376.

Sousa, S. D. (2015). Proteômica do fluido da Rete Testis de carneiros Morada Nova. Stoffel, M. H., & Friess, A. E. (1994). Morphological characteristics of boar efferent ductules and epididymal duct. *Microscopy research and technique*, 29(6), 411-431.

Suzuki, F., & Nagano, T. (1978). Regional differentiation of cell junctions in the excurrent duct epithelium of the rat testis as revealed by freeze-fracture. *The Anatomical Record*, 191(4), 503-519.

Talo, A. (1981). In-vitro spontaneous electrical activity of rat efferent ductules. *Reproduction*, 63(1), 17-20.

Veeramachaneni, D. R., & Amann, R. P. (1991). Endocytosis of Androgen-Binding Protein, Cluster in, and Transferrin in the Efferent Ducts and Epididymis of the Ram. *Journal of andrology*, 12(5), 288-294.

Wang, S., Jones, R. C., & Clulow, J. (1994). Surface area of apical and basolateral plasmalemma of epithelial cells of the ductuli efferentes testis of the rat. *Cell and tissue research*, 276, 581-586.

Wrobel, K. -H. (1972). *Z. Zellforsch.*, 135: 129.

Yang, C. F., Liu, W. W., Wang, H. Q., Zhang, J. L., Li, K., Diao, Z. Y., ... & Sun, H. X. (2022). Gonadal white adipose tissue is important for gametogenesis in mice through maintenance of local metabolic and immune niches. *Journal of Biological Chemistry*, 298(5).

Yeung, C. H., Cooper, T. G., Bergmann, M., & Schulze, H. (1991). Organization of tubules in the human caput epididymidis and the ultrastructure of their epithelia. *American Journal of Anatomy*, 191(3), 261-279.

Yuan, S., Liu, Y., Peng, H., Tang, C., Hennig, G. W., Wang, Z., ... & Yan, W. (2019). Motile cilia of the male reproductive system require miR-34/miR-449 for development and function to generate luminal turbulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(9), 3584-3593.