

Morfologia da bolsa cloacal de emas, *Rhea americana americana* Linnaeus, 1758¹

Radan E.M. Oliveira^{2*}, Hélio N. Araújo Júnior², Felipe V. Câmara³,
Franceliusa D. Oliveira⁴, Herson S. Costa², Ferdinando V.F. Bezerra²,
Carlos E.B. Moura² e Moacir F. Oliveira²

ABSTRACT.- Oliveira R.E.M., Araújo Júnior H.N., Câmara F.V., Oliveira F.D., Costa H.S., Bezerra F.V.F., Moura C.E.B. & Oliveira M.F. 2018. [Morphology of rhea's cloacal bursa, *Rhea americana americana* Linnaeus, 1758.] Morfologia da bolsa cloacal de emas, *Rhea americana americana* Linnaeus, 1758. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(8):1696-1704. Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Rua Francisco Mota 572, Presidente Costa e Silva, Mossoró, RN 59625-900, Brazil. E-mail: radan_elvis@hotmail.com

The cloacal bursa is the bird's organ responsible for maturation and transfer of lymphocytes to other tissues. Despite the importance of this organ in the immunological mechanisms of these animals, information about their morphology in rhea are scarce. We used 12 animals (6 males and 6 females) for light, transmission electron, and scanning microscopy. Microscopically, the cloacal bursa presented the inner mucosa consists of pleated lymphoid lobes of various sizes, organized as alveolar structure, in all ages. In each nail was found four histological components: mucosa, submucosa, muscular and adventitia layers. These lobes were composed of a cortical zone, a corticomedular zone and a medular area. It was verified the existence of varying sizes lymphocytes, lymphoblasts, blood capillaries, epithelial reticular cells and macrophages. By scanning electron microscopy, it was found that the mucous membrane surface of the bursal lobes showed polygonal projections, with the presence of short microvilli membranes throughout the surface. The comparison between 0 and 15 weeks demonstrated the development of the bursal lobes. The morphological pattern of the rhea cloacal bursa differs from standard commonly reported for other birds such as wild duck, Angola's chicken, native goose, turkey, Japanese quail, and Hawk.

INDEX TERMS: Morphology, rhea, cloacal bursa, *Rhea americana americana*, microscopy, ratita, ultrastructure, histology.

RESUMO.- A bolsa cloacal é o órgão das aves responsável pela maturação e transferência de linfócitos para outros tecidos. Apesar da importância deste órgão nos mecanismos imunológicos desses animais, são escassas as informações a respeito de sua morfologia em emas. Neste estudo, objetivou-se descrever o desenvolvimento morfológico da bolsa cloacal de emas jovens. Utilizou-se 12 animais de ambos os sexos

(6 machos e 6 fêmeas) para a microscopia de luz, eletrônica de transmissão e varredura. Microscopicamente, a bolsa cloacal da ema apresentou, em todas as idades a mucosa interna pregueada composta por lóbulos linfóides de diversos tamanhos, organizados como estrutura alveolar. Em cada prega verificou-se quatro componentes histológicos: as camadas mucosa, submucosa, muscular e adventícia. Esses lóbulos eram compostos de uma zona cortical, uma zona corticomedular e uma zona medular. Verificou-se a existência de linfócitos de tamanhos variados, linfoblastos, capilares sanguíneos, células reticulares epiteliais e macrófagos. Pela microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que a superfície da mucosa dos lóbulos bursais apresentaram projeções poligonais, com a presença de curtas microvilosidades em toda a superfície. A comparação nas idades de 0 e 15 semanas de vida demonstrou o desenvolvimento dos lóbulos bursais. O padrão morfológico da bolsa cloacal de emas difere do

¹ Recebido em 12 de julho de 2017.

Aceito para publicação em 5 de outubro de 2017.

² Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Rua Francisco Mota 572, Presidente Costa e Silva, Mossoró, RN 59625-900, Brasil. *Autor para correspondência: radan_elvis@hotmail.com

³ Universidade Potiguar (UnP), Avenida Sen. Salgado Filho 1610, Lagoa Nova, Natal, RN 59056-000, Brasil.

⁴ Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brasil.

padrão comumente reportado para outras aves tais como pato selvagem, galinha da angola, ganso nativo, peru, codorna japonesa e falcão.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Morfologia, bolsa cloacal, emas, *Rhea americana americana*, microscopia, ratitas, ultraestrutura, histologia.

INTRODUÇÃO

O conhecimento da morfologia da ema é importante para auxiliar no manejo sanitário, na sua criação em cativeiro, além de contribuir em procedimentos clínico-cirúrgicos. Já foram descritos na literatura vários estudos que dizem respeito à morfologia dessas aves, podendo ser encontrados trabalhos referentes à morfologia das células do sangue periférico (Fortes et al. 2009) do sistema reprodutor masculino e cloaca (Santos et al. 2011), e do sistema digestório (Rodrigues et al. 2012). Entretanto, são escassas as informações acerca da morfologia da bolsa cloacal, destacando-se apenas trabalhos pioneiros que descrevem a morfologia da bursa, como o de Rautenfeld & Budras (1982), e um mais recente (Elbrond et al. 2009), porém pouco detalhado, no qual os autores não abordam o desenvolvimento morfológico da bolsa cloacal de emas jovens.

A bolsa cloacal em Rheas é um apêndice craniodorsal do proctodeo, separado por uma prega bursoproctodeal. A mucosa interna é modificada em uma rede de pregas, caracterizada por apresentar lóbulos linfoides em toda sua extensão (Rautenfeld & Budras 1982), os quais apresentam linfócitos, linfoblastos, células reticulares epiteliais, capilares sanguíneos, plasmócitos e macrófagos (Ackerman 1962, Song et al. 2012). Os vasos que irrigam a bolsa cloacal de emas (*Rhea americana americana*) estão representados pelas artérias bursocloacais e cloacais direita e esquerda, oriundas das artérias pudendas internas direita e esquerda e em alguns ocorre ainda a participação da artéria mesentérica caudal (Oliveira et al. 2016). Este órgão é o local de diferenciação de linfócitos B, desempenhando papel importante no sistema de defesa humoral do organismo das aves (Dyce et al. 2010).

Existem diversas patologias infectocontagiosas que acometem as aves e que causam alterações tanto na estrutura quanto na função da bolsa cloacal. Por exemplo, a bursite infecciosa viral aguda, acomete aves jovens nas quais a bolsa cloacal é primeiramente envolvida, sendo considerada uma das principais causas de imunossupressão, alta mortalidade e aumento das taxas de condenações de carcaças (Butcher & Miles 2014). Desta forma, o presente estudo poderá contribuir com informações importantes para a indústria de fabricação de vacinas, visto que a bolsa cloacal é um órgão que indica a resposta imune quando se administra cepas de virais, e que, através do exame anatomohistopatológico, pode-se observar alterações morfológicas no órgão (Al-Mayah & Tabeekh 2010, Villanueva & Bernardo 2015).

Este estudo foi desenvolvido levando em consideração a escassez de informações sobre a morfologia da bolsa cloacal de emas e objetivando-se estabelecer o modelo padrão para a bolsa cloacal nesta espécie. Os resultados trarão informações importantes para a obtenção de diagnóstico de doenças por meio de exame anatomohistopatológico, visando a melhoria do manejo sanitário da espécie em cativeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. As emas (*Rhea americana americana* Linnaeus, 1758) foram obtidas no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Foram utilizados 12 animais jovens de ambos os sexos (seis machos e seis fêmeas), sendo quatro animais para cada uma das seguintes idades: 0, 6 e 15 semanas. Os animais foram pré-medicados com cloridrato de xilazina (1mg/Kg) pela via intramuscular. Atingido o estágio de sedação foram eutanasiados com uma sobre dose anestésica de tiopental (150mg/Kg) e administração de cloreto de potássio (2,56mEq/Kg), ambos por via intracardíaca. Em seguida, foram dissecados para obtenção das amostras para microscopia de luz e microscopia eletrônica. O presente projeto foi aprovado no SISBIO sob nº 48847-1 e pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal sob nº 23091.006434/2015-31.

A nomenclatura adotada neste estudo se baseia no Handbook of Avian Anatomy: nomina anatomica avium (Baumel et al. 1993) para a denominação das estruturas identificadas e os resultados comparados com a literatura referente a estudos com aves domésticas e silvestres, sendo os resultados expressos com base em anatomia descritiva e avaliados com base no cálculo de porcentagem simples.

Microscopia de luz. Para microscopia de luz foram usadas técnicas histológicas preconizadas por Tolosa et al. (2003). Os cortes foram aderidos às lâminas de vidro e deixados em estufa a 60°C "overnight", para posterior procedimento de coloração com hematoxilina e eosina (HE), azul de toluidina (AT) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Leica -modelo ICC50 HD) e imagens obtidas por meio do programa LAS EZ Ink.

Microscopia eletrônica de transmissão. Para as análises, foram usados fragmentos da bolsa cloacal de todas as idades coletadas, com cerca de 0,5mm². As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% tamponado com PBS 0,1M e pH 7,4. Em seguida, foram lavadas três vezes em tampão PBS durante 10 minutos, pós-fixadas em Tetróxido de Ósmio tamponado com PBS, por 2hs e em seguida, lavadas três vezes com solução tampão PBS 0,1M e pH 7,4 durante 10 minutos e uma única vez em água destilada por 15 minutos. Os fragmentos foram desidratados em uma série de álcool etílico (50%, 70%, 80%, 90%, 100%, com três trocas a cada 15 minutos). Em seguida banhadas com Óxido de Propileno por 10 minutos e depois imersas em mistura de óxido de propileno e resina Spurr na proporção 1:1 por seis horas. Posteriormente, foram imersas em resina Spurr pura durante 12 horas e inclusas em resina para obtenção dos blocos. Após o processamento, foram obtidos cortes semi-finos com 0,4µm de espessura em ultramicrotomo (LEICA, modelo: Reichert Ultracut S), sendo corados em azul de toluidina a 1% para identificação do material. Logo após realizou-se os cortes ultrafinos de 0,07µm, que foram contrastados em acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo a 0,5% para análise em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni268D, FEI Company, The Netherlands; Mega View III Câmera, Solf Imaging, Germany).

Microscopia eletrônica de varredura. Foram coletados fragmentos da bolsa cloacal em um animal de zero dia de idade e um animal de 15 semanas fixados em glutaraldeído 2,5% tamponado com PBS 0,1M e pH 7,4. Os fragmentos foram lavados com o tampão PBS, pós-fixados com Tetróxido de Ósmio 1% tamponado com PBS 0,1M e pH 7,4 por duas horas, e posteriormente realizados três lavagens em tampão fosfato 0,1M pH 7,2 e duas com água destilada. Em seguida, foram imersos em ácido tânico 1% e desidratados em série de álcoois crescentes (50%, 70%, 90% e 100%). Por último, foi feita a desidratação e secagem em aparelho de ponto crítico

utilizando gás carbônico e montagem do material em suportes (Stub) e recobrimento metálico com ouro "sputtering", para observação em microscópio eletrônico de varredura (LEO VP 435-Carl-Zeis, Oberkochen, Germany).

RESULTADOS

Microscopia de luz

Histologicamente, a bolsa cloacal da ema em todas as idades apresentou mucosa interna pregueada composta por lóbulos linfoides, de diversos tamanhos, organizados como uma estrutura alveolar. Composta por quatro camadas, sendo, a camada mucosa, submucosa, camada muscular e adventícia (Fig.1A). A mucosa é formada por dois tipos de células epiteliais, o epitélio associado ao lóbulo (EAL), PAS positivo, de forma simples e pavimentosa, e o outro tipo é o epitélio interlobular (EIL) também PAS positivo, de forma colunar e pseudoestratificado (Fig.2). A submucosa é delgada, composta por tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos. Já a camada muscular é composta por músculo liso, com suas fibras dispostas de forma longitudinal e circular, enquanto a adventícia é uma membrana fibrosa bem simples (Fig.1A, B).

Os lóbulos bursais são constituídos por três zonas, a cortical, corticomedular e medular. Foi observado nos

animais de zero dia de vida que as zonas cortical e medular apresentaram-se homogêneas e desta forma não conseguindo diferenciá-las. A partir de 6 e 15 semanas de idade, foi possível diferenciar a região cortical da medular, onde a zona cortical corou-se fracamente em relação a zona medular na região periférica do lóbulo bursal. A zona corticomedular é caracterizada por uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo delimitando o córtex da medula e com a presença de vasos sanguíneos (capilares). A zona medular é a parte central do lóbulo bursal, ocupando uma porção maior do lóbulo quando comparado com a zona cortical. Além disso, foi observado a presença de cistos nas três zonas dos lóbulos bursais nos animais com 6 e 15 semanas de idade, revestidos por epitélio pavimentoso simples, com lúmen repleto de substância mucoide (Fig.1).

Microscopia eletrônica de transmissão e varredura

Os lóbulos bursais continham linfócitos de tamanhos variados, vasos sanguíneos (capilares) e algumas células reticulares epiteliais e macrófagos dispersos. Os linfócitos apresentaram os núcleos heterocromáticos quando comparados com as células reticulares, com nucléolos evidentes e pouco citoplasma. Os linfoblastos tenderam a ser ligeiramente maiores do que os linfócitos e arredondados em contorno

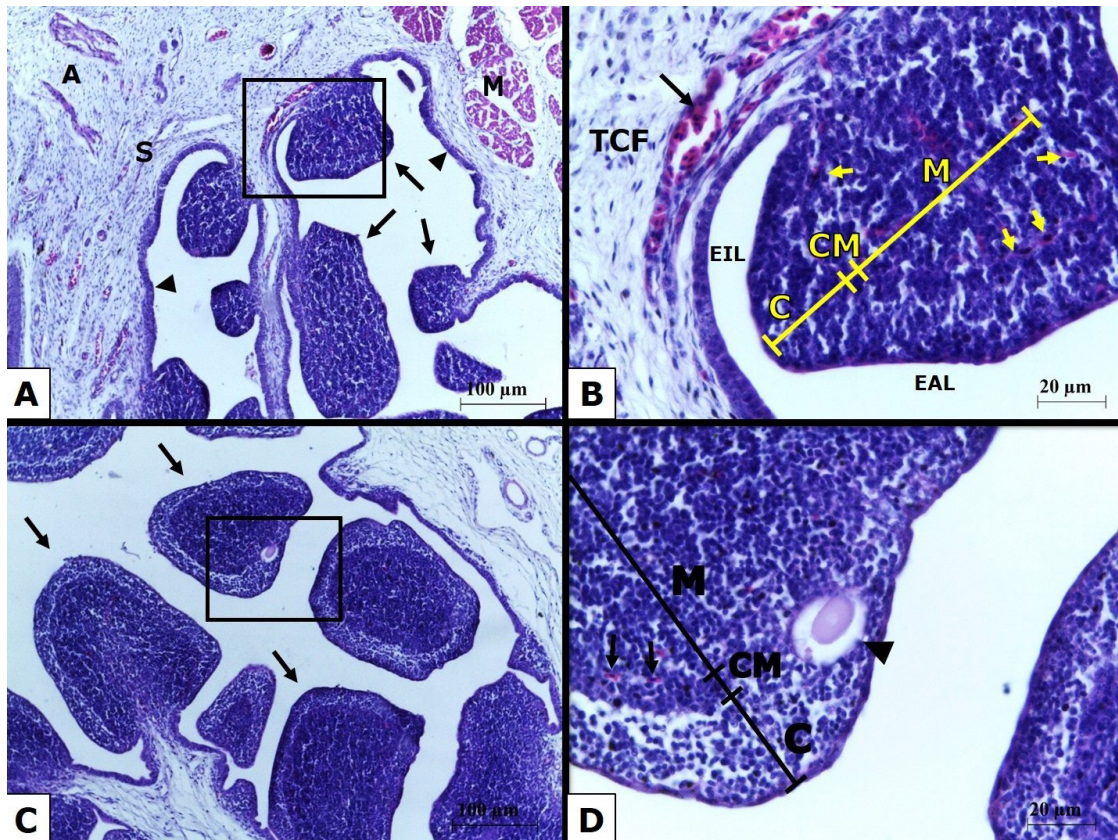


Fig.1. (A,B) Microscopia de luz da bolsa cloacal de ema com zero dia de vida e (C,D) com 15 semanas de idade. (A) Mucosa, representada pelos lóbulos linfoides (setas) e o epitélio interlobular (cabeça de seta), submucosa (S), muscular (M) e adventícia (A). HE, bar=100μm. (B) Três zonas no lóbulo linfóide, a medular (M), corticomedular (CM), cortical (C), vasos sanguíneos (seta preta), capilares sanguíneos (setas amarelas), tecido conjuntivo frouxo (TCF), epitélio pavimentoso simples (EAL) e o epitélio pseudoestratificado colunar (EIL). HE, bar=20μm. (C) Lóbulos linfoides (setas), onde a zona medular corou mais intensamente do que a região cortical. HE, bar=100μm. (D) Zona medular (M), zona corticomedular (CM), zona cortical (C), capilares sanguíneos (setas) e cistos (cabeça de seta). HE, bar=20μm.

com citoplasma. As células reticulares apresentaram grandes núcleos ovais euromáticos, que normalmente continham um ou dois nucléolos pequenos e evidentes, estando dispersos em todo parênquima do lóbulo bursal. Os macrófagos têm núcleo pequeno, heterocromático, com nucléolos evidentes e citoplasma bastante desenvolvido (Fig.3).

As células do epitélio da mucosa apresentaram grânulos de mucina intracitoplasmático na região apical, além de mitocôndrias. O núcleo localizava-se na região basal da célula, além da presença de curtas microvilosidades em toda superfície celular (Fig.4). Essas células epiteliais apresentaram as junções celulares do tipo desmossomos. O citoplasma

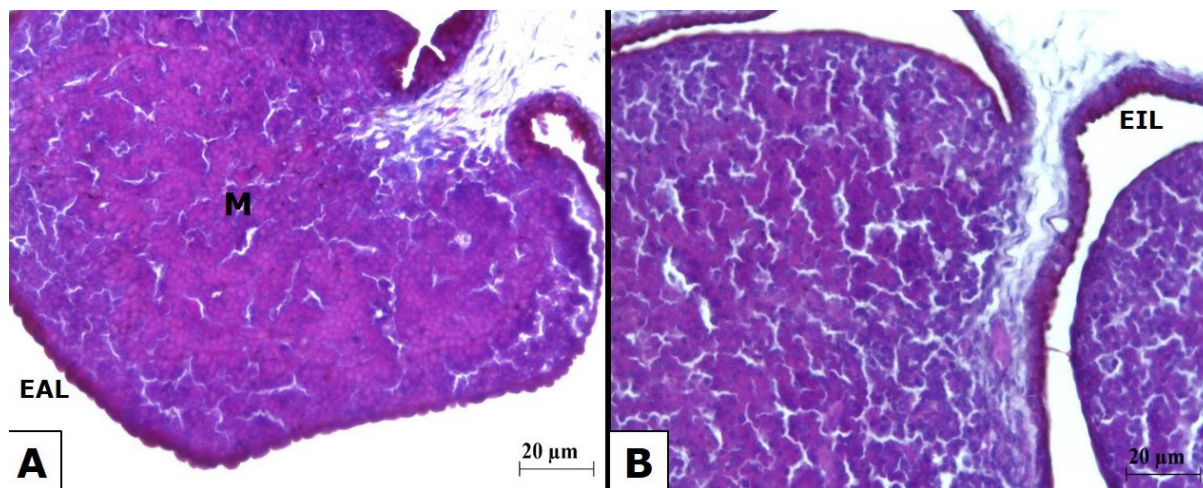


Fig.2. (A,B) Microscopia de luz da bolsa cloacal de ema com 6 semanas de vida. (A) Epitélio associado ao lóbulo bursal (EAL), do tipo pavimentoso simples, e a zona medular (M), PAS positivo. (B) Epitélio interlobular (EIL), do tipo pseudoestratificado colunar, também PAS positivo. PAS, bar=20µm.

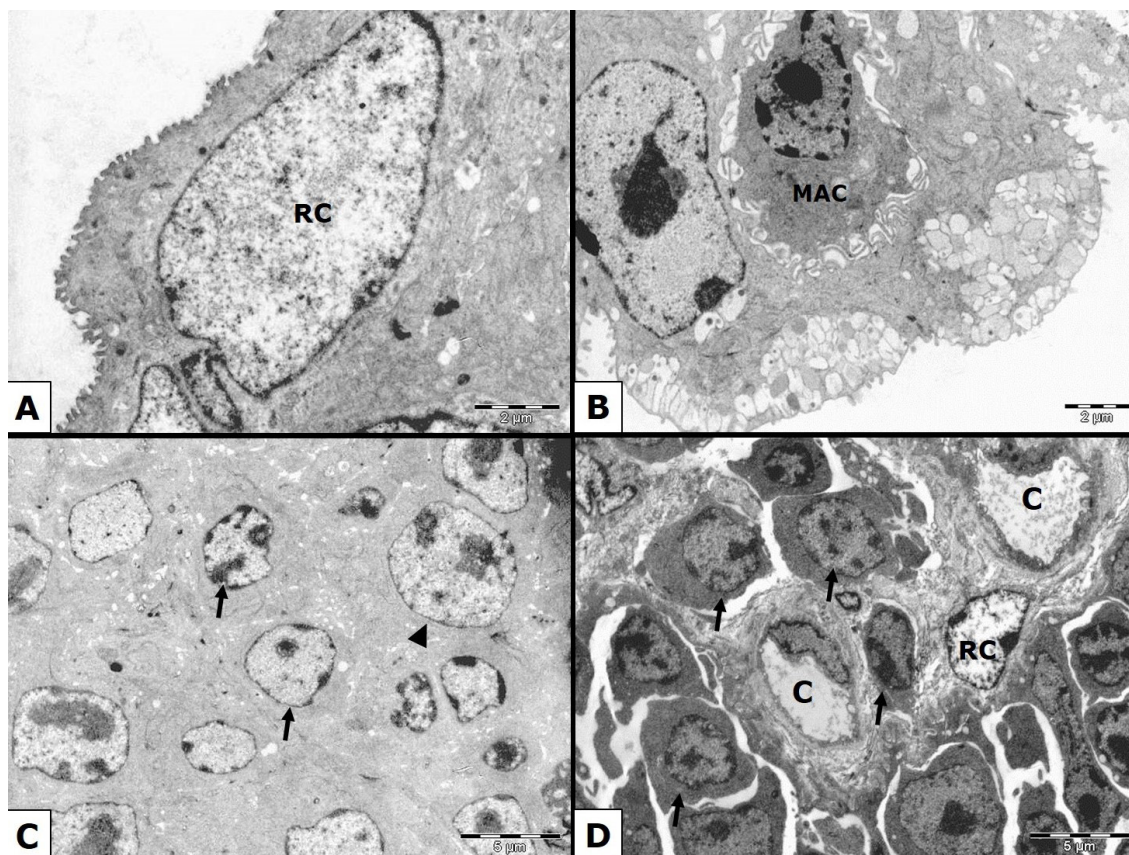


Fig.3. (A,B) Ultraestrutura dos reticulares, macrófagos, linfócitos e vasos sanguíneos da bolsa cloacal de emas com zero dia de vida, (C) 6 semanas de idade e (D) 15 semanas de idade. (A) Célula epitelial reticular (RC) na região cortical do lóbulo bursal. (B) Macrófago (MAC) na região cortical do lóbulo bursal. (C) Linfócitos (setas), linfoblasto (cabeça de seta). (D) Dois capilares (C) circundados por vários linfócitos (setas) e célula reticular (RC).

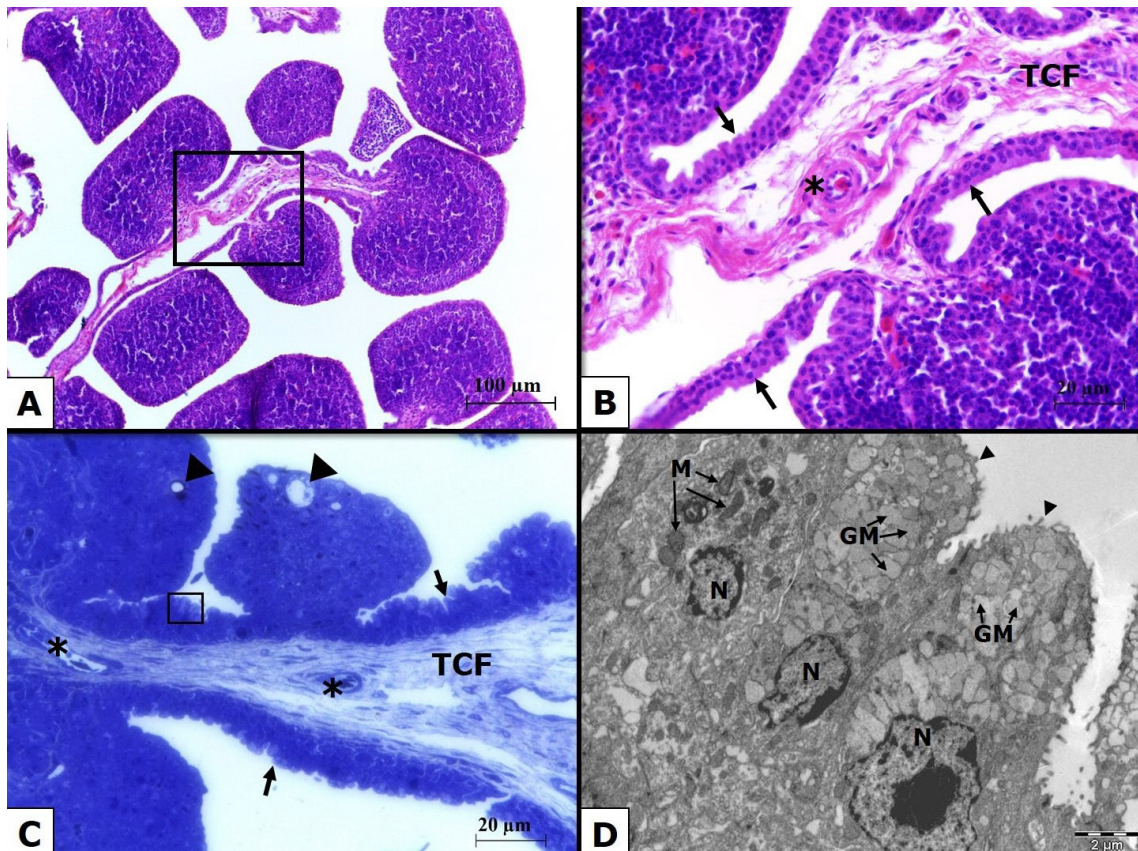


Fig.4. (A-C) Microscopia de luz da bolsa cloacal de emas com 6 semanas de idade e (D) microscopia eletrônica de transmissão de emas de 6 semanas de idade. (A) Conjunto de lóbulos bursais interligados por estrutura peduncular. HE, bar=100μm. (B) Estrutura peduncular com a mucosa constituída de tecido epitelial pseudoestratificado colunar com microvilosidades (setas) e a submucosa constituída de tecido conjuntivo frouxo (TCF) com vasos sanguíneos (*). HE, bar=20μm. (C) Mucosa constituída de tecido epitelial pseudoestratificado colunar (setas) e a submucosa constituída de tecido conjuntivo frouxo (TCF) com vasos sanguíneos (*) e a presença de cistos (cabeça de seta). Azul de toluidina, bar=20μm. (D) Observam-se por meio da ultraestrutura as células da mucosa, constituído de muitos grânulos de mucina intracitoplasmático na região apical (GM), numerosas mitocôndrias (M), o núcleo na região basal da célula (N) e microvilosidades em toda superfície das células (cabeça de seta).

das células continha numerosos ribossomos livres e o retículo endoplasmático rugoso bastante desenvolvido com densidade ligeiramente maior do que a matriz citoplasmática. As mitocôndrias apresentaram-se ovais ou em forma de bastão e estão presentes e espalhadas por todo o citoplasma das células. Alguns lisossomos e complexo de Golgi foram evidenciados nessas células (Fig.5).

Na microscopia eletrônica de varredura, foi observado que a mucosa interna da bolsa cloacal se demonstrou pregueada, composta por lóbulos bursais, de tamanhos variados, organizados como estrutura alveolar, e isso pode ser também verificado na microscopia de luz. Observou-se ainda que, nos animais de zero a 15 semanas de idade, tiveram o desenvolvimento dos lóbulos bursais (Fig.6). A superfície da mucosa dos lóbulos bursais apresentaram projeções poligonais, com microvilosidades em toda a superfície (Fig.7).

DISCUSSÃO

Microscopia

Nas aves, foi observado que a bolsa cloacal apresenta pregas em toda a superfície da mucosa interna, e em cada prega existe um aglomerado de lóbulos e/ou folículos linfoides na

lâmina própria, separados por trabéculas de tecido conjuntivo, a exemplo do que foi relatado em pato selvagem (Ward & Middleton 1971), galinha da angola (Onyeanus et al. 1993), ganso nativo (Gülmez & Aslan 1999), peru (Sari & Kurtde 2007), codorna japonesa (Al-Tememy et al. 2011) e falcão (Sari et al. 2015). Em contrapartida, na ema, observou-se a mucosa pregueada composta por lóbulos linfoides, de diversos tamanhos, distribuídos isoladamente na lâmina própria, como estrutura alveolar, sendo esses achados semelhantes aos relatados para emas adultas (Elbrond et al. 2009) e em pintos de avestruzes (Song et al. 2012).

Em ganso nativo (Gülmez & Aslan 1999), peru (Sari & Kurtde 2007), codorna japonesa (Al-Tememy et al. 2011) e no falcão (Sari et al. 2015), a bolsa cloacal é formada por três túnicas, mucosa, muscular e serosa, enquanto que em estudos realizados com pintos de avestruzes (Song et al. 2012), foram observadas quatro túnicas, mucosa, submucosa, muscular e adventícia, corroborando com nossos resultados. Essa semelhança com o avestruz pode estar relacionada com o que Dani (1993), mencionou que a ema apresenta similaridades morfológicas, bioquímicas, genéticas e comportamentais com o avestruz.

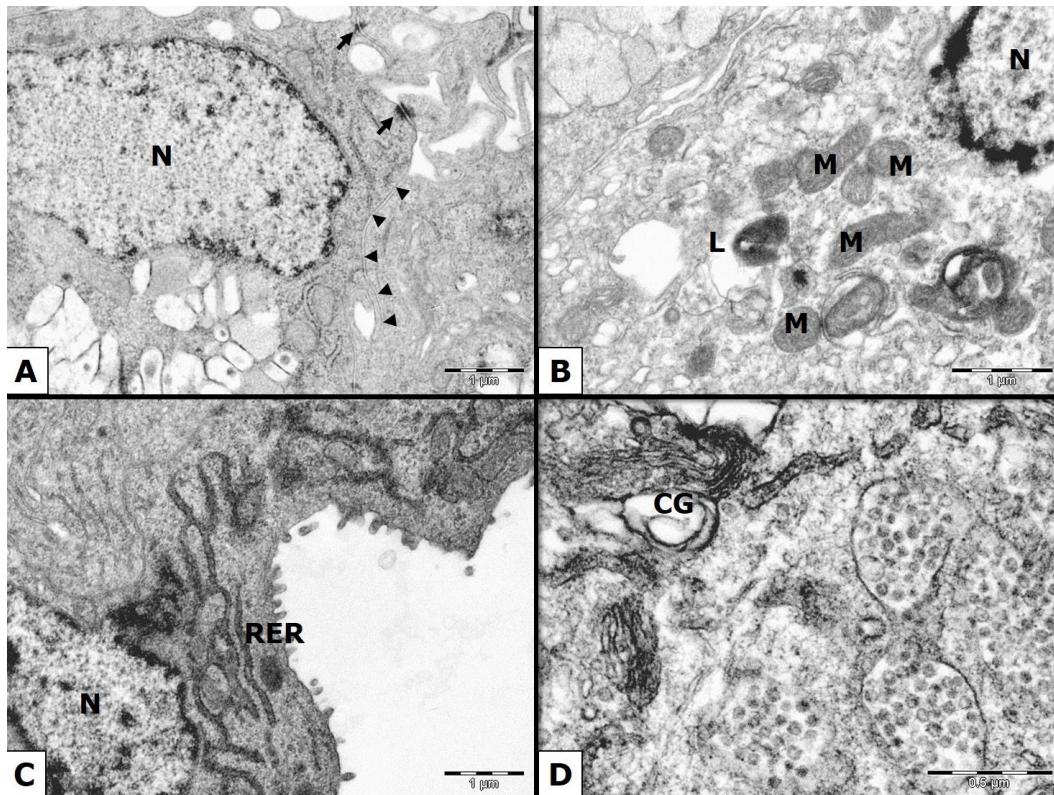


Fig.5. (A) Ultraestrutura da mucosa da bolsa cloacal de emas com zero dia de vida, (B,C) 6 semanas de idade e (D) 15 semanas de idade. (A) Desmossomos (setas) da célula da mucosa (N) com a célula adjacente e a membrana plasmática (cabeças de setas). (B) Núcleo da célula da mucosa (N), lisossomo (L) e mitocôndrias (M). (C) Retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido (RER) da mucosa. (D) Complexo de Golgi (CG).

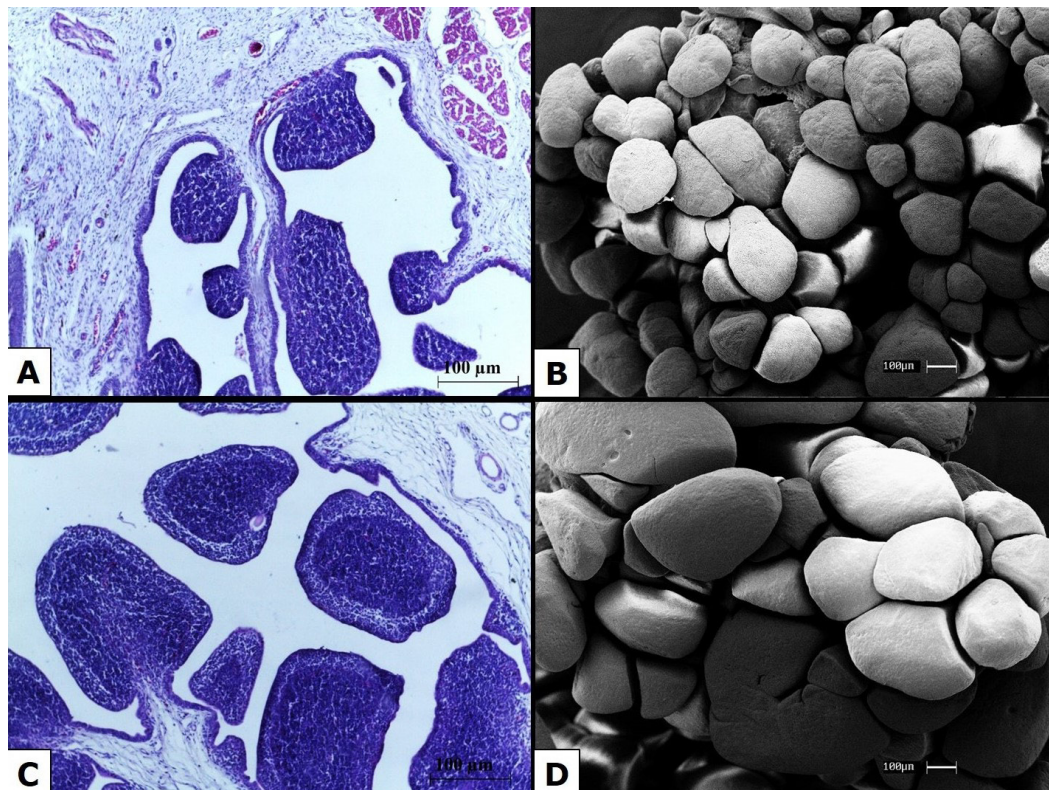


Fig.6. Microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura da bolsa cloacal de emas. (A,B) Animal com zero dia de vida. (C,D) Desenvolvimento dos lóbulos bursais nos animais com 15 semanas de idade.

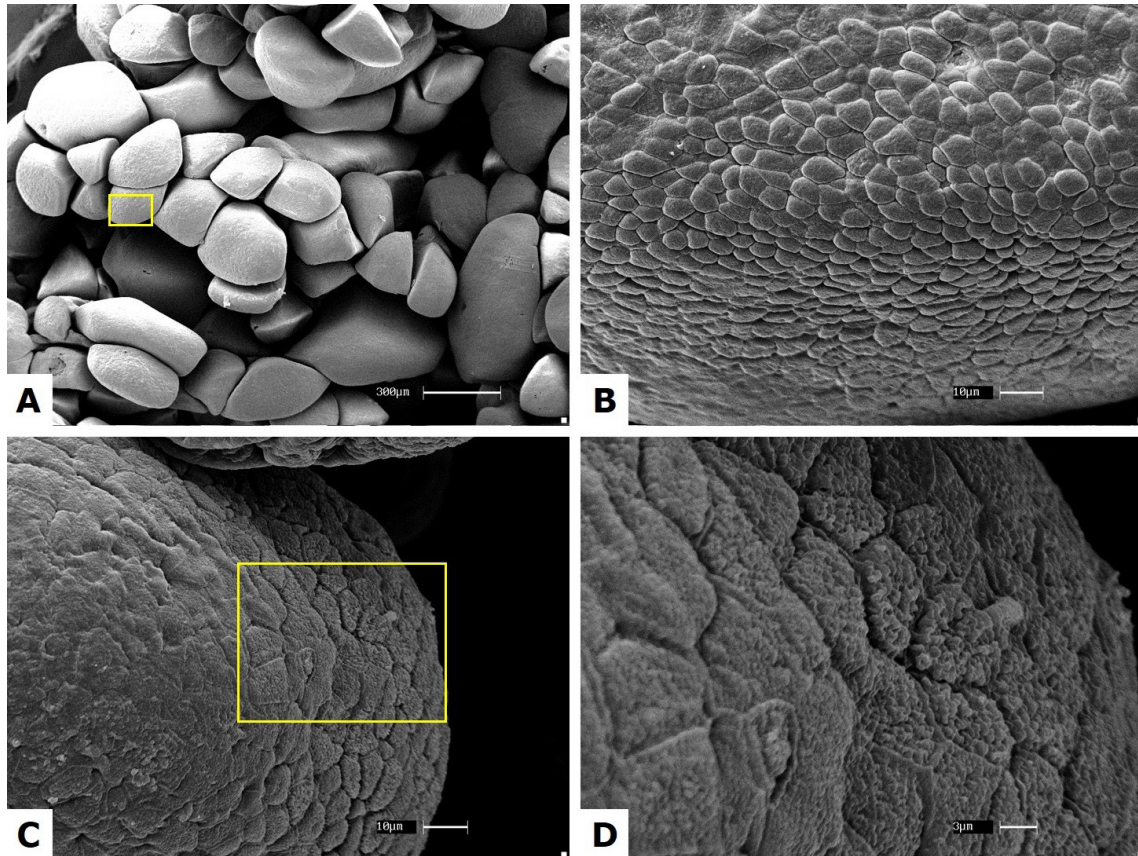


Fig.7. (A,B) Microscopia eletrônica de varredura da bolsa cloacal de emas com 15 semanas de idade e (C,D) zero dia de vida. (A) Disposição dos lóbulos bursais da bolsa cloacal como estrutura alveolar. (B) Revestimento epitelial a partir do aumento do quadrado delineado na Figura A. (C) Superfície da mucosa do lóbulo bursal com várias estruturas poligonais. (D) Microvilosidades a partir do aumento do quadrado delineado na Figura C.

Na mucosa da bolsa cloacal, foi observado a existência de dois tipos de epitélios, o associado ao lóbulo linfóide (EAL) e o interlobular (EIL). Em peru (Sari & Kurtdele 2007) e em codorna japonesa (Al-Tememy et al. 2011), observou-se dois tipos de tecido epitelial, o epitélio simples colunar revestindo os lóbulos bursais e o epitélio pseudoestratificado colunar entre os lóbulos. No entanto, na ema, diferiu apenas no epitélio associado ao lóbulo bursal, o qual foi do tipo pavimentoso simples. Em pato selvagem (Ward & Middleton 1971), ganso nativo (Gülmez & Aslan 1999) e pintos de avestruzes (Song et al. 2012), os autores, observaram que na mucosa interna, esta era revestida apenas por epitélio pseudoestratificado colunar. Já no falcão (Sari et al. 2015), diferiu nos dois tipos de epitélios, tendo cúbico simples e o colunar simples revestindo o lóbulo bursal e a região interlobular, respectivamente. De acordo com Bockman & Cooper (1973), as células epiteliais associadas aos lóbulos linfóides na bolsa cloacal expressam atividade pinocitótica. Whittow (1999), afirma que o EAL estimula a produção de anticorpos transferindo antígenos para a medula após a pinocitose e apresentando papel importante no desenvolvimento da resposta imune local.

Utilizando a coloração histológica ácido periódico de Schiff, foi observado que os resultados encontrados para as emas jovens foram semelhantes para gansos nativos (Gülmez & Aslan 1999) e emas adultas (Elbrond et al. 2009), apresentaram a mucosa da bolsa cloacal fortemente PSA positivo.

Em contrapartida, Sari et al. (2015), afirmaram que no falcão, a mucosa do lóbulo bursal marcou fracamente PAS positivo. Nas emas, além da mucosa, a zona medular também foi PAS positivo, e isso pode estar relacionado com a ação das células reticulares que contêm glicoproteínas em grande concentração em seus citoplasmas e, desta forma, coram fortemente com o PAS, como mencionado por Davison et al. (2008) e Ackerman (1962), ainda reforçam que estas células estão dispersas por todo parênquima do lóbulo bursal.

Nas aves já estudadas como, por exemplo, o pato selvagem (Ward & Middleton 1971), galinha da angola (Onyeansi et al. 1993), ganso nativo (Gülmez & Aslan 1999), peru (Sari & Kurtdele 2007), emas adultas (Elbrond et al. 2009), codorna japonesa (Al-Tememy et al. 2011), falcão (Sari et al. 2015) e em pintos de avestruzes (Song et al. 2012), apresentaram os lóbulos bursais constituídos por três zonas, a cortical, corticomedular e medular, o que também foi observado nesse estudo com emas. Em relação à coloração dessas regiões, verificou-se que o pato selvagem (Ward & Middleton 1971), a galinha da angola (Onyeansi et al. 1993), o ganso nativo (Gülmez & Aslan 1999), o peru (Sari & Kurtdele 2007) e a codorna japonesa (Al-Tememy et al. 2011), coraram fracamente a zona medular em relação a cortical, enquanto que nos pintos de avestruzes (Song et al. 2012), a medula e a cortical corou-se intensamente e homogênea, corroborando com os achados observados para emas jovens. Quando determinada zona do

lóbulo bursal cora intensamente, significa que os linfócitos estão densamente compactados nessa região, apresentando coloração mais escura do que outras zonas de acordo com Bradley & Grahame (1960).

Leena et al. (2009), verificaram a presença de grandes cistos na zona medular, revestidos por epitélio escamoso simples, com lúmen repleto de substância mucoide. Esses achados foram semelhantes aos observados para os animais a partir de 8 semanas de idade, e o número de cistos aumentou com o avançar das idades, das aves estudadas. Nas emas, observou-se também a presença desses cistos nas três zonas dos lóbulos bursais nos animais com 6 e 15 semanas de idade, entretanto o tipo de epitélio que revestiam esses cistos foi o pavimentoso simples. Em pesquisas realizadas com frangos, por meio de análise histopatológica, foi observada a presença de cistos e folículos císticos, sendo estas alterações referentes a lesões compatíveis com o vírus da VDIB, o que se configura como indicativo para a presença desta enfermidade, como descrito por Pereira et al. (2003).

Microscopia eletrônica de transmissão e varredura

Em embriões de 15 e 16 dias de incubação de galinhas da linhagem White Leghorn e em pintos de avestruzes, Ackerman (1962) e Song et al. (2012), respectivamente, descreveram por meio da microscopia de transmissão (TEM), que os linfócitos na bolsa cloacal eram poucos desenvolvidos, possuindo cromatina abundante em seus núcleos. Ainda, Ackerman (1962) em seus estudos com aves domésticas, observou a existência de linfoblastos ligeiramente maiores do que os linfócitos, arredondados em contorno com o citoplasma e as células epiteliais reticulares com grandes núcleos ovais eucromáticos, contendo um ou dois nucléolos pequenos evidentes, com desmossomos entre células adjacentes. Esses achados corroboraram com nossos resultados para as emas jovens.

Neste estudo foi observado a presença de grânulos de mucina no citoplasma apical das células epiteliais, e o mesmo foi relatado por Naukkarinen et al. (1978), em embriões de galinhas White Leghorn no 15º dia de incubação e por Rautenfeld & Budras (1982) nos Struthioniformes. Oláh & Vervelde (2008), afirmam que estes grânulos de mucina são acúmulos de glicoproteínas e Otsubo et al. (2001), ao estudarem o papel do hormônio bursina nos linfócitos B no desenvolvimento embrionário de galinhas da raça White Leghorn, afirmaram que na camada basal do epitélio interlobular foi expressado o hormônio bursina por meio da imunohistoquímica. Desta forma, pode estar associado à produção dos grânulos de mucina com a produção deste hormônio.

Em todos os animais deste estudo observaram-se no citoplasma das células epiteliais, numerosas mitocôndrias e ribossomos livres. Oláh & Vervelde (2008), afirmam que a presença de muitas mitocôndrias e ribossomos sugere no aumento do estado de atividade da célula, que pode estar relacionado com suas funções, transportando células e antígenos.

Quando analisada a bolsa cloacal por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), pôde-se observar que seus lóbulos bursais apresentaram forma alveolar, de tamanhos variados, conforme constatado na microscopia de luz. Já Romano et al. (1996), estudando a ultraestrutura da mucosa da bolsa cloacal em embriões de galinhas, constataram

nas pregas bursais o ápice folicular protrusivo, em formato de um "botão" com epitélio associado. Enquanto que nas emas adultas, Elbrond et al. (2009), compararam os lóbulos bursais como projeções em forma de fungos.

Os resultados da MEV nos animais de zero e 15 semanas de idade, quando comparados com os resultados da microscopia de luz, comprova que ocorreu o desenvolvimento dos lóbulos bursais, afirmando o que foi descrito por Rautenfeld & Budras (1982) em Rheas adultas, onde a metaplasia ou "involução" da bolsa cloacal, inicia-se entre os 3 e 4 anos (fêmeas) ou 2 e 3 anos (machos).

CONCLUSÕES

No epitélio da mucosa da bolsa cloacal, observou-se grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e grânulos de mucina no citoplasma das células epiteliais, e essas células marcaram Ácido Periódico de Schiff (PAS) positivo, o que sugere possível síntese de glicoproteínas e, portanto, prováveis locais de produção do hormônio bursina, visto que, trata-se de glicoproteína.

Comparando-se a microscopia de luz com a microscopia eletrônica de varredura nas idades de zero a 15 semanas de vida, evidenciou-se o aumento dos lóbulos bursais.

O conhecimento do padrão morfológico da bolsa cloacal de emas contribuirá para biologia da espécie, no que diz respeito aos exames anatomohistopatológicos realizados comumente na inspeção sanitária em criatórios legalizados.

REFERÊNCIAS

- Ackerman G.A. 1962. Electron microscopy of the bursa of Fabricius of the embryonic chick with particular reference of the limpho-epitelia nodules. *J. Cell Biol.*, Columbus, 13(1):127-146.
- Al-Mayah A.A.S. & Tabeeh M.A.S.A. 2010. Investigation on bursa fabricius and body weights in broiler and local chicks vaccinated with two types of infectious bursal disease vaccines. *Int. J. Poultry Sci.* 9(5):464-467. <<http://dx.doi.org/10.3923/ijps.2010.464.467>>
- Al-Tememy H.S.A., Hussien J.S. & Rasool B.S. 2011. Histological study on bursa of fabricius of quail birds (*Coturnix coturnix japonica*). *Egyptian Poultry Sci.* 31(2):613-620.
- Baumel J.J., King A.S., Breazile J.E., Evans H.E. & Berge J.C.V. 1993. *Handbook of Avian Anatomy: nomina anatomica avium*. 2nd ed. Nuttall Ornithological Club, Cambridge. 779p.
- Bockman D.E. & Cooper M.D. 1973. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of fabricius, appendix, and peyer's patches: an electron microscopic study. *Am. J. Anat.* 136(4):455-477. <<http://dx.doi.org/10.1002/aja.1001360406>> <PMid:4692973>
- Bradley O.C. & Grahame T. 1960. *The Structure of the Fowl*. 4th ed. Oliver and Boyd, Edinburg. 143p.
- Butcher G.D. & Miles R.D. 2014. Infectious bursal disease (gumboro) in commercial broilers. IFAS Extension, University of Florida, Gainesville. Disponível em <<http://edis.ifas.ufl.edu/vm024>> Acessado em 8 nov. 2014.
- Dani S. 1993. A Ema (*Rhea americana*): biologia, manejo e conservação. Fundação Acangaú, Belo Horizonte. 136p.
- Davison F., Kaspers B. & Schat K.A. 2008. *Avian Immunology*. Elsevier, San Diego. 1384p.
- Dyce K.M., Wensing C.J.G. & Sack W.O. 2010. *Tratado de Anatomia Veterinária*. 4ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro. 834p.
- Elbrønd V.S., Laverty G., Dantzer V., Grondahl C. & Skadhauge E. 2009. Ultrastructure and electrolyte transport of the epithelium of coprodeum,

- colon and the proctodeal diverticulum of *Rhea americana*. Comp. Biochem. Physiol. A, Mol. Integrative Physiol. 152(3):357-365. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.012>> <PMid:19059357>
- Fortes E.A.M., Sousa A.F., Almeida E.C.S., Conde Júnior A.M. & Moura W.L. 2009. Morfologia das células do sangue periférico em emas (*Rhea americana*). Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 46(3):215-221. <<http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2009.26769>>
- Gülmez N. & Aslan Ş. 1999. Histological and histometrical investigations on bursa of fabricius and thymus of native geese. Turkish J. Vet. Anim. Sci. 23(2):163-172.
- Leena C., Prasad R.V., Kakade K. & Jamuna K.V. 2009. Age related histochemical changes of the bursa and thymus of domestic fowl. J. Vet. Anim. Sci. 40:9-11.
- Naukkarinen A., Arstila A.U. & Sorvari T.E. 1978. Morphological and functional differentiation of the surface epithelium of the bursa Fabricii in chicken. Anat. Rec. 191(4):415-432. <<http://dx.doi.org/10.1002/ar.1091910403>> <PMid:697054>
- Oláh I. & Vervelde L. 2008. Structure of the avian lymphoid system, p. 13-15. In: Davison F., Kaspers B. & Schat K.A. (Eds), Avian Immunology. Elsevier, San Diego. <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-012370634-8.50005-6>>
- Oliveira R.E.M., Oliveira G.B., Bezerra F.V.F., Câmara F.V., Costa H.S., Silva A.V.N., Araújo Júnior H.N. & Oliveira M.F. 2016. Arterial vascularization of the cloacal bursa of greater rhea, *Rhea americana americana* Linnaeus, 1758. Biosci. J. 32(3):691-698. <<http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v32n3a2016-29904>>
- Onyeanus B.I., Ezeokoli C.D., Onyeanus J.C. & Ema A.N. 1993. The anatomy of the cloacal bursa (Bursa of Fabricius) in the helmeted guinea fowl (*Numida meleagris galeata*). Anat. Histol. Embryol. 22(3):212-221. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0264.1993.tb00359.x>> <PMid:8238949>
- Otsubo Y., Chen N., Kajiwara E., Horiuchi H., Matsuda H. & Furusawa S. 2001. Role of bursin in the development of B lymphocytes in chicken embryonic bursa of Fabricius. Develop. Comp. Immunol. 25(5/6):485-493. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X\(00\)00070-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X(00)00070-7)> <PMid:11356228>
- Pereira R., Allgayer M.C., Fallavena L.C.B., Moraes H.L.S., Fittél A.P., Motta A.C., Santos L.R. & Salle C.T.P. 2003. Doença Infecciosa da Bursa (DIB): comparação entre monitoria por exame histopatológico e bursometria. Anais XI Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Unesp, Botucatu, p.138. (Resumo)
- Rautenfeld D.B. & Budras K.D. 1982. The bursa cloacae (fabricii) of struthioniforms in comparison with the bursa of other birds. J. Morphol. 172(1):123-128. <<http://dx.doi.org/10.1002/jmor.1051720111>> <PMid:7077679>
- Rodrigues M.N., Oliveira G.B., Silva R.S.B., Tivane C., Albuquerque J.F.G., Miglino M.A. & Oliveira M.F. 2012. Macroscopia e topografia do aparelho digestório de emas (*Rhea americana americana*). Pesq. Vet. Bras. 32(7):681-686. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700018>>
- Romano N., Baldassini M.R., Abelli L., Aita M. & Mastrolia L. 1996. Ultrastructural study on the plical epithelium of the bursa of fabricius in chick embryos: influence of partial decerebration and hypophyseal allografts. J. Anat. 188(Pt 1):29-41. <PMid:8655413>
- Santos T.C., Sousa J.A., Oliveira M.F., Santos J.M., Parizzi R.C. & Miglino M.A. 2011. Morfologia dos órgãos genitais masculinos e da cloaca da ema (*Rhea americana americana*). Pesq. Vet. Bras. 31(5):430-440. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011000500011>>
- Sari E.K. & Kurtde N. 2007. Light and electron microscopic studies of the Bursa of Fabricius in Turkeys. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi 13(2):177-184.
- Sari E.K., Altunay H., Kurtde N. & Bakir B. 2015. The structure of bursa of fabricius in the long-legged buzzard (*Buteo Rufinus*): histological and histochemical study. Acta Veterinaria 65(4):510-517. <<http://dx.doi.org/10.1515/acve-2015-0043>>
- Song H., Peng K., Li S., Wang Y., Wei L. & Tang L. 2012. Morphological characterization of the immune organs in ostrich chicks. Turkish J. Vet. Anim. Sci. 36(2):89-100.
- Tolosa E.M.C., Rodrigues C.J., Behmer O.A. & Freitas Neto A.G. 2003. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. 2nd ed. Manole, Barueri. 331p.
- Villanueva A.C. & Bernardo F.A.E.M. 2015. Morphological and histological features of the bursa of fabricius from non-vaccinated one month old female Gamefowl chicks from hyperimmunized breeders. Philippine J. Vet. Anim. Sci. 41(2):141-146.
- Ward J.G. & Middleton A.L.A. 1971. Weight and histological studies of growth and regression in the bursa of Fabricius in the mallard, *Anas platyrhynchos*. Can. J. Zool. 49(1):11-14. <<http://dx.doi.org/10.1139/z71-003>> <PMid:5543168>
- Whittow G.C. 1999. Sturkie's Avian Physiology. 5th ed. Academic Press, Toronto. 704p.