

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DE AQUAPORINAS NO**  
**EPIDÍDIMO DO GERBILO, *Meriones unguiculatus*, EM DIFERENTES**  
**FASES DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL**

**Carla de Moraes Machado**  
Discente

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Fantin Domeniconi**  
Orientadora

**BOTUCATU**

**2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DE AQUAPORINAS NO**  
**EPIDÍDIMO DO GERBILO, *Meriones unguiculatus*, EM DIFERENTES**  
**FASES DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL**

**Carla de Moraes Machado**  
Discente

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Fantin Domeniconi**  
Orientadora

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu - UNESP,  
como exigência parcial para a  
obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU**  
**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Machado, Carla de Moraes.

Expressão e localização de aquaporinas no epidídimo do gerbilo, *Meriones unguiculatus*, em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal / Carla de Moraes Machado. – Botucatu : [s. n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Raquel Fantin Domeniconi  
Capes: 20600003

1. Células epiteliais. 2. Epitélio. 3. Epidídimo. 4. Rato – Estudos experimentais.

Palavras-chave: Aquaporinas; Desenvolvimento; Epitélio Epididimário.

## **DEDICATÓRIA**

Dedicado aos meus pais, Sineide e Carlos

e à minha irmã, Gabriela

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Raquel Fantin Domeniconi, por toda vivência e aprendizado dentro e fora do laboratório. Por todas as orientações compartilhadas visando ao meu crescimento e toda experiência compartilhada durante cada etapa da Iniciação Científica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Dr. Wellerson Rodrigo Scarano pela análise deste trabalho e pela valiosas contribuições durante toda sua execução.

Aos Professores do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências de Botucatu, Prof. Dr. Sérgio Pereira, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro, Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior e Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior, pela atenção sempre disponibilizada e pelas sugestões valiosas.

Ao companheiro de laboratório, Gelson Rodrigues, por todos os bons momentos (técnicos e não-técnicos) partilhados ao longo dessa jornada.

Ao Encontro Nacional de Biomedicina, pela família construída e por cada ensinamento deixado.

Aos irmãos André (Qualy), Ana Carolina (Passa), Cristiane (Dofa), Juliana (Balsa) e Amanda (Para), pelos laços eternos criados e terem me mostrado o verdadeiro significado da palavra amizade. Sem vocês, esses quatro anos não teriam sido os mais dignos de todos.

Às amigas queridas, Camila (Bonitinha), Tamires (Kapô), Larissa (Rasga) e Bianca (Péks), por serem presentes ao longo do caminho e comprovarem as grandes surpresas boas do destino. À Marina (Hem's), pela amizade, carinho e força durante todos os momentos compartilhados.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências de Botucatu.

“A IDÉIA

De onde ela vem?! De que matéria bruta  
Vem essa luz que sobre as nebulosas  
Cai de incógnitas criptas misteriosas  
Como as estalactites numa gruta?!  
Vem da psicogenética e alta luta  
Do feixe de moléculas nervosas,  
Que, em desintegrações maravilhosas,  
Delibera, e depois, quer e executa!”

*Augusto dos Anjos*

## RESUMO

As aquaporinas (AQPs) são proteínas expressadas na membrana plasmática de diferentes tipos celulares e tecidos envolvidos no transporte de fluidos. No sistema genital masculino, o movimento de fluidos e solutos através do epitélio é essencial para a formação e manutenção do fluido luminal. Esta proposta tem como objetivo estudar a localização das AQPs 2 e 9 no epitélio de revestimento do segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo de gerbilos em diferentes faixas etárias (10, 30, 60, 120 e 300 dias de idade), observando possíveis alterações no padrão de expressão das AQPs ao longo do desenvolvimento pós-natal. Para realização deste projeto, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, e após a coleta dos epidídimos, as diferentes regiões foram isoladas. O material biológico obtido foi processado segundo as rotinas histológica e imunoistoquímica para estudo da expressão e localização das AQPs 2 e 9. Os resultados obtidos foram analisados e fotodocumentados em microscópio de luz convencional.

## **ABSTRACT**

Aquaporins (AQPs) are membrane protein channels expressed in a wide variety of cells and tissues that are involved in the transport of water. In the male excurrent duct, the movement of fluid and solutes across the epithelium is essential for establishing the proper luminal environment in which sperm mature and are stored. The initial aim of the present propose is to localize AQP 2 e 9 in epithelium of the initial segment, caput, corpus and cauda epididymidis in Mongolian gerbil during postnatal development (10, 30, 60, 120 and 300 days), observing possible changes in the pattern of expression of the AQPs along the postnatal development. The animals will be killed by inhalation of carbon dioxide. After euthanasia, the epididymis will be removed and the different regions will be isolated. The biological material obtained will be processed in accordance with the routines of histological techniques and imunohistochemistry to study the expression and localization of the AQPs 2 and 9. The results obtained will be analyzed and photographed in conventional light microscope.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Ducto Epididimário.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Aquaporinas.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Aquaporinas e epidídimo.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 AQP2.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5 AQP9.....</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Manutenção dos animais.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Coleta e Processamento histológico.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Preparo de Lâminas e Microtomia.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Imunoistoquímica.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 <i>Western blotting</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>3.6 Morfometria.....</b>	<b>24</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Morfologia.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Imunoistoquímica e <i>Western blotting</i> para AQP2 e AQP9.....</b>	<b>28</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Morfologia.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Aquaporinas.....</b>	<b>35</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## 1. Introdução

### 1.1 Ducto epididimário

O epidídimo é um ducto grandemente enovelado e único, sendo responsável pelos processos de maturação e estocagem de espermatozoides, através de transformações bioquímicas, morfológicas e fisiológicas proporcionadas pela interação dos espermatozoides com o epitélio especializado deste órgão (ROBAIRE E HERMO, 1988; SETCHELL *et al.*, 1994). O epidídimo consiste, predominantemente, de um compartimento epitelial cercado por células musculares e por um compartimento estromal (WANG *et al.*, 2012).

Macroscopicamente, o ducto epididimário é dividido em cabeça, corpo e cauda, mas devido a importantes diferenças histológicas segmentares, presentes em diferentes mamíferos, foram descritas quatro regiões morfológicamente bem definidas (ROBAIRE & HERMO, 1988). Assim, o epidídimo é, por critérios bioquímicos e funcionais, compreendido em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Figura1), sendo cada segmento composto por funções específicas como: secreção, endocitose e absorção (ROBAIRE *et al.*, 2006).

O epidídimo origina-se da parte proximal do ducto mesonéfrico (ou Wolffiman). Este ducto torna-se contorcido por influência da testosterona, a partir da 8ª semana do desenvolvimento fetal, formando o epidídimo (MOORE & PERSAUD, 2008). Durante este processo, o ducto epididimário dobra-se em uma estrutura altamente organizada e composta por vários segmentos, com morfologias e funções específicas (JOSEPH *et al.*, 2009).

A diferenciação celular pós-natal marcante deste compartimento epitelial ocorre no período da puberdade, quando os níveis de andrógenos circulantes aumentam significativamente (WANG *et al.*, 2012).

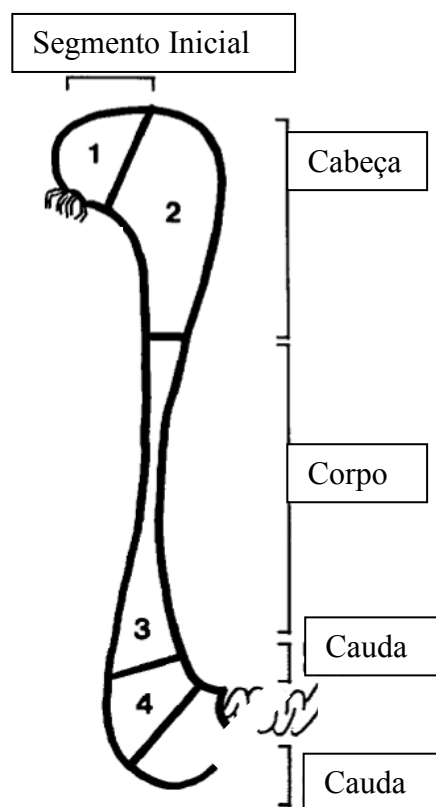


Figura 1: Representação esquemática do epidídimo, mostrando as divisões propostas para este estudo. 1) Segmento Inicial, 2) Cabeça, 3) Corpo e 4) Cauda. (Adaptado de Serre & Robaire, 1998).

Assim, os espermatozoides deixam o testículo, ainda imaturos, e durante o trânsito, ao longo dos diferentes segmentos do epidídimo, passam por modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, que permitem o amadurecimento e a aquisição progressiva da motilidade e habilidade para fertilizar um ovócito (CORNWALL, 2009; SETCHELL *et al.*, 1994).

O epitélio epididimário dos mamíferos apresenta-se colunar e pseudoestratificado, formado por 6 tipos de células: as células principais, basais, apicais, claras, halo e *narrow*. (HAMILTON, 1975; ROBAIRE & HERMO, 1988). Os diferentes tipos celulares podem estar presentes em uma região (segmento inicial: *narrow* e apicais), mais de uma região (cabeça, corpo e cauda: células claras) ou presentes em todas as regiões (principais e basais) (HERMO & SMITH, 2011).

A **célula principal** é o tipo mais abundantemente encontrado e sua estrutura e função variam de acordo com a região em que está presente (ROBAIRE & HERMO, 1988, TRASLER *et al.*, 1988). Participa ativamente da síntese e da secreção de proteínas e glicoproteínas, sendo responsável pela produção de todas as proteínas do ambiente luminal epididimário (ROBAIRE & HINTON, 2002).

Este tipo celular também está envolvido em processos de secreção, absorção de fluido luminal e endocitose (NICANDER & MALMQVIST, 1977; ROBAIRE & HERMO, 1988).

As **células basais** são encontradas em todas as regiões do epidídimo de mamíferos, atuando como possíveis elementos de estabilização do epitélio epididimário (HAMILTON, 1975), e acreditava-se não apresentarem contato com o compartimento luminal, estando associadas a células principais sobrepostas. No entanto, estudo recente utilizando imagem tridimensional confocal identificou que as células basais epididimárias apresentam projeções citoplasmáticas, que alcançam o lúmen a fim de obterem informações químicas do ambiente luminal (WANG *et al.*, 2012).

Em estudos realizados com células basais de epidídimo humano, YEUNG *et al.* (1994) concluíram que existem similaridades ultraestrutural, antigênica e espacial entre as células basais e os macrófagos. Com base nestes achados, os autores propõem a hipótese que os macrófagos são precursores das células basais e provêm um lento *turnover* da população de células basais que se tornam sobrecarregadas com os detritos removidos do epitélio. Ressaltando a possível importância do epidídimo nos aspectos imunológicos da fertilidade.

As **células apicais** estão localizadas no ápice do epitélio epididimário, contêm muitas enzimas proteolíticas e podem ter papel na proteção dos espermatozoides a ataques eletrofilicos (ADAMALI & HERMO, 1996).

As **células narrow** estão presentes apenas no epitélio do segmento inicial e zona intermediária, podem ser precursoras das células claras e talvez, estejam envolvidas na degradação de proteínas endocitadas (ADAMALI & HERMO, 1996). Segundo HERMO *et al.* (2000), esta célula parece estar envolvida na acidificação luminal, atividade esta que pode ser considerada essencial para os espermatozoides durante sua travessia e estocagem no epidídimo.

Ao longo de todo o epidídimo foram identificadas as **células halo**, estas células foram consideradas por alguns autores como linfócitos ou macrófagos (DYM *et al.*, 1975, NASHAN *et al.*, 1989). Já as **células claras** estão presentes, principalmente, na cauda do epidídimo e, aparentemente, estão envolvidas na secreção de glicoconjugados (VICENTINI & ORSI, 1989) e absorção celular

(FLICKINGER *et al.*, 1978). Outra função atribuída a essas células é a habilidade de eliminar a gota citoplasmática liberada pelos espermatozoides no lúmen (HERMO *et al.*, 1994; SETCHELL *et al.*, 1994), vide Figura 2.

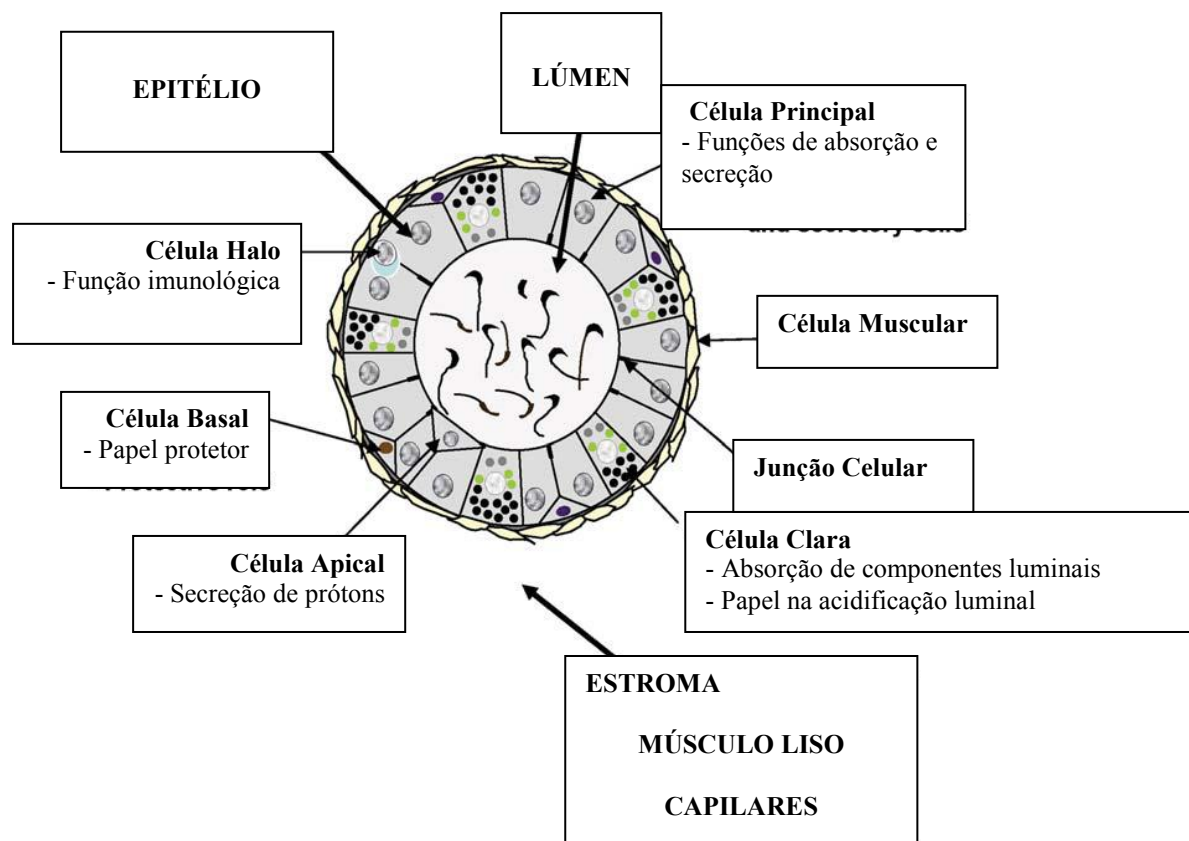


Figura 2: Representação esquemática da organização celular, em corte transversal, de epidídimo. (Adaptado de CORNWALL, G.A. *New insights into epididymal biology and function*. 2009).

A localização e a frequência dos tipos celulares variam regionalmente e também são observadas variações na altura do epitélio e nos diâmetros luminal e tubular nas diferentes regiões epididimárias. No gerbilo, o epitélio foi descrito como alto nas três regiões mais proximais, tornando-se mais baixo em direção à cauda do epidídimo e o diâmetro luminal mostrou um padrão de comportamento oposto (DOMENICONI *et al.*, 2007a). Este estudo descritivo concorda com observações feitas em outros roedores (SERRE & ROBAIRE, 1998).

Em geral, o segmento inicial é composto por epitélio muito alto e contém poucos espermatozoides no lúmen. Estudos em ratos mostraram que esta região apresenta células principais com estereocílios apicais longos, além de células basais, halo, delgadas e apicais (SERRE & ROBAIRE, 1998). No gerbilo, diferentemente do rato, foram descritas, em nível de microscopia eletrônica de

transmissão, células claras no segmento inicial (DOMENICONI *et al.*, 2007a). Na cabeça do epidídimo, células principais altas revestem o lúmen, onde se observam mais espermatozoides, e também a presença de células basais e halo, assim como células claras (HERMO *et al.*, 1994; SERRE & ROBAIRE, 1998).

O corpo do epidídimo possui, geralmente, o epitélio tubular mais baixo do que a cabeça, sendo constituído em sua maior parte por células principais. Na cauda, a altura epitelial é menor do que nos outros segmentos, tendendo à forma cúbica. Sua parte distal apresenta células claras evidentes e em grande número (ROBAIRE & HERMO, 1988; HERMO *et al.*, 1994).

## 1.2 Aquaporinas

As aquaporinas (AQPs) constituem uma família de proteínas intrínsecas de membrana presentes em diferentes tipos celulares envolvidos em transporte de fluidos (VERKMAN & MITRA, 2000). Em vertebrados, foram identificadas 13 isoformas de AQPs (0 a 12) que, em geral, estão envolvidas no aumento da permeabilidade osmótica das membranas (VERKMAN & MITRA, 2000; DA SILVA *et al.*, 2006a). Em regiões epiteliais onde há canais de água mediados por AQPs a velocidade de permeação de água é de 10 a 100 vezes maior do que a observada na difusão simples (AGRE, 2004). As AQPs estão divididas em dois subgrupos de acordo com as características de permeabilidade, sendo as seletivas a água (AQPs 0, 1, 2, 4, 5, 6 e 8) e as “aquagliceroporinas” que permitem a passagem de água e glicerol (AQPs 3, 7, 9 e 10), vide DA SILVA *et al.* (2006a).

As Aquaporinas estão envolvidas em uma grande variedade de funções fisiológicas como a homeostase de água e solutos, função secretória, facilitando o transporte transepitelial de fluidos, migração celular e neuroexcitação. Além de participar de doenças humanas como glaucoma, epilepsia, obesidade e o câncer (VERKMAN, 2012).

Essas proteínas apresentam peso molecular entre 26 a 30kDa e são constituídas por um tetrâmero protéico, no qual cada monômero consiste em seis domínios  $\alpha$ -hélice, com as extremidades carboxi e aminoterminal orientadas para o citoplasma (Figura 3).

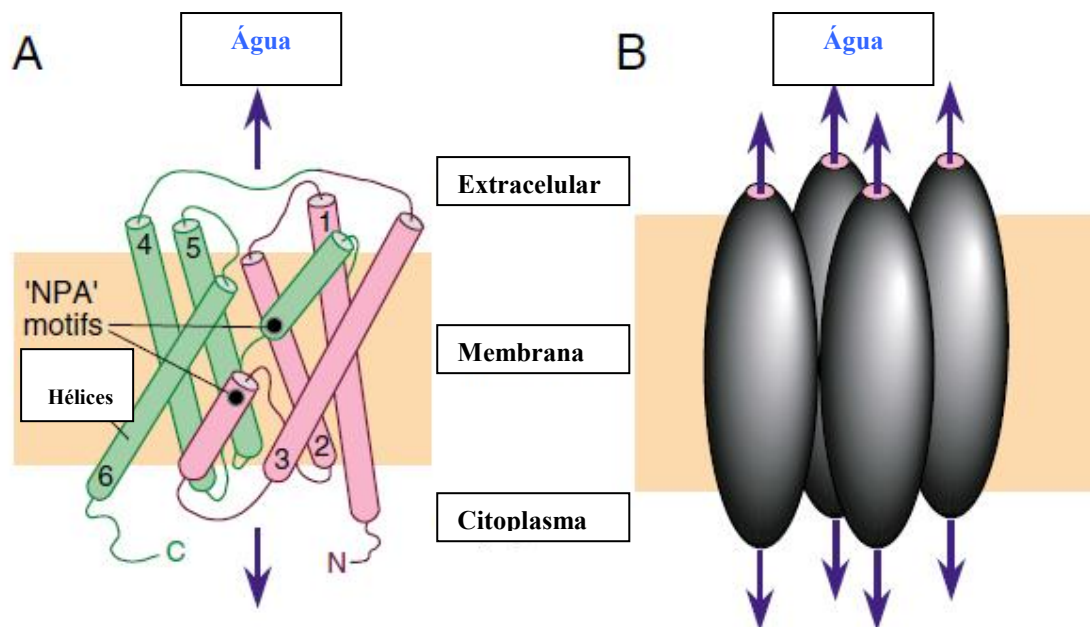


Figura 3 – Modelo proposto para a estrutura da aquaporina (Adaptado de VERKMAN, A.S., 2012 ). Cada isoforma é composta por uma cadeia polipeptídica simples com seis domínios que atravessam a membrana e as extremidades carboxi e amino terminais voltadas para o citoplasma (A). Modelo tetramérico e seus monômeros individuais contendo poros (B).

Mais de um tipo de AQP pode estar presente no mesmo tecido ou em uma mesma célula. No rim foram descritas pelo menos 7 diferentes AQPs, no olho 5 e no sistema respiratório 4. No sistema genital masculino do homem e de roedores foram identificadas as AQPs 1, 2, 7, 8 e 9 (MATSUZAKI *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2006a) e foram estudadas em ratos, as AQPs 5 e 11 (HERMO *et al.*, 2008). Recentemente, outras duas aquaporinas foram descritas em mamíferos, as AQP 11 e 12, sendo que a AQP11 está presente em altos níveis nos testículos e em níveis mais moderados nos rins, enquanto a AQP12 é seletivamente expressada no pâncreas (ISHIBASHI *et al.*, 2009; YEUNG, 2010).

No sistema genital masculino, a água é importante para manutenção do ambiente luminal, pois serve como um veículo para transportar os espermatozoides do testículo para o ducto deferente (HERMO & SMITH, 2011). Na via espermática, durante o processo de maturação do espermatozóide, o fenômeno de absorção do fluido luminal nos ductos extratesticulares é de fundamental importância para promover o aumento na concentração de espermatozoides no lúmen, tornando o meio hipertônico (TURNER, 1991; ROBAIRE & VIGER, 1995). Ainda, a composição do fluido luminal, no qual os espermatozoides terminam a sua maturação e são estocados envolve uma

complexa regulação transepitelial de transporte de água e solutos (DA SILVA *et al.*, 2006a).

### 1.3 AQPs e Epidídimo

No epidídimo, as aquaporinas estão associadas a tipos celulares e regiões de domínios de membranas específicos (Figura 4). A reabsorção de fluido tem papel notável nesse órgão, tornando o meio hipertônico e a concentração de espermatozoides elevada ao longo dos segmentos epididimários. O movimento transepitelial de água e a expressão região-específica das aquaporinas talvez esteja envolvida no desenvolvimento pós-natal do epidídimo (HERMO & SMITH, 2011).

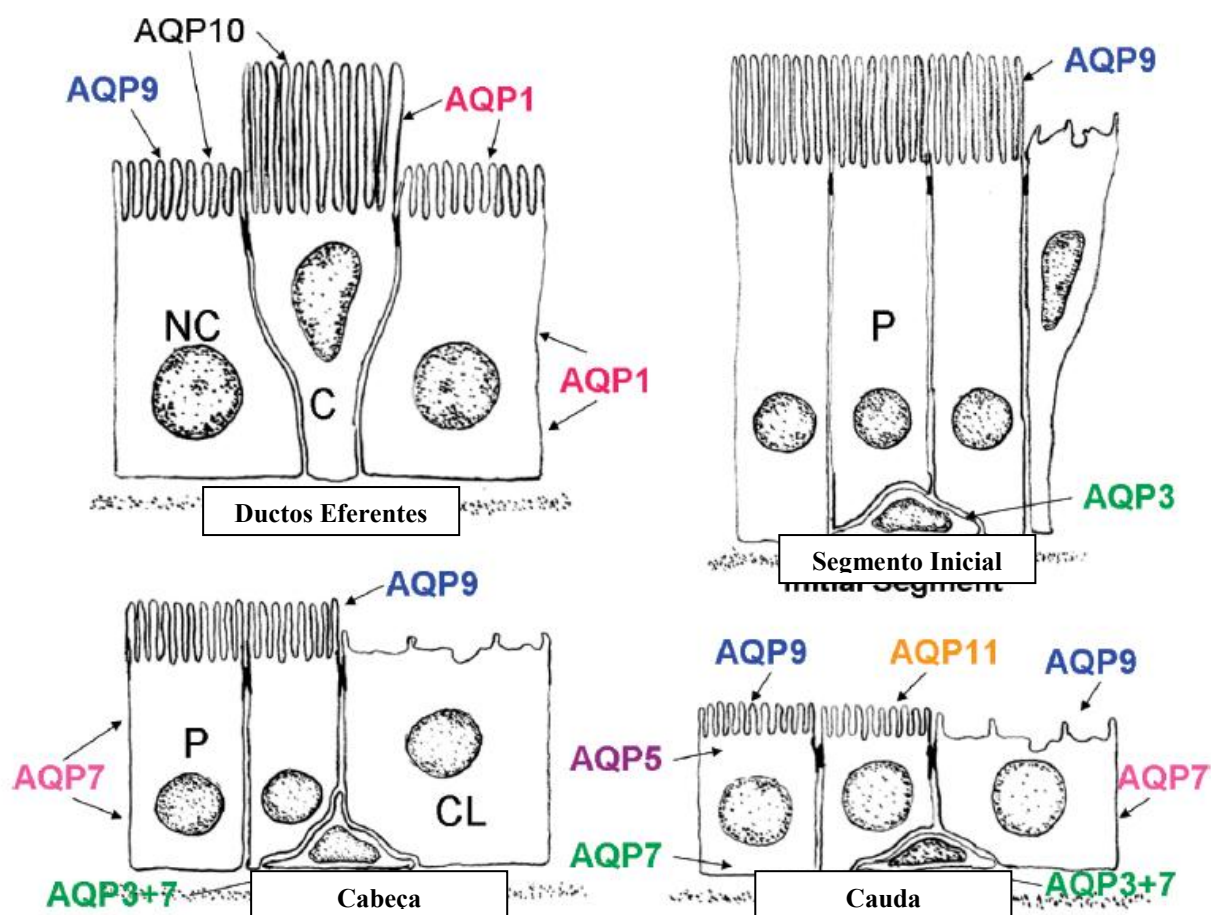


Figura 4: Distribuição esquemática de diferentes AQPs nos ductos eferentes e ao longo do epidídimo. É possível notar a especificidade regional e celular das AQPs. (Adaptado de Hermo & Smith, 2011).

Muitos membros da família das aquaporinas foram identificados no epitélio ou estroma do epidídimo de roedores. Entre estas AQPs, podemos citar a AQP1, identificada nas células mióides que circundam o ducto epididimário, bem como



nas células endoteliais de canais vasculares situados no espaço intertubular do epidídimo (BADRAN & HERMO, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2005, DOMENICONI *et al.*, 2008). Em todos os relatos científicos analisados, a AQP9 apresenta o mesmo padrão de distribuição, está presente nos microvilos das células principais ao longo de todas as regiões do epidídimo (PASTOR-SOLER *et al.*, 2001; BADRAN & HERMO, 2002; DOMENICONI *et al.*, 2007b). Apenas existem controvérsias a respeito da presença da AQP9 nas células claras, enquanto alguns autores relatam intensa reatividade para a AQP9 no citoplasma destas células (BADRAN & HERMO, 2002), outros relatam ausência de reatividade (PASTOR-SOLER *et al.*, 2001).

A AQP2 foi identificada no epidídimo de aves (ZANIBONI *et al.*, 2004) e em vesículas intracelulares localizadas nas regiões distais do epidídimo, sendo que nestas últimas a reação foi moderada e inconstante (DOMENICONI *et al.*, 2008). Com uso de métodos de RT-PCR, DA SILVA *et al.* (2006b) mostraram que a AQP2 está presente nas células epiteliais epididimárias.

Outros membros do grupo das AQPs foram identificados no epidídimo de roedores, como por exemplo, as AQPs 3, 5 e 7 (HERMO *et al.*, 2008). Ou ainda, as AQPs 5, 7 e 9 que foram localizadas no epidídimo de ratos adultos através de análise molecular (PASTOR-SOLER *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2006b). A AQP11 também foi identificada na borda apical de microvilos, predominantemente no corpo e cauda do epidídimo (HERMO *et al.*, 2008), dividindo o sítio de localização da AQP9.

As AQPs 1, 2 e 9 foram as mais amplamente estudadas ao longo dos ductos extratesticulares. A AQP1 foi identificada nos ductos eferentes e parte distal do ducto deferente; a AQP2 na parte média e distal do ducto deferente e a AQP9 nos ductos eferentes, epidídimo e em todas as partes do ducto deferente (DA SILVA *et al.*, 2006a). Estudos realizados com as AQPs 2 e 9 mostraram que a expressão destas proteínas altera durante o desenvolvimento pós-natal. A expressão da AQP9 apresenta aumento progressivo (PASTOR-SOLER *et al.*, 2001), já a AQP2 está presente apenas nas fases iniciais do desenvolvimento, desaparecendo no epidídimo de animais adultos (DA SILVA *et al.*, 2006b).

#### 1.4 AQP2

AQP2 está presente nos rins e a regulação de sua expressão é mediada pela vasopressina, sendo de fundamental importância na regulação da excreção renal (NIELSEN & AGRE, 1995). No sistema genital masculino de camundongo, foi descrita reação positiva para AQP2 no compartimento apical das células principais do ducto deferente e nas regiões centrais dos túbulos seminíferos, mas não foi detectada no epidídimo adulto (NELSON *et al.*, 1998).

A AQP2 apresenta distribuição heterogênea ao longo do comprimento do ducto deferente. Em estudos no rato adulto, esta proteína não foi detectada na região proximal, mas sua expressão aumenta progressivamente na porção média e, finalmente, em todas as células epiteliais da porção distal do ducto deferente (STEVENS *et al.*, 2000). Segundo STEVENS *et al.*, (2000) a AQP2 presente no sistema genital masculino é idêntica à encontrada nos rins, ou seja, apresenta a mesma sequência de nucleotídeos e aminoácidos, entretanto no ducto deferente ela não é regulada pela vasopressina. O ducto deferente é derivado do ducto mesonéfrico durante o desenvolvimento embrionário, assim como os ductos coletores dos rins, e a presença desta AQP nestes tecidos pode refletir essa origem embrionária comum (STEVENS *et al.*, 2000). A função da AQP2 no ducto deferente deve estar relacionada com a modificação do conteúdo luminal, promovendo a concentração de espermatozoides por extração de fluido do lúmen (MATSUZAKI *et al.*, 2002).

Em aves, como no peru branco, foi evidenciada reação positiva para AQP2 nos ductos eferentes, ductos conectores e epididimário (ZANIBONI *et al.*, 2004). Na via espermática do cão, diferentemente dos demais mamíferos, a AQP2 foi localizada no epitélio da rede testicular, na parte testicular dos ductos eferentes e em vesículas intracelulares localizadas nas regiões distais do epidídimo, sendo que nestas últimas a reação foi moderada e inconstante (DOMENICONI *et al.*, 2008). As vesículas AQP2-positivas poderiam, talvez, desempenhar função na estocagem destas proteínas, as quais seriam rapidamente recicladas entre a membrana plasmática e as vesículas intracelulares, como ocorre nos ductos coletores dos rins (Agre *et al.*, 1995).

DA SILVA *et al.* (2006b) estudaram a expressão da AQP2, ao longo do desenvolvimento pós-natal, no epitélio epididimário de ratos. Os resultados mostraram variações no padrão de expressão desta AQP nas diferentes faixas

etárias. Em animais adultos, o RNAm da AQP2 foi abundantemente expressado no epidídimo, porém a proteína não foi detectada com auxílio das técnicas de imunofluorescência ou Western blotting, exceto durante as fases iniciais do desenvolvimento pós-natal, quando a AQP2 foi imunolocalizada na região da cauda do epidídimo. A expressão da proteína na cauda limitou-se a uma fase do desenvolvimento, já que não foi detectada na mesma região no animal adulto, mesmo na presença do mRNA.

Por outro lado, métodos de RT-PCR têm revelado que a AQP2 está presente nas células epiteliais epididimárias e que o nível de expressão do RNAm da AQP2 é significativamente superior na cauda se comparada com as demais regiões epididimárias. A variabilidade temporal da expressão da AQP2 poderia indicar papel importante para esta AQP durante o desenvolvimento pós-natal (DA SILVA *et al.*, 2006b).

### 1.5 AQP9

A AQP9 foi localizada nas células intersticiais do testículo de roedores (ELKJAER *et al.*, 2000; BADRAN & HERMO, 2002), entretanto, não foi detectada nos testículos humano (TSUKAGUCHI *et al.*, 1999) e na rede testicular de cão (DOMENICONI *et al.*, 2007b). Por outro lado, esta AQP está presente nos ductos eferentes, no epidídimo e ducto deferente de mamíferos (DA SILVA *et al.*, 2006a; DOMENICONI *et al.*, 2007b). A AQP9 é o principal canal de água localizado na membrana apical do epitélio ao longo dos ductos extratesticulares, bem como de outras regiões do sistema genital masculino, além disso permite não apenas a passagem de água, mas também de pequenos solutos. Portanto, acredita-se que este canal de água represente importante caminho apical para movimentos de água e solutos através da membrana plasmática ao longo da via espermática de mamíferos (TSUKAGUCHI *et al.*, 1998).

No cão, ao contrário do que afirma PASTOR-SOLER *et al.* (2001), a AQP9 não é a única AQP presente na porção proximal do ducto epididimário, pois a AQP7 também foi identificada nessa mesma região (DOMENICONI *et al.*, 2008). Tais redundâncias na expressão de AQPs no epidídimo entre outras regiões da via espermática são, presumivelmente em parte, um meio para assegurar que a disfunção de qualquer uma das AQPs não impeça a capacidade deste epitélio transportar água e manter o balanço iônico do fluido em níveis

ótimos para o transporte, maturação e estocagem de espermatozoides (HERMO *et al.*, 2008).

Segundo PASTOR-SOLER *et al.* (2001), a AQP9 foi detectada apenas em algumas células dos ductos extratesticulares de ratos em desenvolvimento. Entretanto, nos ductos deferentes o nível de expressão já era alto logo nas primeiras semanas de vida. No epidídimo, aumento progressivo da expressão da AQP9 foi observado durante o desenvolvimento pós-natal, tanto no número de túbulos como na intensidade da reação em células individuais. Após a 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semana de vida, os níveis de expressão da AQP9 se tornaram semelhantes à fase adulta, possivelmente isso ocorra por modulação androgênica.

Tendo em vista os relatos na literatura científica a respeito das alterações na expressão das AQPs na via espermática em diferentes fases do desenvolvimento, e o fato destas AQPs mostrarem comportamento espécie-específico, propusemos neste plano de atividades a descrição e padronização das possíveis alterações destas proteínas ao longo do desenvolvimento pós-natal do gerbilo. Visando contribuir nas discussões a respeito do comportamento destes canais de água ao longo do desenvolvimento pós-natal em roedores. Além de contribuir para a elaboração de hipóteses que possam explicar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na expressão das aquaporinas relacionadas ao equilíbrio do ambiente luminal da via espermática, mais especificamente do epidídimo.

## **2. Objetivos**

- Analisar as características morfológicas regionais do epidídimo do gerbilo, em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal.
- Localizar as AQPs 2 e 9 no segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo do gerbilo (*Meriones unguiculatus*) nas diferentes faixas etárias.
- Verificar a expressão das AQPs 2 e 9 no epidídimo de gerbilos de diferentes idades.
- Observar as possíveis alterações no padrão de localização e expressão das AQPs 2 e 9, no epidídimo, ao longo do desenvolvimento pós-natal.

### **3. Materiais e Métodos**

Para execução deste trabalho, foram utilizados 25 gerbilos (*Meriones unguiculatus*) machos, os quais foram divididos em 5 grupos experimentais de acordo com as idades 10, 30, 60, 120 e 300 dias de idade. As faixas etárias foram estabelecidas com base em estudos prévios de desenvolvimento utilizando a próstata ventral de gerbilo (DE CAMPOS *et al.*, 2006; CORDEIRO *et al.*, 2008)

#### **3.1 Manutenção dos Animais**

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia, UNESP, Botucatu, sob condições controladas de temperatura (23°C) e de luz (12 horas de claro e 12 horas de escuro), com acesso livre à água e ração. Periodicamente, foi realizada a reposição de ração e água; descarte de dejetos biológicos (maravalha com fezes e urina); higienização das garrafas de água e caixas de alojamento dos animais; conservação da limpeza da sala do biotério.

Após o nascimento, as ninhadas foram registradas e monitoradas até atingirem cada idade proposta para cada grupo experimental. Seguindo a separação, os filhotes foram submetidos à sexagem e mantidos até os 10, 30, 60, 120 ou 300 dias de idade, quando então foram sacrificados para compor os diferentes grupos de estudo.

Todo o experimento e os procedimentos cirúrgicos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal do IBB/UNESP (Protocolo nº 241-CEEA), o qual certificou que a conduta deste trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Ressalta-se ainda que todos os resíduos químicos gerados nos laboratórios do Depto. de Anatomia foram segregados, acondicionados e transportados adequadamente para o Entrepósito de Resíduos Químicos do Campus de Botucatu – UNESP, de acordo com o Plano de Gerenciamento de Resíduos Analíticos (PGRA), identificado por AMBICAMP PGRA nº AMB-A 014-0108-00399.

#### **3.2 Coleta e Processamento histológico**

Os roedores, sendo 5 animais de cada grupo, com 10, 30, 60, 120 e 300 dias, foram pesados e submetidos à eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>.

Em seguida, procedeu-se incisão abdominal no plano sagital mediano para expor os órgãos da cavidade abdominal, na maioria dos sacrifícios os testículos e epidídimos foram encontrados no interior da cavidade abdômino-pélvica, lateralmente a bexiga urinária, uretra e pênis. Quando necessário, os testículos, juntamente com os epidídimos, eram manualmente deslocados do escroto para cavidade abdominal, através do canal inguinal.

Durante todo o procedimento de coleta do material, o fixador (Bouin) foi constantemente gotejado. Então, os epidídimos foram pesados, dissecados, isolados para posterior redução e divisão nos segmentos inicial (si), cabeça (cb), corpo (cp) e cauda (cd) (Figura 5). Após a pré-fixação por gotejamento, as amostras foram pós-fixadas no líquido fixador por 24 horas. Seguindo a fixação histológica, as amostras de epidídimo foram lavadas em álcool 70% e submetidas à rotina para inclusão em Paraplast.



Figura 5 : Epidídimo do gerbilo e suas diferentes regiões, segmento inicial (si), cabeça (cb), corpo (cp) e cauda (cd).

### 3.3 Preparo de Lâminas e Microtomia

As lâminas de vidro foram lavadas e silanizadas (3-Aminopropyl triethoxysilane, Sigma-Aldrich) e depois de secas foram armazenadas. Seguindo à inclusão, foi feita microtomia para a obtenção de cortes histológicos de 4  $\mu$ m de espessura, montados nas lâminas silanizadas pré-confeccionadas. As lâminas, com os cortes devidamente identificados, foram armazenadas para, posteriormente, serem submetidas à desidratação e desparafinização (em baterias com álcool em concentração crescente e xilol, respectivamente) para seguirem a rotina específica de imunolocalização das AQPs.

### 3.4 Imunoistoquímica

Para realização das rotinas imunoistoquímicas, os cortes desparafinizados foram submetidos à recuperação da atividade antigênica em tampão citrato de sódio, no microondas. Após o bloqueio com BSA (3%), o material foi incubado “overnight” em geladeira utilizando-se anticorpos anti-AQP9 e anti-AQP2 (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA), em diluição de 1:100.

Após lavagem em PBS, os cortes foram novamente bloqueados seguindo-se as etapas para incubação em anticorpo secundário diluído 1:70, por 1 hora a 37°C, seguida de outra lavagem para revelação com DAB. As lâminas foram montadas com lamínulas e em sequência observadas e analisadas.

As lâminas histológicas, submetidas à reação imunoistoquímica para padronização da AQP9 e da AQP2 foram analisadas em microscópio de luz (ZEISS, AXIO LAB.A1, Processo nº 2010/01056-1). Em seguida, o material foi fotografado em fotomicroscópio de pesquisa ZEISS, AXIO LAB.A1, para verificar as possíveis alterações no comportamento das AQPs ao longo do desenvolvimento pós-natal. Com o objetivo de confirmar a reação específica e a eficiência da técnica e dos reagentes empregados, foram utilizados controles negativo e positivo, respectivamente.

### 3.5 *Western blotting*

Para o processamento da eletroforese, as amostras obtidas foram homogeneizadas em tampão de extração contendo Tris 0,05M pH 7,5, Triton X100, NaCl e inibidores (proporção de 30 mg de tecido/100µl de tampão de extração). Os homogenatos obtidos foram centrifugados e os sobrenadantes resultantes solubilizados e aplicados em gel SDS-poliacrilamida a 12%. Após a realização da eletroforese, os “spots” correspondentes às proteínas foram eletrotransferidos para uma membrana imobilizadora. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em BSA (5%) e incubada com os anticorpos policlonais anti-AQP2 e anti-AQP9 (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA), diluídos 1:500. A membrana foi lavada em tampão e incubada com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Sigma, USA), durante 1 hora. Após a lavagem, a reação foi revelada utilizando-se substrato quimioluminescente para *Western blotting* (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce).

### **3.6 Morfometria**

Para realização do estudo morfométrico, os cortes desparafinizados foram submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina. As lâminas foram cobertas com lamínulas e em sequência observadas, analisadas e fotodocumentadas. Em seguida foram realizadas as medidas morfométricas de altura de epitélio e diâmetro tubular nas diferentes regiões epididimárias para as idades estudadas (10, 30, 60, 120 e 300 dias).

Foram realizadas 30 medidas de cada região epididimária, para cada animal, sendo utilizados três animais de cada grupo de estudo. Foram calculadas as médias e os desvios-padrão para cada grupo etário de estudo, tanto para a altura epitelial quanto para o diâmetro tubular. Em seguida, foram realizadas análise de variância (ANOVA) seguido de teste estatístico de Tukey (Programa InStat3) para verificar o valor de significância ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes regiões epididimárias, dentro de cada idade e também entre as diferentes idades estudadas.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Morfologia

As mensurações dos pesos corpóreo e epididimário dos gerbilos, em diferentes faixas etárias, mostraram correlação positiva entre o peso total dos epidídimos e o peso dos animais (Tabela 1).

<b>Idades (dias) dos animais</b>	<b>Média do Peso Corporal (g)</b>	<b>Média de Peso do Epidídimo (g)</b>
10	10	0,00783
30	25,88	0,0476
60	63,15	0,1241
120	76,67	0,2695
300	100	0,3541

**Tabela 1: Médias dos pesos corporais e epididimários do gerbilo nas diferentes idades estudadas.**

O epidídimo do gerbilo, a partir dos 30 dias de vida, apresentou epitélio pseudoestratificado com células já diferenciadas. Entre essas células, houve predomínio das células principais, com núcleos localizados no terço médio-basal, também foram observadas células basais e apicais. A luz tubular mostrou-se desprovida de espermatozoides, com pregas epiteliais apenas na cauda epididimária deste grupo (Figura 1 A-D). A morfologia observada nos animais de 60 dias (Figura 1 E-H) foi semelhante à encontrada para 120 (Figura 1 I-L) e 300 dias (Figura 1 M-P).

A altura do epitélio na cauda epididimária, dos animais de 30 dias, foi maior quando comparada às demais regiões. Já nos animais de 60, 120 e 300 dias a altura do epitélio no segmento inicial foi significativamente maior se comparada às demais regiões epididimárias (Tabela 2).

Com a idade, foi possível observar nas regiões proximais (SI e CB) o aumento progressivo dos valores médios da altura do epitélio. No corpo do epidídimo a altura epitelial média oscila com a idade, sendo menor no animal de 300 dias se comparada aos 10 dias de idade. Na cauda epididimária, a altura do epitélio diminui com a idade, e igualou-se na fase adulta à altura média dos recém-nascidos (Tabela 2).

Altura de Epitélio do Epidídimo				
Idades	SI	CB	CP	CD
10	9,422 ( $\pm 0,348$ ) Aa	7,52 ( $\pm 0,673$ ) Aa	23,667 ( $\pm 2,358$ ) Ba	8,780 ( $\pm 2,385$ ) Aa
30	18,542 ( $\pm 1,393$ ) Ab	14,246 ( $\pm 0,965$ ) Aab	16,879 ( $\pm 3,517$ ) Aab	25,06 ( $\pm 2,541$ ) Bb
60	30,144 ( $\pm 4,95$ ) Ac	16,612 ( $\pm 1,286$ ) Bab	21,406 ( $\pm 0,508$ ) Ba	17,011 ( $\pm 3,108$ ) Bc
120	31,695 ( $\pm 3,883$ ) Acd	15,178 ( $\pm 2,24$ ) Bab	19,063 ( $\pm 1,259$ ) Bab	11,016 ( $\pm 0,44$ ) Bac
300	39,612 ( $\pm 2,001$ ) Ad	18,411 ( $\pm 7,844$ ) Bb	15,102 ( $\pm 2,435$ ) Bb	9,336 (1,918) Ba

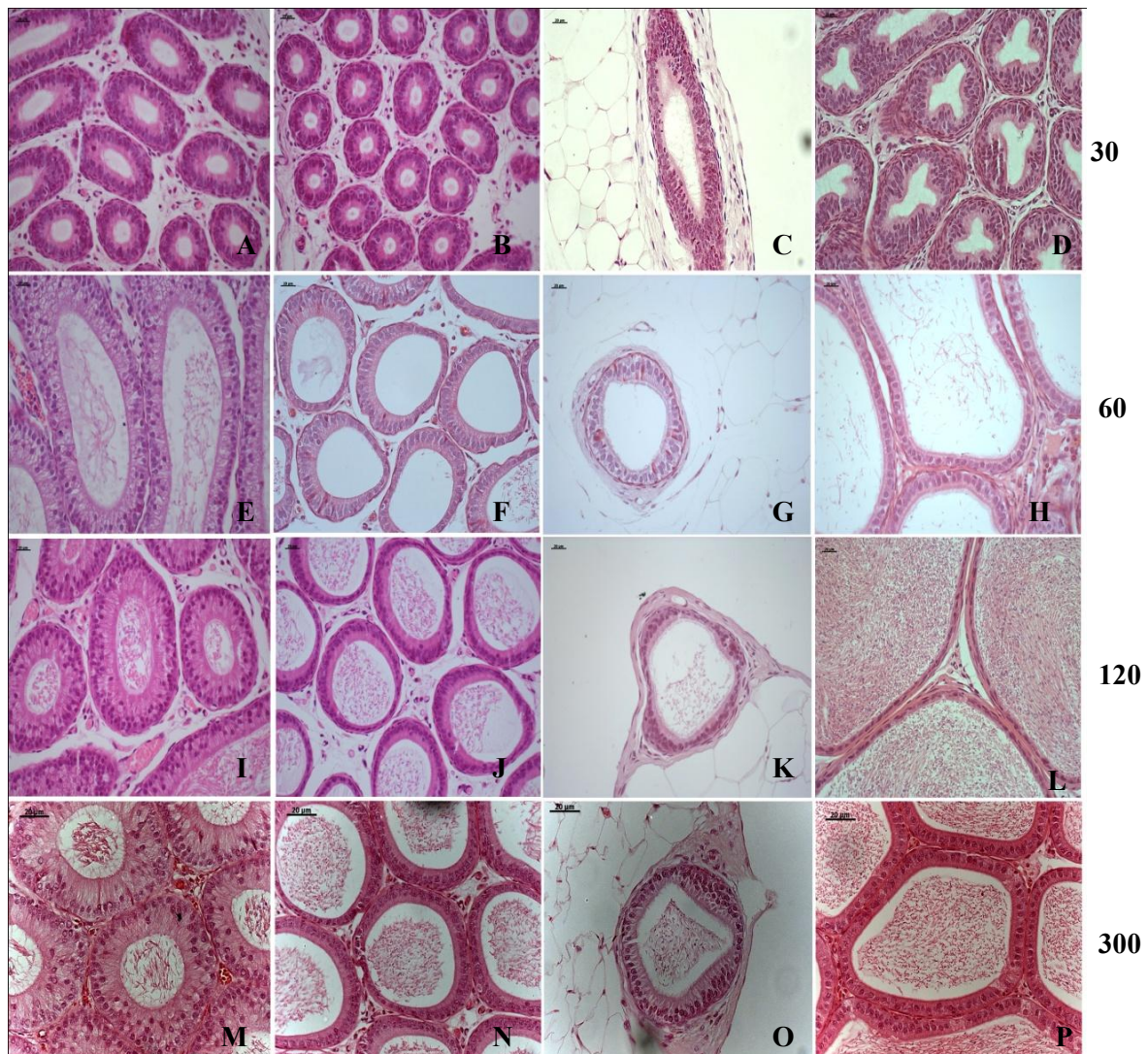
Tabela 2: Média e desvio-padrão da altura do epitélio do epidídimo do gerbilo, nas idades de 10, 30, 60, 120 e 300 dias. As letras maiúsculas comparam as regiões de segmento inicial (SI), cabeça (CB), corpo (CP) e cauda (CD) dentro de uma mesma idade. As letras minúsculas comparam a mesma região nas diferentes faixas etárias.

Nos animais de 30, 60, 120 e 300 dias de idade não houve diferença significativa entre os diâmetros tubulares das regiões de segmento inicial, cabeça, corpo e cauda epididimária (Tabela 3).

De forma geral, o diâmetro tubular tornou-se cada vez maior com a idade. Nas regiões do corpo e cauda do epidídimo, o ducto atingiu seu maior diâmetro aos 60 e 120 dias, respectivamente. O diâmetro tubular no corpo do epidídimo, dos animais de 300 dias, apresentou valor médio semelhante aos recém-nascidos.

Diâmetro Tubular do Epidídimo				
Idades	SI	CB	CP	CD
10	36,397 ( $\pm 10,981$ ) Aa	24,390 ( $\pm 0,845$ ) Aa	80,611 ( $\pm 2,368$ ) Ba	32,998 ( $\pm 0,588$ ) Aa
30	64,963 ( $\pm 4,384$ ) Aab	49,875 ( $\pm 7,541$ ) Aab	101,569 ( $\pm 50,058$ ) Aab	109,404 ( $\pm 22,239$ ) Aa
60	141,032 ( $\pm 11,35$ ) Ab	123,1426 ( $\pm 1,886$ ) Ab	170,997 ( $\pm 24,15$ ) Ab	149,917 ( $\pm 32,536$ ) Aab
120	125,3618 ( $\pm 30,765$ ) Ab	123,337 ( $\pm 50,259$ ) Ab	152,259 ( $\pm 18,55$ ) Abc	275,147 ( $\pm 126,044$ ) Abc
300	118,381 ( $\pm 58,04$ ) Ab	97,372 ( $\pm 42,302$ ) Aab	83,595 ( $\pm 1,984$ ) Aac	123,199 ( $\pm 3,786$ ) Aac

Tabela 3: Média e desvio-padrão do diâmetro tubular do epidídimo do gerbilo, nas idades de 10, 30, 60, 120 e 300 dias. As letras maiúsculas comparam as regiões de segmento inicial (SI), cabeça (CB), corpo (CP) e cauda (CD) dentro de uma mesma idade. As letras minúsculas comparam a mesma região nas diferentes faixas etárias.



**Figura 1:** Coloração em H.E. das regiões de segmento inicial (SI: A, E, I, M), cabeça (CB: B, F, J, N), corpo (CP: C, G, K, O), e cauda (CD: D, H, L, P), mostrando a morfologia do epitélio epididimário nas idades de 30, 60, 120 e 300 dias.

#### 4.2 Imunoistoquímica e *Western blotting* para AQP2 e AQP9

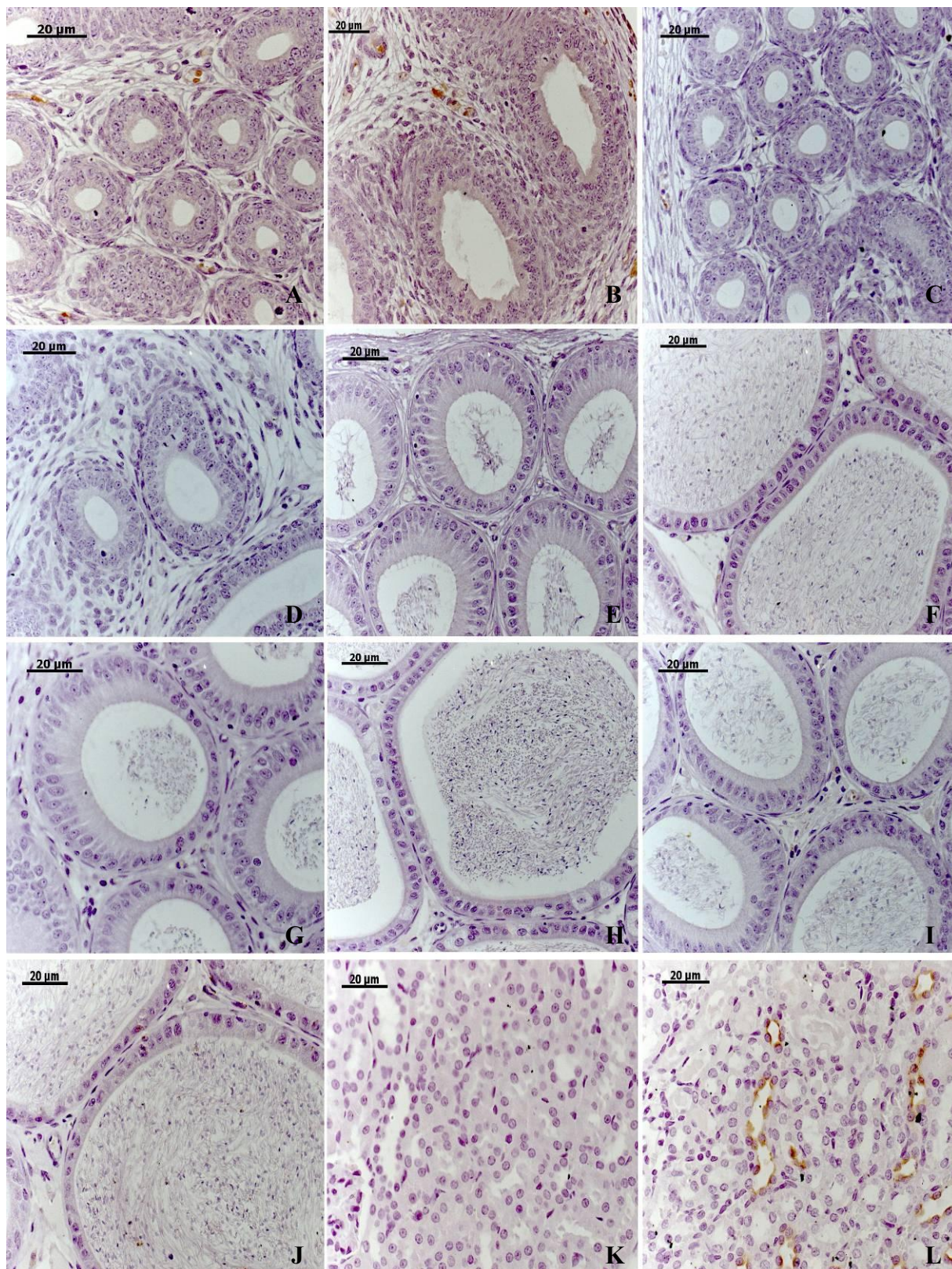
Os resultados imunoistoquímicos, não detectaram reação positiva para a AQP2 no epitélio epididimário das regiões: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda, para os animais de 10, 30, 60, 120 e 300 dias de idade (Figura 2). Para confirmar a eficiência da técnica foram utilizados cortes de rim de gerbilo como controle negativo (Figura 1K) e controle positivo (Figura 1L). Já, as rotinas de *Western blotting*, diferentemente da imunoistoquímica, revelaram bandas positivas para a AQP2 no epidídimo dos animais de 10, 120 e 300 dias de idade. Os animais de 30 e 60 dias não expressaram esta AQP (Figura 3).

De forma geral, a AQP9 foi localizada no epidídimo dos gerbilos, predominantemente, nos animais de faixas etárias mais avançadas, conforme evidenciado pela técnica de imunoistoquímica. Observou-se reatividade para a AQP9 restrita à região apical do epitélio epididimário e na região dos estereocílios (Figuras 4 e 5). A reatividade mostrou-se descontínua nas regiões de célula-clara, bastante evidenciada na cauda do epidídimo dos gerbilos (Figuras 4 H e 5 K e L). Para confirmar a especificidade da técnica, foi utilizado controle negativo, suprimindo a etapa de incubação em anticorpo primário (Figura 6).

Através da técnica de imunoistoquímica não foi possível evidenciar marcação para a AQP9 no epidídimo dos animais de 10 dias de idade (Figura 4 A, C, E, G). Nos animais de 30 dias de dias de idade, notamos a marcação para a AQP9 restrita à região do corpo epididimário. Já os animais de 60 dias, apresentaram padrão de marcação semelhante aos apresentados nos animais de 120 e 300 dias, em todas as regiões estudadas (Figura 5 B, E, H, K).

Através do *Western blotting*, as bandas para a AQP9 foram praticamente ausentes nos animais de 10 dias de idade. De forma geral, foi possível observar que, no epidídimo do gerbilo, a expressão da AQP9 aumenta progressivamente com a idade e tende a se manter quando esse animal atinge a idade adulta (Figura 7).





**Figura 2:** Imunoistoquímica para AQP2 mostrando ausência de reação de positiva, segmentos de cabeça (A), (C), (E), (G), (I) e cauda (B), (D), (F), (H) e (J) de animais de 10, 30, 60, 120 e 300 dias de idade, respectivamente. E cortes histológicos de rim de gerbilo utilizados como controles negativo (K) e positivo (L) para a reação.

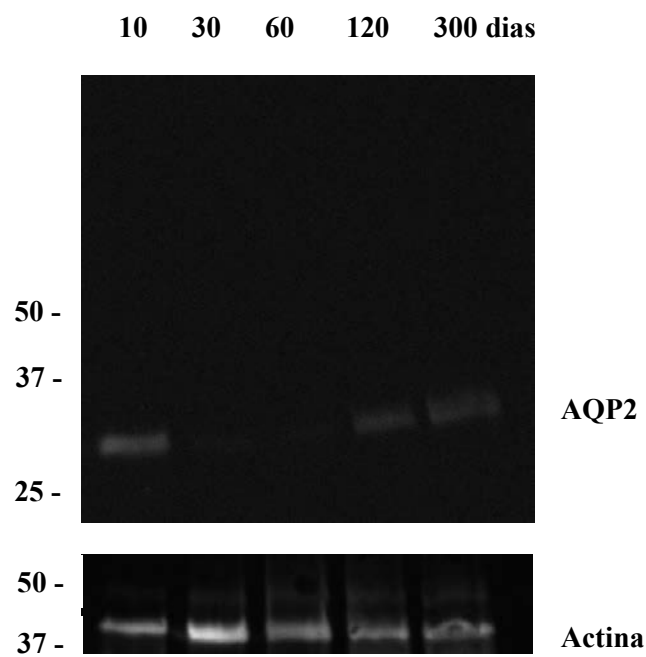


Figura 3: *Western blotting* para análise da expressão da AQP2 no epididimo de gerbilo em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal (10, 30, 60, 120 e 300 dias).



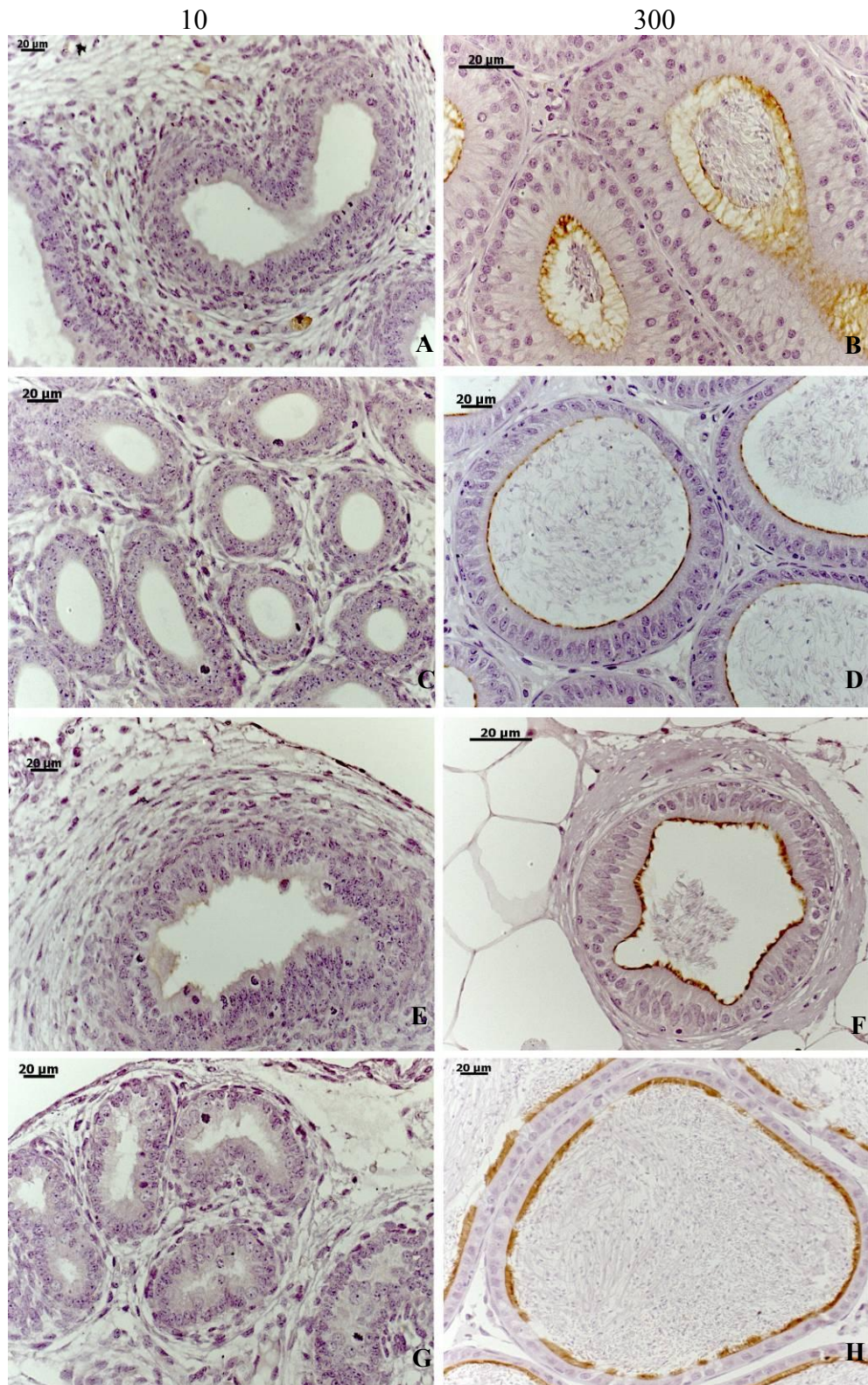


Figura 4: Imunolocalização da AQP9 em animais de 10 dias (esquerda) e 300 dias de idade (direita), nas diferentes regiões epididimárias, segmento inicial (A) e (B), cabeça (C) e (D), corpo (E) e (F) e cauda (G) e (H).



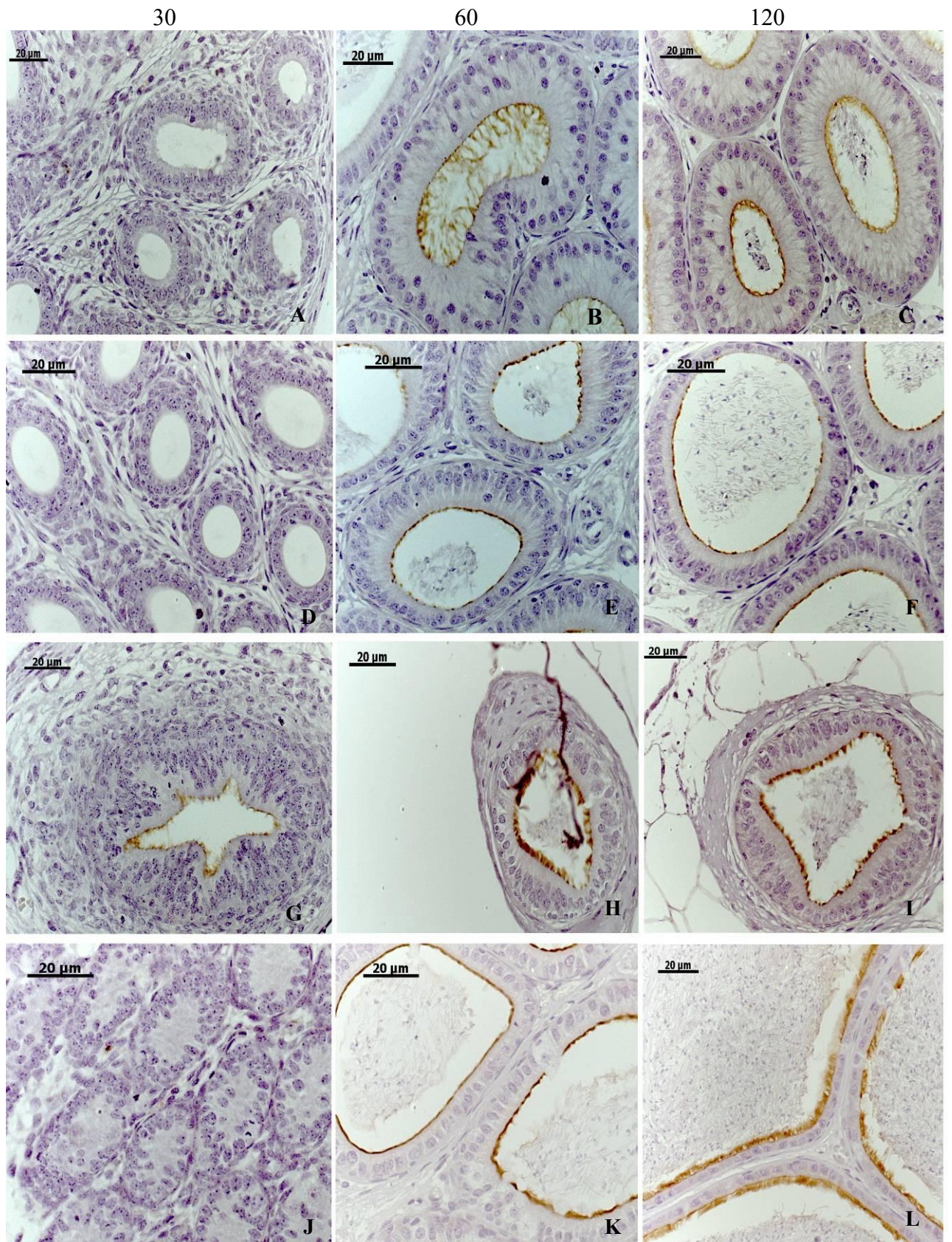


Figura 5: Imunolocalização da AQP9 em animais de 30, 60 e 120 dias nos diferentes segmentos do epidídimo, segmento inicial (A), (B) e (C), cabeça (D), (E) e (F), corpo (G), (H) e (I), cauda (J), (K) e (L).



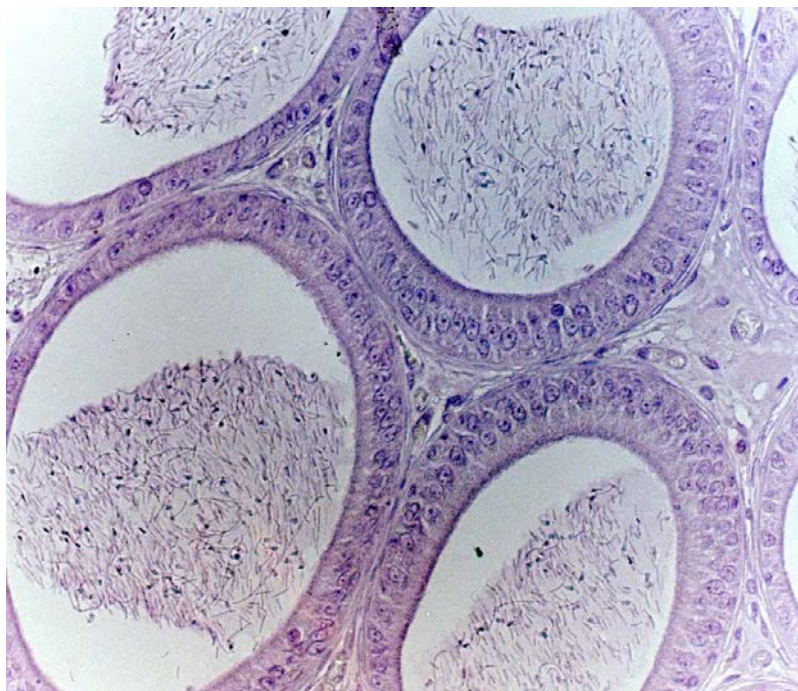


Figura 6: Controle negativo para imunolocalização da AQP9, epidídimo de gerbilo (40x).

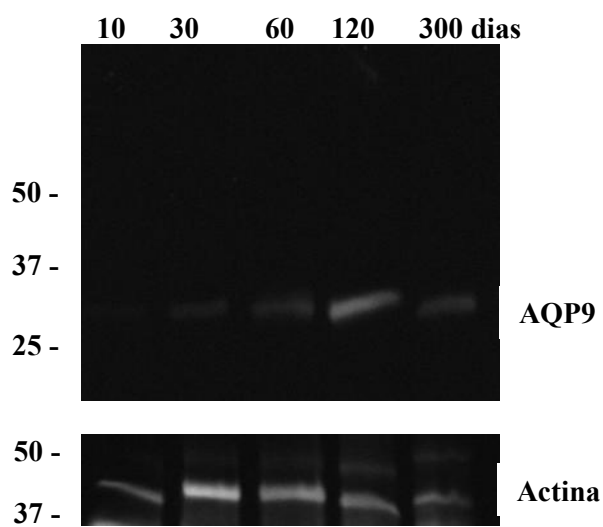


Figura 7: *Western blotting* para análise da expressão da AQP9 no epidídimo de gerbilo em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal (10, 30, 60, 120 e 300 dias).

## 5. DICUSSÃO

### 5.1 Morfologia

O epitélio pseudoestratificado do epidídimo do gerbilo, apresenta células diferenciadas a partir dos 30 dias de idade, bem como observado para o Hamster champanha (VICENTINI *et al.*, 1990) e para o cobaio (SCHIMMING *et al.*, 2012). A luz tubular apresentou pregas epiteliais na região da cauda epididimária nos gerbilos de 30 dias de idade, no entanto, diferentemente do descrito para o cobaio (SCHIMMING *et al.*, 2012), essas ondulações não persistiram até os 60 dias. Os aspectos estruturais observados no epidídimo do gerbilo de 60 dias foram semelhantes aos observados nos animais de 120 e 300 dias, padrão característico desta espécie, em idade adulta, como já descrito anteriormente (DOMENICONI *et al.*, 2007a).

Aos 30 dias de idade, a altura do epitélio na cauda foi maior quando comparada às demais regiões epididimárias. Já os animais de 60, 120 e 300 dias apresentaram maior altura de epitélio no segmento inicial, este padrão para os animais adultos concorda com os descritos anteriormente para roedores (ROBAIRE & HERMO, 1988; SERRE & ROBAIRE, 1998, DOMENICONI *et al.*, 2007a, BEU *et al.*, 2009).

O aumento progressivo da altura do epitélio nas regiões proximais do epidídimo do gerbilo, também foi observado no hamster champanha (VICENTINI *et al.*, 1990). Os mesmos autores também identificaram oscilações da altura epitelial com a idade, no segmento do corpo epididimário. Já, a diminuição da altura do epitélio, com a idade, na região da cauda epididimária, estaria relacionada às características desta região, a qual apresenta, no adulto, epitélio visivelmente mais baixo que as demais regiões.

Apesar do diâmetro tubular da cauda não apresentar diferença, estatisticamente significativa, em relação às demais regiões epididimárias, é possível notar uma tendência de este diâmetro ser maior no animal adulto (120 dias). Além disso, há uma compensação na altura do epitélio, a qual diminui significativamente, na região da cauda, em relação à região mais proximal do epidídimo.

Em relação ao diâmetro tubular, foi possível notar que, de forma geral, este parâmetro aumenta com a idade, provavelmente, esse dado esteja relacionado ao próprio crescimento do órgão. Nas regiões mais distais do epidídimo, o ducto atingiu seu maior diâmetro aos 120 dias, talvez por esta ser uma idade altamente

reprodutiva. Destaca-se que o corpo do epidídimo do gerbilo é a região na qual as médias da altura do epitélio e do diâmetro tubular são, no recém-nascido, muito próximas aos animais adultos. Aparentemente, nesta espécie, a região do corpo epididimário tem um desenvolvimento diferenciado se comparada às outras regiões. Em trabalho anteriormente realizado com o gerbilo, esta região do epidídimo foi considerada diferente quando comparada aos demais roedores, inclusive em relação às características estruturais e celulares (DOMENICONI *et al.*, 2007a).

## 5.2 Aquaporinas

A AQP2 foi inicialmente identificada nos ductos coletores dos rins (FUSHIMI *et al.*, 1993) e estudos posteriores mostraram que esta AQP é regulada pela vasopressina, um hormônio diurético (NIELSEN *et al.*, 1995). No sistema genital masculino, a AQP2 foi detectada, predominantemente, na membrana apical do ducto deferente, sendo suas sequências de nucleotídeos e aminoácidos idênticas à AQP2 renal. No entanto, neste órgão a AQP2 não é regulada pela vasopressina, sendo considerada uma proteína constitutiva de membrana (STEVENS *et al.*, 2000).

No presente estudo, a AQP2 foi detectada no epidídimo do gerbilo, somente por *Western blotting* e nos animais de 10, 120 e 300 dias de idade. A expressão desta AQP foi praticamente ausente nas demais idades estudadas. Essas variações temporais, no padrão de expressão da AQP2, poderiam indicar um papel para esta AQP no desenvolvimento pós-natal do epidídimo do gerbilo, bem como já descrito no epidídimo de ratos (DA SILVA *et al.*, 2006b).

Em ratos, o RNAm para AQP2 foi relativamente mais abundante nas células epiteliais epididimárias do rato adulto, no entanto, apesar do forte sinal apresentado pelo RNAm, a proteína não foi detectada por imunofluorescência ou *Western blotting*. A imunorreatividade para a AQP2 foi detectada apenas em uma subpopulação de células epiteliais da cauda epididimária, nas 3ª e 4ª semanas de vida, sendo confirmada por *Western blotting* (DA SILVA *et al.*, 2006b). Apesar da AQP2 ser expressa de forma transitória ao longo do desenvolvimento epididimário, tanto no rato como no gerbilo, o momento que esta AQP é expressa difere, sutilmente, em cada espécie. Enquanto no gerbilo a expressão da AQP2 é mais alta entre a 1ª e 2ª semana de vida, no rato (DA SILVA *et al.*, 2006b) esta

expressão é detectada apenas entre a 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas. Já em ratos adultos (DA SILVA *et al.*, 2006b) somente foi detectado o RNAm para AQP2, enquanto no gerbilo a proteína foi detectável. Estas pequenas diferenças temporais, na expressão da AQP2, devem estar relacionadas com características específicas do desenvolvimento de cada espécie.

Em estudos com camundongo, NELSON *et al.* (1998) mostraram que a AQP2, no sistema genital masculino, está restrita às regiões apical e subapical das células principais no ducto deferente e nas regiões centrais dos túbulos seminíferos, no entanto para esta espécie, não foi detectada reatividade no ducto epididimário. Contrastando estes dados, em aves, como o peru branco, a AQP2 foi evidenciada nos ductos eferentes, conectores e epididimário (ZANIBONI *et al.*, 2004). No cão, a AQP2 foi localizada em vesículas intracelulares, localizadas na região distal do epidídimo, as quais poderiam talvez exercer função de estocagem (DOMENICONI *et al.*, 2008). Estas vesículas AQP2-positivas seriam rapidamente recicladas entre a membrana plasmática e as vesículas intracelulares, como ocorre nos ductos coletores renais (AGRE *et al.*, 1995).

A AQP2 também foi descrita no citoplasma e na membrana plasmática de células principais, do corpo e da cauda, do epidídimo de ratos da linhagem Sprague-Dawley. E sua expressão não foi alterada em ratos submetidos à desnutrição durante a vida uterina e pós-natal (ARRIGHI *et al.*, 2010).

Na literatura especializada, as descrições sobre localização e expressão da AQP2 no sistema genital masculino, principalmente no epidídimo, são variáveis. Provavelmente, estas variações reflitam as características peculiares de cada espécie ou linhagem.

A AQP9 está presente em diferentes segmentos, do sistema genital masculino, envolvidos no transporte de fluidos (PASTOR-SOLER *et al.*, 2001). Estudos em oócitos revelaram que este canal permite não apenas a passagem de água, mas também de pequenos solutos (TSUKAGUCHI *et al.*, 1998). Segundo PASTOR-SOLER *et al.* (2002), a AQP9 é o principal canal de água detectado nas células principais do epidídimo, sendo regulada por andrógenos.

No epidídimo do gerbilo, a imunorreatividade para a AQP9 foi restrita à região apical de microvilos das células principais, ao longo de todas as regiões epididimárias, estes achados assemelham-se aos descritos para outras espécies (BADRAN & HERMO, 2002, DOMENICONI *et al.*, 2007b, PIETREMENT *et al.*, 2008). Os relatos mais controversos acerca da AQP9 está relacionada à reatividade das células claras da cauda epididimária, alguns autores afirmam que o citoplasma apical das células claras apresentam intensa reatividade para AQP9 (BADRAN & HERMO, 2002, HERMO *et al.* 2008), e outros relatam que, semelhantemente ao encontrado para o gerbilo, estas células não apresentam reatividade para esta AQP (PASTOR-SOLER *et al.*, 2001, DOMENICONI *et al.*, 2007).

A AQP9 foi detectada no epidídimo do gerbilo apenas a partir dos 30 dias de vida pós-natal. A expressão desta AQP aumentou progressivamente até a idade adulta. Estudos realizados por BADRAN & HERMO (2002) mostraram que, de fato, a AQP9 não está presente no início do desenvolvimento pós-natal. Os autores descreveram que apenas a partir do 21º dia de vida, a expressão da AQP9 nas células principais da cabeça, corpo e cauda do epidídimo atingem níveis de expressão semelhantes ao observado no animal adulto. Já nas células principais do segmento inicial e nas células claras da cauda epididimária, o padrão de expressão se torna semelhante ao animal adulto apenas a partir do 29º dia pós-natal. Segundo os autores, diferentes fatores parecem regular a expressão da AQP9, considerando-se os diferentes tipos celulares e as diferentes regiões epididimárias.

Estudos anteriores mostraram, no epidídimo de rato, aumento progressivo da expressão da AQP9 durante o desenvolvimento pós-natal, tanto no número de túbulos como na intensidade de reação de células individuais. Durante a puberdade, os níveis de expressão da AQP9 se tornaram semelhantes aos da fase adulta, ocorrendo possivelmente por modulação androgênica. Porém, neste estudo, a AQP9 foi detectada no epidídimo de rato, na primeira semana de vida, levantando uma discussão sobre a expressão desta AQP não ser totalmente dependente de altos níveis de andrógeno. No entanto, os andrógenos estão presentes em ratos machos durante o desenvolvimento pré e pós-natal, sendo assim possível que a expressão da AQP9 seja modulada por estes hormônios. Desta forma, seria possível afirmar que um baixo nível de andrógeno, no período pré-puberal, já seria suficiente para desencadear uma expressão progressiva desta proteína no epidídimo (PASTOR-SOLER *et al.*, 2001).

Recentemente, Arrighi et al (2010) desenvolveram um estudo sobre os efeitos da desnutrição, em fases precoces do desenvolvimento pós-natal de ratos, sobre a expressão de AQPs. Segundo os autores, a expressão da AQP9, no epidídimo adulto, foi modificada nos animais submetidos à desnutrição. As regiões do corpo e cauda do epidídimo foram as mais alteradas. A diminuição na expressão da AQP9 foi atribuída a uma provável queda hormonal, resultante da desnutrição.

## **6.CONCLUSÃO**

Os resultados apresentados acrescentaram informações acerca das características morfológicas das regiões epididimárias do gerbilo, em diferentes faixas etárias. Além disso, nossos resultados permitiram compreender o comportamento das AQPs 2 e 9 nos segmentos inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo do gerbilo, ao longo do desenvolvimento pós-natal. Estes achados acrescentam informações inéditas que poderão contribuir para esclarecimentos futuros a respeito da biologia reprodutiva desta espécie.

Sendo assim, foi possível concluir que:

- O padrão morfológico do desenvolvimento epididimário do gerbilo é semelhante aos demais roedores, guardando peculiaridades na região do corpo epididimário;
- O fato da AQP2 ser expressa de forma transitória, ao longo de diferentes faixas etárias, no epidídimo do gerbilo, sugere que esta AQP tenha importância para o desenvolvimento deste órgão;
- A etapa do desenvolvimento em que a AQP2 é expressa difere, sutilmente, entre as espécies;
- A localização e expressão da AQP2 é espécie-específica;
- A localização da AQP9 no epidídimo do gerbilo é semelhante às demais espécies;
- A expressão da AQP9 no epidídimo do gerbilo é modificada com a idade;

## 7. REFERÊNCIAS

ADAMALI, H.I.; HERMO, L. Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis, **J. Androl.**, v.17, p.208-222, 1996.

AGRE, P. Aquaporin water channels (Nobel Lecture). **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.43, p.4278-4290, 2004.

AGRE, P.; BROWN, D.; NIELSEN, S. Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. **Cur. Open. Cell Biol.**, v.7, p.472-483, 1995.

ARRIGHI, S.; ARALLA, M.; GENOVESE, P.; PICABEA, N.; BIELLI, A. Undernutrition during foetal to prepubertal life affects aquaporin 9 but not aquaporins 1 and 2 expression in the male genital tract of adult rats. **Theriogenology**, v.74, p.1661–1669, 2010.

BADRAN, H.H.; HERMO, L.S. Expression and regulation of Aquaporins 1, 8 and 9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during postnatal development. **J. Androl.**, v.23, p.358-373, 2002.

BEU, C.C.L.; ORSI, A.M.; DOMENICONI, R.F. Structure of the Lining Epithelium of the Cauda Epididymis of the Golden Hamster. **Anat. Histol. Embryol.**, v.38, p.49-57, 2009

CORDEIRO, R.S.; SCARANO, W.R.; DE CAMPOS, S.G.P.; SANTOS, F.C.A.; VILAMAIOR, P.S.L.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Androgen receptor in the *Mongolian gerbil* ventral prostate: Evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. **Micron**, v.39, p.1312–1324, 2008.

CORNWALL, G.A. New insights into epididymal biology and function. **Hum Reprod.**, v.15, p.213-227, 2009

DA SILVA, N.; PIÉTREMENT, C.; BROWN, D.; BRETON, S. Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrents duct. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1758, p.1025-1033, 2006a.

DA SILVA, N.; SILBERSTEIN, C.; BEAULIEU, V.; PIÉTREMENT, C.; HOEK, A.N.V.; BROWN, D.; BRETON, S. Postnatal expression of aquaporins in epithelial cells of the rat epididymis. **Biol. Reprod.**, v.74, p.427- 438, 2006b.

DE CAMPOS, S.G.P.; ZANETONI, C.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. **Anat. Rec.**, v.288A, p.723–733, 2006.

DOMENICONI, R.F.; ORSI, A.M.; BEU, C.C.L.; FELISBINO, S.L. Morphological features of the epididymal epithelium of gerbil, *Meriones unguiculatus*. **Tissue Cell.**, v.39, p.47-57, 2007a.

DOMENICONI, R.F.; ORSI, A.M.; JUSTULIN, L.A.; BEU, C.C.L.; FELISBINO, S.L. Aquaporin 9 (AQP9) localization in the adult dog testis excurrent ducts by immunohistochemistry. **Anat. Rec.**, v.290, p.1519-1525, 2007b.

DOMENICONI, R.F.; ORSI, A.M.; JUSTULIN, L.A.; BEU, C.C.L.; FELISBINO, S.L. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. **Cell Tissue Res.** v.332, p.329-335, 2008.

DYM, M.; ROMRELL, L.J. Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. **J. Reprod. Fertil.**, v.42, p.1-7, 1975.

ELKJAER, M.; VADJA, Z.; NEJSUM, L.N.; KWON, T.; JENSEN, U.B.; AMIRY-MOGHADDAM, M.; FROKIAER, J.; NIELSEN, S. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.276, p.1118-1128, 2000.

FLICKINGER, C.J.; HOWARDS, S.S.; ENGLISH, H.P. Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. **Am. J. Anat.**, v.15, p.557- 586, 1978.



FUSHIMI, K.; UCHIDA, S.; HARA, Y.; HIRATA, Y.; MARUMO, F.; SASAKI, S. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. **Nature**, v.361, p.549-552, 1993.

HALMINTON, D.W. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis, and ductus deferens in the rat. **In**: GREEP, R.O., ASTWOOD, E.B., eds., *Handbook of Physiology. Sect. 7, Endocrinology, Male Reproductive System*. American Physiology Society, Washington, v.5, p.259-301, 1975.

HERMO, L.; ADAMALI, H. I.; ANDONIAN, S. Immunolocalization of CA II and H<sup>+</sup> V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis, **J. Androl**, v.21, p.376-391, 2000.

HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. **Int. Rev. Cytol.**, v.154, p.106-189, 1994.

HERMO, L.; SCHELLENBERG, M.; LIU, L. Y.; DAYANANDAN, B.; ZHANG, T.; MANDATO, C. A.; SMITH, C. E. Membrane domain specificity in the spatial distribution of aquaporins 5, 7, 9 and 11 in efferent ducts and epididymis of rats. **J. Histochem. Citochem.**, v.56, p.1121-1135, 2008.

HERMO, L.; SMITH, C.E. Thirsty Business: Cell, Region and Membrane Specificity of Aquaporins (AQPs) in the Testis, Efferent Ducts and Epididymis and Factors Regulating Their Expression. **J. Androl.**, 2011.

ISHIBASHI, K.; KOIKE, S.; KONDO, S.; HARA, S.; TANAKA, Y. The role of a group III AQP, AQP11 in intracellular organelle homeostasis. **J. Med. Invest.**, v.56, p. 312-317, 2009b.

JOSEPH, A.; YAO, H.; HINTON, B.T. Development and morphogenesis of the Wolffian/Epididymal Duct, *More Twists and Turns*. **Dev. Biol.**, v.325, p.6-14, 2009.

MATSUZAKI, T.; TAJIKA, Y.; TSERENTSOODOL, N.; SUZUKI, T.; AOKI, T.; HAGIWARA, H.; TAKATA, K. Aquaporins: water channel family. **Anat. Sci. Int.**, v.77, p.85-93, 2002.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. Embriologia Básica. Ed. Elsevier: 7ª Ed, Rio de Janeiro, p.376, 2008.

NASHAN, D.; MALORNY, U.; SORG, C.; COOPER, T.; NIESCHLAG, E. Immunocompetent cells in the murine epididymis. **Int. J. Androl.**, v.12, p.85-94, 1989.

NELSON, R.D.; STRICKLETT, P.; GUSTAFSON, C.; STEVENS, A.; AUSIELLO, D.; BROWN, D.; KOHAN, D.E. Expression of an AQP2 Cre recombinase transgene in kidney and male reproductive system of transgenic mice. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v.275, p.C216-C226, 1998.

NICANDER, L.; MALMQVIST, M. Ultrastructural observations suggesting merocrine secretion in the initial segment of the mammalian epididymis. **Cell Tiss. Res.**, v.184, p.487-490, 1977.

NIELSEN, S.; AGRE, P. The aquaporin family of water channels in kidney. **Kidney Int.**, v.48, p.1057-1068, 1995.

NIELSEN, S.; CHOU, C. L.; MARPLES, D.; CHRISTENSEN, E. I.; KISHORE, B. K.; KNEPPER, M. A. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p.1013-1017, 1995.

OLIVEIRA, C.A.; CARNES, K.; FRANCA, L.R.; HERMO, L.; HESS, R.A. Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductile epithelium and initial segment of the epididymis. **Biol. Cell.**, v.97, p.385-395, 2005.

PASTOR-SOLER, N.; BAGNIS, C.; SABOLIC, I.; TYSZKOWSKI, R.; MCKEE, M.; HOEK, A.V.; BRETON, S.; BROWN, D. Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. **Biol. Reprod.**, v.65, p.384-393, 2001.

PASTOR-SOLER, N.; BAGNIS, C.; HERAK-KRAMBERGER, C.; SABOLIC, I.; HOEK, A.V.; BROWN, D.; BRETON, S. Expression of Aquaporin 9 in the Adult Rat Epididymis is Modulated by Androgens. **Biol. Reprod.**, v.66, p.1716-1722.

PIETREMENT, C.; DA SILVA, N.; SILBERSTEIN, C.; JAMES, M.; MARSOLAIS, M.; VAN HOEK, A.; BROWN, D.; PASTOR-SOLER, N.; AMEEN, N.; LAPRADE, R.; RAMESH, V.; BRETON, S. Role of NHERF1, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, and cAMP in the regulation of aquaporin 9. **J. Biol. Chem.** v.283, p. 2986-2996, 2008.

ROBAIRE, B.; HERMO, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens structure, functions, and their regulation. **In:** KNOBIL, E., NEILL, J.D. The Physiology of Reproduction. New York: **Raven Press.**, v.23, p.999-1080, 1988.

ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. The Epididymis. From Molecules to Clinical Practice. **Kluwer Academic/Plenum Publishers**; New York: 2002.

ROBAIRE, B.; VIGER R.S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. **Biol. Reprod.** v.52, p.226-236, 1995.

ROBAIRE, B.; HINTON, B.T.; ORGEBIN-CRIST M.C. The epididymis. **In:** The physiology of reproduction. Knobil E., Neill J.D eds. **Elsevier:** 3rd Ed, New York, p.1071-1148, 2006.

SCHIMMING, B. C.; DOMENICONI, R. F.; PANHOZA TSE, M.C.; TSE, H. G.; ORSI, A. M. Morfologia do epidídimo do cobaio (*Cavia porcellus*) em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, n 4, v.49, p307-317, 2012.

SERRE, V.; ROBAIRE, B. Segment-specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. **Biol. Rep.**, v.58, p.497-513, 1998.

SETCHELL, B.P.; MADDOCKS, S.; BROOKS, D.E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. **In:** The physiology of reproduction. Knobil E., Neill J.D. eds. **Raven Press**, v.18, p.1063-1147, 1994.

STEVENS, A.L.; BRETON, S.; GUSTAFSON, C.E. et al. Aquaporin-2 is a vasopressin-independent, constitutive apical membrane protein in rat vas deferens. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v.278, p.C791-C802, 2000.

TRASLER, J.M.; HERMO, L.; AND ROBAIRE, B. Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach. **Biol Reprod.** v.38, p.463-479, 1988.

TSUKAGUCHI, H.; SHAYAKUL, C.; BERGER, U.V.; MACKENZIE, B.; DEVIDAS, S.; GUGGINO, W.B.; VAN HOEK, A.N.; HEDIGER, M.A. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.24737-24743, 1998.

TSUKAGUCHI, H.; WEREMOWICZ, S.; MORTON, C.C.; HEDIGER, M.A. Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. **Am. J. Physiol.**, v.277, p.F685-F696, 1999.

TURNER, T.T. Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.637, p.364-383, 1991.

VERKMAN, A.S.; MITRA, A.K. Structure and function of aquaporin water channels. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v.278, p.F13-F28, 2000.

VERKMAN, A. S. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. **Journal of Cell Science**, v.118, p.3225-3232, 2012.

VICENTINI, C.A.; ORSI, A.M. Características citoquímicas e ultra-estruturais do epitélio de revestimento na parte distal do hamster (*Mesocricetus auratus*). **Rev. Brás. Biol.**, v.49, p.291-301, 1989

VICENTINI, C.A.; ORSI, A.M.; BOARO MARTINS, M.R.F. Considerações sobre o Desenvolvimento pós-natal do Epidídimo do Hamster (*Mesocricetus auratus*), **Naturalia**, v.15, p.35-45, 1990.

WANG, H.; RAJENDRA KUMAR, T. Segment- and cell- specific expression of D-type cyclins in the postnatal mouse epididymis. **Gene Expr. Patterns**, 2012.

YEUNG, C.H. Aquaporins in spermatozoa and testicular germ cells: identification and potential role. **Asian J Androl.**, v.12, p.490-499, 2010.

YEUNG, C.H., COOPER, T.G. Study of the role of epididymal  $\alpha$ -glucosidase in the fertility of male rats by administration of the enzyme inhibitor castanospermine. **J. Reprod. Fertil.**, v.102, p.401-410, 1994.

ZANIBONI, L.; AKUFFO, V.; BAKST, M.R. Aquaporins are observed in the duct epithelia of the epididymal region of the large white turkey. **Poultry Sci.**, v.83, p.1917–1920, 2004.

ZHANG, D. et al. Functions of water channels in male and female reproductive systems. **Molecular Aspects of Medicine**, 2012.