

MAINARA FERREIRA BARBIERI

**"ESTUDO DA EXPRESSÃO DA ALBUMINA NO
DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO TRATO
REPRODUTOR MASCULINO DE MURINOS"**

Campinas, 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MAINARA FERREIRA BARBIERI

**"ESTUDO DA EXPRESSÃO DA ALBUMINA NO
DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO TRATO
REPRODUTOR MASCULINO DE MURINOS"**

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese defendida pela candidata

Mainara Ferreira Barbieri

Luis Violin

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural do Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Tecidual.

Orientador: Dr. Luis Antonio Violin Dias Pereira
Coorientadora: Dra. Lúcia Elvira Alvares

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B234e Barbieri, Mainara Ferreira, 1987-
Estudo da expressão da albumina no desenvolvimento pós-natal do trato reprodutor masculino de murinos / Mainara Ferreira Barbieri. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Luis Antonio Violin Dias Pereira.
Coorientador: Lúcia Elvira Alvares.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Albumina. 2. Trato reprodutor masculino. 3. Barreira hematotesticular. 4. Desenvolvimento pós-natal. 5. Fertilidade. I. Pereira, Luis Antonio Violin Dias, 1968-. II. Alvares, Lúcia Elvira, 1968-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Albumin expression in the postnatal development of murine male reproductive tract

Palavras-chave em inglês:

Albumin
Male reproductive tract
Blood-testis barrier
Postnatal development
Fertility

Área de concentração: Biologia Tecidual

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Luis Antonio Violin Dias Pereira [Orientador]
Taiza Stumpp Teixeira
Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Data de defesa: 24-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 24 de Fevereiro de 2014.

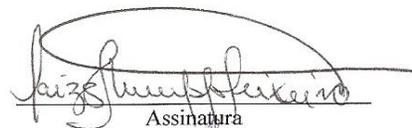
BANCA EXAMINADORA

Dr. Luis Antonio Violin Dias Pereira (Orientador)



Assinatura

Dra. Taiza Stumpp Teixeira



Assinatura

Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete



Assinatura

Dr. César Alexandre Fabrega Carvalho

Assinatura

Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Assinatura

RESUMO

A origem da albumina nos órgãos do trato reprodutor masculino tem sido questionada ao longo dos anos sendo sua presença tecidual constantemente atribuída a um mecanismo de extravasamento do plasma sanguíneo para o espaço extravascular intersticial, atribuindo-se ao fígado o papel de sítio de síntese desta proteína no período pós-natal. O padrão de distribuição da proteína albumina nos tecidos epiteliais de órgãos do trato reprodutor masculino reserva questionamentos quanto à veracidade de seu alcance luminal pelo rompimento de suas barreiras hematoteciduais. Carreador de esteroides; estimulador de células de Leydig; mediador do mecanismo parácrino de comunicação entre células de Sertoli e germinativas; promotor de proliferação celular e mediador de mudanças estruturais em membranas celulares, com suposta participação na reação acrossômica e capacitação do espermatozoide são possíveis papéis atribuídos à albumina no trato reprodutor masculino. A associação da proteína albumina a componentes glicídicos não é usual para mamíferos, porém há respaldo a essa hipótese por meio das PES (glicoproteínas pré-albumínicas epidídimo-específicas de ovinos) e dados de nosso grupo de pesquisa através do epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal (Amc) TRA 54 (testicular germ cells immunized to rat). Essa dissertação de mestrado retoma a polêmica discussão centrada na presença, origem, localização e função da albumina no trato reprodutor masculino e se propôs, utilizando de uma abordagem cronológica pós-natal (períodos neonatal, pré-pubere, púbere, adulto e idoso) a rediscutir os fundamentos teóricos associados à principal proteína sérica de mamíferos bem como o dubio perfil de expressão dessa proteína em Ratos analbuminêmicos Nagase (NAR). Nesse estudo, a presença da proteína albumina foi evidenciada por immunoblotting em todos os grupos e períodos do desenvolvimento pós-natal, apresentando padrão distinto de bandeamento para testículos e epidídimos NAR. A localização celular da proteína albumina foi identificada em camundongos, por imunohistoquímica, principalmente no tecido intersticial e nas células da linhagem germinativa. Testículos de ratos Sprague Dawley adultos apresentaram marcação adicional para células de Sertoli. Testículos e epidídimos de NAR mantiveram reatividade intersticial, sugerindo, ainda que em níveis extremamente baixos, a expressão de albumina.

Para epidídimos, foi identificado amplo espectro de perfis de imunomarcção das células epiteliais e estereocílios. Ductos deferentes apresentaram, na região proximal ao epidídimo, imunomarcção citoplasmática e, na região distal, marcação de estereocílios e espermatozoides luminiais. Perfis de imunomarcção citoplasmática também foram observados em vesícula seminal, próstata e uretra peniana, principalmente, no período adulto. Por fim, a presença de transcritos de RNAm detectados por ensaios de RT PCR (reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa) para testículos e epidídimos foi confirmada desde o período neonatal até idoso, mostrando-se também presente para ducto deferente a partir da puberdade. A abordagem do desenvolvimento pós-natal revelou um pico de maior expressão da albumina no período adulto com início do declínio registrado no período idoso. Como ressalva final, a confirmação da presença de RNAm para órgãos do trato reprodutor masculino não invalida a hipótese da também presença de albumina circulante, sintetizada, em primeira instância, pelas células hepáticas.

ABSTRACT

The origin of the albumin in the male reproductive tract has been questioned over the years and their presence tissue constantly assigned to a mechanism for extravasation of plasma into the interstitial extravascular space, assigning the role of the liver as the site of synthesis of this protein in the postnatal period. The distribution pattern of the albumin protein in the epithelial tissues of organs of the male reproductive tract reserves inquiries as to the veracity of their luminal reach through the disruption of their tissue blood-barriers. Carrier steroids; stimulator of Leydig cells; mediator of paracrine mechanism of communication between Sertoli and germ cells; promoter of cell proliferation and mediator of structural changes in cell membranes, with alleged involvement in the acrosome reaction and capacitation of sperm are possible roles of albumin in the male reproductive tract. The association of the albumin protein to glycidyl components is unusual for mammals, but there is support to this hypothesis by the PES (prealbumins epididymis-specific glycoproteins of sheep) and data from our research group through the epitope recognized by the monoclonal antibody (mAb) TRA 54 (testicular germ cells immunized to rat). This dissertation takes up the controversial discussion centered on the presence, source, location and function of albumin in the male reproductive tract and proposed, through a chronological postnatal approach (neonatal, prepubertal, puberal, adult and elderly periods) to revisit the theoretical foundations associated with major serum protein of mammals as well as the dubious expression profile of this protein in Nagase analbuminemic rats (NAR). In this study, the presence of albumin protein was detected by immunoblotting in all groups and periods of postnatal development, with distinct banding pattern in testis and epididymis of NAR. The cellular localization of the albumin protein has been identified in mice by immunohistochemistry mainly in the interstitial tissue and in germline cells. Testes of Sprague Dawley rats showed additional labeling of Sertoli cells. Testes and epididymides of NAR maintained interstitial reactivity, suggesting the expression of albumin even at extremely low levels. To epididymis a broad spectrum of immunostaining of epithelial cells and stereocilia profiles were identified. Vas deferens showed cytoplasmic immunostaining in the region proximal to epididymis, and in the distal region, stereocilia and luminal spermatozoa labeling. Cytoplasmic immunostaining profiles were also observed in the seminal vesicle, prostate and penile urethra, especially in adult period. Finally, the presence

of mRNA transcripts detected by RT PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) assays to testis and epididymis was confirmed from neonates to the elderly, being also present in vas deferens from puberty. The approach of postnatal development revealed a peak with the highest expression of albumin in the adult period beginning to decline at elderly. As a final caveat, the presence of mRNA confirmed for organs of the male reproductive tract does not invalidate the hypothesis of the also presence of circulating albumin in reproductive tissue, which must be synthesized at first instance, by liver cells.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	O trato reprodutor masculino	2
1.1.1	Testículo	3
1.1.2	Epidídimo	11
1.1.3	As barreiras hematotesticular e hematoepididimária.....	17
1.1.4	Ducto Deferente.....	22
1.1.5	Vesícula Seminal	24
1.1.6	Próstata.....	26
1.1.7	Compartimento estromal.....	29
1.1.8	Plasma seminal	30
1.1.9	Pênis.....	32
1.2	Sobre a albumina.....	35
1.2.1	Sobre a albumina e o trato reprodutor masculino.....	36
1.2.2	Sobre a albumina e um complexo glicoproteico de alto peso molecular: uma justificativa à proposta deste trabalho	39
2	Objetivos	41
3	Material e métodos.....	43
3.1	Animais.....	44
3.2	Estudo da expressão da albumina	45
3.3	Coleta e processamento das amostras	45
3.4	Detecção imunoquímica da proteína albumina.....	46
3.5	Determinação da imunolocalização histológica da proteína albumina	48
3.6	Análise do perfil transcricional para RNAm de albumina	50
4	Resultados	55
4.1	Estudo da expressão da albumina em murinos em idade reprodutiva.....	56
4.1.1	Perfil imunoquímico da proteína albumina.....	56
4.1.2	Imunolocalização de albumina	56
4.1.3	Perfil transcricional para RNAm de albumina	58

4.2	Estudo da expressão da albumina em camundongos neonatos, pré-púberes, púberes, adultos e idosos	59
4.2.1	Perfil imunoquímico da proteína albumina	59
4.2.2	Imunolocalização de albumina	60
4.2.3	Perfil transcricional para RNAm de albumina	61
5	Discussão	63
6	Conclusões	79
7	Pranchas de imagens	83
8	Referências	119
9	Anexo	137

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1.1 Representação histológica do testículo de murinos.....	9
Figura 1.2 Ilustração esquemática do epidídimo.	16
Figura 1.3 Ilustração esquemática da barreira hematotesticular e hematoepididmal.	19
Figura 1.4 Ilustração esquemática da dinâmica dos componentes da BHT no tubo seminífero.	20
Figura 1.5 Ilustração esquemática da próstata.	29

Pranchas de imagens

Figura 7.1 Ensaios representativos da validação do perfil imunológico (western blot) das proteínas GAPDH e albumina em amostras de órgãos.	85
Figura 7.2 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos tomadas como controle.	87
Figura 7.3 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de testículo de camundongo C57BL/6 adultos (60dpp).	89
Figura 7.4 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de epidídimo de camundongo C57BL/6 adultos (60dpp).	91
Figura 7.5 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de testículo e epidídimo de ratos SD adultos (75dpp).....	93
Figura 7.6 Ilustrações esquemáticas dos diferentes perfis de imunomarcção para albumina associados às células da linhagem germinativa em testículos de camundongos C57BL/6 adultos (60dpp).	94
Figura 7.7 Ilustrações esquemáticas dos diferentes perfis de imunomarcção para albumina associados às células epiteliais dos diferentes compartimentos epididimários de camundongos C57BL/6 adultos (60dpp).....	95

Figura 7.8 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de ducto deferente, vesícula seminal, próstata e pênis de camundongos C57BL/6 adultos (60dpp).	97
Figura 7.9 Ensaios representativos da validação do perfil transcricional para RNAm de albumina (RT-PCR) dos genes para GAPDH , ciclofilina e albumina em órgãos do trato reprodutor masculino, fígado e tecido cartilaginoso (cauda).....	99
Figura 7.10 Ensaios representativos da validação do perfil imunológico (western blot) das proteínas GAPDH e albumina em fígado e órgãos do trato reprodutor masculino de camundongos C57BL/6 em diferentes estádios do desenvolvimento pós-natal.....	101
Figura 7.11 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos de testículos de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.	103
Figura 7.12 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos de epidídimo de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.	105
Figura 7.13 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos de ducto deferente de camundongos em diferentes estágios durante o desenvolvimento pós-natal.....	107
Figura 7.14 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos de vesícula seminal de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.	109
Figura 7.15 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos de próstata de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.	111
Figura 7.16 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos de uretra peniana e pênis de camundongos em diferentes estádios do desenvolvimento pós-natal.	113
Figura 7.17 Ensaios representativos da validação do perfil transcricional para RNAm de albumina (RT-PCR) dos genes para GAPDH , ciclofilina e albumina em órgãos do trato reprodutor masculino de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.	115
Figura 7.18 Ensaios representativos da validação do perfil transcricional para RNAm de albumina (RT-PCR) dos genes para GAPDH , ciclofilina e albumina em órgãos do trato reprodutor masculino de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.	117

*"... Guimarães Rosa profetizou que os homens
haveriam de ficar loucos em decorrência da lógica.
Já está acontecendo em nossas instituições de pesquisa.
- Vivam os pianos! Mas os concertos, estão proibidos!"*

- O Que é Científico? Rubem Alves, 2007.

. *“Sou feito de cinzas, sou Aroeira (...). Nasci em caatingas e me
formei em desertos. Ainda sonho com chuvas e (h)eras que nascem
até sobre pedras.” – Aatoria desconhecida.*

Dedico essa dissertação à minha mãe, D. Tetê, meu
sinônimo de força e resistência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades dadas e pelo feliz caminho de encontro com pessoas admiráveis. A fé que carrego por tudo isso é maior do que eu poderia expressar.

Agradeço pela base.

À minha família. Por toda a alegria que é característica. Sei de todo o amor. Nunca haverá um agradecimento que seja suficiente para o apoio às minhas escolhas, mesmo quando meus argumentos eram falhos.

À minha mãe, Maria Terezinha Barbieri, detentora do maior amor do mundo, meu alvo de admiração como mulher, presente sempre, mesmo em minhas ausências.

À Andresa Barbieri, minha irmã, cúmplice por escolha, melhor amiga e com quem, não importa o tempo, as risadas e piadas nunca se tornam obsoletas.

À memória de meu pai, Ademir Barbieri, o meu herói. Sei que está ao meu lado, a cada minuto. Prometo nunca me esquecer de “aproveitar a vida”.

Aos meus tios e tias, Tio Nardo e Tia Cristina Ferreira, Tio Berto e Tia Zezé Cyrino e aos meus primos, Jacques, Melissa e Fernanda. O significado tão lindo de família que guardo comigo é por vocês. Conto nos dedos até o reencontro a cada festividade ou acaso e sempre sei dos sorrisos que me esperam.

Eu os amo, na plenitude de tudo o que isso possa representar.

Agradeço às pessoas admiráveis que conheci.

Aos amigos. A todos. Cada encontro fez de mim uma pessoa melhor.

Àqueles que, apesar da distância, parecem morar ao lado e que, eu sei, estão na torcida, a cada passo. Em especial: À Jéssica e Ana Maria, desde os tempos de colégio e uniforme. À Ângela Rapacci, Daiana Cristina, Andréia Spinoza e Elson Rosseto, desde os primeiros minutos de aula na graduação. À Bianca Moschetti, Marcos Moraes, Leonardo Cardozo e Iuri Ventura, desde o início dessa pós-graduação. Obrigada a todos pela prova de que o tempo e a distância não são medidas inversas à amizade. Particularmente, obrigada pela insistência dos telefonemas, redes sociais e e-mails. A felicidade que sinto a cada notícia de vocês me faz perceber o quão sortuda sou.

À Maria Fernanda Lopes, Benedito Justino, Fabiano Santos e Julia Justino, por terem se constituído como uma segunda família desde o primeiro momento em que me mudei para Campinas. Obrigada por toda a ajuda, por todo incentivo e todo o socorro. Sei de toda a alegria que guardo de todos os momentos partilhados com vocês.

Aos exemplos profissionais

À Suzana Mesquita, orientadora de minha iniciação científica. Espero que eu nunca me desvincilhe da Ciência à qual você me apresentou. Sei de todo o carinho e de seu empenho em equilibrar meus primeiros passos e hoje sou extremamente grata por poder atribuir a você meu referencial de professora e cientista.

À Mariana Nicolielo, Elaine Pereira e Beatriz Michiyori, companheiras de bancada em minha iniciação científica. Não importava quão básicas eram minhas dúvidas, elas nunca se sustentaram por muito tempo com vocês. Que eu nunca me esqueça das lições de respeito profissional que tive. Sei que nunca perderei a amizade que construímos entre um experimento e outro.

À Renata Basso, que iniciou sua iniciação científica em meu tempo de mestrado, com quem tenho tido a honra de dividir a bancada, os ensinamentos e uma grande amizade. Obrigada por depositar em mim a confiança que outrora eu depositei nas pessoas às quais confiei uma parte de meu aprendizado. Verdadeiramente, eu não podia ter tido mais sorte!

À todos os alunos de iniciação científica, mestrandos e doutorandos do Departamento de Histologia e Embriologia (DHE-IB/UNICAMP). Obrigada pelos sorrisos nos corredores, mãos extras na bancada, por todo o conhecimento compartilhado, e, principalmente, por terem feito meus dias de trabalho tão mais prazerosos. Em especial à Letícia Hernandez e suas gargalhadas, à Patrícia Lima e seu jeito mineiro de comemorar o sucesso de um experimento (“Agora, Morreu Maria!”), à Débora Sobreira e sua alegria de viver e ao Silvio Consonni e seus conselhos!

À todos os Professores que guiaram minhas ideias. Aos Professores de graduação, que me provavam a cada aula, toda a beleza que a biologia carrega. Aos Professores do DHE que distribuíram boas recomendações e explicações nos corredores, particularmente aos Professores Paulo Joazeiro e Áureo Yamada cujas orientações metodológicas fundamentaram os protocolos estabelecidos para essa dissertação.

À Natália Santos, técnica do DHE-IB/UNICAMP. Obrigada pela excelência com que você realiza cada minúcia do seu trabalho oferecendo suporte a todos, sempre, sem diferenças! Meus dias são muito melhores desde que sua alegria e amizade chegaram a minha vida!

Ao seu João, por todo o amor que dedica ao cuidado do biotério. Por tornar mais leves e alegres os dias de limpeza. Toda a ciência dessa dissertação começou pelo seu trabalho.

À Liliam Panagio, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, por todo suporte, por todo cuidado e toda a dedicação, independente da data ou horário. Obrigado por nunca descuidar dos detalhes e mesmo por se antecipar na orientação de tudo o que precisei.

Aos meus orientadores

Ao Professor Luis Violin, por me acolher em seu laboratório e compartilhar comigo não apenas um projeto, mas uma linha de pesquisa, permitindo assim meu crescimento não somente no tema específico desse projeto. Pela constante dualidade entre pesquisa e ensino que se complementam em uma vívida experiência acadêmica e por toda a honestidade com que conduz nossa relação. Meu eterno carinho e gratidão.

À Professora Lúcia Alvares, por ter iniciado meu aprendizado na Biologia do Desenvolvimento. Espero me aprofundar e carregar comigo essa Ciência. Obrigada por ter-me entregue a primeira pipeta, acompanhada da garantia de suporte, confiança e cuidado.

À Marília Justino

Que poderia estar com a família, os amigos ou os profissionais, mas muito mais do que isso foi um pouco de cada e assim, me acompanhou por todas as etapas.

A todos, todo o meu amor!

Essa dissertação de Mestrado foi realizada no Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP (DHE – IB/UNICAMP), pelo programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, com auxílio CNPq e CAPES/PROAP.

1.

Introdução

1.1 O TRATO REPRODUTOR MASCULINO

“The average man makes upwards of 1500 sperm per heartbeat. Such a feat requires a robust stem cell system...”.

(Stella Hurtley, This week in Science, April 2, 2010)

O trato reprodutor masculino é composto por órgãos e estruturas distintas que cooperam para a produção do espermatozoide funcional, do fluido seminal e dos hormônios reprodutivos masculinos (andrógenos). Os órgãos que compõem o trato reprodutor masculino são testículo, epidídimo, ducto deferente, vesícula seminal, próstata e pênis, sendo o pênis o único órgão que se apresenta como estrutura única (Johnson et al., 2010).

O desenvolvimento do trato reprodutor masculino, em mamíferos, está espacial e temporalmente sobreposto à embriologia do trato urinário. Ambos desenvolvem-se de um precursor comum, o mesoderma intermediário, e, em ambos, os ductos excretores inicialmente desembocam em uma cavidade comum, o seio urogenital (Sadler, 2013).

Nas etapas iniciais do desenvolvimento, ambos os sexos são morfologicamente indistinguíveis e a determinação sexual depende de uma complexa rede de interações que envolve sinais celulares e estímulos hormonais (Bowles e Koopman, 2004), regentes de três processos sequenciais principais: o estabelecimento do sexo cromossômico no momento da fecundação (sexo genético); a diferenciação da gônada indiferenciada em testículos ou ovários (sexo gonadal) e a diferenciação da genitália interna e externa em indivíduos femininos e masculinos (sexo fenotípico) (Lejeune et al., 1998).

O desenvolvimento e diferenciação de cada órgão componente do trato reprodutor masculino serão abordados a partir de uma breve introdução ao desenvolvimento pré-natal e, subsequentemente, ao pós-natal, visando um maior detalhamento de sua biologia tecidual e papel na reprodução.

1.1.1 Testículo

Desenvolvimento pré-natal

Em ambos os sexos, as gônadas desenvolvem-se a partir das cristas gonadais, constituídas por um epitélio celômico e um mesênquima medular, ditos componentes somáticos da gônada. O componente germinativo das gônadas é derivado das células germinativas primordiais (CGP; Sadler, 2013).

Concomitantemente ao dobramento do embrião e à incorporação da porção dorsal do saco vitelino para a formação do intestino primitivo, as CGP migram da parede da vesícula vitelina por movimentos amebóides (De Felici, 2013; Sadler, 2013) pelo mesentério dorsal do embrião, tendo como destino final as cristas gonadais no dia 10,5 de gestação em murinos (Bowles e Koopman, 2004) e 6ª semana em humanos (Schoenwolf et al., 2011).

Em resposta à migração e à ação indutiva das CGP, o epitélio celômico da crista gonadal continua a se proliferar, torna-se espesso e forma cordões irregulares, os cordões sexuais primários, que adentram o mesênquima subjacente e que, com a chegada das CGP às cristas gonadais, passam a constituir os cordões gonadais (De Felici, 2013).

Em embriões de sexo genético masculino (cromossomos XY), a partir do 13º dia de gestação em murinos (Bowles e Koopman, 2004) e da 7ª semana em humanos (Schoenwolf et al., 2011), a transcrição do gene SRY (cromossomo Y) codifica o Fator Determinante do Testículo (FDT) e ativa uma cascata de interações gênicas responsáveis pela diferenciação e comprometimento da linhagem celular das gônadas. O FDT induz a diferenciação de parte dos cordões gonadais em cordões seminíferos e, para aqueles cordões mais próximos à região medular da gônada, a diferenciação na conectiva rede testicular (Staack et al., 2003). Os cordões seminíferos se alongam pela proliferação do epitélio celômico sobre a crista genital e caracterizam-se, nesse momento, por conter células da linhagem espermatogênica (originadas das CGP) e células de suporte (originadas principalmente do epitélio celômico; Huff, 2011).

Durante a diferenciação funcional da gônada masculina (testículo), dois compartimentos são definidos: os cordões testiculares e o interstício. Os cordões testiculares dão origem aos túbulos seminíferos, enquanto células intersticiais esteroidogênicas (Leydig) e outros tipos celulares menos caracterizados se diferenciam no interstício (o espaço entre os cordões testiculares; DeFalco et al., 2011). As células de Leydig aparecem no tecido intersticial a partir de 12,5 dias de gestação em camundongos e da 6ª semana em humanos e sua provável origem remete à proliferação de células integrantes do epitélio celômico e também de células perivasculares ainda em estágio indiferenciado da região de borda mesonefro-gonadal (Merchant-Larios et al., 1993; O'Shaughnessy et al., 2006).

No interior dos cordões testiculares, as CGP comprometem-se com a linhagem germinativa diferenciando-se em gonócitos, e as células de sustentação (Sertoli) proliferam-se continuamente, constituindo a maior parte do epitélio seminífero no testículo fetal (De Felici, 2013).

Até a puberdade

Os primeiros dias de proliferação pós-natal das células germinativas podem ser divididos em três etapas, correspondentes aos períodos neonatal, pré-puberal e puberal, ocorrendo na última fase a espermatogênese (Müller e Skakkebaek, 1984; Nistal et al., 1986).

No período neonatal, definido até 10 dias pós-parto (dpp) para murinos (Kulandavelu et al., 2006) e até os 90 dias para humanos (Scolfaro et al., 2003) os cordões seminíferos apresentam ausência de lúmen tubular, por ausência de fluido intratubular (Nistal et al., 1986). Seu epitélio constitui-se de células de Sertoli e das células germinativas, distribuídas em um epitélio pseudoestratificado de revestimento (Nistal et al., 1986). Há um predomínio notável de células de Sertoli nesse primeiro momento, com aproximadamente 26 a 28 células por secção micrométrica tubular em humanos. Os gonócitos são as únicas células germinativas encontradas em camundongos recém-nascidos, localizados no centro do túbulo seminífero (Clermont e Perey, 1957) até o 6º dpp em

murinos, quando essas células atingem a membrana basal dos túbulos seminíferos (McCarrey, 1993).

No período neonatal, à custa de um aumento das gonadotrofinas hipofisárias e, conseqüentemente, também da concentração tissular de testosterona produzida pelas células de Leydig, ocorre uma primeira onda proliferativa das células germinativas, com a transição gradual dos gonócitos em espermatogônias, de tal forma que ao final de 06 dpp em murinos (Culty, 2013) e do 6º mês em humanos (Scolfaro et al., 2003) apenas espermatogônias são encontradas nos testículos em maturação.

Regidas pela liberação das gonadotrofinas, a proliferação das células de Leydig, em humanos, ocorre já nas primeiras 20 semanas do período fetal, quando estas aumentam rapidamente em tamanho e número, tornando-se a característica histológica predominante do testículo e dobrando o volume total do órgão (Huff, 2011). Em murinos, entretanto, a intervenção no aumento do volume testicular fica a cargo das células de Sertoli imaturas, que logo após o nascimento começam a se proliferar até 10-12 dpp (de Kretser e Kerr, 1994), quando esse processo enfim cessa e as junções de oclusão se formam entre células de Sertoli vizinhas, constituindo a barreira hematotesticular e de compartimentalização basal-(intermediário)-adluminal dos túbulos seminíferos (Muller e Skakkebaek, 1992). Apesar de o evento proliferativo das células de Leydig não ser centrado imediatamente no pós-natal, a concentração de testosterona sérica, em murinos, é reconhecidamente alta após o nascimento, declinando rapidamente nos primeiros 5-10 dpp (Forest and Cathiard, 1975) e atingindo novo pico somente aos 60 dpp, no auge reprodutivo do organismo (Forest et al, 1973; Winter et al, 1976).

O início da fase pré-púbere do desenvolvimento testicular, subsequente ao período neonatal, caracteriza-se por um curto período de repouso, sendo dito tradicionalmente que as células germinativas entraram em um período de quiescência (Charney et al, 1952; Vilar, 1970; Steinberger, 1974; Gondos, 1975). Esse período é interrompido por uma fase de proliferação das espermatogônias recém-estabelecidas, as quais, no entanto, não chegam a atingir sua completa diferenciação em espermatócitos, resultando em células germinativas degeneradas que, por isso, representam conhecidamente uma espermatogênese frustra ou incompleta (Müller e Skakkebaek, 1983; Paniagua e Nistal, 1984). Não se sabe ainda ao

certo o motivo desta proliferação incompleta de células germinativas, visto que não há aumento das concentrações séricas das gonadotrofinas neste período.

Indiscutivelmente, a dinamicidade de mudanças estruturais nos testículos de neonatos e pré-puberes é alta, mas o significado dessas modificações para o testículo de adultos permanece desconhecido. É sugerido que a reativação pós-natal juvenil do eixo gonadal-hipotalâmico-pituitário seja importante para a posterior entrada na puberdade e tenha repercussões positivas na fertilidade adulta (Hadziselimovic et al, 1986).

A conclusão da espermatogênese ocorre durante os primeiros estágios da puberdade, aproximadamente aos 13,4 anos em humanos (Muller e Skakkebaek, 1992). Em murinos, a idade puberil varia de acordo com a cepa, o *status* nutricional e influências ambientais, mas geralmente se restringe aos 28 a 49 dpp (Harkness e Wagner, 1995). É de importante ressalva que a puberdade é usualmente apontada como o tempo no qual a reprodução é possível pela primeira vez, cronologia esta que não necessariamente coincide com a maturidade sexual, i.e. idade em que a máxima capacidade reprodutiva é adquirida, a qual pode ocorrer substancialmente mais tarde (Paniagua e Nistal, 1984).

O marco da puberdade coincide com a elevação das concentrações de LH¹, levando à massiva proliferação das células de Leydig. O aumento de testosterona e de FSH² levará à maturação definitiva das células de Sertoli, à progressão meiótica das células germinativas, canalização definitiva do lúmen tubular, e aumento global do volume testicular (Burr et al., 1970; Nistal et al., 1982; Scolfaro et al., 2003). Além das gonadotropinas e andrógenos, sendo a espermatogênese regulada por um complexo controle multifatorial, os estrógenos atuam, reconhecidamente, como potenciais reguladores funcionais em diversas espécies, inclusive a humana. Dorrington et al. (1978) demonstrou que os testículos são capazes de

¹ O LH ou hormônio luteinizante possui natureza proteica e é responsável por estimular, no homem, as células de Leydig a produzir a testosterona, que é o hormônio responsável pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários do macho e pelo apetite sexual (Sharpe, 1986).

² O FSH ou hormônio folículo estimulante possui natureza glicoproteica e é responsável por estimular tanto em indivíduos masculinos quanto femininos, a maturação das células germinativas. Em indivíduos masculinos, ainda, o acúmulo de FSH induz as células de Sertoli a segregar o hormônio responsável por sua retroalimentação, a inibina, exercendo também ação estimulatória quanto à formação de junções de oclusão entre as células de Sertoli (Sharpe, 1986). Em presença de alta atividade espermatogênica, as concentrações de FSH tendem a ser mais baixas por causa da produção de inibina pela célula de Sertoli, que se encontra em alta atividade secretora, sendo, portanto, um sinal de queda do processo espermatogênico baixos níveis de FSH (Stanbenfeld e Edqvist, 1986).

produzir estrógenos. Assim como em outros tecidos, a aromatase é a enzima que transforma, de forma irreversível, andrógenos em estrógenos. Em ratos imaturos, a célula de Sertoli é a principal fonte de estrógenos, enquanto que, para animais adultos, as células de Leydig e germinativas podem também assumir essa função, sugerindo uma mudança no sítio de expressão da aromatase (Dorrington et al., 1978; Carreau et al., 2012). Antes dos testículos atingirem o tamanho adulto, as epífises ósseas estarão fechadas e as características sexuais secundárias, desenvolvidas (Daniel et al., 1982). A ocorrência da espermarca em humanos (início da liberação de espermatozoides) é comumente retratada como um evento precoce de entrada na puberdade, estando associado à diferenciação da linhagem germinativa testicular em espermatozoides luminais, tendo ocorrência média registrada aos 14.1 anos em humanos (Schaefer et al., 1990). Em murinos, espermatozoides não são encontrados integrando o microambiente testicular em maturação até os 35 dpp (Kerr, 1992). Os hormônios peptídicos e esteróides são críticos não somente para a regulação da diferenciação das células germinativas, mas também para a proliferação e função de tipos celulares somáticos, requeridos para o desenvolvimento adequado dos testículos. Essas células incluem as células de Leydig, de perfil intersticial esteroideogênico, cuja função primária é a produção de testosterona; as células mióides que circulam os túbulos seminíferos e secretam componentes da lâmina basal e as células de Sertoli, cujo contato direto com as células germinativas em proliferação e diferenciação nos túbulos seminíferos as torna essenciais por prover os suportes físico e nutricional para a espermatogênese (Burr et al., 1970; Scolfaro et al., 2003; Meng et al., 2005). Cada um desses tipos celulares é essencial para a fertilidade masculina e é alvo direto de um ou mais hormônios que agem no trato reprodutor.

O epitélio seminífero

A espermatogênese ocorre continuamente desde a puberdade até a morte do indivíduo (Schoenwolf et al., 2011). Os gametas são produzidos em ondas sincronizadas em cada área local do epitélio germinativo, embora o processo não seja sincronizado ao longo do túbulo seminífero (Kerr, 1992). Caracterizado por um complexo epitelial estratificado, o epitélio seminífero do testículo maduro é constituído pelas células de

Sertoli, células colunares altas, e várias populações de células germinativas em constante proliferação e diferenciação (Kerr, 1992; Junqueira e Carneiro, 2004). As células germinativas estão completamente ou parcialmente cercadas pelas células de Sertoli as quais repousam sobre a lâmina basal estendendo-se apicalmente no sentido luminal do túbulo seminífero. O deslocamento de numerosos tipos de células germinativas da região basal para a luminal é assistida pelas extensões citoplasmáticas laterais das células de Sertoli que se expandem interdigitalmente entre as linhagens gonadais e cuja ação promove a ascensão das camadas de células em divisão meiótica pelo epitélio seminífero (Forest et al, 1973; Winter et al, 1976).

Estudos ultraestruturais fornecem evidências de que essas ondas de células em diferenciação foram sincronizadas por causa da citocinese incompleta ao longo de uma série de divisões mitóticas e meióticas entre a divisão da espermatogônia e a formação das espermátides. Supõe-se que, ao invés de se separarem completamente, as células filhas produzidas por estas divisões permanecem conectadas por pontes citoplasmáticas delgadas capazes de permitir a passagem de pequenas moléculas sinalizadoras ou metabólitos (Schoenwolf et al., 2011).

Células-tronco espermatogoniais repousam sobre a lâmina basal e por mecanismos de proliferação e diferenciação originam os espermatócitos primários que dão entrada no processo de divisão meiótica. Três tipos principais de espermatogônias foram caracterizadas em humanos, de acordo com o formato, tamanho e variação nas propriedades de afinidade a corantes de rotina histológica (Clermont, 1963; Kerr, 1992): 1) espermatogônias tipo A escuras, contendo cromatina densa com uma pequena área pálida nuclear central; 2) espermatogônias tipo A pálidas, com baixa afinidade a corantes e um ou dois nucléolos associados à membrana nuclear; 3) espermatogônias tipo B, contendo grumos de cromatina condensada de localização nuclear periférica. As células-tronco espermatogoniais (i.e. espermatogônias tipo A escuras) são a base da espermatogênese e responsáveis pela contínua auto renovação do ciclo gamético dos testículos. Alojadas na cavidade formada entre duas células de Sertoli, as espermatogônias tipo A escuras sofrem mitoses para produzir células-filhas, as quais podem continuar a se dividir por mitose – renovando a população de células-tronco espermatogoniais – ou originarem as espermatogônias tipo A pálidas que se diferenciam em espermatogônias tipo B,

comprometendo-se enfim com a divisão meiótica ao duplicar seu conteúdo de DNA para formação dos espermatócitos primários (Kerr, 1992; Figura 1.1).

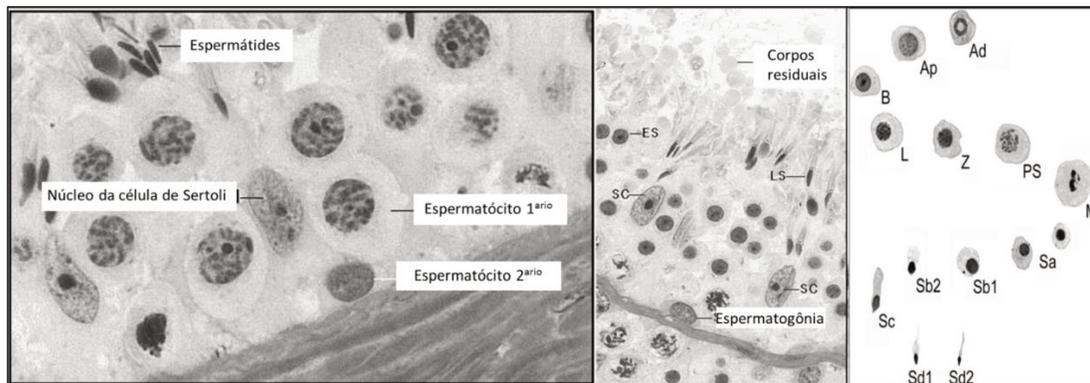


Figura 1.1 Representação histológica do testículo de murinos.

O apontamento dos principais constituintes do túbulo seminífero, com destaque para o tecido peritubular, concêntrico ao epitélio germinativo pseudoestratificado. Em correspondência, o diagrama à direita detalha a morfologia celular ao longo da espermatogênese de acordo com a descrição e classificação de Clermont (1963). Ad, Espermatogônia tipo A escura; Ap, Espermatogônia tipo A pálida; B, Espermatogônia tipo B; L, Espermatócito I em leptóteno; Z, Espermatócito I em zigóteno; PS, Espermatócito I em paquíteno; M, Espermatócito I em metáfase; Sa–d, Espermátides. (Imagem retirada do artigo: McLachlan et al., 2007).

Durante sua fase migratória, os espermatócitos primários passam sem interrupção por ambas as divisões meióticas, produzindo dois espermatócitos secundários e então, quatro espermátides. As espermátides em maturação são conectadas às células de Sertoli adjacentes por junções intercelulares iniciando, em fluxo contrário ao até então impulsionado por essa célula de suporte, sua penetração pelos recessos citoplasmáticos e, assim, estabelecendo processos únicos chamados complexos túbulo-bulbares (Schoenwolf et al., 2011). Os complexos túbulo-bulbares fornecem um mecanismo pelo qual o excesso de citoplasma da espermátide em diferenciação é transferido para as células de Sertoli havendo drástica perda citoplasmática ao longo da espermição, i.e. liberação do espermatozoide na luz do túbulo seminífero (Shinohara et al., 2001). Ao fim do processo, as últimas conexões entre espermátides e células de Sertoli se rompem e um espermatozoide morfologicamente caracterizado por regiões distintas de cabeça, peça

intermediária e cauda é liberado para o compartimento luminal do túbulo seminífero e encaminhado para a rede testicular, onde a espermatogênese se continua (Schoenwolf et al., 2011).

O interstício testicular

Um total aproximado de seis camadas extracelulares constituídas por miofibroblastos proximais aos túbulos seminíferos e fibroblastos externos se dispõem concentricamente a cada um dos túbulos, sendo denominados em conjunto como lâmina própria, tecido peritubular ou túnica própria (Johnson et al., 1980; Russell et al., 1990). Eventos de perturbação da espermatogênese ocasionalmente causam o espessamento dessas camadas muitas vezes em função do aumento na espessura dos componentes da matriz extracelular (Virtanen et al., 1986; Davidoff et al., 1990). O tecido peritubular está envolvido com a contratilidade tubular e tem a capacidade de interferir, como barreira, à ação parácrina de hormônios e fatores de crescimento destinados ao epitélio seminífero (Skinner e Fritz, 1986).

As células de Leydig também residem no espaço intersticial do testículo e são responsáveis pela produção de testosterona (Sadler, 2013; Schoenwolf et al., 2011), como já abordado anteriormente. São células distintas morfológicamente por seu formato poligonal e característica eosinófila, núcleo arredondado e citoplasma granular com inclusões lipídicas (Junqueira e Carneiro, 2004). Embora as células de Leydig representem apenas 5% de todos os tipos celulares presentes no testículo adulto, seu metabólito produzido, a testosterona, perfaz 95% da fração circulante desse hormônio, razão pela qual substâncias que afetam diretamente as células de Leydig também afetam drasticamente os tecidos dependentes de andrógenos (Ye et al., 2011).

1.1.2 Epidídimo

Desenvolvimento pré-natal

Dois pares de ductos genitais bilaterais são formados e coexistem durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos: os ductos de Wolff³ e os ductos de Muller⁴. Localizados adjacentes à crista gonadal, os ductos desenvolvem-se independentemente do sexo a partir de 10 dias de gestação em murinos (Arango e Donahoe, 2010) e 05 semanas em humanos (Huff, 2011) para os ductos de Wolff; e 11,5 dias (Staack et al., 2003) e 6,5 semanas de gestação (Huff, 2011) em murinos e humanos, respectivamente, para os ductos de Müller.

A partir de 11,5 dias de gestação em murinos (Staack et al., 2003) e 7 semanas em humanos (Huff, 2011), um complexo de túbulos é formado, conectando o ducto de Wolff à gônada em desenvolvimento. Esses túbulos, denominados túbulos mesonéfricos, logo regressam em indivíduos femininos, mas se conservam em indivíduos masculinos, nos quais alguns túbulos darão origem aos ductos eferentes e conectarão à gônada (mais precisamente a rede testicular) ao epidídimo (Staack et al., 2003).

O estágio indiferenciado relativo aos ductos de Wolff e Müller é posterior à determinação do sexo gonadal e termina aos 16 dias de gestação em murinos (Staack et al., 2003) e 10 semanas em humanos (Huff, 2011), quando o destino desses ductos no desenvolvimento embrionário é determinado.

A estabilização e o amplo crescimento dos túbulos mesonéfricos e ductos de Wolff é dependente de andrógenos produzidos pelos testículos de embriões de sexo gonadal masculino definido a partir do dia 14 em murinos (Staack et al., 2003) e da 8ª semana de gestação em humanos (Schoenwolf et al., 2011), sendo, portanto, a regressão programada

³ Os Ductos de Wolff foram assim nomeados em homenagem ao anatomista alemão Caspar Friedrich Wolff (1733-1794) e seu trabalho de descrição do par de mesonefros, por ele denominados "Wolffian body and its duct" (corpo do Wolff e seu ducto) (Jacob et al., 2012).

⁴ Os Ductos de Muller foram assim nomeados em homenagem ao fisiologista alemão Johannes Peter Müller (1801-58) e seu trabalho de descrição do par de paramesonefros na obra "Bildungsgeschichte der Genitalien" datada de 1830 (Hashimoto, 2011).

pela falta de sinalização do hormônio testosterona aos receptores androgênicos (Staack et al., 2003; Arango e Donahoe, 2010).

Até o final do 16º dias de gestação em murinos (Staack et al., 2003) e 10ª semana em humanos (Huff, 2011), células somáticas derivadas do epitélio celomático (Sertoli) proliferam-se continuamente, constituindo a maior parte do epitélio seminífero no testículo fetal (De Felici, 2013). As células de Sertoli iniciam a produção de uma glicoproteína conhecida como hormônio antimulleriano (HAM) que continua até a puberdade quando seus níveis diminuem e o evento da meiose, suspenso para as células germinativas até então, tem início. O HAM suprime o desenvolvimento dos ductos de Müller prevenindo a formação de útero e as tubas uterinas em indivíduos de sexo gonadal masculino definido (O'Shaughnessy et al., 2006).

O maior evento morfogênético descrito para o desenvolvimento do ducto de Wolff é sua alongação e dobramento (Hannema & Hughes, 2007) na presuntiva região epididimária, aproximadamente ao 18º dia de gestação em murinos (Staack et al., 2003) e da 8ª semana em humanos (Huff, 2011). O processo de alongação é resultante de mecanismos como a proliferação celular acoplada a rearranjos celulares resultantes de interações entre o epitélio de revestimento do ducto de Wolff e as células mesenquimais subjacentes (Hinton et al., 2011). O dobramento do ducto de Wolff respeita um gradiente rostro-caudal, ou seja, desloca-se da região proximal à região distal do ducto em relação à gônada, temporalmente, e somente se completa no período pós-natal (Robaire e Henderson, 2006; Arroiteia et al, 2012).

Até a puberdade

Ao nascimento, as áreas presuntivas do segmento inicial, cabeça e corpo epididimários já apresentam um padrão de contorção maior quando comparados à região de cauda (De Miguel et al., 1998). Logo nos primeiros dias pós-nascimento a organização do septo conjuntivo inicia a segmentação de epidídimo em compartimentos funcionais (Robaire et al., 2000). O epitélio mostra-se ainda indiferenciado e permanece caracterizado por células colunares até os primeiros estágios da pré-puberdade, quando a diferenciação das células halo impulsiona mudanças histológicas (Robaire et al., 2000).

Dando prosseguimento ao período pré-púbere, o epitélio epididimário se diferencia em um epitélio pseudoestratificado, somando às células halo, outros 05 (cinco) tipos celulares: células principais, basais, apicais, estreitas e claras (De Miguel et al., 1998; Robaire et al., 2000). A completa diferenciação e maturação epitelial do epidídimo só é estabelecida na puberdade quando ocorre a maior taxa de proliferação celular e expansão do ducto epididimário, correlato ao qual se dá a primeira onda de espermatozoides integrados ao microambiente luminal (Cornwall, 2009). O estabelecimento de secreções regionalizadas ocorre, sendo acoplado progressivamente à consolidação da segmentação anatômica do epidídimo, impulsionada, por sua vez, em resposta aos estágios de desenvolvimento testicular (Dacheux et al., 2005; Robaire e Henderson, 2006).

Em indivíduos adultos, 05 (cinco) tipos principais de populações epiteliais podem ser listadas integrando o epidídimo. As células principais são o tipo mais abundante encontrados no epitélio epididimal, constituindo um total de 80% do total de células do segmento inicial e 65% do total da população epitelial da cauda. São células colunares, apresentando estereocílios e frequentemente associadas à formação de "protusões citoplasmáticas" (do inglês *Buds*) em sua superfície apical. Estão envolvidas diretamente no controle de secreção de proteínas para o lúmen (Robaire e Henderson, 2006; Arroiteia et al., 2012). As células basais são o segundo tipo mais abundante, constituindo de 15-20% do total da população epitelial do epidídimo. De morfologia achatada e triangular, residem na base da membrana basal e nunca acessam o compartimento luminal. As funções exatas desse tipo celular ainda não são claras (Robaire e Henderson, 2006; Arroiteia et al., 2012). As células apicais constituem aproximadamente 10% do total da população epitelial no segmento inicial do epidídimo e 1%, na cauda. Possuem poucos microvilos associados à sua borda luminal e relacionam-se aos processos de quiescência espermática e à regulação do pH luminal epididimário (Robaire e Henderson, 2006; Arroiteia et al., 2012). As células *narrow* ou células estreitas são células alongadas mais encontradas na cauda - 6% da população total de células que no segmento inicial, 3%. Estão envolvidas em processos de transporte intracelular e na degradação de proteínas e carboidratos específicos (Robaire e Henderson, 2006, Arroiteia et al., 2012). As células claras, juntamente às células halo constituem menos de 5% da população epitelial total do epidídimo. As primeiras caracteristicamente apresentam um núcleo bastante condensado, circundado por um

citoplasma claro, funcionalmente relacionando-se a processos endocíticos. Já as células halo, a última população de células epiteliais epididimárias aqui abordada, usualmente se localiza na base do epitélio, sem estabelecer contato com a membrana basal. Relacionam-se ao sistema imune do epidídimo (Arroteia et al., 2012).

O ducto epididimário

O ducto epididimário é conhecido como um canal que transporta, concentra e estoca os espermatozoides (Robaire e Henderson, 2006). Sob controle androgênico, o epitélio epididimal secreta moléculas específicas para o compartimento intraluminal criando um microambiente altamente complexo e favorável para a maturação do espermatozoide, que ao deixar o compartimento testicular mostra-se pouco móvel, imaturo e incapaz de fertilizar um oócito pelo processo natural (Yanagimachi et al., 1995; Flesch e Gadella, 2000).

O compartimento luminal da porção mais caudal do ducto epididimário estoca os espermatozoides até o momento da ejaculação acondicionando especificamente essa célula haplóide e conferindo condições ótimas em termos de temperatura, tensão de oxigênio, pH e substratos energéticos (Herms et al., 1994; Sullivan, 2004).

Enquanto a proliferação celular do ducto mesonéfrico mostra-se dependente da presença de andrógenos e fatores mesenquimais durante o desenvolvimento pré-natal, fatores lumicrinais produzidos pelos testículos desempenham um papel crucial durante o desenvolvimento pós-natal do epidídimo.

Fatores lumicrinais⁵ são fatores – como andrógenos, fatores de crescimento e enzimas – cujo efeito na atividade secretória tanto das células epiteliais do epidídimo como do espermatozoide epididimário relaciona-se diretamente ao evento da maturação (Lan et al., 1998; Robaire e Henderson, 2006). Durante o transporte do espermatozoide luminal, no epidídimo, moléculas de superfície podem ser alteradas, extraídas, modificadas e adicionadas, resultando em uma nova organização bioquímica da membrana plasmática do espermatozoide, contribuindo para a maturação do gameta masculino (Figura 1.2) (Orgebin-Crist, 1967).

⁵ Fatores lumicrinais estão presentes no lumen do testículo e são transportados pela luz dos túbulos seminíferos ao ducto epididimário (Robaire e Henderson, 2006).

Sobre tal dinâmica, é conhecido que algumas moléculas são incorporadas pelo espermatozoide (Bartholow e Geyer, 1981; Ellerman et al., 1998; Von Horsten et al., 2007; Arroteia et al., 2012), sendo futuramente envolvidas na ligação à zona pelúcida (Ellerman et al., 1998) ou à membrana plasmática do ovócito (Flesch e Gadella, 2000). Outras permanecem no lúmen por toda a extensão do epidídimo (Fouchécourt et al., 2000) ou se mostram ali atuantes por um curto período de tempo formando ou não agregados proteicos (Von Horsten et al., 2007).

Na ejaculação, ao fluido luminal estocado na cauda do epidídimo contendo os espermatozoides, é adicionada à secreção das glândulas acessórias ao trato reprodutor masculino, compondo o sêmen, nutrindo, mantendo o espermatozoide e convertendo-o em uma célula competente à fecundação (Gonzales, 2007). É provável que a secreção originada afete diretamente a coagulação do sêmen, a motilidade espermática, a estabilidade da cromatina dos espermatozoides e atue na supressão imunitária no trato reprodutor feminino (Gonzales, 2007).

Por toda a maturação do espermatozoide até o estímulo da ejaculação, a regulação das atividades epididimárias conta, principalmente, com a participação de andrógenos e fatores testiculares. A testosterona chega ao epidídimo por duas vias principais: circulação sanguínea e fluido testicular. A testosterona que atinge o epidídimo via fluido testicular está associada à proteína ligante de andrógeno (*androgen binding protein*, ABP), secretada pelas células de Sertoli nos túbulos seminíferos. No citoplasma das células epididimárias, grande parte da testosterona é metabolizada pela enzima 5 α -redutase em 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT), principal andrógeno regulador das funções epididimárias (Robaire e Henderson, 2006)

Estudos mostram que o segmento inicial do epidídimo depende de fatores lumicrinais para manutenção de sua estrutura e função, além da dependência de andrógenos (Turner et al., 1999). Na ausência de fatores lumicrinais, muitas células do segmento inicial sofrem apoptose dentro de 24 horas (Turner et al., 1999). Este tipo de regulação parácrina tem sido denominada regulação lumicrinal, por ocorrer em um sistema de ductos e túbulos. A regulação lumicrinal não ocorre apenas entre o testículo e o epidídimo, mas também

entre as diferentes regiões epididimárias e entre o epidídimo e o ducto deferente (Robaire e Henderson, 2006).

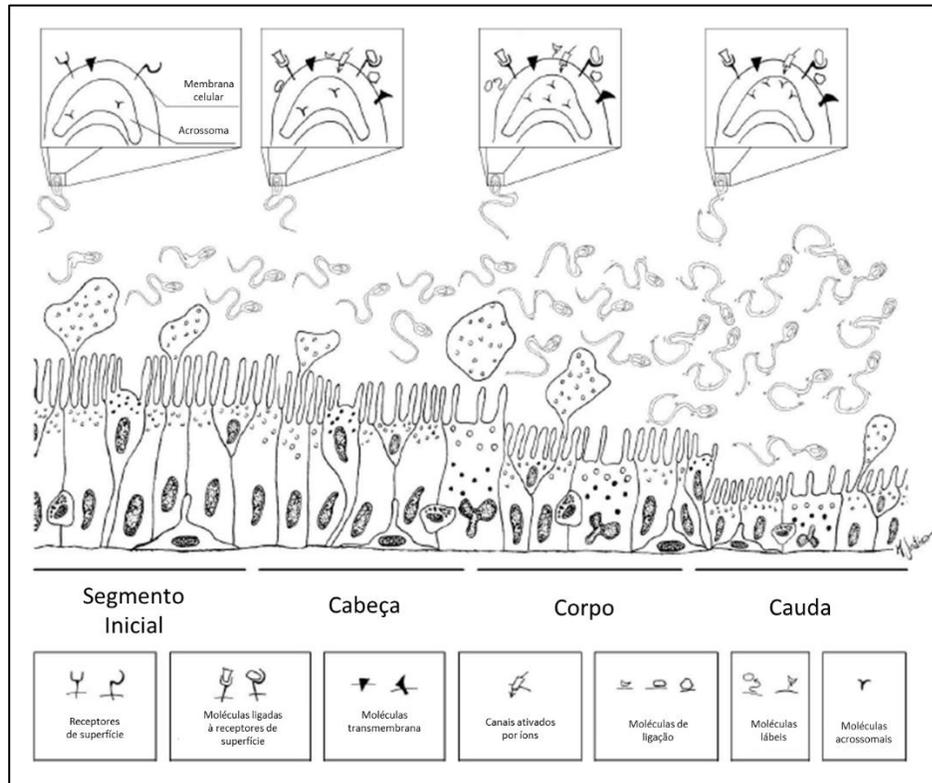


Figura 1.2 Ilustração esquemática do epidídimo.

A ilustração representa os distintos padrões de modificações sofridas pela superfície do espermatozoide através dos estágios de maturação e constituição celular ao longo do epitélio epididimário. As características histológicas permitem a identificação das extremidades anterior (segmento inicial e cabeça) e posterior (corpo e cauda) do epidídimo uma vez que o epitélio varia da secção mais espessa no segmento inicial a mais fina, na cauda. A posição relativa e a distribuição dos principais tipos celulares ao longo do epidídimo são sugeridos bem como, na porção acima da figura, a incorporação/ perda de moléculas ao longo da passagem do espermatozoide pelo ducto epididimário durante o processo de maturação celular. (Imagem retirada do capítulo de livro: Arroteia et al., 2012).

1.1.3 As barreiras hematotesticular e hematoepididimária

O conceito de barreira hematotesticular foi proposto originalmente no começo do século 20 com a observação da não entrada, em alguns tecidos, de corantes injetados diretamente no sistema circulatório de animais de laboratório (Bouffard, 1906; Cheng e Mruk, 2012). Como outras barreiras hematotesticulares, as barreiras hematotesticular (BHT) e hematoepididimal (BHE) não são barreiras impenetráveis, mas são restritivas por natureza (Meinhardt e Hedger, 2011), controlando a entrada de moléculas e mesmo células presentes no sistema circulatório ou no interstício do tecido ou compartimento em questão (Hoffer e Hinton, 1984; Mital et al., 2011).

Para o testículo e o epidídimo, o estabelecimento de uma barreira tem como função primária a criação de um microambiente apropriado para controle do desenvolvimento (mitose, meiose e diferenciação) e maturação das células germinativas, sequestro de células germinativas potencialmente autoantigênicas (i.e. para prevenção de respostas autoimunes) e estabelecimento de um escudo de proteção às moléculas citotóxicas (Setchell, 1980; Hoffer e Hinton, 1984; Mital et al., 2011).

Diferentemente do cérebro, no qual a barreira (hematoencefálica) é centrada nas junções de oclusão do endotélio de revestimento dos vasos sanguíneos, no testículo e epidídimo os primeiros componentes físicos das BHT e BHE são as junções de oclusão (*tight junctions*) do epitélio, formadas entre células de Sertoli adjacentes nos túbulos seminíferos e entre células epiteliais adjacentes no ducto epididimário (Reese e Karnovsky, 1967; Dym e Fawcett, 1970; Mital et al., 2011).

As especializações de membrana observadas nas superfícies laterais de células de Sertoli são similares a outras junções oclusivas epiteliais já descritas, compostas por ocludinas, claudinas e moléculas de adesão, sendo única, no entanto, sua localização, preferencialmente basal a apical (Gregory e Cyr, 2006). Para a composição da BHT ainda, um terceiro elemento tem sido listado, a especialização ectoplasmática das células de Sertoli, constituídas por feixes de microfilamentos e cisternas subsuperficiais de retículo endoplasmático (Yazama, 2008). No epidídimo, o contato epitelial pelas junções de oclusão é “o mais desenvolvido dentre vários contatos epiteliais já examinados” como dito por

Friend e Gilula (1972)⁶, caracterizando-se por uma extensiva malha juncional rica em proteínas claudinas, conexinas e cateninas (Gregory e Cyr, 2006; Cyr et al., 2007).

A total funcionalidade das BHT e BHE depende, além de uma barreira física (junções de oclusão), da integração de um componente fisiológico (transportadores, canais e rotas paracelulares) para controle da entrada e saída de moléculas e de um componente imunológico (interno e externo ao túbulo/ducto) para proteção das células germinativas (Mital et al., 2011).

Pela barreira física testicular, classicamente, dois compartimentos anato-funcionais são delimitados nos túbulos seminíferos: um compartimento basal contendo espermatogônias e espermatócitos no estágio de pré-leptóteno e outro compartimento, o adluminal, preenchido por espermatócitos primários em estágios posteriores, secundários e espermátides arredondadas (Russell, 1977; 1978). O deslocamento dos espermatócitos do compartimento basal para o adluminal acompanha o processo de maturação da linhagem germinativa, a qual, comprometida com a divisão meiótica, migra em direção luminal, suportada nutricional e estruturalmente pelas células de Sertoli (Russell, 1978; Mital et al., 2011).

A ideia de que o movimento das células germinativas através do epitélio seminífero durante a espermatogênese é associado a uma extensiva reestruturação juncional, incluindo mudanças dinâmicas na BHT é universal. Apesar desse tema, duas teorias principais se estabelecem na literatura atual:

- A teoria proposta por Dym e Fawcett (1970) na qual a BHT, única, passa por ciclos de abertura e fechamento acompanhando o ciclo epitelial para facilitar a migração das células germinativas, atualmente reforçada por Mital e colaboradores (2011; Figura 1.3);

- A teoria proposta inicialmente por Russel (1977) sobre a existência de um compartimento intermediário, ao basal e o adluminal, transitório, delimitado por duas BHT, teoria esta que tem sido revisitada por Yazama (2008) a partir de modelos criptorquídicos aliados à ferramenta da microscopia eletrônica (Figura 1.4).

⁶ "Among the various epithelial cell contacts examined, the zonula occludens of the epididymis is the most highly developed." (Friend e Gilula, 1972).

Ainda que em ambas as teorias a manutenção restritiva da barreira seja o foco, a arquitetura da segunda teoria assegura um maior isolamento da porção adluminal em relação ao interstício, sem que haja, ainda que por um breve momento, um canal de total abertura da BHT com exposição direta da porção adluminal ao compartimento basal (Yazama, 2008).

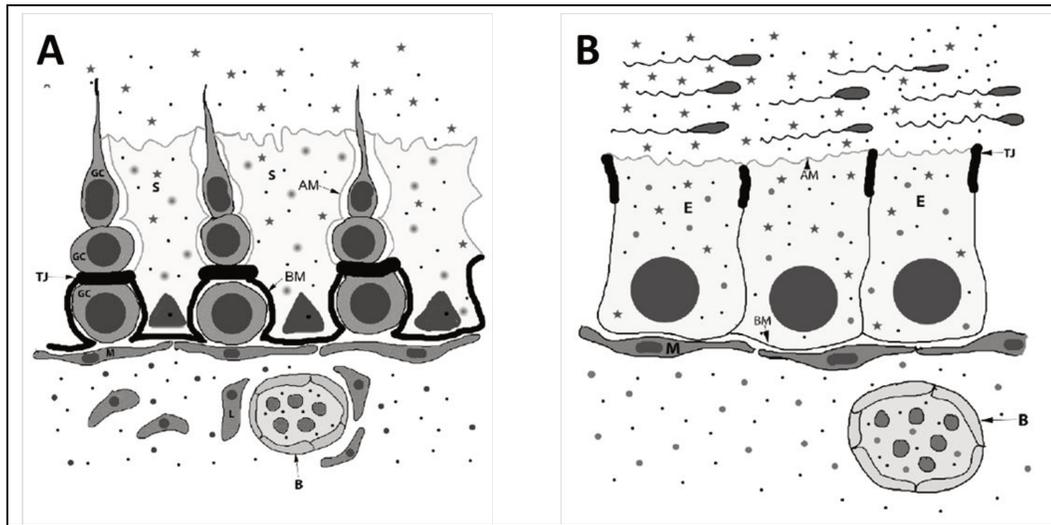


Figura 1.3 Ilustração esquemática da barreira hematotesticular e hematoepididimal.

(A) BHT (B) BHE. Substâncias circulantes (pontos) que transpassam a barreira endotelial e podem ser encontradas no interstício dos órgãos e compartimento basal do epitélio, mas não ultrapassam a barreira anatômica composta por junções celulares (linhas espessas). (A) No testículo a BHT conecta células de Sertoli e isola o compartimento adluminal e luminal do compartimento basal. (B) No epidídimo a BHE conecta células epiteliais auxiliando na criação de um microambiente epididimário propício à maturação espermática. (Imagem retirada do artigo de Mital et al., 2011)

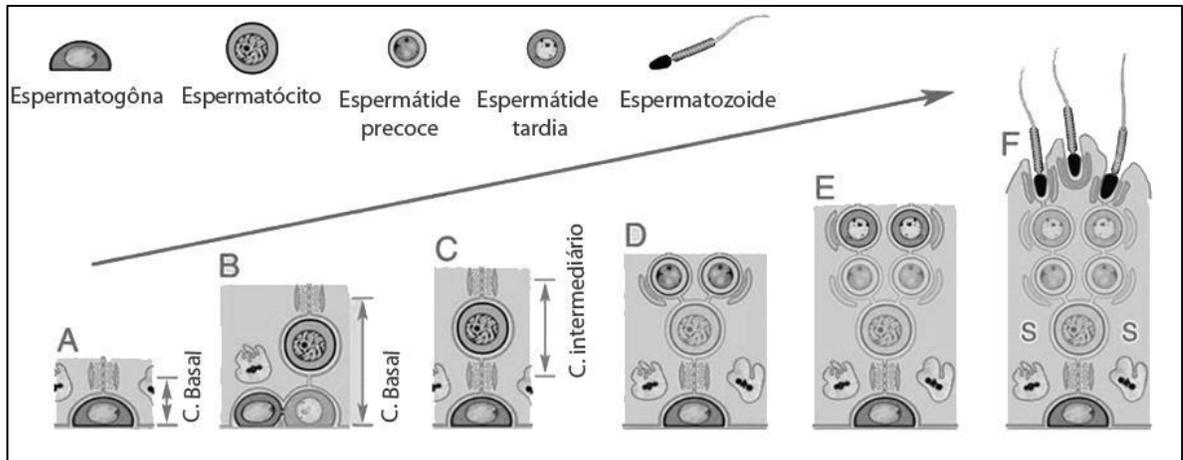


Figura 1.4 Ilustração esquemática da dinâmica dos componentes da BHT no tubo seminífero.

(A) BHT situada acima da espermatogônia. (B) BHT é elevada fisicamente pela ocorrência da divisão mitótica da espermatogônia e diferenciação do espermatócito. (C) Nova barreira se organiza abaixo do espermatócito, criando um compartimento intermediário. (D) a BHT situada acima do espermatócito é desestruturada pela ocorrência da divisão meiótica. (E-F) componentes remanescentes da BHT desestruturada permanecem associados a espermatídes e células de Sertoli. (Imagem retirada do artigo de Yazama, 2008).

A compartimentalização tecidual, como resultado da presença física da barreira, para criação de um microambiente específico, só foi de fato compreendida e descrita no final dos anos 60, quando foi reportado que a injeção na corrente sanguínea dos mesmos corantes que tinham a capacidade de penetrar os túbulos seminíferos de ratos pré-púberes, eram excluídos desse tecido em ratos adultos (Kormano, 1967a,b, 1968; Agarwal e Hoffer, 1989).

Pela barreira fisiológica, a permeabilidade a moléculas das membranas basolaterais e apicais das células de Sertoli testiculares e epiteliais epididimárias é o foco, sendo dependente da presença e da especificidade quanto ao número de transportadores e carreadores. Em ambos, testículos e epidídimos, a barreira fisiológica é altamente dinâmica, sendo capaz de alterar sua estrutura tridimensional durante o curso da espermatogênese, espermiogênese e maturação espermática (Maeda et al., 2007; Setchell, 2008).

Conforme as necessidades das células de Sertoli se alteram, a barreira fisiológica se adequa para ir de encontro às novas exigências, como, por exemplo, ao suprimento das necessidades nutricionais e vinculadas às células germinativas (Mital et al., 2011). Da mesma forma, no epidídimo, ainda que as junções de oclusão permaneçam intactas, a barreira fisiológica muda constantemente de uma região para a próxima, o que se reflete na diferenciada composição do fluido luminal, em constante gradiente, ao longo do ducto (Hinton e Howards, 1981).

Pela barreira imunológica, o bloqueio à entrada de leucócitos e anticorpos nos compartimentos adluminal e luminal definem a criação de um ambiente imunoprivilegiado, regulado centralmente pelas células de Sertoli, no testículo e células epiteliais, no epidídimo, em associação às propriedades da BHT e BHE (Dym e Romrell, 1975; Barker e Billingham, 1977; Setchell, 1990).

A proteção das células espermatogênicas e dos espermatozoides em maturação à resposta autoimune são fundamentais para a manutenção da fertilidade masculina. Significativamente, esta proteção estende-se à tolerância de enxertos de tecidos alógenos alocados no ambiente testicular, um fenômeno conhecido como “privilégio imunológico” (Setchell, 1990). Este privilégio envolve o controle de diversos mecanismos imunológicos, desde a tolerância imunológica, até a imunossupressão ou imunorregulação de resposta a antígenos, pela redução da ativação da resposta imunológica (Meinhardt e Hedger, 2011). Para manutenção de tal característica, no testículo, andrógenos, citocinas, peptídeos e lipídeos bioativos desempenham um papel paralelo à atuação das células de Sertoli e da BHT, de forma que a falha desses mecanismos, por trauma, inflamação, infecção ou fatores genéticos pode levar, de 5 a 10% dos casos à infertilidade autoimune (Meinhardt e Hedger, 2011).

No epidídimo, os mecanismos de defesa desempenhados pela BHE incluem tanto a restrição de compostos interferentes (i.e. agentes xenobióticos, espécies reativas de oxigênio, etc.) que alcançam o ambiente luminal bem como prevenção do escape ductal de antígenos de potencial repercussão autoimune (Dym e Romrell, 1975). Sendo ainda, o ambiente luminal epididimário hiperosmótico, fica a encargo da BHE a proteção quanto a mudanças acentuadas no potencial osmótico do meio (Robaire e Henderson, 2006). Por

fim, a síntese e secreção de proteínas específicas como as defensinas, e compostos antioxidantes também se estabelecem como mecanismos imunorreguladores (Robaire e Henderson, 2006; Meinhardt e Hedger, 2011).

A formação funcional da BHT foi relatada para murinos, pela primeira vez, a partir de observações de micrografias eletrônicas e da mensuração dos índices de penetração de marcadores eletro-opacos em túbulos seminíferos, datando-se que a BHT é formada entre os 16 e 18 dpp em ratos (Vitale-Calpe et al., 1973). A cronologia foi confirmada anos mais tarde, estabelecendo-se o início e fim da formação da barreira entre os 15-16 e 18-21 dpp, respectivamente (Bergmann e Dierichs, 1983; Russell et al., 1989; Toyama et al., 2001), coincidentemente ao cessar do período mitótico das células de Sertoli (Orth, 1982).

Outros estudos realizados à inspeção de microscopia de luz chegaram ainda a sugerir a formação da barreira de forma não tão abrupta, completando-se somente aos 25 dpp em ratos (Kormano, 1967a) ou mesmo até após os 44 dpp como relatado por Setchell et al. (1988).

1.1.4 Ducto Deferente

Desenvolvimento pré-natal

A porção medial do ducto mesonéfrico permanece em indivíduos masculinos como um tubo simples formando o ducto deferente, responsável pela conexão epidídimo-uretra, circundado por uma camada espessa e concêntrica de músculo liso, desenvolvida a partir do mesênquima subjacente ao ducto (Staack et al., 2003; Thomson e Marker, 2006; Arroiteia et al, 2012).

Até a puberdade

O desenvolvimento da porção medial do ducto mesonéfrico estabelece, ainda intra-útero, uma estrutura de arranjo tubular que ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal apresenta picos de proliferação celular ao passo em que se propaga o alongamento ductal com a descida dos testículos e epidídimos pelo canal inguinal (Koslov e Andersson, 2013).

A cobertura desse ducto por túnicas musculares confere resistência e elasticidade à estrutura, na qual cada célula muscular lisa é intimamente associada a até outras 12 células circunvizinhas por fortes interações intercelulares (junções *gap*) (Abdel-Hamid et al., 2009).

Os constituintes ductais

Durante a 1ª semana e a maior parte da 2ª semana do desenvolvimento pós-natal os ductos deferentes de murinos tendem ainda a apresentar características morfológicas do período pré-natal (Rodriguez e Bustos-Obregón, 1993). A diferenciação dos segmentos proximais e distais do ducto deferente se inicia aos 12 dpp e aos 25 dpp o epitélio da mucosa do segmento distal já apresenta características histológicas adultas. O peso bruto do ducto deferente aumenta muito entre os 1 e 45 dpp, sendo observadas as maiores taxas de desenvolvimento e proliferação associadas aos seus componentes histológicos aos 60 dpp, em paralelo ao aumento dos níveis de testosterona (Rodriguez e Bustos-Obregón, 1993).

A ejaculação consiste de duas fases distintas: a emissão e a expulsão. A emissão denota a injeção de espermatozoides na uretra posterior juntamente a outros produtos de secreção emitidos pelas glândulas sexuais acessórias (Koslov e Andersson, 2013). Durante a fase de emissão, tanto a liberação da secreção epitelial quanto a contração dos músculos lisos associados obedecem a um gradiente sequencial propagado ao longo da porção seminal do trato reprodutor. A função dos ductos deferentes nesse contexto é transportar espermatozoides do epidídimo à uretra, o que realiza por meio de coordenadas contrações musculares propulsoras (Burnstock and Verkhatsky, 2010).

É um engano, no entanto, pensar que os ductos deferentes possuem como única serventia a função de um conduto: seu papel é significativo quanto à contribuição secretora de seu epitélio, auxiliando na propagação do espermatozoide a partir de fluidos de transporte e, possivelmente, relacionando-se à reabsorção de espermatozoides remanescentes no ducto de passagem (Koslov e Andersson, 2013).

1.1.5 Vesícula Seminal

Desenvolvimento pré-natal

Oriunda de uma dilatação dorsolateral da porção caudal do ducto de Wolff, que se alonga cranialmente a fim de formar um divertículo distinto a partir dos 16 dias de gestação (ddg) em murinos (Staack et al., 2003) e 12 semanas de desenvolvimento humano (Hannema & Hughes, 2007), a vesícula seminal é o componente mais distal à gônada em desenvolvimento, ainda de origem mesodérmica. Sua morfogênese é dependente de andrógenos testiculares fetal, sendo um órgão presente unicamente em indivíduos masculinos, sem homólogos femininos (Flickinger, 1970).

Pouco tempo antes do nascimento, a vesícula seminal pode ser descrita essencialmente como um tubo oco rodeado por mesênquima, precocemente já possuindo uma abertura luminal presente (Hayward et al., 1996). A complexidade epitelial da vesícula aumenta ao passo que o brotamento epitelial cresce lateralmente, adentrando o mesênquima adjacente, alongando-se e bifurcando-se, estabelecendo ramificações secundárias até o completo pregueamento do epitélio e desenvolvimento glandular que acompanha a diferenciação do órgão (Aitkenm 1959; Hayward et al., 1996; Risbridger e Taylor, 2006). A diferenciação do estroma da vesícula seminal dá-se também em um processo ordenado e controlado por andrógenos, de forma que somente uma delgada camada muscular mostra-se presente em experimentos com castração animal em idade fetal (Lung e Cunha, 1981; Hayward, et al., 1996). A provável dependência de outros sinalizadores hormonais como, por exemplo, o estrogênio, durante o desenvolvimento fetal da vesícula seminal, não tem sido descartada, sendo o papel de modulação estrogênica atribuído à condução da diferenciação e proliferação celular (Bianco et al., 2002).

Embora funcionalmente correlatas, as glândulas acessórias ao trato reprodutor masculino – a vesícula seminal e a próstata – não compartilham a mesma origem embrionária apesar da proximidade anatômica.

Até a puberdade

A morfogênese da próstata e da vesícula seminal é regulada por sinais endócrinos, interações locais célula-célula e padrões genéticos específicos. Os botões epiteliais iniciais da vesícula seminal formam tubos a partir do ducto mesonéfrico, antes do nascimento (Takeda e Chang, 1991). Após o nascimento, os tubos iniciais desenvolvem ramificações laterais que crescem e se ramificam secundariamente. A morfogênese de ramificação da próstata e da vesícula seminal é completada na 2ª semana após o nascimento em murinos, porém a próstata continua acumulando aos poucos novos ramos até a puberdade onde se completa. (Cunha et al., 2004).

Os constituintes seminais

A vesícula seminal é uma glândula que varia consideravelmente entre as espécies e em alguns mamíferos está ausente⁷. No humano, a vesícula seminal é composta por túbulos alveolares contendo secreção viscosa. Seu desenvolvimento pode ser identificado em humanos no 4º mês de desenvolvimento intra-uterino (Gonzales, 1989). As vesículas seminais de murinos são formações irregulares, volumosas e lobadas, achatadas dorsoventralmente com pólo proximal direcionado caudalmente. O epitélio secretor da vesícula seminal é pseudo-estratificado e apresenta duas populações de células: basais e principais. As células basais estão dispostas inferiormente às células principais, apresentam núcleos poligonais e centrais com superfícies separadas da luz pelo ápice das células principais (Thomson and Marker, 2006). As células principais são colunares com núcleos basais, sendo maiores e mais numerosas que as células basais. A mucosa, camada interna, forma conjunto de dobras, com epitélio secretor apoiado sobre lâmina própria, composta de feixes de fibras colágenas entrelaçadas. A camada média, muscular, é constituída por feixes de fibras musculares lisas, de espessura variável dispostas em dois extratos: circular interno e longitudinal externo. A camada externa, serosa, é delgada e composta de tecido conjuntivo frouxo. Cada glândula apresenta ducto único que desemboca na uretra (Martinez et al., 1995).

⁷ Como ocorre em monotremados, marsupiais, carnívoros, cetáceos e em alguns tipos de insetívoros, lagomorfos e primatas (Cunha et al., 2004).

1.1.6 Próstata

Desenvolvimento pré-natal

A descrição da origem prostática requer o detalhamento do destino da cloaca fetal e seus derivados, e, principalmente, requer a introdução do papel exercido por estruturas de origem endodérmica no desenvolvimento urogenital.

Anatomicamente sendo relatada como uma expansão caudal do intestino primitivo, a cloaca é precocemente subdividida pelo septo urorretal, definindo, ventralmente, um seio urogenital (SUG) e dorsalmente, o reto e o canal anal (Sadler, 2013).

Na porção uretral do SUG, acima e abaixo da entrada dos ductos de Wolff, o aparecimento de brotamentos epiteliais⁸ coincide temporalmente ao desenvolvimento da vesícula seminal (17 dias em murinos e 10 semanas de gestação em humanos; Staack et al., 2003; Timms, 2008) caracterizando o desenvolvimento prostático (Sugimura et al., 1986). O crescimento inicial dos brotamentos prostáticos ocorre em resposta à secreção de testosterona pelas gônadas fetais, mas sustenta-se pela interação com seu metabólito ativo, o hormônio DHT cujos receptores encontram-se localizados no mesênquima adjacente (Shannon e Cunha, 1983; Takeda et al., 1985; Takeda e Chang, 1991; Timms, 2008). Os brotamentos, nesse momento, são constituídos por cordões epiteliais sólidos que, ao longo do crescimento, sofrem ramificações morfogenéticas⁹ para a formação de um arranjo lobular glandular, rodeado pelo estroma que circunda a uretra em desenvolvimento e os ductos ejaculatórios (Timms, 2008). Os pares de brotamentos mais proximais às gônadas em desenvolvimento são compostos de epitélio que se acredita ter origem mesodérmica resultando na formação das zonas medulares da próstata madura; enquanto os brotamentos mais distais formarão as zonas mais periféricas, possuindo origem endodermal (Takeda e

⁸ Os brotamentos epiteliais são definidos como múltiplas evaginações endodérmicas que penetram no mesênquima circundante, constituindo um total de 5 brotamentos em camundongos (anterior, posterior, medial e laterais) e 3 em humanos (central e laterais) (Sugimura et al., 1986).

⁹ A ramificação morfogenética é o processo pelo qual o epitélio invade o mesênquima envolvente e o ducto epitelial nascente se alonga e ramifica para dar origem a uma rede complexa de ductos secretórios (Timms, 2008).

Chang, 1991; Thomson and Marker, 2006). As diferenças relatadas nas origens embriológicas são ressaltadas pela diferenciação de resposta das zonas citadas quanto a processos patológicos (Cunha e Donjacour, 1987; Takeda e Chang, 1991). As zonas medulares e periféricas da próstata se expandem em círculos concêntricos ao redor da uretra e nesse processo, se fundem, embora, ainda no indivíduo adulto, possamos encontrar lóbulos separados, nem sempre sendo o desenvolvimento dos lóbulos uniforme (Takeda e Chang, 1991).

Durante o período pós-natal, com seu desenvolvimento sempre regido por influência androgênica, o lúmen prostático se estabelece na porção medular dos cordões e o epitélio de revestimento se diferencia, assumindo a característica morfologia acinosa e sintetizando uma variedade de produtos de secreção (Timms, 2008).

Até a puberdade

A interação epitélio-estromal desempenha um papel fundamental na regulação da atividade funcional e manutenção pós-natal da próstata (Nemeth & Lee, 1996). Durante a embriogênese, sob ação de andrógenos, células invaginam da uretra na base da bexiga para formar o mesênquima do SUG (Timms, 1994). Esse tecido induz a proliferação epitelial, a formação dos ductos e suas ramificações, a expressão de receptores de andrógenos e secreção de proteínas específicas da próstata (Hayward et al., 1997), ações essas desencadeadas em grande parte no período pós-natal, prolongando-se a maturação prostática até a puberdade. Na idade adulta, a manutenção da fisiologia da próstata continua dependente de andrógenos e das interações epitélio-estroma.

A primeira mudança morfológica indicativa do desenvolvimento da próstata é a formação dos botões epiteliais prostáticos observados no camundongo por volta do 17º dia de desenvolvimento pré-natal (Staack et al., 2003) e em humanos, a partir do 8º mês do desenvolvimento pós-natal (Timms, 2008). Ocorrem eventos de proliferação e ramificação dos ductos e o crescimento dos componentes concomitante dos elementos mesenquimais e epiteliais. O resultado final é o padrão de ductos constituídos por uma camada de células epiteliais e outra camada de músculo liso que são conectados uns aos outros pelo tecido conjuntivo frouxo (Hayward et al., 1997). Em humanos, o epitélio ocorre inteiramente

dentro da massa sólida do mesênquima do SUG que se diferencia em estroma fibromuscular que preenche o espaço entre ductos (Cunha e Donjacour, 1987). Nos roedores, os botões epiteliais não são ramificados no nascimento. Entretanto, no período neonatal, os ductos prostáticos alongam-se em direção ao mesênquima do SUG, formando três lobos prostáticos distintos e simetricamente bilaterais: anterior (correlata à glândula de coagulação), ventral e dorsolateral (Cunha e Donjacour, 1987).

Concomitantemente ao processo de morfogênese de ramificação ductal ocorre a citodiferenciação do epitélio e do estroma nas primeiras semanas após o nascimento (Timms, 1994).

Os constituintes prostáticos

A próstata é uma glândula acessória do aparelho reprodutor masculino (Figura 1.5), presente em todos os mamíferos (Mann, 1964; Patel et al., 1988) e responsável pela produção e armazenamento do líquido prostático, secretado juntamente com os demais componentes do sêmen durante a ejaculação. Esse líquido contribui para o aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozoides, assim como na neutralização da acidez da vagina, assumindo um papel importante no processo da fecundação (Mann, 1964; Patel et al., 1988). A próstata anterior, atualmente, é fortemente relacionada à glândula de coagulação. A próstata ventral é dividida em dois lobos, que são compostos por um conjunto de estruturas epiteliais túbulo-alveolares que se encontram envoltas por um estroma (Aümuller, 1979). Cada lobo constitui-se de um sistema de oito conjuntos de ductos que se ramificam distalmente. Esses ductos podem ser arbitrariamente divididos, conforme a distância relativa das suas regiões com relação à uretra, em três segmentos: proximal, intermediário e distal (Lee et al., 1990) que diferem quanto aos tipos celulares (Cunha e Donjacour, 1987), padrão de ductos, tipo de secreção (Prins, 1991), resposta a hormônios (Prins et al., 1991), padrão de expressão gênica (Takeda e Chang, 1991) e de síntese protéica (Banerjee et al., 1995). A região distal é composta por células colunares altas, capazes de produzir os componentes da secreção prostática, mas com atividade proliferativa. As células musculares lisas apresentam-se como uma camada esparsa e descontínua associadas a um grande número de fibroblastos. Essa distribuição das células

estromais coincide com a região de proliferação das células epiteliais (Prins et al., 1991). As células epiteliais na região intermediária possuem características morfológicas e funcionais semelhantes à porção distal, entretanto essas células apresentam intensa atividade secretora e são quiescentes (não proliferativas). Nesta região, as células musculares lisas formam uma camada fina e contínua (Lee et al., 1990).

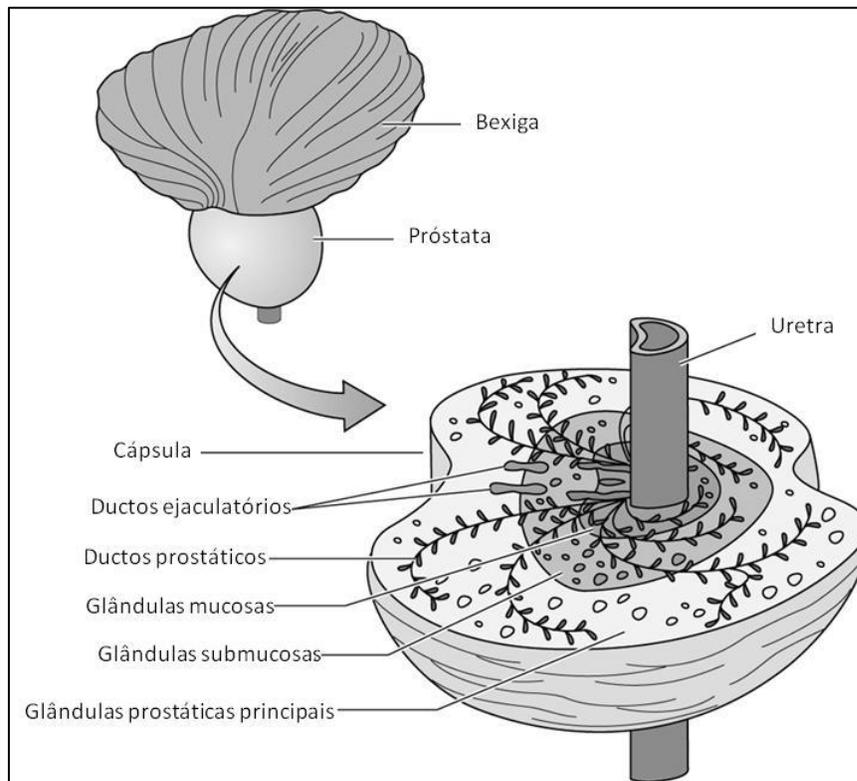


Figura 1.5 Ilustração esquemática da próstata.

Na ilustração, a representação do plano de corte transversal permite a identificação em camadas da distribuição glandular e dos ductos constituintes da próstata, com destaque para a orientação da inserção uretral. (Imagem retirada do artigo: Arora K., 2012).

1.1.7 Compartimento estromal

É conhecido que as interações epitélio-estromais têm importante papel para o desenvolvimento e manutenção do fenótipo adulto das glândulas acessórias ao trato reprodutor masculino (i.e. vesícula seminal e próstata; Hayward et al., 1996). Tuxhorn e colaboradores (2002) sugerem o conceito de compartimento estromal reativo, composto de fibroblastos e mais de 50% de miofibroblastos, um fenótipo de célula estromal ativada que

não é observado no estroma prostático normal (Gabbiani et al., 1972). Fibroblastos no tecido lesado alteram seu fenótipo para o de miofibroblasto, o qual é caracterizado pela expressão da vimentina e α -actina (Tuxhorn et al., 2001). De acordo com Tuxhorn e colaboradores (2002), a substituição do estroma normal pelo estroma reativo pode alterar as interações epitélio-estromais. Os estrógenos atuam sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais da próstata quanto as alterações patológicas (Cunha et al., 2002), tornando-se, nesse caso, importante modulador do estroma reativo. A DHT é o principal hormônio trófico da próstata, ligando-se com grande afinidade a receptores androgênicos (AR), uma proteína nuclear que é expressa na maioria das células prostáticas, incluindo as epiteliais e as do estroma. Embora a testosterona também possua a capacidade de ligar-se a tais receptores, seu papel parece ser secundário ao da DHT, uma vez que não ocorre o desenvolvimento da glândula em homens portadores de deficiência da enzima 5-alfa-redutase (Imperato-McGinley et al., 1992).

1.1.8 Plasma seminal

O plasma seminal nada mais é que o fluido do sêmen desprovido de espermatozoides, composto, principalmente, por secreções das glândulas sexuais acessórias, i.e. a vesícula seminal e a próstata (Sadler, 2013).

No momento da ejaculação, os espermatozoides previamente estocados na cauda do epidídimo avançam pelo canal deferente, atingem a uretra e a adição do plasma seminal ocorre. Por definição, as glândulas sexuais acessórias são responsáveis por prover aos espermatozoides nutrientes e fatores diversos, que, em continuidade à maturação epididimária, alteram a membrana plasmática, alteram os parâmetros de motilidade e se correlacionam à prevenção da capacitação e da reação acrossômica precoces (Way et al., 2000).

Embora seja possível que tanto os espermatozoides coletados a partir da cauda do epidídimo como ejaculados sofram, de forma geral, a capacitação¹⁰, o espermatozoide do ejaculado difere do epididimal (porção caudal) quanto ao pH (Hammerstedt et al., 1979), síntese e consumo de adenosina trifosfato (ATP), sítios de ligação à heparina (Lardy e

¹⁰ Processo que torna o espermatozóide capaz de fecundar um óvulo (Sadler 2013).

Ghosh, 1952) e quanto ao perfil de proteínas ligadas à membrana plasmática (Nass et al., 1990). Ensaio funcionais apontam divergências ainda quanto à viabilidade e motilidade desses espermatozoides (Braun et al., 1994).

Quanto à viabilidade dos espermatozoides, é sugerido que, em curto prazo, fatores decapitantes e/ou inibitórios à reação acrossômica tenham ação ativa na composição do fluido seminal (Chang, 1957; Han et al., 1990; Dostalova et al., 1994). Em contraponto, estudos têm apontado que a porcentagem de espermatozoides mortos pós-reação acrossômica é significativamente maior em populações de espermatozoides da cauda do epidídimo quando incubadas no fluido seminal (Corteel, 1980; Braun et al., 1994). Way e colaboradores (2000) sugerem ainda que os componentes do fluido devem ter um efeito tóxico imediato sobre a viabilidade espermática.

Pouco ainda se sabe sobre o real impacto do fluido das glândulas sexuais acessórias sobre as características de motilidade do espermatozoide. As proteínas ditas "formadoras da trama em gel", as semenogelinas, sintetizadas pelas vesículas seminais (Lilja et al., 1989) possuem um efeito inibidor sobre a capacidade móvel dos espermatozoides (Robert e Gagnon, 1996). Na contramão, outro produto vesical, a frutose, tem sido relatada como uma fonte de energia para a motilidade dos gametas (Mann, 1964; Patel et al., 1988) assim como o antígeno prostático-específico (PSA), envolvido na degradação das semenogelinas (Robert e Gagnon, 1996).

Ensaio *in vivo* (Amann e Griel, 1974) e *in vitro* (Hosoi et al., 1981) avaliando a capacidade de fecundação demonstraram não haver diferença significativa entre espermatozoides ejaculados e oriundos da cauda do epidídimo. Apesar disso, uma maior relação de sucesso nas taxas de fertilização de procedimentos *in vitro* realizados com espermatozoides punccionados da cauda epididimária foi reportada em trabalhos subsequentes de Brackett e colaboradores (1978) e Way e colaboradores (2000), redialogando sobre a possibilidade de a principal função das secreções das glândulas sexuais acessórias ser o fornecimento de fluidos para o transporte dos espermatozoides no trato reprodutor feminino. O papel secundário do plasma seminal no processo de fecundação em si, é colocado em contradição nos estudos de Henault e colaboradores

(1995), que mostram uma maior capacidade de penetração dos ovócitos bovinos por espermatozoides da cauda do epidídimo incubados com plasma seminal.

1.1.9 Pênis

Desenvolvimento pré-natal

No início do 12º dia de gestação em murinos e da 4ª semana em humanos, na extremidade cranial da membrana cloacal o mesênquima em proliferação produz um tubérculo genital, em ambos os sexos, a partir do qual, a genitália externa se desenvolve. Até os 16 dias de gestação em murinos e da 7ª semana em humanos, as genitálias externas são ainda semelhantes em ambos os sexos, a partir de quando, regidas por regulação hormonal, características sexuais distintas começam a aparecer, até a completa diferenciação, na 12ª semana em humanos e, em murinos, no pós-nascimento (Weiss et al., 2012).

Tão logo o septo urorretal divide a cloaca fetal, este se funde à membrana cloacal, dividindo-a em uma membrana anal (dorsal) e uma membrana urogenital (ventral), formando as regiões presuntivas de ânus e o orifício urogenital, respectivamente, o último, limitado pelas pregas urogenitais (Weiss et al., 2012). O tubérculo genital se alonga para formar o falo primordial, do qual derivam, de cada lado da membrana cloacal as eminências labioescrotais e pregas urogenitais.

Sobre o folheto interno das pregas urogenitais repousam a placa uretral de endoderma e a abertura do SUG, determinando o formato em ferradura da genitália externa, em fase inicial de desenvolvimento (Rodriguez et al., 2012). A masculinização da genitália externa indiferenciada é induzida principalmente pelo hormônio DHT, indutor do crescimento e alongamento do tubérculo genital para formação do pênis, do crescimento do corpo perineal de recobrimento do SUG e conexão ânus-pênis, canalização da placa uretral para formação da uretra e fusão dos folhetos externos do tubérculo genital para formação do escroto (Rodriguez et al., 2012).

As pregas urogenitais fundem-se uma com a outra ao longo da superfície ventral do pênis, que finalmente assume o formato de falo cilíndrico, constituído, em indivíduos

adultos pelos corpos esponjosos e cavernosos, além de peças cartilaginosa e óssea em murinos (Rodriguez et al., 2012). O ectoderma da superfície funde-se no plano mediano do pênis, formando a rafe peniana e envolvendo a uretra esponjosa internamente ao pênis. Na extremidade da glândula do pênis, uma invaginação do ectoderma forma um cordão ectodérmico celular, que cresce em direção à raiz do pênis para se unir à uretra esponjosa (Sadler, 2013; Schoenwolf et al., 2011). Esse cordão se canaliza e se une à uretra esponjosa previamente formada constituindo a fossa navicular completando a parte terminal da uretra que tem seu orifício externo deslocado para a extremidade da glândula do pênis (meato da glândula do pênis). Durante o pós-natal de murinos e da 12ª semana de desenvolvimento fetal em humanos, uma invaginação circular de ectoderma forma-se na periferia da glândula peniana. A ocorrência de morte celular programada pelas células constituintes da invaginação resulta na formação do prepúcio (prega cutânea) (Schoenwolf et al., 2011; Rodriguez et al., 2012).

O escroto ou bolsa testicular é uma extensão do abdômen, localizado entre o pênis e o ânus que deverá abrigar, em indivíduos masculinos adultos, a gônada e seus ductos acessórios. Sua formação depende do crescimento e posterior fusão das eminências labioescrotais, caracterizando a rafe escrotal como vestígio desse evento.

O último grande evento do desenvolvimento sexual anterior à puberdade retoma a importância da gônada, palco inicial da diferenciação sexual. Em indivíduos masculinos, a descida da gônada e ductos acessórios ao escroto é dependente do encurtamento das porções extra-inguinais do gubernáculo¹¹ o qual, por volta de 25 dpp em murinos (O'Shaughnessy e Sheffield, 1991) e a partir do 9º mês de gestação em humanos, estará reduzido a um pequeno ligamento que fixa o polo caudal do testículo ao assoalho escrotal (Schoenwolf et al., 2011).

Apesar de já estabelecidos os sexos genético e gonadal, a diferenciação sexual depende ainda da manifestação de características sexuais secundárias, desencadeadas no início da puberdade e essenciais ao estabelecimento do sexo fenotípico. A continuidade da

¹¹ Gubernáculo é o ligamento fixado à porção caudal do complexo mesonéfrico-gonadal masculino ou feminino e se estende para o assoalho peritoneal onde se fixa à fáscia entre os músculos abdominais oblíquos interno e externo em desenvolvimento, na região das eminências labioescrotais (O'Shaughnessy e Sheffield, 1991).

maturação e diferenciação pós-natal dos órgãos do trato reprodutor masculino culminarão, tanto em humanos quanto em murinos, no início da vida reprodutiva.

Até a puberdade

A genitália externa adulta desenvolve-se a partir do tubérculo genital ambissexual, pregas urogenitais e eminências labioescrotais, por processos dependentes de hormônios. O papel androgênico no desenvolvimento da genitália externa em indivíduos masculinos, rege, principalmente, 2 (dois) eventos distintos: a especificação da identidade da genitália em um momento pré-natal e a morfogênese e diferenciação pênis-clitoris em murinos, no pós-natal (Rodriguez et al., 2012).

Ao nascimento, o tubérculo genital de indivíduos masculinos é ligeiramente maior, mas o dimorfismo sexual é mínimo, principalmente em estruturas como o pênis e a fibrocartilagem distal, meramente representadas como condensações mesodérmicas (O'Shaughnessy e Sheffield, 1991). A diferenciação anatômica de murinos, nesse caso, acaba ficando a cargo, principalmente, de outros dimorfismos sexuais como a mensuração da distância ânus-genital, maior em indivíduos masculinos (Rodriguez et al., 2012).

Constituintes penianos

O pênis é constituído, dorsalmente, por dois corpos cavernosos e um corpo esponjoso ventral. Este último envolve a uretra e expande-se, formando a glândula. A maior parte da uretra peniana é revestida por epitélio pseudoestratificado colunar, que na glândula, passa a ser estratificado pavimentoso, tendo destaque a presença de desenvolvimento glandular (glândulas de Littré, secretoras de muco). Cobrindo a glândula do pênis e protegendo o meato urinário, o prepúcio é uma dobra de duas camadas de pele e mucosa, bastante elástico, agindo como um lubrificante natural (Junqueira e Carneiro, 2004). Nada se sabe sobre a natureza de moléculas secretadas pelo epitélio uretral que possam ter alguma correspondência a alguma etapa de formação ou maturação dos espermatozoides ejaculados (Rodrigues et al., 2012).

1.2 SOBRE A ALBUMINA

A albumina é a principal proteína globular sérica dos mamíferos. As principais funções ligadas à albumina relacionam-se à regulação da pressão osmótica do sangue e ao transporte de cátions, de ácidos graxos e outros compostos lipofílicos, fitoquímicos e xenobióticos (Kragh-Hansen, 1981; Peters, 1985).

A origem evolutiva da albumina ainda é desconhecida, já tendo sido descrita em mamíferos (caninos, felinos, equinos, bovinos, suínos, roedores e primatas), aves (galináceos), répteis (ofídios), anfíbios (anuros) e peixes ósseos (Peixe-pulmonado-australiano) (Hilger et al., 1996; Moskaitis et al., 1989; Wolffe et al., 1985; Petras e Maclaren, 1976; Rosen e Geller, 1977; McGillivray et al., 1979; Weinstock e Baldwin, 1988; Troiano et al., 1999; Trow et al., 2008). Em ciclóstomos (Lampréia) e invertebrados (platelmintos e equinóideos) há registros de proteínas similares à albumina (*albumin-like protein*), com possível relação evolutiva (Doolittle e Gray, 1992; Danis et al., 2000).

Em humanos, a albumina é um membro de uma família de quatro genes de proteínas séricas: *alb* (*albumin*), *afp* (*α -feto protein*), *dbp* (*D-binding protein*) e *alf* (*α -albumin/afamin*). Os quatro genes são, especificamente, expressos no fígado, com o *afp* e *alb* sendo também expressos no saco vitelino (durante o desenvolvimento intra-útero) (Nishio e Dugaiczky, 1996). É ainda relatada a expressão de transcritos de *alb* extra-hepáticos em rim e pâncreas (Nahon et al., 1988) e cérebro (Ahn et al., 2008) de humanos e em glândulas mamárias, língua, intestino, linfonodo, testículo e útero de bovinos (Shroyer e Nakane, 1987; Nishio e Dugaiczky, 1996; Shamay et al., 2005). A expressão do gene da albumina é codominante, com ambos os alelos mostrando penetrância completa (i.e. ambos os alelos são transcritos e traduzidos). Polimorfismos ligados aos alelos humanos denotam frequências raras nas populações¹² e podem decorrer de diferentes mutações no gene da albumina (Pietrangelo et al., 1992), ou de modificações regulatórias que tornem o produto

¹² A frequência de bisalbuminemia (condição heterozigota na qual ambos – a albumina normal (*alb*. A) e o alelo variante - estão presentes) é de 0,0003 a 0,001. A frequência de analbuminemia (vide nota13) é extremamente rara e somente 20 casos foram documentados por Dammacco et al. (1980) em revisão de literatura mundial.

(ou a grande maioria dos produtos) de transcrição não-funcional, mesmo em casos em que o gene mantém-se intacto (Peters, 1985).

A observação dos fenótipos, sem alterações evidentes, associados aos (raros) casos de polimorfismo do gene da albumina levou à sugestão de que a proteína codificada não devesse ser considerada como essencial uma vez que ratos (Nagase *rats*) e humanos analbuminêmicos¹³ pareciam sobreviver normalmente até a vida adulta tardia, inclusive com sucesso reprodutivo (Boman et al., 1976; Nagase et al., 1979; Tarnoky, 1980). Apesar do conceito, animais considerados analbuminêmicos possuem concentração de até 1/1000 de albumina em relação a níveis séricos normais, deixando aberta à albumina a definição de proteína essencial (Baker, 2002).

A biossíntese de albumina foi extensivamente investigada *in vivo* e *in vitro* por metodologias envolvendo a confecção de anticorpos mono e policlonais e a incorporação de aminoácidos radioativos na formação do propeptídeo precursor, a proalbumina, caracterizada pela não clivagem de um hexapeptídeo básico N-terminal (Arg-Gly-Val-Phe-Arg-Arg) (Peters, 1977; Fournier-Delpech et al., 1997).

1.2.1 Sobre a albumina e o trato reprodutor masculino

Antes mesmo de qualquer possível relação da albumina com o trato reprodutor masculino, as hipóteses iniciais a respeito da origem dessa proteína incluíam proposições diversas, nas quais a albumina, possivelmente, fosse o produto de quebra (fragmento citoplasmático) de leucócitos, eritrócitos, plaquetas, células de medula óssea ou de células em geral (Reimann et al., 1934). Outros autores propuseram que a albumina seria derivada do fibrinogênio ou de "*humors*" circulantes (i.e. antigo nome dado ao sangue e outros fluidos corpóreos) ou sintetizada por qualquer região do intestino, dos pulmões, da pele ou do fígado (Madden & Whipple, 1940; Campbell & Stone, 1957). Dados clínicos e experimentais de Madden e Whipple (1940) forneceram algumas das primeiras evidências sobre a síntese de albumina, estabelecendo o fígado como sítio transcricional ativo no desenvolvimento pós-parto, e atribuindo a presença de albumina em tecidos extra-

¹³ É conhecido por analbuminêmico o organismo que possui uma condição alélica variante extremamente rara na qual, por definição, há completa ausência de albumina circulante. Note que a definição carrega uma contradição com relação à observação de Baker, 2002 (ver texto).

hepáticos, como única alternativa, pelo extravasamento dessa molécula pela barreira endotelial de vasos sanguíneos, conclusão essa por anos apoiada (Miller et al., 1951; Miller & Bale, 1954) e, mais recentemente reestruturada, em novas pesquisas (Nahon et al., 1988; Nishio & Dugaiczky, 1996; Shamay et al., 2005; Ahn et al., 2008).

A síntese da albumina no trato reprodutor masculino foi sugerida, mas não comprovada, em estruturas tais como: próstata (Lindholmer et al., 1974; Elzanaty, 2007), células germinativas e somáticas de testículo (Cheng et al., 1987; Orlando et al., 1988) e células epiteliais da cabeça, corpo e cauda do epidídimo (Shaha et al., 1988). Funcionalmente, já se postulou que a albumina pode alterar a composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide por veículo de troca ou hidrólise lipídica (Go e Wolf, 1985) ou que a presença dessa proteína sérica no testículo humano adulto e no fluido seminal poderia estar relacionada à sua habilidade no transporte de andrógenos, sendo, as células de Leydig, mais ativas na produção esteroidal quando em presença da albumina (Orlando et al., 1988; Melsert et al., 1989). A ocorrência da albumina seminal é ainda correlacionada à qualidade, concentração e motilidade espermática (Lindholmer et al., 1974; Elzanaty et al., 2007). Adicionalmente, de acordo com Fraser (1985) e Langlais e Robert (1985), possivelmente pela via de ativação da fosfolipase, a albumina participaria da indução da reação acrossômica de espermatozoides de mamíferos.

Com a utilização de análises de citometria de fluxo e SDS-PAGE complexos albuminóides já haviam sido identificados no epidídimo (Carles et al., 1992; Fournier-Delpech et al., 1997), como uma nova classe de proteínas andrógeno-dependentes, denominadas glicoproteínas pré-albuminas epidídimo-específicas (PES - caracterizadas pela presença de domínios estruturais glicídicos e proteicos, sendo os últimos relacionados com os domínios de albumina; Fournier-Delpech et al., 1997) capazes de se associarem à membrana de espermatozoides durante sua passagem pelo lúmen do epidídimo (Fournier-Delpech et al., 1997). Isoformas protéicas de PES foram identificadas nos tecidos reprodutivos de ovinos por *immunoblotting* (Carles et al., 1992), carneiros por SDS-PAGE (Fournier-Delpech et al., 1988) e ratos por imunização heteróloga (Fournier-Delpech et al., 1985; Fournier-Delpech et al., 1997). Em ratos, a avaliação da fertilidade de espermatozoides da cauda do epidídimo ativamente imunizados contra as glicoproteínas PES demonstrou um decréscimo dramático, mas não uma supressão completa, da

capacidade dos espermatozoides do epidídimo de se ligar a zona pelúcida, em comparação com os controles não imunizados (Fournier-Delpech et al., 1985).

O padrão de imunolocalização da albumina ou proteínas similares à albumina em túbulos seminíferos do testículo de murinos ganhou refinamento ao longo dos anos sendo, de todo o sistema reprodutor masculino, o padrão mais detalhado (Everett e Simmons, 1958; Mancini et al., 1965; Sharpe, 1979; Setchell e Sharpe, 1981; Christensen et al., 1985; Gelly et al., 1994).

Muitos são os estudos que reportam uma concentração substancial de albumina no espaço extravascular intersticial do testículo de mamíferos (Everett e Simmons, 1958; Mancini et al., 1965; Sharpe, 1979; Setchell e Sharpe, 1981; Christensen et al., 1985). Mancini et al. (1965) trabalhou com anticorpos conjugados à marcadores radioativos e/ou fluorescentes comprovando, em ratos, a difusão da albumina de vasos sanguíneos para o espaço extravascular e reportando, por autorradiografia, a passagem da albumina sérica pela lâmina basal dos túbulos seminíferos e espaços intercelulares do epitélio germinativo, atingindo o lúmen tubular e dando início à discussão sobre a passagem transendotelial de proteínas do plasma em comparação à dinâmica observada nos sinusóides hepáticos (Sakiyama et al., 1988).

Em 1990, Krishna e Spanel-Borowski, utilizando-se da técnica de imunohistoquímica, corroboram as hipóteses de Mancini et al. (1965) introduzindo o conceito de “*leakage*” i.e. depósitos de albumina que se estendem da lâmina basal para o lúmen testicular. Christensen e colaboradores (1985), em contraste, ao utilizar a técnica de imunomarcção com ouro coloidal reporta, pela primeira vez, o padrão de identificação da albumina restrito à interação entre células de Sertoli, espermatogônias e espermátócitos primários, ressaltando não observar a presença de albumina além das junções entre as células de Sertoli, observações essas suportadas também pelos estudos imunohistoquímicos realizados com biópsias de testículo humano por Forti e colaboradores. (1989) e posteriormente por Orlando e colaboradores (1988).

Em 1987, Cheng e colaboradores tornam definitiva a associação entre albumina e gônadas masculinas ao conceber o termo *Testibumina*, relativo à proteína imunologicamente relacionada à albumina e responsiva à testosterona e hormônio folículo-

estimulante, identificada em meios de cultura enriquecidos com células de Sertoli, cuja caracterização por radioiodação em testículo e epidídimo de ratos, apontou maior pico de concentração aos 60 dpp com declínio da concentração até os 150 dpp, quando um platô é atingido.

Por meio de minuciosa comparação dos padrões de imunolocalização das moléculas albumina e transferrina, em 1994, Gelly e colaboradores descrevem estudo ontogenético que se estende desde a morfogênese gonadal (13º dia de gestação) até o desenvolvimento pós-natal (1, 18, 45 dpp) em ratos. Nesse estudo é destaque a concepção de um padrão de imunomarcção estágio-dependente e a hipótese de síntese e/ou internalização por endocitose da albumina pelas células germinativas primordiais e gonócitos, independentemente das células de Sertoli que, no período adulto, entretanto, ao manter forte interação com as células germinativas passariam a acumular albumina.

Por fim, a presença da albumina ou de proteínas similares, conjugadas ou não a grupamentos acessórios, tem sido documentada nos órgãos do trato reprodutor masculino ao longo dos anos, tendo sido destaque sua função primária de proteína carreadora, atrelada ao transporte de hormônios e/ou fatores de maturação/modificação celular e, aparentemente, com secreção controlada por genes especificamente ativados pela testosterona.

1.2.2 Sobre a albumina e um complexo glicoproteico de alto peso molecular: uma justificativa à proposta deste trabalho

A proposta de envolvimento do nosso grupo de pesquisa com a investigação da relação entre a albumina e o sistema reprodutor masculino fundamenta-se em resultados de estudos anteriores que visavam caracterizar o padrão de imunolocalização da proteína reconhecida pelo do anticorpo monoclonal (Amc) TRA 54 (*Testicular germ cells immunized to rat - monoclonal antibody*). Ensaios de imunohistoquímica e *immunoblotting* revelaram que o epítipo reconhecido pelo Amc TRA 54 estava presente em um complexo glicoprotéico de alto peso molecular (~200-260 kDa) liberado no lúmen do testículo para posterior agregação ao espermatozoide luminal epididimário, sob caráter andrógeno-dependente (Arroteia et al., 2004). A porção proteica do epítipo, reconhecido pelo Amc

TRA 54, foi sequenciada e, por homologia, foi caracterizada como sendo albumina. Ensaios de fertilização *in vitro* demonstraram o envolvimento do complexo glicoproteico (contendo albumina) reconhecido pelo Amc TRA 54 na capacidade do espermatozoide em reconhecer e penetrar a zona pelúcida do ovócito (dados não publicados¹⁴).

Diante desse panorama, essa dissertação de mestrado dá continuidade a uma linha de pesquisa centrada no trato reprodutor masculino, iniciada em 1998 com o estudo do antígeno reconhecido pelo Amc TRA 54 (Pereira et al., 1998), e mais recentemente guiada pelo estudo do padrão de expressão proteico e identificação de transcritos de RNAm da albumina em testículos, epidídimos, ductos deferentes, vesículas seminais, próstata e uretra peniana.

Utilizando uma abordagem qualitativa, esse trabalho retoma uma polêmica e antiga discussão centrada na presença, origem e localização da albumina em órgãos do trato reprodutor masculino, embasando a proposição e rediscussão das possíveis funções da albumina na reprodução.

¹⁴ Os dados aqui destacados compõem o manuscrito “Albumin is Synthesized in Epididymis and Aggregates in a High Molecular Mass Glycoprotein Complex Involved in Sperm-Egg Fertilization” submetido à Plos One em dezembro/2013. Tal manuscrito consta de resultados referentes do projeto de mestrado aqui descrito, tendo a autora (Barbieri, MF) compartilhado da primeira autoria com Arroiteia, KF. O manuscrito foi aceito em Janeiro/2014 sob a condição de revisões estruturais e deve ser ressubmetido no mês de Fevereiro/2014.

2.

Objetivos

Essa dissertação teve por objetivo central caracterizar a expressão da albumina em órgãos do trato reprodutor masculino de murinos.

Para tanto, estipulou-se duas etapas para realização da investigação proposta:

1. Estudo da expressão da albumina em murinos em idade reprodutiva;
2. Estudo da expressão da albumina em camundongos neonatos, pré-púberes, púberes, adultos e idosos

Considerando-se o contexto do desenvolvimento pós-natal, a realização de ambas as etapas foram focadas em três alvos de análise:

- i. Detecção imunoquímica da proteína albumina;
- ii. Determinação da imunolocalização histológica da proteína albumina;
- iii. Análise do perfil transcricional para RNAm de albumina.

3.

Material e métodos

3.1 ANIMAIS

A divisão por grupo dos animais utilizados nessa dissertação de mestrado respeitou a abordagem do desenvolvimento pós-natal e a escolha dos períodos estudados foi baseada no estabelecimento de eventos morfo-fisiológicos importantes para a temática dessa dissertação de mestrado. Os períodos em destaque foram definidos a partir de revisão da literatura:

Período Neonatal, compreendido até 10 dpp (ver Culty, 2013);

Período Pré-Pubere, compreendido entre 10 e 30 dpp (ver Charney et al, 1952);

Período Puberal, compreendido entre 28-49 dpp (ver Harkness e Wagner, 1995);

Adulto, a partir de 60 dpp (ver Staack et al., 2003) e

Idoso, a partir de 42 spp (i.e. semanas pós-parto; ver Book et al., 2013).

Animais adultos e idosos

Camundongos machos e fêmeas adultos da linhagem C57BL/6/JUnib e ratos machos adultos da linhagem NTacUnib:SD (*Sprague Dawley*; SD) foram obtidos do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório). Ratos machos adultos da cepa mutante NAR (*Nagase Analbuminemic Rats*) foram cordialmente cedidos para esse projeto de pesquisa pelo Dr. Sérgio Catanozi, vinculado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), Laboratório de Lípidos (LIM 10). Todos os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia (DHE), Instituto de Biologia (IB), UNICAMP, sob condições ambientais controladas. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia da UNICAMP sob o protocolo N° 2855-1(A).

Animais neonatais, pré-puberes e púberes

Camundongos adultos machos e fêmeas (1 macho: 2 fêmeas) foram acasalados e a presença positiva de plugue vaginal, demarcou o dia 1 de prenhez. As proles foram divididas para composição dos grupos experimentais. Proles nascidas no mesmo dia foram reunidas para posterior redivisão dos grupos etários ao acaso, sendo desmamados aos 21 dpp. Todos os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia (DHE), Instituto de Biologia (IB), UNICAMP, sob condições ambientais controladas. O projeto aprovado pela CEUA do Instituto de Biologia da UNICAMP consta sob o mesmo protocolo N° 2855-1(A).

3.2 ESTUDO DA EXPRESSÃO DA ALBUMINA

A expressão da albumina no desenvolvimento pós-natal do trato reprodutor masculino foi estudada em camundongos para a seguinte distribuição cronológica: 1 dpp, 2 dpp, 5 dpp, 8 dpp, 12 dpp, 16 dpp, 20 dpp, 40 dpp, 60 dpp, 90 dpp, 135 dpp, 5 mpp, 10 mpp, 18 mpp e 1 app (ano pós-parto). Para cada idade referida, um n=9 animais por grupo de idade foi respeitado.

De acordo com as idades acima destacadas, os animais foram realocados em 5 períodos do desenvolvimento: neonatal, pré-pubere, púbere, adulto e idoso respeitando as características destacadas para cada período, no tópico introdutório (1) da presente dissertação de mestrado.

O mesmo n total foi respeitado para os grupos de ratos SD e NAR.

3.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A partir da amostra de 9 (nove) animais (n=9) por grupo de idade, 3 animais foram destinados às técnicas de imunohistoquímica e *immunoblotting* sendo os órgãos alocados ao lado direito destinados à primeira técnica e os órgãos alocados ao lado esquerdo destinados à segunda técnica. Outros 3 animais foram utilizado para coleta do pênis e, eventualmente, para reposição de órgãos mediante complicação metodológica. Os demais 3 (três) animais

foram destinados à técnica de RT-PCR. O mesmo protocolo foi respeitado para os grupos de ratos SD e NAR.

Os órgãos coletados para todas as técnicas acima referidas foram: testículos, epidídimos, ductos deferentes, vesículas seminais, próstata, uretra (juntamente ao pênis), tecidos cartilagosos da cauda (fibrocartilagem e hialino), ovário e fígado de murinos.

Os registros fotográficos (imunoquímica) contidos nessa dissertação remetem a tecidos perfundidos com solução glicosada de lavagem (NaCl 0,6% e Sacarose 7,3%) e fixados em Bouin por 12h (lavado extensivamente em solução de base alcalina diluída de carbonato de lítio 0,2% para processamento subsequente). A pressão de perfusão foi estabelecida pela padronização da altura do suporte dos recipientes que continham a solução. Para canulação do coração, o ventrículo esquerdo foi perfurado com escalpe (G-21) e o átrio direito, rompido.

Para as demais técnicas propostas (*immunoblotting* e RT-PCR), camundongos não perfundidos (RT-PCR) foram eutanasiados por deslocamento cervical e ratos, em câmara de CO₂. Os animais perfundidos (*immunoblotting*) foram devidamente anestesiados e eutanasiados, posteriosteriormente, por deslocamento cervical.

3.4 DETECÇÃO IMUNOQUÍMICA DA PROTEÍNA ALBUMINA

Immunoblotting

Os órgãos coletados foram imersos em nitrogênio líquido para congelamento e estocagem da amostra.

Obtenção dos Homogenados

Os órgãos de estudo foram homogeneizados em tampão de extração da proteína contendo EDTA 10mM pH 7,4; tris HCl 100mM pH 7,4; PMSF 2mM; pirofosfato de sódio 10mM; fluoreto de sódio 100mM; ortovanadato de sódio 10mM; aprotinina 100mg/mL e igepal 1% - Bio-Rad Laboratories) em homogeneizadores mecânicos (pressão ou corte) e Homogeneizador ultrassônico (VirSonic 60, Virtis, Gardiner) em banho de gelo. O

homogenado foi então centrifugado a 4°C; 3000 xG; 10 min, e o sobrenadante foi submetido ao método de quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976) e armazenado à -80°C.

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Após a quantificação de proteínas alíquotas de 70µg de proteínas foram aplicados em géis de poliacrilamida a 10%, preparados segundo Laemmli (1970), em placas verticais do sistema Mini Protean III (Bio-Rad Laboratories). A amostra de proteínas foi solubilizada (1:1) em tampão contendo 0,001g de azul de bromofenol; 2,0 ml de glicerol; 2,5 ml tris-HCl 0,5M pH=6,8; 4 ml SDS 10%; 0,5 ml β-mercaptoetanol; 1,0 ml H₂O milliQ e a corrida ocorreu com o uso do tampão para eletroforese (tris base 12,5mM; glicina 100mM e SDS 0,02%). Utilizou-se o padrão de peso molecular (Prestained SDS-PAGE Standards Dual Color; Low Range – Bio-Rad Laboratories) empregando uma fonte de corrente contínua (Power pac 300, Bio-Rad Laboratories) ajustada com amperagem constante de 25 mA. Em sequência, foi realizada a transferência das proteínas para membrana de PVDF (Immobilon-P-Transfer Membranes, Millipore).

Western Blotting

A transferência dos géis SDS-PAGE para a membrana de PVDF foi realizada em cuba de transferência (Bio-Rad Laboratories) com a corrente ajustada para 220 mA durante 2h, com trocas de gelo a cada 1h, em tampão de transferência (Tris base 0,06M; Glicina 0,2M e Metanol 20%, Bio-Rad Laboratories). As membranas foram coradas pela solução de Ponceau (100mg de Ponceau e 0,5ml de ácido acético, q.s.p. 50mL) a fim de se verificar o padrão de separação eletroforética e a transferência efetiva para a membrana PVDF.

Para realização dos ensaios imunoquímicos, as membranas foram preparadas conforme as etapas que se seguem:

- 1) Três lavagens em solução-tampão tris-HCl 50mM e tween 20x (TBS-T);

2) 3 bloqueios foram testados: bloqueio em 3% gelatina (Sigma); bloqueio em 20% soro de coelho (Santa Cruz) e bloqueio em leite desnatado em pó 10% em TBS-T por 30min a TA.

3) Lavagem em TBS-T e, em seguida, incubação com o anticorpo anti-albumina de camundongo produzida em cabra (goat polyclonal to mouse serum albumin – ab19194, Abcam), diluído a 1:1000 em TBS-T; por 12h a 4°C;

4) Três lavagens de 5 min cada com TBS-T e incubação com o anticorpo policlonal de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (ZyMax, Invitrogen), na diluição de 1:2000 em TBS-T; durante 1h a TA;

5) Após três lavagens de 5 min em TBS-T, procedeu-se à revelação da reação com diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio.

Como controle negativo da reação, foi omitida a etapa de incubação com o anticorpo primário. Como controle negativo para a expressão de albumina, utilizou-se amostra de tecidos cartilagosos de cauda. A integridade e a qualidade da extração de proteínas total foi verificada por reação de *immunoblotting* para a molécula constitutiva (*housekeeping*) GAPDH (goat polyclonal to GAPDH, ab9483, Abcam) diluído a 1:1000 em TBS-T por; 12h (O/N); 4°C e incubação com o anticorpo policlonal de mula anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (donkey polyclonal secondary antibody to Goat, ab97110, Abcam), na diluição de 1:2000 em TBS-T durante 1h a TA.

3.5 DETERMINAÇÃO DA IMUNOLocalização HISTOLÓGICA DA PROTEÍNA ALBUMINA

Imunohistoquímica indireta

Coleta e Processamento

Os animais foram anestesiados (Ketamina, 80 mg/kg e Xilasina, 10 mg/kg) e seus órgãos foram coletados precedendo-se a perfusão cardíaca dos animais com solução de lavagem (1,2 g NaCl; 14,6 g sacarose; q.s.p. 200 ml H₂O destilada) e fixador (veiculado

através também de perfusão ou para imersão). As amostras de tecido foram fixadas em Bouin por imersão (Solução aquosa de ácido pícrico), paraformaldeído 4% ou formalina 10% tamponada através de perfusão a fim de se padronizar um fixador que permitisse, na medida do possível, a preservação da morfologia, da imunorreatividade e que prevenisse a extração, difusão e deslocamento do antígeno durante as etapas subsequentes à fixação. O tecido foi desidratado em soluções crescentes de etanol e diafanizado em xilol. Após inclusão em parafina, cortes de 3-5 μm foram coletados. Para garantir melhor adesão dos cortes à lâmina, foram empregadas lâminas silanizadas (methacryl-oxypropil-methoxysilane, Sigma) e/ou tratadas com poly-L-lisina (Sigma).

Exposição do epítipo e bloqueio dos sítios inespecíficos

Após a bateria de hidratação, ensaios envolvendo a opção pela adoção de uma metodologia de exposição dos epítipos antigênicos a partir de incubação em forno de micro-ondas foram realizados. Para tanto, as lâminas contendo os cortes histológicos foram incubadas em tampão citrato de sódio 0,3M; pH 7,4 e submetidas a ação de microondas (2450mHz) por por 3 ciclos de 2 minutos cada. Após bloqueio da peroxidase endógena (H_2O_2 0,3% em metanol, 40 min), 03 protocolos principais de bloqueio para sítios inespecíficos foram testados, tendo os cortes experimentais sido incubados em 3% gelatina (Gelatin from cold water fish, Sigma), 20% soro de coelho (SantaCruz) ou 5% leite em pó. O protocolo contendo gelatina apresentou os melhores resultados sendo portanto, o escolhido. A incubação primária dos cortes ocorreu com anticorpo policlonal (Apc) obtido a partir de albumina sérica de camundongos (ab19196), diluição 1: 150 em TBS e a secundária, com o anticorpo IgG anti-cabra feito em cavalo biotinilado (BA-8000, Vector), diluições 1:100 e 1:250, em TBS. A solução de conjugação à estreptoavidina (1:100) foi incubada por 45 minutos. A reação foi revelada através de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio sendo contra-corado com hematoxilina. Lâminas de controle negativo não receberam o Apc anti- albumina.

3.6 ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL PARA RNAM DE ALBUMINA

RT-PCR (Reação em Cadeia de Polimerase Via Transcriptase Reversa)

Como etapas preliminares ao RT-PCR, a extração de RNA total dos tecidos foi obtida a partir da homogeneização das amostras em Trizol® (Invitrogen) e a síntese de cDNA foi realizada com o kit *RevertAidT First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas).

Para a extração de RNA total, as amostras teciduais foram maceradas em tubos *falcons* estéreis (15 ml) contendo 1mL de Trizol e incubados por 5 min à temperatura ambiente (TA). A extração de RNA foi realizada nos órgãos mencionados anteriormente (item Coleta e processamento das amostras) e, adicionalmente, para algumas análises, o epidídimo foi individualizado em quatro segmentos: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. Em seguida, foi adicionado 200µL de clorofórmio RNase free a cada amostra, procedendo-se agitação por 15s e incubação por 3 min (TA). As amostras foram centrifugadas a 12000 xG durante 15 min a 2-8°C. A fase aquosa foi removida cuidadosamente para evitar contaminação por proteínas ou DNA genômico. A seguir, foi adicionado 500µL de isopropanol e, incubado por 10min (TA). O material foi centrifugado a 12000 xG por 10 min a 2-8°C. Detectada a formação de *pellet* na parede do *ependorf*, o sobrenadante foi removido e foi adicionado álcool etílico 70% (4°C). O material foi centrifugado a 7000 xG, 5min, 2-8°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet permaneceu durante 15min exposto para secagem. Em seguida, o material foi reidratado com 30µL de água DEPC (Diethyl pyrocarbonate ≥ 97% (NMR), Sigma-Aldrich).

A integridade do RNA total obtido, contido nas amostras, foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% em cuba horizontal, com corrente contínua a 100V durante 15 min. O RNA total foi quantificado com o auxílio do espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer). A seguir, o material foi aliqotado e armazenado à -80°C.

Para a síntese de cDNA total, 2µg de RNA total foram adicionados à 1µL de oligo(dT)18 primer (0,5µL/µL); q.s.p. 12µL H₂O DEPC. Após incubação a 65°C por 5 min,

foram adicionados 8µL do mix contendo 4µL de 5x reaction buffer, 1µL de Ribolock Ribonuclease inhibitor (20u/µL), 2µL de 10mM dNTP mix e 1µL de RevertAid H Minus M-MuLV RT (200 u/µL); q.s.p. 20µL H₂O DEPC. As amostras foram incubadas no termociclador (90 min a 42°C, 5 min a 70°C), quantificadas com auxílio do NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) e então armazenadas a -80°C. Qualquer possibilidade ainda vigente de contaminação das amostras com DNA genômico foi apaziguada pelo tratamento prévio com DNase I previamente à síntese de cDNA.

PCR para Albumina

As reações foram realizadas num volume final de 50 µl contendo 50ng/uL de cDNA, 10 pmol de *primers*, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1X tampão para PCR, 2,5% DMSO e 1U de Taq DNA polimerase (LGC Biotecnologia). Os parâmetros de amplificação para o gene de albumina respeitaram: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C (2 min); 5 ciclos de desnaturação a 95°C (30 s), 55°C (30 s) e 72°C (2 min); 35 ciclos de anelamento a 95°C (30 s), 55°C (30 s) e 72°C (1 min) e 1 ciclo de extensão a 72°C (10 min). As sequências de *primers* para albumina utilizados para reação de PCR foram: 5'-ATGAAGTGGGTAACCTTTCTCC-3' (*foward*) e 5'-GGATGTCTTCTGGCAACTTC - 3' (*reverse*), com tamanho do produto predito de 512 pb. Um microlitro de cada amostra de PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 3% corado com intercalante GelRed™ (Biotium) e fotografado sob luz ultravioleta. A identidade do produto de PCR de albumina foi confirmada por sequenciamento de nucleotídeos (ABI DNA Analyser 3730, Centro de Estudos do Genoma Humano, Universidade de São Paulo/USP) e o tamanho do fragmento resultante foi verificado por digestão com a enzima de restrição HinfI (Fermentas). O protocolo adotado para a digestão por HinfI seguia o recomendado pelo fabricante para a digestão de produtos de PCR diretamente após a amplificação, consistindo de ~ 0,1 a 0.5 µg de DNA; 2 µl 10X Buffer R; 10 u/µl HinfI, com período de incubação de 8 horas a 37°C.

Reações de controle do RT-PCR

A funcionalidade do kit *RevertAidT First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) foi verificada conforme sugerido pelo fabricante, procedendo-se a síntese de cDNA a partir de amostra de RNA controle para GAPDH (item disponível no Kit; 3'-poly(A) tailed RNA transcript; 0,05µg/µl). A integridade e a qualidade do cDNA total foi verificada por RT-PCR para os genes constitutivos (*housekeeping*) Ciclofilina e GAPDH (respeitando-se as concentrações preditas para o protocolo de RT-PCR do gene Albumina). Em adição, todos os ensaios de RT-PCR foram acompanhados de uma reação de “branco”, a qual continha todos os reagentes para a reação exceto o cDNA a fim de verificar a não-contaminação dos reagentes.

Ciclofilina

Os parâmetros de amplificação para o gene de Ciclofilina respeitaram: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C (1 min); 5 ciclos de desnaturação a 95°C (30 s), 55°C (30 s) e 72°C (1:30 min); 30 ciclos de anelamento a 95°C (30 s), 55°C (1 min) e 72°C (1 min) e 1 ciclo de extensão a 72°C (10 min). As sequências de primers utilizados para a reação de PCR para o gene da ciclofilina foram: 5'-CTTGCTGCAGACATGGTC-3' (*foward*); 5'-GCAATCCTGCTAGACTTG-3' (*reverse*), com tamanho do produto predito de 95 pb. Um microlitro de cada amostra de PCR foi submetida à electroforese em gel de agarose a 1% corado com intercalante GelRed™ (Biotium) e fotografado sob luz ultravioleta.

GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

Os parâmetros de amplificação para o gene GAPDH respeitaram: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C (3 min); 35 ciclos de anelamento a 94°C (30 s), 58°C (30 s) e 72°C (45 s). As sequências de primers para GAPDH utilizados para reação de PCR foram: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3' (*foward*); 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3' (*reverse*), com tamanho do produto predito de 496

pb. Um microlitro de cada amostra de PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com intercalante GelRed™ (Biotium) e fotografado sob luz ultravioleta.

4.

Resultados

4.1 ESTUDO DA EXPRESSÃO DA ALBUMINA EM MURINOS EM IDADE REPRODUTIVA

4.1.1 Perfil imunológico da proteína albumina

Ensaio de *immunoblotting* realizados com Apc anti-albumina a partir do extrato de órgãos componentes do trato reprodutor masculino coletados de camundongos C57BL/6 e ratos SD em idade reprodutiva (60dpp e 75dpp, respectivamente) evidenciaram a presença da proteína albumina. A ampla reatividade caracterizada para todos os órgãos analisados foi contraposta para a cepa mutante NAR, na qual somente nos órgãos fígado, testículo e epidídimo houve a revelação de um padrão, ainda que pouco reativo, sendo confirmado em reação posterior, na ausência de bloqueios para reações inespecíficas e com tempo prolongado de revelação do sinal da estreptoavidina pelo DAB, sugerindo a presença de moléculas imunologicamente similares àquela reconhecida pelo Apc anti-albumina. Os ensaios realizados com o Apc anti-GAPDH para validação da preservação antigênica de todas as amostras foi bem sucedido, garantindo a integridade das amostras utilizadas (Figura 7.1).

4.1.2 Imunolocalização de albumina

As reações de controle negativo realizadas com a omissão do anticorpo primário anti-albumina não apresentaram marcação.

O padrão de especificidade do Apc anti-albumina para tecidos utilizados na verificação da imunoreatividade do anticorpo (i.e. tecidos controle) é evidenciado na Figura 7.2. Como controles positivo e negativo de verificação da expressão da proteína albumina, o fígado e a cartilagem da cauda de camundongos, respectivamente, demonstraram a especificidade do Apc anti-albumina, com destaque para a marcação granular característica dos cordões de hepatócitos e a ausência de marcação tanto pelos condroblastos/condrócitos quando pela matriz territorial/interterritorial da peça cartilaginosa.

Fragmentos de ovário evidenciam ainda intensa imunomarcação intersticial (tecido conjuntivo associado ao estroma do órgão) associada à presença da albumina em células

foliculares e zona pelúcida de ovócitos I. Em testículo e epidídimo de NAR, a ausência de reatividade epitelial ao Apc anti-albumina é contraposta aos focos de sutil marcação intersticial que corroboram e justificam os resultados encontrados para esse grupo nos ensaios de *immunoblotting*.

Após conclusão dos estudos iniciais sobre o padrão de especificidade evidenciado pelo Apc anti-albumina prosseguiu-se com o estudo do trato reprodutor masculino de murinos (camundongos e ratos – SD) em idade reprodutiva.

Em testículos, todos os estádios de diferenciação da linhagem germinativa apresentaram imunomarcações consistentes e específicas. A linhagem somática do epitélio seminífero, representada pela célula de Sertoli foi evidenciada como reativa ao Apc anti-albumina, principalmente, em testículos de ratos SD, embora raramente observada para camundongos (Figura 7.3 e 7.5).

A presença da albumina, em epidídimo, apresentou amplo espectro de variação ao longo das compartimentalizações do ducto epididimário, i.e. segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. A marcação apresentou-se qualitativamente mais diluída ao longo do gradiente dos compartimentos epididimais de camundongo. Similarmente, a expressão de albumina em células epiteliais epididimárias de ratos SD respeitou o mesmo gradiente não havendo, no entanto, a observação de perfis tão distintos quanto os relatados para os camundongos (Figura 7.4 e 7.5).

Em função da diversidade de perfis de marcação para albumina identificados tanto no testículo quanto para epidídimo, ilustrações esquemáticas foram desenvolvidas, a fim de sintetizar os resultados obtidos. As principais possibilidades de imunomarcação, testiculares (Figura 7.6) e epididimárias (Figura 7.7) foram esquematizadas (ilustrações) e correlacionadas por analogia aos seus equivalentes registrados pelas fotomicrografias relatadas para murinos de 60 dpp. As minúcias de tais correlações constam na legenda das Figuras 7.6 e 7.7.

Apesar dessa dissertação por muitas vezes restringir o foco sobre espaços de diferenciação e maturação espermática (testículo e epidídimo, respectivamente), a observação de canais e glândulas acessórias ao trato reprodutor masculino foram especialmente adotadas para o modelo de camundongo, a fim de buscar possíveis inter-

relações na dinâmica de expressão da albumina no trato reprodutor masculino (Figura 7.8). A começar pelo ducto deferente, a observação de um perfil de expressão diferencial para porções proximal e distal ao epidídimo reafirmam a dinamicidade da expressão da albumina, com imunomarcação evidente para corpo celular total na porção proximal e da região de estereocílios e espermatozoides luminais na porção distal. Vesículas seminais e próstata possuem perfil bastante similar, com apontamentos de imunomarcação restritos a alguns nichos celulares, nos quais a marcação pontual de células epiteliais é revelada. Perfil similar também é respeitado para o epitélio da uretra, peniana. Em contraposição, robusta imunomarcação é uniforme e presente no estroma de todos os órgãos acessórios.

4.1.3 Perfil transcricional para RNAm de albumina

A extração de RNA total (Figura 7.9) e síntese de cDNA foram satisfatórios e confirmados pela expressão dos genes constitutivos (*housekeeping*) Ciclofilina e/ou GAPDH garantindo a integridade do cDNA para todas as amostras. A análise de RT-PCR confirmou a síntese de RNAm de albumina nos órgãos: testículo, epidídimo, incluindo aqui sua segmentação (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda) e ducto deferente. Em NAR, resultados análogos foram obtidos. O sequenciamento de nucleotídeos e o perfil de digestão do produto de PCR com enzimas de restrição reiteraram a identidade da molécula de albumina, confirmando tais órgãos como os sítios sintéticos dessa molécula.

4.2 ESTUDO DA EXPRESSÃO DA ALBUMINA EM CAMUNDONGOS NEONATOS, PRÉ-PUBERES, PÚBERES, ADULTOS E IDOSOS

4.2.1 Perfil imunológico da proteína albumina

A expressão de GAPDH foi confirmada nos extratos testados para todos os órgãos componentes do trato reprodutor masculino, para todos os grupos de idades.

Ensaio de *immunoblotting* realizados com Apc anti-albumina a partir do extrato de órgãos componentes do trato reprodutor masculino coletados de camundongos C57BL/6 neonatos, pré-puberes, púberes, adultos e idosos evidenciaram a presença da proteína albumina.

A análise de tecidos oriundos de camundongos neonatos (representados pelo *immunoblotting* do grupo de 1 dpp) evidenciou a presença da proteína albumina para testículos, epidídimos, ductos deferentes e vesículas seminais, com identificação de banda com imunomarcagem fraca para próstata e pênis (Figura 7.10).

A ampla reatividade de todos os tecidos analisados, com distinta identificação de banda foi pela primeira vez observada no grupo de 16 dpp, idade inclusa no período pré-pubere. Consistente a esse padrão, a presença de bandas imunorreativas em animais adentrando o estágio púbere (40dpp) confirmam, também para esse período do desenvolvimento pós-natal a presença da proteína albumina em extratos de todos os órgãos do trato reprodutor masculino analisados (Figura 7.10).

A presença de albumina em animais adultos já havia sido confirmada no item 4.1 desta dissertação a cargo do grupo de 60dpp, tendo sido, neste momento, reavaliada pela introdução de dois grupos de idades mais avançadas: 90 dpp e 135 dpp. Em ambos, foram detectadas bandas imunorreativas para a proteína albumina (Figura 7.10).

Como último grupo de análise, camundongos de 10 mpp e 1 app (ano pós-parto), representantes do grupo idoso de desenvolvimento pós-parto, mantiveram o padrão de imunorreatividade acima descrito para o grupo adulto, apresentando bandas com imunomarcagem positiva, embora com expressão claramente reduzida para o grupo de 1 app (Figura 7.10).

4.2.2 Imunolocalização de albumina

As reações de controle negativo realizadas com a omissão do anticorpo primário anti-albumina não apresentaram marcação. A reação de imunohistoquímica para testículos revelou para o período neonatal (representado por 1dpp e 3dpp) e pré-puberal (representado por 18dpp) gonócitos com imunomarcação citoplasmática para albumina, embora tal imunorreatividade não tenha sido observada para a totalidade dessa população celular. Células de Sertoli imunorreativas foram frequentemente identificadas nesses grupos. A partir dos períodos puberal (representado por 40dpp) e adulto (representado por 90dpp) observou-se ampla associação entre albumina e células da linhagem germinativa, relatadas nos compartimentos basal, adluminal e luminal, com eventual associação também entre albumina e células de Sertoli. O envelhecimento representou abrupta mudança no perfil de expressão da proteína albumina, o qual passou a ser associado a uma aparentemente imunomarcação de espaços intercelulares do túbulo seminífero (Figura 7.11).

A diversidade de perfis de marcação para albumina identificados para os grupos de estudo do desenvolvimento pós-natal foram, quando possível, correlacionada às ilustrações esquemáticas apresentadas no item 4.1. As minúcias de tais correlações constam na legenda das Figuras 7.11 e 7.12.

Em epidídimos neonatos (representado por 1dpp) são observadas sugestões de imunomarcação da região de estereocílio e de início da imunomarcação para corpo celular total para algumas células epiteliais (Figura 7.12). Em epidídimos pré-puberes (representado por 18dpp), o perfil se repete e intensifica. A diversidade de perfis de imunomarcação observada para camundongos adultos (item 4.1, camundongo 60dpp) é retomada conforme o desenvolvimento pós-natal, surgindo no período puberal (representado por 40dpp) o perfil de imunomarcação para grânulos supranucleares. Perfis referentes à protusões citoplasmáticas e via paracelular somente são identificados no período adulto (representado por 90dpp) sendo que, com o envelhecimento (representado por 10mpp), a marcação torna-se menos conspícua (Figura 7.12).

A associação de células epiteliais do ducto deferente com a albumina é observada para o período neonatal (representado por 1dpp), sendo menos conspícua no período pré-

puberal (representado por 18dpp) e puberal (representado por 40dpp). A distinção de imunomarcção das regiões proximais e distais (ao epidídimo) do ducto deferente, de fato é observada apenas no período adulto (representado por 90dpp), tal qual descrito no item 4.1 com a adição de um novo perfil de imunomarcção que combina corpo celular total, região de estereocílios e espermatozoides luminais, intermediário aos perfis previamente descritos (Figura 7.13D). No envelhecimento (representado por 10mpp), a intensidade de imunomarcção torna-se menos evidente, conservando a imunorreatividade dos espermatozoides luminais (Figura 7.13)

Vesícula seminal, próstata e uretra peniana, somente apresentaram imunomarcção epitelial evidenciada a partir do período puberal (representado por 40dpp), atingindo rapidamente o estágio de complexidade do animal adulto. Também para esses órgãos o envelhecimento representou decréscimo na diversidade de expressão proteica (Figuras 7.14, 7.15 e 7.16).

4.2.3 Perfil transcricional para RNAm de albumina

A confirmação da presença de transcritos de RNAm de albumina em testículo, epidídimo e ductos deferentes de animais de 60 dpp foi confirmada no item 4.1.3 da presente dissertação de mestrado. A fim de verificar se a presença de transcritos de RNAm se mostravam presentes durante todos os períodos (neonatal, pré-pubere, púbere, adulto e idoso) do desenvolvimento pós-natal foram realizados ensaios de RT-PCR.

A extração de RNA total e síntese de DNAc foram satisfatórios e confirmados pela expressão do gene constitutivo (*housekeeping*) Ciclofilina garantindo a integridade do DNAc para todas as amostras. A análise de RT PCR confirmou a síntese de RNAm de albumina nos órgãos: testículo e epidídimo em todos os períodos analisados e para ducto deferente a partir de 30 dpp (representação do período puberal; Figuras 7.17 e 7.18). O sequenciamento de nucleotídeos foi realizado para todas as amostras do 1º ensaio de RT PCR, sendo as demais replicatas testadas com êxito quanto ao perfil de digestão do produto de PCR com enzimas de restrição.

5.

Discussão

Pelos ensaios evidenciados na Figura 7.2, a imunorreatividade da albumina parece ser relacionada a tecidos epiteliais associados a um estroma vascularizado ou ao próprio tecido conjuntivo, amplamente vascularizado, como comprovado na gônada feminina utilizada como referencial análogo da porção feminina do trato reprodutor. Como contraponto, foi demonstrada a imunorreatividade negativa observada nos tecidos cartilagosos da cauda de camundongos (*immunoblotting* e imunohistoquímica).

A presença de albumina no lúmen dos túbulos seminíferos já foi relatada por vários trabalhos (Mancini et al., 1965; Krishna e Spanel-Borowski, 1990; Gelly, 1994; Liao et al., 2006), embora o meio de acesso dessa proteína circulante através das BHT ainda seja alvo de discussão.

Diferentes moléculas são submetidas à característica restritiva das barreiras, a qual diverge em resposta a natureza físico-química dessas moléculas. Para algumas substâncias, tais como o etanol (Setchell, 1980), o acesso é imediato ao testículo inteiro, transpassando sem dificuldades as BHT. Substâncias como a Cr-etilenodiamino tetra-acético (EDTA; Setchell e Sharpe, 1981; Setchell et al., 1988), possuem fácil acesso ao compartimento basal, mas são impedidos de atingir o compartimento adluminal.

Ainda para outras substâncias, tais como albumina (Setchell e Sharpe, 1981; Setchell et al., 1988), a passagem para o compartimento adluminal, mesmo que de forma muito vagarosa, é permitida. A lenta progressão da albumina pelas BHT e BHE e seu maior confinamento no compartimento basal (Setchell et al., 1988) fazem com que essa proteína sérica seja frequentemente utilizada como parâmetro de comparação à permeabilidade de outras moléculas e mesmo validação da integridade das barreiras (Banks e Kastin, 1992; Setchell, 2008).

A permeabilidade, ainda que limitada, da BHT à albumina é questionada por outros trabalhos que afirmam que o epitélio seminífero é, de fato, impermeável às proteínas séricas (Wright et al., 1981; Mital et al., 2011). Wright e colaboradores (1981) injetaram no sistema circulatório de ratos com idade superior a 2 (duas) semanas, moléculas de albumina radiomarcadas com I^{125} , documentando em diferentes tempos, por eletroforese, a exclusão dessas moléculas do fluido da rede testis.

A ausência de imunomarcção de albumina em espermátocitos secundários e espermátides precoces em testículos controle de tecidos criofixados também reforça, para Liao e colaboradores (2006) a teoria de bloqueio da albumina pela BHT, muito embora o “vazamento” de albumina para o espaço luminal, como evidenciado pela marcação positiva de espermátides tardias e espermatozoides, esteja presente e seja de difícil explicação. Na mesma pesquisa referida, a dinâmica temporal de permeabilidade à albumina é proposta juntamente a um viés comparativo, realizada a partir de testículos tratados com cádmio (3 mg/kg), conhecido disruptor da BHT. O padrão de imunomarcção evidenciado após ruptura da BHT (24h e 48h após administração intraperitoneal de cádmio; Liao et al., 2006) assume um aspecto ubíquo, com todo o epitélio seminífero apresentando imunoreatividade positiva à albumina, sem que sejam notados padrões diferenciados ou marcações específicas ao redor das células germinativas ou somáticas.

Os animais utilizados para o estudo de Liao e colaboradores (2006) possuem de 20-30g, peso comumente relatado para estimativa de idade de camundongos, entre a época de desmame (10-15g; Neves et al., 2013) e adultos (25-50g; Neves et al., 2013). À semelhança do padrão de imunomarcção positivo relatado por esses autores, o grupo de camundongos com 40 dpp (Figura 7.11D), descritos para essa dissertação, também apresentam ausência ou fraca imunomarcção de albumina nas células germinativas do compartimento adluminal, anteriores ao estágio de espermátides. Embora não seja possível determinar com certeza a fase do desenvolvimento pós-natal dos animais utilizados por Liao e colaboradores (2006), a semelhança observada sugere uma possível explicação para a divergência relatada em seu trabalho original diante do panorama da literatura – que destaca a presença da albumina também para outros estádios de células germinativas. A idade dos camundongos relatada/estimada coincide com um importante momento no estabelecimento da BHT (Setchell et al., 1988), sendo especialmente complexa uma inferência absoluta sobre a possibilidade de passagem de albumina sérica para os demais compartimentos nesse período.

A despeito da permeabilidade da BHT à albumina, a síntese de proteínas séricas por culturas primárias de células de Sertoli sugerem que algumas, se não todas, as proteínas presentes no lúmen do túbulo seminífero devem ser sintetizadas *de novo* nos testículos (Wright et al., 1981). Esses achados evitam a necessidade de se postular um mecanismo

especial de transporte de proteínas através da BHT. Corrobora para a hipótese de síntese *de novo* para albumina os resultados aqui apresentados pela técnica de RT-PCR para a transcrição de RNAm desta proteína em testículos, positiva para todos os grupos e idades analisados (Figura 7.9, 7.17 e 7.18).

Com o processo de envelhecimento, alterações progressivas, estruturais e funcionais se acumulam (Perheentupa e Huhtaniemi, 2009). Experimentos realizados com ratos marrons (*Brown Norway Rats*) com 24 mpp mostram, por microscopia de luz e eletrônica, a substituição das junções oclusivas entre as células de Sertoli adjacentes, componentes da BHT, por pontos de adesão focal, usualmente entre processos de até 3 (três) células de Sertoli (Levy et al., 1999). Em animais idosos, o nitrato de lantano atravessa a barreira, passando do compartimento basal para o adluminal, estendendo-se por entre os processos das células de Sertoli, adentrando espaços intercelulares até alcançar o lúmen (Levy et al., 1999). A função endócrina testicular, iniciada ainda no útero materno e interrompida no pós-natal entre os períodos neonatal e puberal, prossegue vigorosamente a partir de então, juntamente à espermatogênese, até a possibilidade de um sutil declínio com o envelhecimento (Perheentupa e Huhtaniemi, 2009).

A provável regulação da permeabilidade da BHT por andrógenos é alvo dos estudos de Meng e colaboradores (2005) os quais mostram que a testosterona, ao agir sobre seu receptor nas células de Sertoli (receptores de andrógenos) interfere na expressão de algumas proteínas, como as claudinas tipo 3, responsáveis pela codificação de componentes de transição na formação de novas junções de oclusão. A sugestão é que a ação androgênica interfira diretamente no perfil regulatório das células de Sertoli e assim, no controle do microambiente do epitélio seminífero, que passa a ser mais ou menos acessível à entrada de moléculas.

A hipótese de que a albumina ligada à testosterona possa, diferencialmente, transpassar a BHT foi sugerida e comprovada por Nishimura e Ichihara (1997). No experimento proposto, decorridas 2 (duas) horas da injeção do complexo testosterona-BSA-ouro pela veia da cauda de ratos de 70 dpp, diversos depósitos de ouro foram localizados no núcleo das células de Leydig e no tecido intersticial, nos núcleos das células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos e espermátides precoces; além de, em menor

porcentagem, na cromatina condensada de espermátides alongadas e células mioepiteliais ao redor do túbulo. Em testículos submetidos ao mesmo protocolo, mas injetados apenas com BSA-ouro, aproximadamente 25% dos núcleos de células de Leydig estabeleceram-se imurreativos por tecido-alvo, sem que fossem visualizados depósitos evidentes em células da linhagem germinativa para esse complexo desprovido de andrógenos.

A morfologia associada à imunomarcagem de testículos de camundongos de 10 mpp sugere a presença da albumina em espaços intercelulares (Figura 7.11F), à semelhança do relatado por Liao e colaboradores (2006) no grupo ao qual foi administrado cádmio 48h antes da coleta dos testículos. Tal observação morfológica corrobora para a proposição do enfraquecimento da BHT com o processo de envelhecimento.

Na contramão, no processo de desenvolvimento pré-natal, dois mecanismos são sugeridos para justificar a presença de albumina em gonócitos: anteriormente à diferenciação das células de Sertoli, é defendido um mecanismo de internalização, enquanto que, em estádios posteriores, a síntese *de novo* aparece como opção. Ambos os momentos são diferenciados pela total ausência ou presença das células de Sertoli, ainda que, em ambos os casos, com ausência de BHT (Gelly et al., 1994).

Os ensaios de imunohistoquímica realizados para composição dessa dissertação revelam, para o primeiro grupo do desenvolvimento pós-natal (1 dpp; Figura 7.11A), a continuidade da imunomarcagem dos gonócitos juntamente à imunoreatividade das células de Sertoli – ainda que, em ambos os casos, não na totalidade dessas populações celulares. Até 5 dpp a imunomarcagem positiva dos gonócitos persiste, em um momento que se caracteriza pela redistribuição dessas células no cordão seminífero e manutenção de uma fase de quiescência (Zogbi et al., 2012; Figura 7.11B).

A relação da albumina como um auxiliador de divisões mitóticas é reconhecidamente inversa à ação da alfa-fetoproteína (AFP), glicoproteína também pertencente à família gênica da albumina. Produzida pelos espermátócitos em condições de choque térmico, a AFP é responsável pelo bloqueio da espermiogênese (Yazama e Tai, 2011). Em contraste a essa ação, o estímulo à continuidade da espermatogênese é observada em testículos microinjetados com altas doses de albumina. O papel da albumina como indutor mitótico no fígado lesionado é novamente contraposto à injeção sistêmica de

AFP, capaz de inibir a divisão celular durante processos de regeneração hepática (Sudweeks e Hill, 1967). É destaque, principalmente para as fotomicrografias de camundongos adultos (60 dpp) apresentadas nessa dissertação, que grande parte das fases de divisão celular suportadas pelo epitélio seminífero são acompanhadas da imunomarcagem positiva para albumina (Figura 7.3).

Na fase pré-puberal, ondas de proliferação e degeneração celular se sobrepõem, sendo observada imunomarcagem positiva para albumina, principalmente, nos gonócitos em fase de diferenciação às espermatogônias. A relação da albumina com o processo de apoptose tem tido destaque na literatura, sendo apontada como um inibidor específico da apoptose endotelial (Zoellner et al., 1996) e de ilhotas pancreáticas (Barbaro et al., 2008).

Seja no indivíduo pré-pubere ou adulto, em concordância ao descrito por Gelly e colaboradores (1994), usualmente somente alguns poucos grupos (“clusters”) de células germinativas em desenvolvimento mostram-se imunorreativos à albumina, sugerindo sincronicidade entre os clones de uma célula germinativa.

A imunoreatividade de células germinativas em ratos adultos, não foi observada por Cheng e Bardin (1986), responsáveis por cunhar o termo *Testibumin*, sendo relatada por esses autores a imunomarcagem única para células de Sertoli. Estes dados contrastam com os variados padrões de imunolocalização da albumina evidenciados para camundongos de 60 dpp e ratos de 75 dpp nesta dissertação, os quais, por sua vez, são correspondentes aos descritos por Gelly e colaboradores (1994). A presença de *leakages* (i.e. extravasamentos; Cheng e Bardin, 1986; Shaha et al., 1988; Krishna e Spanel-Borowski, 1990) no epitélio seminífero é comumente descrita para ratos na literatura e é atribuído a esse perfil de marcação mecanismos de transferência intracelular e/ou mecanismos parácrinos de secreção cíclica, ambos tendo como alvo a liberação de albumina ou proteínas semelhantes à albumina (*albumin-like protein*) pelas células de Sertoli. É de importante ressalva, nesse momento, destacar que a macromolécula reativa ao anticorpo anti-*Testibumin* é correlata, ainda que não idêntica, à albumina sérica uma vez que esta não pode ser reconhecida por este anticorpo em sua forma nativa (Cheng e Bardin, 1986).

A análise da expressão do anticorpo anti- *Testibumin* após o estabelecimento da orquidectomia de testículos de camundongos mostrou queda de 58% da concentração desta

proteína (Cheng e Bardin, 1986), ressaltando, pela fração remanescente, a possível existência de substancial, mas não exclusiva, fonte de produção dessa molécula no sangue e a direta relação de andrógeno-dependência da albumina.

Para tal relação, apesar da baixa afinidade da albumina por compostos não polares, a elevada concentração dessa proteína no soro sanguíneo faz dela uma das principais carreadora de esteróides e hormônios lipofílicos, regulando o acesso dessas moléculas aos seus respectivos receptores. Aproximadamente 54% da testosterona circulante e que deve ser entregue ao tecido-alvo encontram-se ligadas à albumina, completando-se demais 44% ligadas à globulina de ligação a hormônios sexuais (*sex hormone-binding globulin*; SHBG), ambas, proteína e glicoproteína respectivamente, produzidas no fígado, com os restantes 2% de testosterona na forma livre. As frações livre e ligada à albumina estão prontamente disponíveis para os tecidos, sendo ditas “biodisponíveis”, possuindo atividade biológica enquanto a fração inativa funciona como modulador da secreção androgênica nos tecidos.

Ao suturar túbulos semíferos em ambas as extremidades e estabelecer uma situação de isolamento do lúmen seminífero ao contato direto com o meio de cultura, Nishimura e Ichihara (1997) testaram a possibilidade de correspondência entre o papel de entrega de andrógenos pela ABP e albumina. Moléculas de testosterona-ABP diluídas no meio de cultura foram capturadas pela porção basal de células de Sertoli sendo, em seguida, transferidas para espermatócitos e espermátides precoces. No mesmo sistema, complexos testosterona-BSA-ouro são entregues por via análoga à descrita anteriormente. A sugestão da função da albumina ultrapassar a de carreadora sérica de andrógenos podendo também adentrar o tecido-alvo e carrear testosterona para o sistema reprodutor masculino, traria, a essa dissertação, novos embasamentos teóricos, capazes de suscitar novas proposições funcionais para essa proteína tão versátil. Ainda, a despeito do demonstrado nessa dissertação, sobre a comprovada síntese de RNAm e, portanto, da produção autóctone de albumina pelo testículo, a participação da albumina de origem alóctone (i.e. síntese hepática) tem tido sua revelância compreendida pela literatura recente, não podendo ser esquecida ou negligenciada.

A presença de albumina intersticial, como pode ser observado pelas reações de imunohistoquímica presentes nessa dissertação, é substancial e, aquém do carreamento

androgênico, Yamamoto e colaboradores (1994) sugerem também o possível envolvimento da albumina e sua presença no espaço peritubular, para fins de modulação do movimento transepitelial de andrógenos, com destaque para os epidídimos.

O fluido epididimário é hiperosmótico e difere em composição do plasma sanguíneo, do fluido testicular e do plasma seminal. As proteínas detectadas neste fluido podem ser de origem secretória epididimária, da internalização pós-passageira pela BHE ou ainda de origem testicular, chegando via fluido da rete testis ao lúmen deste órgão (Fouchécourt et al., 2000). De acordo com Koskimies e Kormano (1973) as proteínas séricas estão presentes no fluido da rede testis e presumivelmente passam para o epidídimo através dos ductos eferentes.

A presença continuada das proteínas séricas no fluido luminal epididimário após a ligadura dos ductos eferentes permitiu a Brooks e Higgins (1980) sugerirem que essas proteínas, semelhantes à albumina, deviam ter a capacidade de acessar diretamente o fluido luminal, sendo internalizadas através do epitélio epididimário. Resultados de RT-PCR, obtidos para composição dessa dissertação, para epidídimo total e epidídimo fragmentado em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda revelaram a presença de transcritos de albumina nesse órgão, sugerindo, em adição à hipótese de internalização, a de tradução de RNAm de albumina.

Proteínas consideradas importantes para a secreção epididimária foram purificadas por Brooks (1987), tiveram seu DNAc clonado e a mensuração de seu RNAm realizada. Sialoproteínas e proteínas relacionadas à superfamília α_2 -globulinas, ambas dependentes de andrógenos, tiveram seus RNAm detectados pela primeira vez aos 20 dpp, coincidentemente ao período em que o epitélio epididimário se diferencia em vários tipos celulares, atingindo síntese máxima entre os 30 e 40 dpp. A detecção de transcritos de albumina, no testículo e no epidídimo, foi confirmada por dados dessa dissertação desde o 1º dpp (Figura 7.17), sugerindo a síntese dessa proteína e estágios bastante precoces da diferenciação epitelial seminífera e epididimária com sugestão de redução da síntese em animais do grupo idoso (1 app; Figura 7.18).

A maturação morfológica do ducto genital começa na porção caudal do epidídimo e do ducto deferente após 7 dpp e nos segmentos craniais após os 14 dpp. Até o 5º dpp não há

alterações maiores detectadas no ducto genital, que desenvolve progressivo enovelamento dos túbulos causado pela atividade mitótica das células epiteliais e peritubulares. Em 1 dpp sugestões de marcação epitelial ocorrem como pode ser conferido no detalhe da Figura 7.12 mas é a partir do 18° dpp (Figura 7.12) que a expressão de albumina é aumentada nos ductos epididimários, coincidentemente à fase final de diferenciação da região do segmento inicial (Krutskikh et al., 2011). Dos 20-40 dpp o perfil de imunomarcacão de corpo celular começa a declinar com aumento da formação de protusões citoplasmáticas (*buds*) e assim, da sugestão de secreção, em uma faixa etária (40 dpp; Figura 7.12G-I) marcada pelo começo da espermiacão (Krutskikh et al., 2011).

A concentraçao proteica de *Testibumina*, por sua vez, aumenta no epididimo com a idade, atingindo um pico de expressao aos 90 dpp e permanecendo inalterada a partir de entao (Cheng e Bardin, 1986). Muito embora nao haja o respaldo do uso de ferramentas morfométricas, a observacão das lâminas por microscopia de luz revelou, para o grupo de 90 dpp desta dissertaçao, poucos ductos epididimários com ausencia total de marcaçao para albumina, sendo característico, para a maioria, a observacão de protusões da superfície apical celular (Figura 7.12) e marcaçoes supranucleares (Figura 7.12) para todos os segmentos do epidídimo (Figura 7.12), corroborando com a proposta deste período representar o pico de expressao de albumina/*Testibumina*.

Dada a natureza absorativa e secretora do epitélio do epidídimo, para todo e qualquer parâmetro de modificacão do fluxo do fluido luminal, é esperada complementar alteraçao molecular e iônica desse microambiente, com possível alteraçao dos processos epiteliais, regulados por moléculas intraluminais (Turner et al., 1999). Processos obstrutivos e inflamatórios dos ductos deferentes podem ocasionar esse cenário. Portanto, cada vez mais, na literatura, o ducto deferente tem abandonado a premissa de ser apenas um canal de passagem dos espermatozoides (Turner et al., 1999).

Flickinger (1973) e Hoffer (1976) sugeriram, com base em características estruturais, que a funçao de síntese de proteínas/glicoproteínas bem como a absorçao de material luminal é encargo do ducto deferente proximal. Por outro lado, no ducto deferente distal é evidenciada a síntese de esteróides. Embora nao haja nenhuma demarcaçao funcional rígida entre os compartimentos proximal e distal, pode ser feita a distincão dos

mesmos quanto às capacidades progressivas de absorção, síntese e secreção. Em murinos, sugere-se que ambas as regiões dos ductos deferentes integrem as três atividades de destaque, em grau variável (Chinoy, 1985; Chinoy e Kumar, 1983).

De fato, de acordo com o observado pelas fotomicrografias, o padrão funcional acima descrito é ilustrado pelos grupos de camundongos de 60-90 dpp (Figura 7.8A-B e Figura 7.13D-E) sendo a presença de albumina no ducto deferente, ao menos em parte, derivada da tradução de RNAm a partir dos 30dpp (Figura 7.17), como demonstrado nessa dissertação.

Os componentes do plasma seminal são constituídos de contribuições testiculares, epididimárias, ductais, vasculares e, principalmente, das glândulas sexuais acessórias masculinas (Autiero et al., 1991). Para a fertilização, uma composição apropriada de plasma seminal é requerida para composição do ejaculado que deve fornecer o transporte e vitalidade dos espermatozoides no trato reprodutor feminino (Lunenfeld, 1986). Baixos níveis de componentes seminais solúveis refletem defeitos na atividade secretória das glândulas sexuais acessórias e são associados a casos de subfertilidade ou infertilidade masculinas (Autiero et al., 1991). A participação das glândulas sexuais acessórias na produção do semem é rotineiramente avaliada por testes de pH do ejaculado e/ou mensuração da concentração de certos marcadores de glândulas secretórias (Lunenfeld, 1986; Autiero et al., 1991).

Em experimentos conduzidos por Lindholmer (1974) fica bastante claro que os padrões de motilidade dos espermatozoides sejam marcadamente diferentes após lavagem em soluções salinas contendo ou não albumina. Na presença de albumina, os espermatozoides mostram boa motilidade progressiva, enquanto que na ausência, o padrão de motilidade relatado é similar ao característico movimento do espermatozoide epididimário. Para ambos, os espermatozoides ejaculados e espermatozoides recuperados do epidídimo, lavados com solução livre de proteínas, a adição de albumina ou plasma seminal imediatamente restaura o padrão de motilidade progressiva dos espermatozoides, indicando a albumina como um dos fatores presentes no fluido seminal, responsável pela promoção do efeito da motilidade em espermatozoides.

O fato de que os polissacarídeos Dextran e Ficoll não foram capazes de preservar a motilidade progressiva de espermatozoides ou de protegê-los da entrada permeável de eosina sugere que o efeito da albumina é específico para com o espermatozoide e não somente um efeito coloidal generalizado (Lindholmer, 1974; Autiero et al., 1991). Uma vez que o modo de ação da albumina não parece envolver efeitos coloidosmóticos, Rumke (1974) ressalta a probabilidade da albumina formar complexos com vários fatores no plasma seminal ou originados pelo/do espermatozoide e que esses complexos, direta ou indiretamente, influenciem nas propriedades funcionais do espermatozoide.

A deficiência na concentração de glicoproteínas seminais tem sido associada com a atenospermia (Autiero et al., 1991,) enquanto que a abundância de fragmentos proteolíticos e baixos níveis de albumina têm sido encontrados em ejaculados de homens oligospermicos. De acordo com Lindholmer e colaboradores (1974) e Orlando e colaboradores (1988), a albumina constituinte do plasma seminal deriva dos testículos.

A possível entrada de albumina na vesícula seminal foi também testada por Nishimura e Ichihara (1997) com o complexo testosterona-BSA-ouro localizado nas células epiteliais, demonstrando a capacidade do complexo em atravessar a membrana basal e atingir o núcleo das células epiteliais.

Uma vez que as análises de expressão gênica, no presente estudo, não respaldaram a produção de RNAm pelas glândulas acessórias e pênis, é suposto que a evidente imunomarcagem epitelial descrita para esses órgãos ao longo do desenvolvimento pós-natal seja provinda da migração da albumina por vias séricas e/ou mesmo derivadas dos órgãos do trato reprodutor envolvidos com a transcrição dessa molécula. Elzanaty e colaboradores (2007) investigou a origem e a relação da albumina com parâmetros reprodutivos masculinos a partir da coleta de amostras seminais de 916 homens submetidos à investigação clínica de infertilidade. Seus estudos com a análise da estrutura da cromatina do espermatozoide, por citometria de fluxo, não revelaram uma associação direta da albumina com a motilidade espermática ou aos parâmetros de integridade de DNA, o que fez Elzanaty sugerir a associação da albumina ao desenvolvimento funcional da morfologia espermática e não à vitalidade fisiológica do mesmo. Em ensaios de correlação entre níveis de albumina e outros marcadores teciduais, Elzanaty também demonstrou relações positivas

da albumina para com marcadores epididimários (*NAG; neutral alfa-glicosidase*) e prostáticos (*PSA; prostate-specific antigen*), mas negativas para marcadores de vesícula seminal (*fructose*), sugestionando uma possível origem prostática e epididimal da albumina em adição à fração sérica de contribuição oriunda do sangue.

Na presente dissertação de mestrado, o início da marcação epitelial para albumina em vesículas seminais e próstatas foi evidenciada entre 40-90 dpp (Figuras 7.14C-D e 7.15C-D, respectivamente), sendo progressivamente perdida até os 10mpp (Figura 7.14E e 7.15E, respectivamente), muito embora desde o 1dpp forte marcação positiva para albumina tenha sido evidenciada no estroma dos órgãos analisados. Mesmo na fase pré-natal, o acúmulo de albumina estromal é relatado por todo o momento de diferenciação da vesícula, com a transformação, no feto, de um epitélio simples revestido por mesênquima, para um epitélio maduro dotado de dobras, com função secretora e revestido por lâmina própria, túnica muscular e adventícia no indivíduo após seu nascimento (Brewster, 1985).

O estroma das glândulas sexuais acessórias, principal constituinte imunoreativo para a albumina ao longo das idades analisadas, tem se mostrado, na literatura recente (Hagglof e Bergh, 2012) um regulador chave atrelado às funções fisiológicas e, eventuais quadros proliferativos malignos prostáticos. A dosagem de albumina sérica trata-se de um teste laboratorial prontamente disponível e de baixo custo, frequentemente incorporado como parte do processo de avaliação pré-operatória (Hagglof e Bergh, 2012).

Utilizada como fator prognóstico, a dosagem sérica de albumina tem se tornado uma ferramenta valiosa para a predição de sobrevivência de pacientes com cânceres de pulmão, reto, cólon, ovário, cabeça e pescoço, bexiga, fígado, melanoma, leucemia e câncer da próstata hormônio-refratário (Richter et al., 2000; Hagglof e Bergh, 2012). Possuindo ainda relação direta como marcador do estado nutricional, baixos níveis séricos de albumina indiretamente se relacionam ao grau de inflamação existente (Richter et al., 2000).

O mecanismo pelo qual a albumina pode estar interferindo no prognóstico de desenvolvimento desses tumores não é claro, muito embora a associação entre albumina e regulação do ciclo celular/apoptose não seja novidade, previamente discutidas também para a associação da albumina às células germinativas em diferentes estádios de divisão meiótica no testículo. Não é certa também a correlação entre o desenvolvimento do estroma reativo e

a albumina. No entanto, diante de evidências de que ambos os fatores são determinantes da fisiologia normal e/ou desenvolvimento de quadros patológicos, torna-se pertinente a proposição dessa associação.

Finalmente, para a uretra peniana, de acordo com Parr e colaboradores (1992), glândulas uretrais de camundongos machos são alvos da ação da testosterona e contêm componentes de secreção análogos aos descritos para a próstata ventral e células plasmáticas de imunoglobulinas tipo A, ambas detectadas nas porções pélvica e bulbosa da uretra. Dentre os compostos de secreção, a albumina ou proteínas semelhantes à albumina são descritas como possuindo origem sérica. Para composição dessa dissertação de mestrado, a uretra peniana foi foco da análise, adicionando essa porção às demais para as quais já havia sido descrita a presença de albumina. A análise do grupo referente a 1 dpp (Figura 7.16A) evidenciou a imunoreatividade à albumina de células do tecido conjuntivo adjacente à placa uretral do falo, ainda não completamente desenvolvido. A presença de albumina no epitélio uretral peniano foi registrada por imunohistoquímica a partir dos 40 dpp (Figura 7.16C), havendo queda do perfil de imunomarcagem após os 90dpp (Figura 7.16D).

Ademais a todas as funções até então assinaladas para a albumina, seu papel como agente dissipador de xenobióticos, diminuindo a capacidade de ligação desses agentes à receptores hormonais (Baker, 2000) e outras proteínas celulares; na desestabilização da membrana plasmática do espermatozoide pela transferência de fosfolípidos como contribuição para o mecanismo de capacitação (Daves et al., 1980); na remoção de componentes inibitórios à reação acrossômica precoce associados à superfície celular do espermatozoide (Davis, 1976; Fraser, 1985), como agente anti-oxidante, prevenindo danos oxidativos (Baraka-Vidot et al., 2013) além de tantas outras funções que ainda se sobressaem, fundamentando a característica versatilidade da albumina.

A versatilidade da albumina pode ser parcialmente entendida por sua análise filogenética. Proteínas com sequências similares à albumina não foram ainda descritas para invertebrados, incluindo os genomas completos da *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*. Há, no entanto, uma proteína, conhecida por Endo16, relatada para ouriços-do-mar, na qual o claro padrão de resíduos de cisteína, característicos da albumina,

encontra-se presente (Soltysik-Espanola, 1994). Associada à membrana plasmática, pouco se sabe acerca da função desta proteína. De acordo com Baker (2002), processos de duplicação gênica da Endo16 podem ter conduzido ao aparecimento da albumina ancestral. Processos posteriores de duplicação levaram à AFP. Assim, é provável que uma albumina ancestral estivesse presente na origem de vários receptores ativados por ligantes-nucleares em protocordados e vertebrados primitivos e que, nesse momento, a albumina fosse o principal carreador de esteroides e regulador do acesso desses esteroides a seus receptores, bem como um protetor destes receptores da ocupação por produtos químicos interferentes (Baker, 2002).

Nesse contexto, não parece ser casual a presença da proteína albumina em todos nos órgãos do sistema reprodutor masculino (testículo, epidídimo, ducto deferente, vesícula seminal, próstata e pênis) demonstrada por *immunoblotting* neste trabalho (Figura 7.10). A partir de 1dpp em murinos, a expressão protéica é observada mesmo em camundongos idosos (01 app). O peso molecular (67 kDa) obtido é correlato ao determinado para a *Testibumina*, sugerindo semelhança entre as classes de proteínas albuminas.

O contraponto criado pelo quadro de analbuminemia para ratos NAR frente a toda a orquestração desempenhada pela albumina no trato reprodutor masculino parece, à primeira vista, insustentável. Embora a taxa total de proteínas séricas em NAR sejam similares àquelas descritas para sua linhagem basal, os ratos *Sprague Dawley* (SD), teoriza-se que esse resultado seja devido ao aumento da taxa de outras proteínas que não a albumina na circulação. A marcação por *immunoblotting* de bandas reativas acima ou abaixo do peso molecular característico da albumina (67 kD) é um padrão conhecido para NAR, devendo representar a marcação de pré/pró-albuminas ou mesmo complexos albuminoides, traduzidos pela síntese proteica, mas possivelmente anormalmente dobradas para aquisição de estrutura terciária devido à anterior falha do número de aminoácidos em sua estrutura primária, com exposição duvidosa dos sítios de ligação (Ogawa e Inagaki, 2012).

Em contraste à imunomarcção granular e robusta para albumina relatada para hepatócitos de ratos SD em reações de imunohistoquímica, hepatócitos positivos à albumina só são visíveis em NAR idosos, usualmente sendo encontrados como células únicas ou conjuntos agregados de poucas células. Usualmente, hepatócitos de NAR adultos

são negativos à imunomarcagem para albumina, mas já há na literatura ressalvas contrárias acompanhadas da argumentação sobre a manutenção, ainda que em níveis extremamente baixos de albumina sérica, resultados estes obtidos com frequência inferior à comum falta de reatividade deste tecido para a albumina (Ogawa e Inagaki, 2012).

A expressão de albumina no sistema reprodutor masculino é coerente com a história evolutiva dessa proteína e deve estar funcionalmente relacionada às suas propriedades bioquímicas e estruturais. Este fato fundamenta-se na proposição de Baker (2002) de que, ancestralmente, a albumina tenha sido uma proteína transportadora de esteróides, hormônios tireoidianos e lipofílicos em vertebrados primitivos. Neste modelo, a baixa afinidade de interação da albumina com seus ligantes seria compensada pela grande diversidade de ligantes que podem se associar a esta proteína, conferindo vantagem adaptativa ou seletiva aos organismos que a expressavam. Tal característica de associação é conservada atualmente para o transporte de hormônios esteróides e lipofílicos em altas concentrações séricas de albumina, fazendo dessa proteína um dos principais transportadores e mediadores/reguladores do acesso dessas moléculas aos seus receptores, ainda que, conforme já propunha Peters (1985), a probabilidade de ligação da albumina com hormônios esteróides, com destaque para o cortisol e a testosterona, seja mais fraca que a intermediada por proteínas de transporte plasmático específicas aos hormônios relatados.

Por definição, a albumina – ao menos a molécula produzida pelo fígado de humanos e murinos - é uma das poucas proteínas constitutivas secretadas pelo organismo que carece de grupamento glicídico associado (Peters, 1996). Moléculas ancestralmente relacionadas à superfamília da albumina, em contrapartida, parecem ser normalmente dotadas de grupos prostéticos ou aditivos, como é demonstrado pelo padrão de glicosilação em uma das duas isoformas de albumina encontradas em anfíbios do gênero *Xenopus* e em proteínas similares à albumina, descritas em lampreias (Peters, 1996).

Remetendo à literatura (Cuasnicú et al., 1984; Carles et al, 1992; Fournier-Delpech et al., 1997) e ao próprio fundamento iniciado com o anticorpo anti-TRA 54 (Pereira et al., 1998; Arroiteia et al., 2004) neste grupo de pesquisa, a provável complexação da albumina a grupamentos glicídicos (e.g. PES) e o assim possível papel desempenhado por tais

complexos nos mecanismos de fecundação têm somado evidências à importância da albumina nos mecanismos de interação oócito-espermatozoide. O diversificado padrão de expressão da albumina aqui relatado para o trato reprodutor masculino, entretanto, suscita e embarga novas hipóteses quanto à amplitude de processos biológicos suportados por essa proteína, se não como fator primário, como facilitador de eventos. Várias funções têm sido atribuídas à albumina, como carreador de esteroides, estimulador das células de Leydig, promotor de proliferação celular e mediador de mudanças estruturais das membranas celulares (Carles et al, 1992; Shamay et al., 2005) e, se é possível hipotetizar, um agente integrador dos complexos mecanismos envolvidos na gametogênese masculina e, assim, indiretamente, no sucesso reprodutivo de uma espécie, no caso desse estudo, murinos.

6.

Conclusões

Sobre a origem da albumina

As validações dos perfis imunológico e de imunolocalização corroboram com dados da literatura direcionando a discussão para o dualismo quanto à procedência da forma funcional proteica que pode ter origem alóctone ou autóctone, i.e. albumina sérica sintetizada no fígado ou sintetizada de novo no trato reprodutor masculino.

A constante associação da albumina com tecidos conjuntivos ricamente vascularizados e a não detecção dessa em tecidos com baixo suprimento sanguíneo reforçam a teoria alóctone.

A detecção de RNAm para o gene da albumina em órgãos do trato reprodutor masculino representa um reforço proeminente da teoria autóctone.

Adicionalmente, a ausência de imunorreatividade epitelial ao Apc anti-albumina em NAR sugere uma possível repressão em algum ponto da via autóctone, enquanto que o encaminhamento da albumina por vias séricas é reforçado pela fraca detecção de albumina no interstício de testículo e epidídimo.

Reitera-se, portanto, a não exclusão da teoria alóctone ou autóctone.

Sobre a distribuição da albumina

Perfis de expressão da albumina em ratos SD e camundongos C57BL/6 demonstram similaridades e desvios, reforçando a complexidade da regulação da via de expressão e distribuição autóctone, sendo evidente para o SD mas não para o C57BL/6 a íntima associação entre a célula de Sertoli e a albumina.

Dados relativos ao desenvolvimento pós-natal, quanto ao estabelecimento das BHT e BHE (períodos neonatal, pré-puberal e puberal), bem como às alterações em sua integridade (período idoso) sugerem a importância desse componente na distribuição alóctone da albumina.

Para todos os órgãos do trato reprodutor masculino analisados, fica evidente que o período adulto representa não somente o auge de expressão da albumina, mas também o momento de maior complexidade dos perfis de imunomarcagem.

Sobre a correlação da albumina e o epítipo reconhecido pelo Amc TRA 54

O estudo dos perfis de caracterização da expressão da proteína albumina, de modo geral, mais amplos que os determinados pelo epítipo reconhecido pelo Amc TRA 54, devem contribuir, em uma análise futura, para a delimitação de processos e funcionalidades convergentes entre as formas conjugada e isolada da albumina no trato reprodutor masculino.

Sobre perspectivas de continuidade desse estudo

A execução desse trabalho reforça e alicerça o entendimento da literatura associada ao estudo da expressão da albumina, de forma que, a partir desse ponto, novos questionamentos do enfoque funcional nos processos da espermatogênese característicos a cada órgão do trato reprodutor masculino justificam-se.

7.

Pranchas de imagens

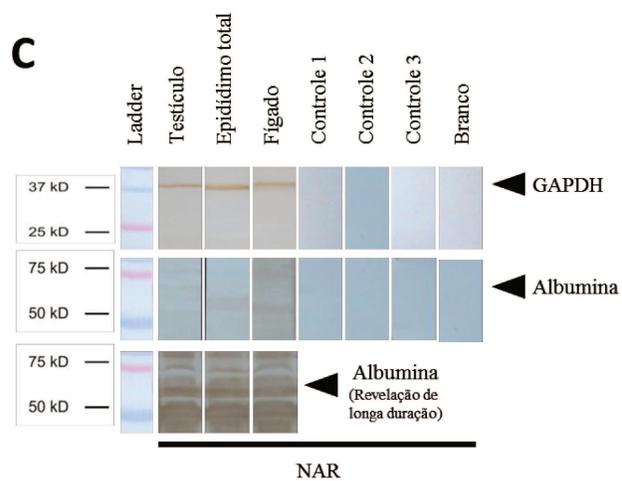
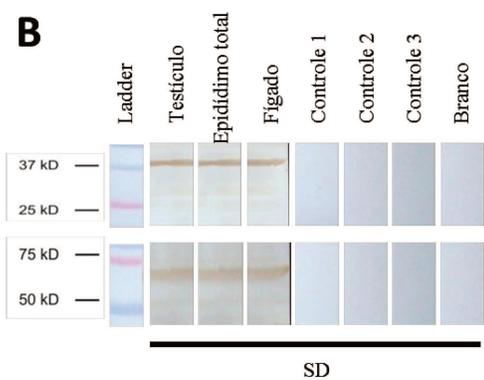
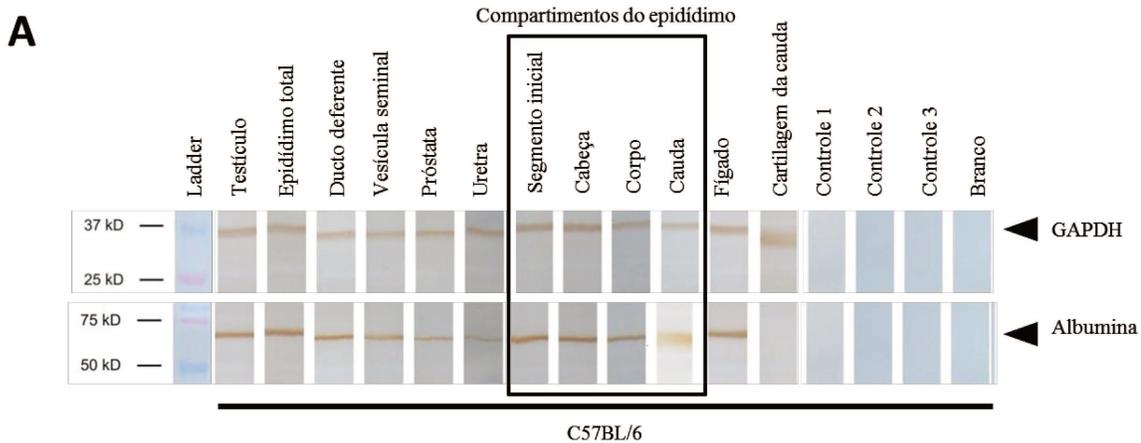


Figura 7.1 Ensaio representativos da validação do perfil imunológico (western blot) das proteínas GAPDH e albumina em amostras de órgãos.

(A) Camundongos C57BL/6 de 60dpp (B) ratos SD de 75dpp e (C) NAR de 75dpp. Os ensaios realizados com o Apc anti-GAPDH para validação da preservação antigênica de todas as amostras evidenciaram banda de PM correspondente ao predito para a proteína GAPDH (37KDa). Os ensaios realizados com o Apc anti-albumina evidenciaram banda de PM correspondente ao da proteína albumina (67KDa) para (A) Fígado e órgãos do trato reprodutor masculino, mas não para cartilagem da cauda de camundongos, (B) Fígado, testículo e epidídimo total de ratos SD. (C) Em NAR o ensaio padrão não revelou bandas, enquanto que ensaios com ausência de bloqueio e tempo prolongado de exposição evidenciaram gradiente de bandas que se aproximam do PM predito para albumina em amostras de fígado e testículo e epidídimo total. Os controles negativos (omissão de anticorpos primários) 1, 2 e 3 foram realizados com amostras de fígado, testículo e epidídimo respectivamente. Branco representa extrato de fígado incubado com os reagentes DAB/peróxido de hidrogênio utilizados na revelação de reações imunológicas (western blot).

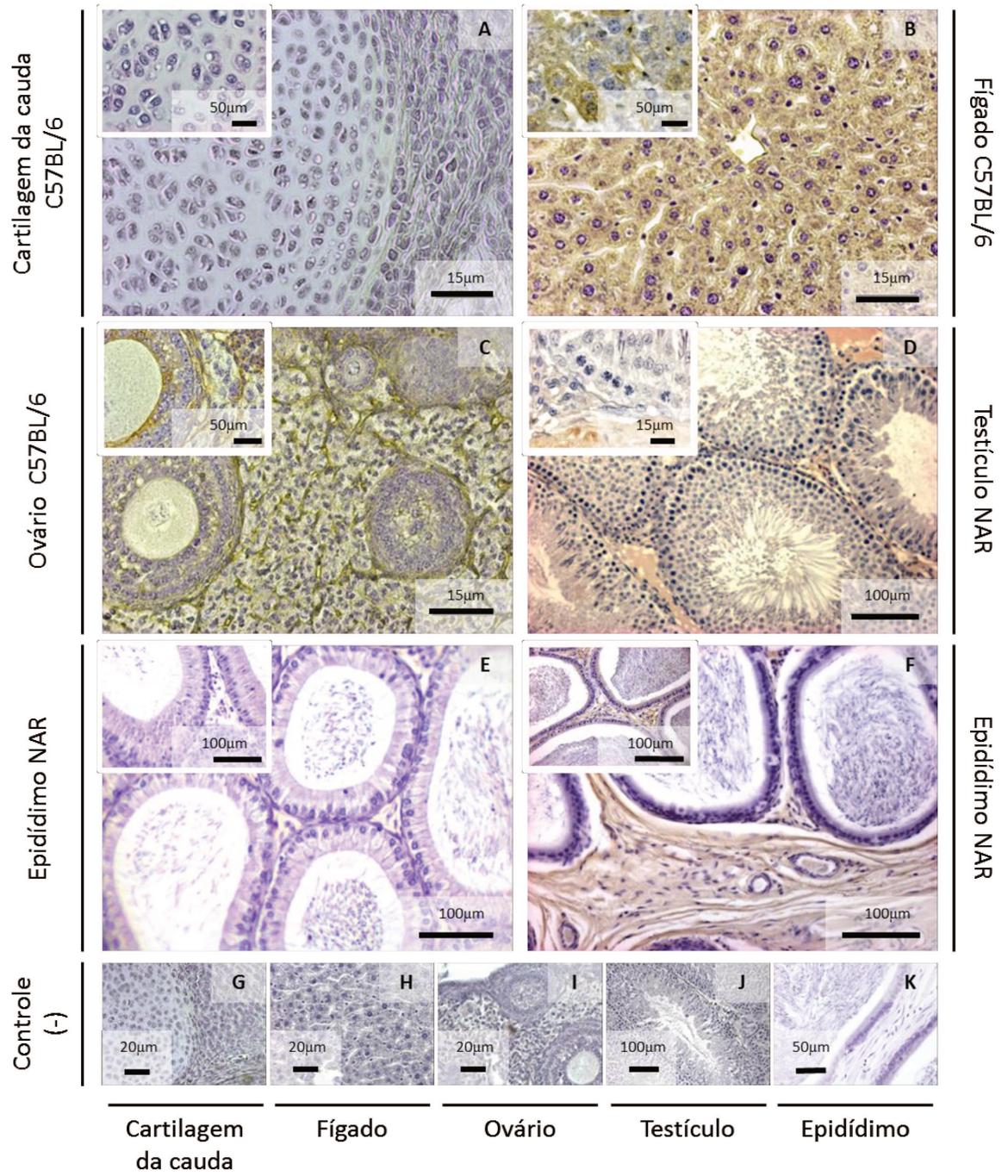


Figura 7.2 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos tomadas como controle.

(A) Como controle negativo, tecidos cartilagosos da cauda de camundongo C57BL/6 60dpp não apresentaram traços relevantes de albumina, não evidenciando imunorreatividade ao Apc anti-albumina. No detalhe maior aumento permite validar a não detecção de albumina no componente celular (condrócitos) ou na matriz extracelular do tecido. (B – C) Imunorreatividade para Apc anti-albumina foi detectada em hepatócitos do fígado e no estroma ovariano, respectivamente, de camundongos C57BL/6, 60dpp. Nos detalhes (B) o perfil granular da albumina nos hepatócitos e (C) a imunorreatividade de células foliculares e da zona pelúcida de Ovócito I. (D – E) amostras de tecidos de NAR de 75dpp. O quadro de analbuminemia se reflete na não detecção de traços de albumina em regiões de tecido epitelial. (D) No testículo é evidente a imunorreatividade do interstício ao Apc anti-albumina. No detalhe, note a total ausência de marcação do epitélio do túbulo seminífero. (E) Compartimentos da cabeça e, no detalhe, segmento inicial, evidenciam a não marcação epitelial e sutil imunorreatividade do interstício; (F) Compartimentos da cauda e, no detalhe, corpo, revelam, para regiões de interstício, imunorreatividade mais evidente. (G – K) Controles negativos das reações de imunohistoquímica por omissão de anticorpo primário para sequencia de amostras: (G) cartilagem da cauda, (H) fígado e (I) ovário de camundongo C57BL/6 60dpp; (J) testículo e (K) compartimento da cauda de epidídimo de NAR 75dpp.

Controle (-)

Testículo C57BL/6
(60dpp)

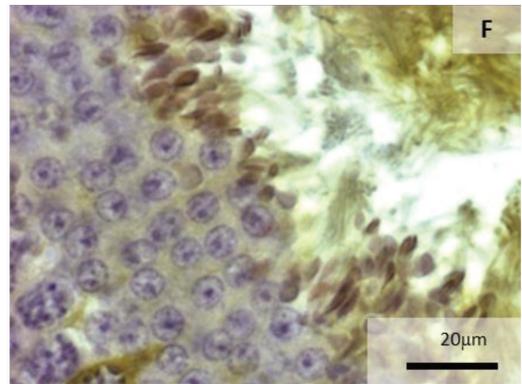
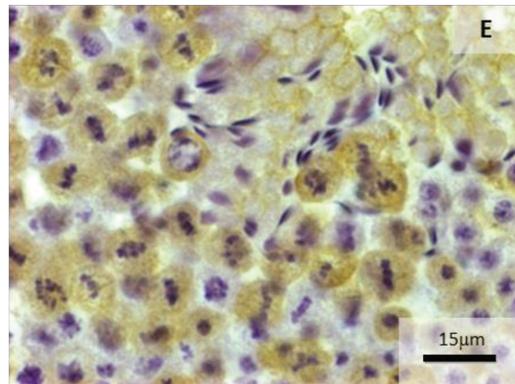
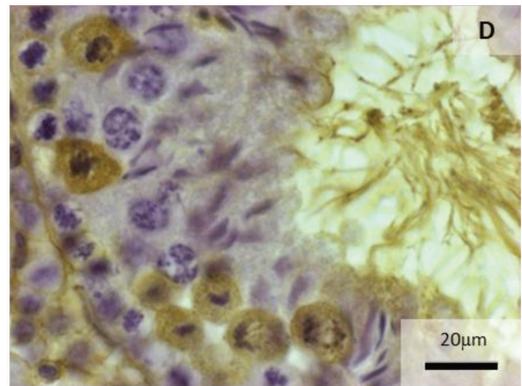
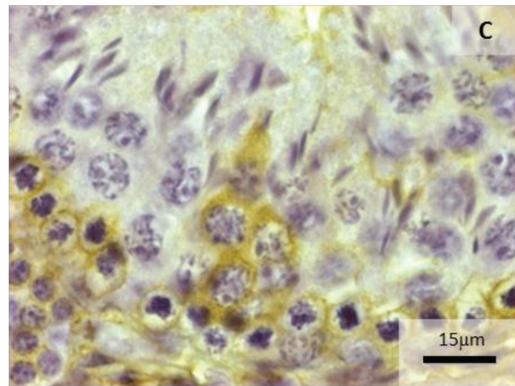
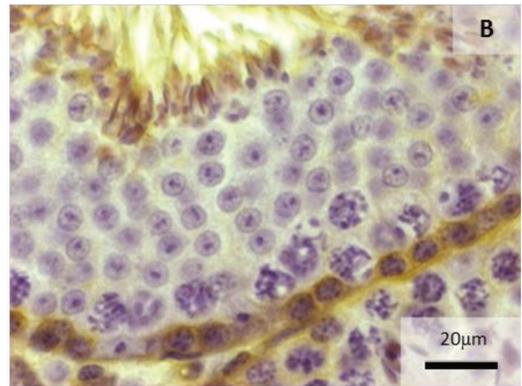
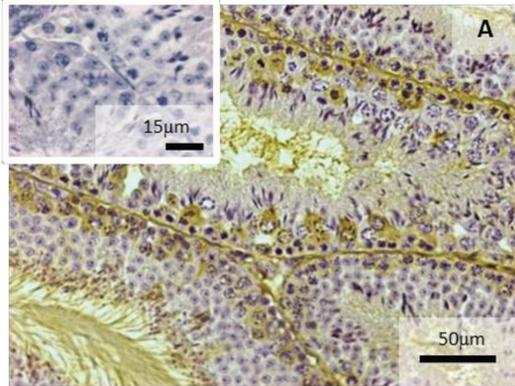


Figura 7.3 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de testículo de camundongo C57BL/6 adultos (60dpp).

(A) Fotomicrografia panorâmica, destacando a imunorreatividade tanto do interstício quanto do epitélio seminífero ao Apc anti-albumina. Note a imunomarcagem de células em diferentes estádios da linhagem germinativa. No detalhe, controle negativo da reação imunohistoquímica por omissão de anticorpo primário. (B) Imunorreatividade de células associadas ao compartimento basal (espermatócitos pré-leptóteno) e espermátides tardias na porção apical do compartimento adluminal. (C) Agrupamento (cluster) de espermatócitos imunorreativos ao Apc anti-albumina em fase precoce do ciclo celular. A provável imunomarcagem do citoplasma das células de Sertoli é evidenciada pelo perfil de forma de halo. (D) Espermatócitos I em diferentes fases do ciclo celular evidenciam a imunorreatividade ao Apc anti-albumina associado a eventos de divisão celular. Espermatozoides livres na luz do túbulo são evidenciados pela imunomarcagem. (E) Secção de túbulo seminífero em meiose II evidencia a imunorreatividade de espermatócitos II e espermátides precoces ao Apc anti-albumina. (F) Secção de túbulo seminífero em espermiogênese evidencia a imunorreatividade exclusiva de células da linhagem germinativa posterior ao estágio de espermátide tardia.

Epidídimo C57BL/6
(60dpp)

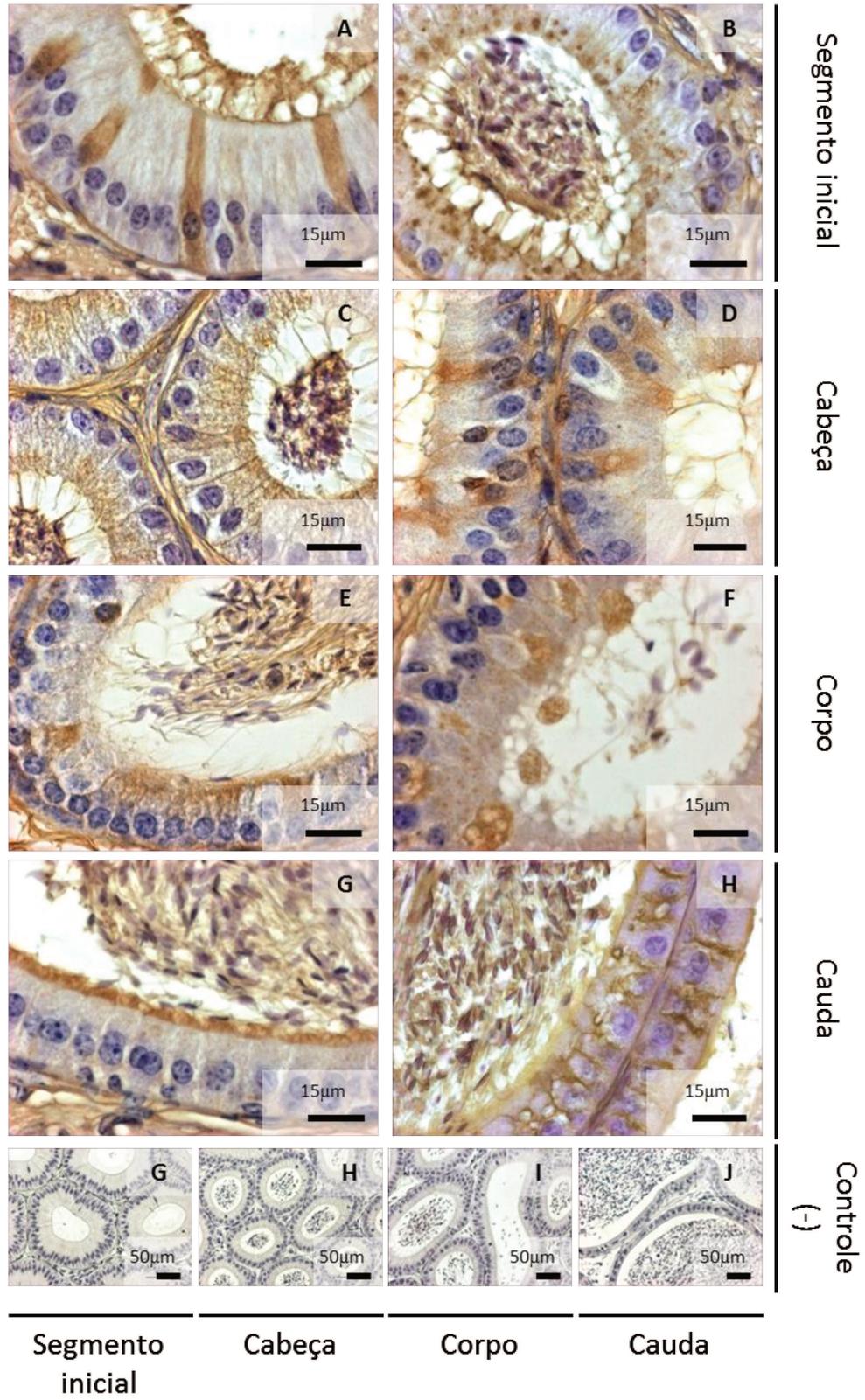


Figura 7.4 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de epidídimo de camundongo C57BL/6 adultos (60dpp).

Além da imunorreatividade do interstício epididimário ao Apc anti-albumina, células epiteliais do ducto epididimário evidenciaram diferentes perfis de imunomarcção para a proteína albumina. (A - B) segmento inicial (C - D) cabeça; (E - F) corpo e (G - H) cauda do epidídimo. (A) Células imunorreativas distinguem-se das não-imunorreativas, pelo perfil de imunomarcção de corpo celular total para albumina. A região de estereocílios também se apresenta imunorreativa para o Apc anti-albumina; (B) Células epiteliais apresentam imunomarcção em grânulos supranucleares e na região de estereocílios, além da nítida imunorreatividade dos espermatozoides luminais. (C) O mesmo perfil evidenciado em (B) se repete, porém, a marcação granular aqui evidenciada parece apresentar-se com diâmetro reduzido; (D) Retomada da imunomarcção de corpo celular total. (E) Imunomarcção de espermatozoides luminais, da região de estereocílios e de corpo celular total; (F) Imunomarcção revela a formação e liberação de protusões citoplasmáticas. (G) Evidencia uniformidade da imunomarcção da região de estereocílios e dos espermatozoides luminais; (H) destaca perfil de marcação periférica com sugestão da presença de albumina na via paracelular. (G - J) Controle negativo da reação de imunohistoquímica por omissão de anticorpo primário para compartimentos do segmento inicial, cabeça, corpo e cauda, respectivamente.

SD (75dpp)

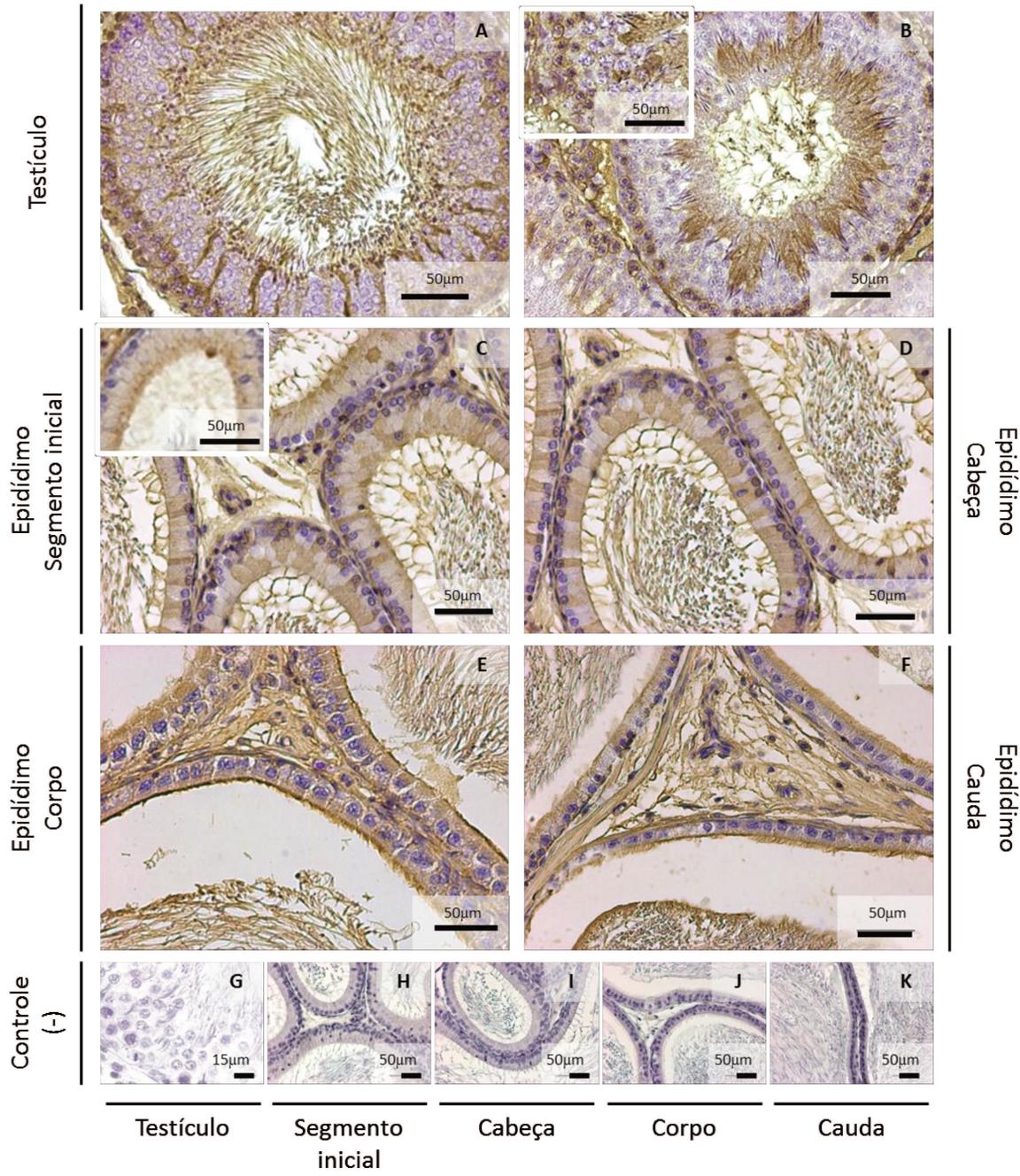


Figura 7.5 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de testículo e epidídimo de ratos SD adultos (75dpp).

(A–B) Testículo. (A) Imunorreatividade das espermatídes, células do compartimento basal e das células de Sertoli, destacando processos de extravasamento (leakage, citoplasma Sertoli) que atravessam todo o compartimento adluminal; (B) Além da forte associação do interstício com a albumina, caudas das espermatídes alongadas e células do compartimento basal mostram-se imunomarcadas. No detalhe, observe a imunomarcção de espermatócitos em diferentes fases do ciclo celular. (C–F) Compartimentos epididimários com epitélio e interstício imunoreativo ao Apc anti-albumina: (C) Segmento inicial. A imunorreatividade ao Apc anti-albumina é observada em células epiteliais com perfil de corpo celular total, região de estereocílios e espermatozoides luminais. No detalhe, imunomarcção evidencia grânulos apicais de albumina; (D) Cabeça. Região de estereocílios e espermatozoides luminais e células com perfil de imunomarcção de corpo celular total para albumina; (E) Corpo. Imunorreatividade de células epiteliais com perfil de grânulos supranucleares, região de estereocílios e espermatozoides luminais; (F) Cauda. Imunomarcção da região de estereocílios e espermatozoides, além de sugestão de imunorreatividade de grânulos da região supranuclear. (G–K) Controle negativo da reação de imunohistoquímica por omissão de anticorpo primário para testículo: compartimentos de segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo, respectivamente.

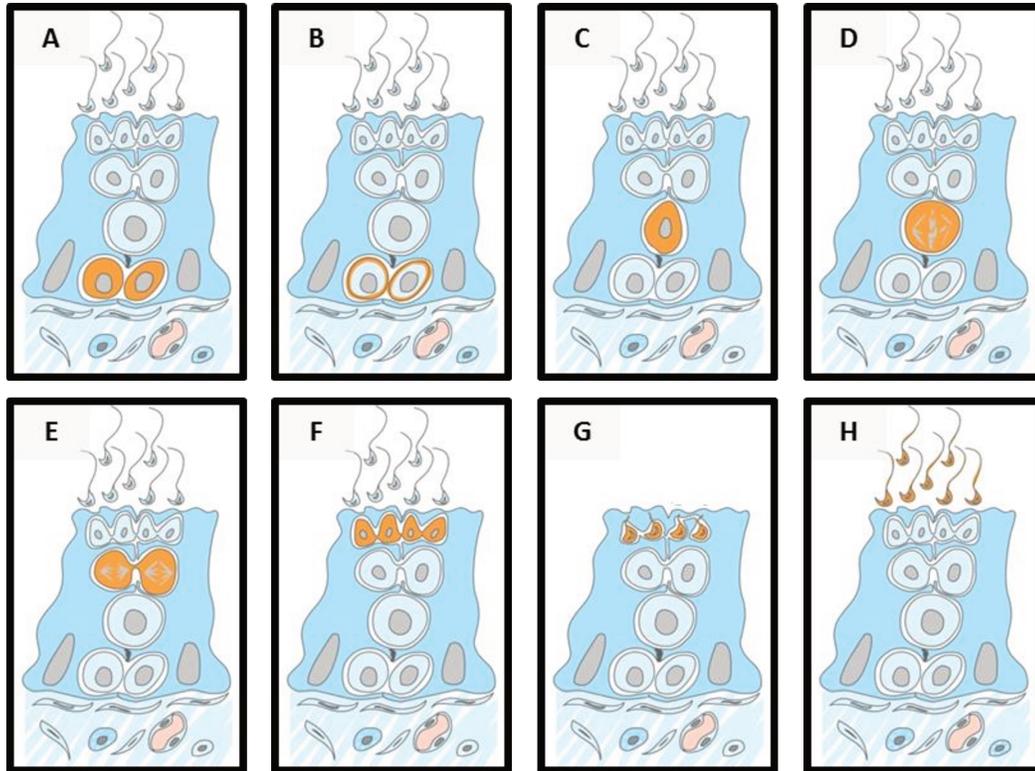


Figura 7.6 Ilustrações esquemáticas dos diferentes perfis de imunomarcção para albumina associados às células da linhagem germinativa em testículos de camundongos C57BL/6 adultos (60dpp).

(A) Espermatogônias com albumina evidenciada em todo o citoplasma (ver análogo em Figura 7.3 B); (B) espermatogônias com perfil de distribuição da albumina em halo (ver análogo em Figura 7.3C); (C) espermatócito I com morfologia fusiforme e em fase precoce do ciclo celular com imunomarcção citoplasmática (ver análogo em Figura 7.3C); (D) espermatócito I com morfologia arredondada e em fase avançada do ciclo celular com imunomarcção citoplasmática (ver análogo em Figura 7.3D); (E) Espermatócito II com morfologia arredondada em fases avançadas de divisão celular (ver análogo em Figura 7.3E); (F) espermatócitos arredondados, com imunomarcção citoplasmática (ver análogo em Figura 7.3E); (G) espermátide tardia com imunomarcção citoplasmática (ver análogo em Figura 7.3B e F); (H) espermatozoides livres na luz do túbulo seminífero com imnumarcção positiva para albumina ((ver análogo em Figura 7.3A). A observação dos ensaios de imunohistoquímica para Apc Anti-albumina revelam a possibilidade de diversas combinações dos perfis esquematizados (Figura 7.6A – H).

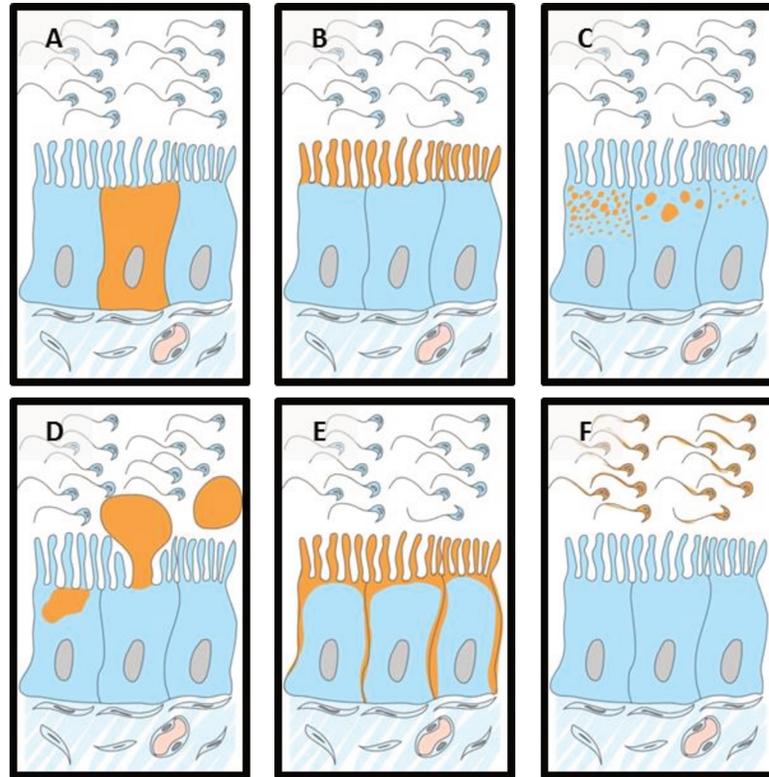


Figura 7.7 Ilustrações esquemáticas dos diferentes perfis de imunomarcção para albumina associados às células epiteliais dos diferentes compartimentos epididimários de camundongos C57BL/6 adultos (60dpp).

(A) Algumas células distinguem-se das células vizinhas por apresentar imunomarcção de corpo celular total para albumina (ver análogo em Figura 7.4A, D e E). (B) A região de estereocílios apresenta-se imunoreativa para o Apc anti-albumina. Geralmente esse perfil se repete para células vizinhas (ver análogo em Figura 7.4A, B, E e G). (C) grânulos supranucleares contendo albumina se distribuem em um amplo espectro de organização (ver análogo em Figura 7.4B e C). (D) Formação e liberação de protusões da superfície celular (buds) que constam de albumina (ver análogo em Figura 7.4F); (E) perfil periférico que sugere a presença de albumina na via paracelular (ver análogo em Figura 7.4H); (F) espermatozoides luminais imunorreativos para o apc anti-albumina (ver análogo em Figura 7.4B, C, E, G, H). A observação dos ensaios de imunohistoquímica para Apc Anti-albumina revelam a possibilidade de diversas combinações dos perfis esquematizados (Figura 7.7A – H).

C57BL/6 (60dpp)

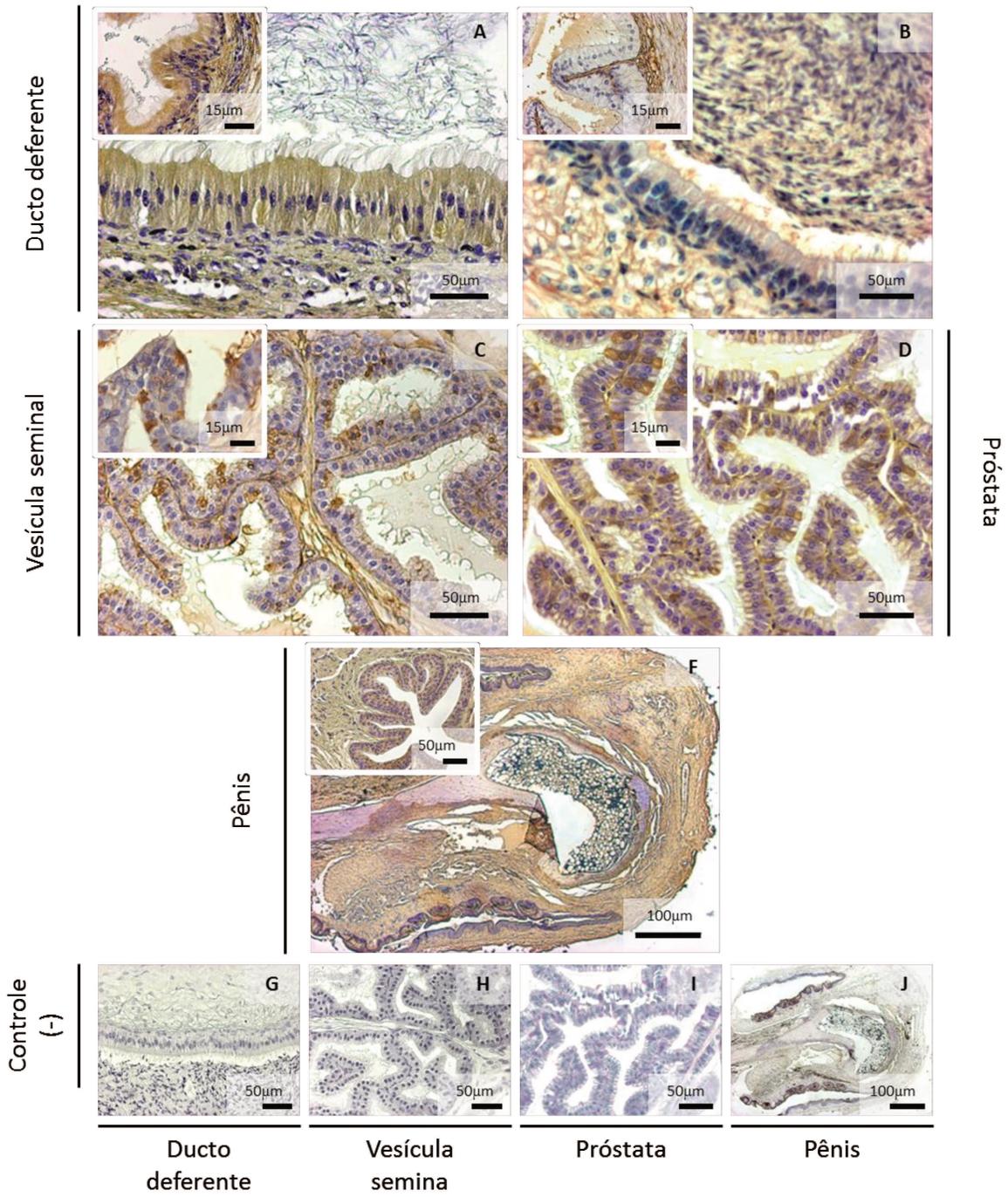
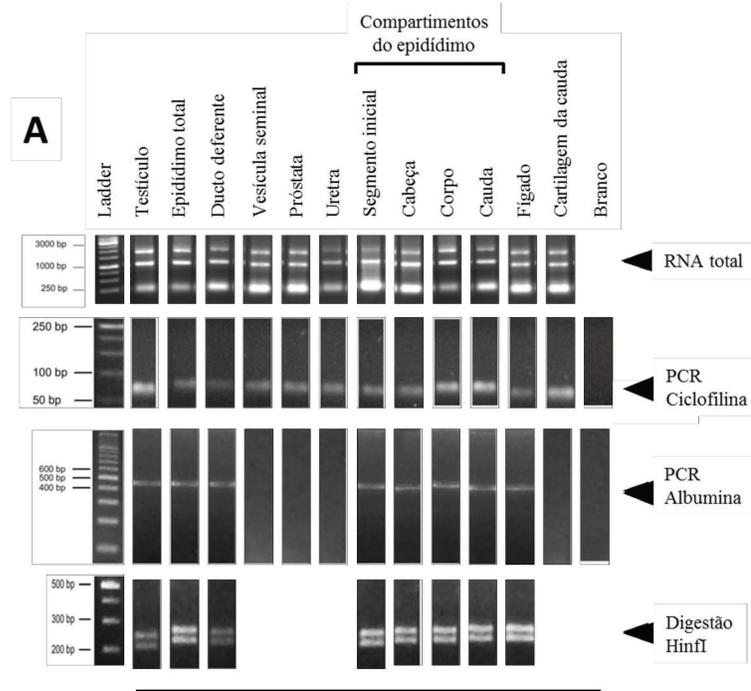


Figura 7.8 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de ducto deferente, vesícula seminal, próstata e pênis de camundongos C57BL/6 adultos (60dpp).

(A) Ducto deferente, porção proximal ao epidídimo em corte longitudinal. Observe o estroma imunorreativo ao Apc anti-albumina e imunomarcção de corpo celular total das células epiteliais. Não é evidenciada a presença da proteína albumina na região de estereocílios e para os espermatozoides luminiais. No detalhe, corte transversal da mesma porção do ducto deferente. (B) Ducto deferente, porção distal ao epidídimo em corte longitudinal. Observe o estroma imunorreativo ao Apc anti-albumina e imunomarcção de restrita a região de estereocílios e aos espermatozoides livres na luz do órgão. Não é evidenciada a presença da proteína albumina no corpo celular do epitélio de revestimento interno do órgão. No detalhe, corte transversal da mesma porção do ducto deferente. (C) Vesícula seminal e (D) próstata revelam imunomarcção que evidencia a presença da albumina no estroma do órgão e em algumas poucas células epiteliais, nesse caso, revelando uma imunomarcção de corpo celular total. Nos respectivos detalhes, aumentos que favorecem a observação da imunomarcção epitelial para albumina. (F) Pênis com imuno marcação conspicua para todo o estroma, exceto peça cartilaginosa e óssea. No detalhe, a imunorreatividade ao Apc anti-albumina em células epiteliais da uretra peniana. Controle negativo da reação de imunohistoquímica por omissão de anticorpo primário para ducto deferente, vesícula seminal, próstata e pênis, respectivamente.



C57BL/6

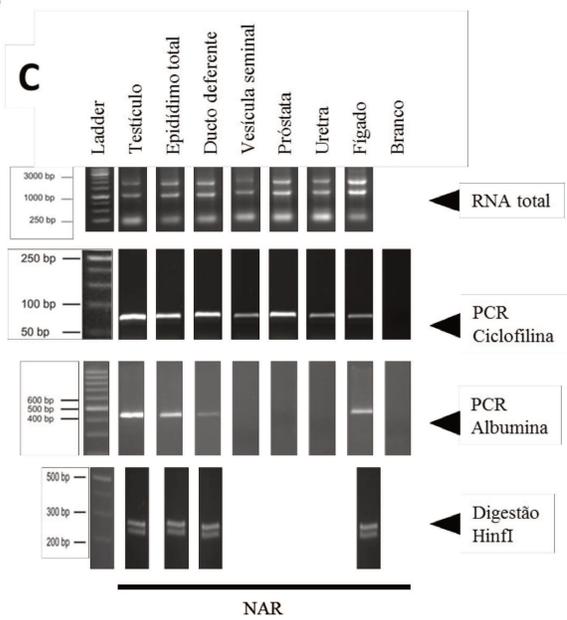
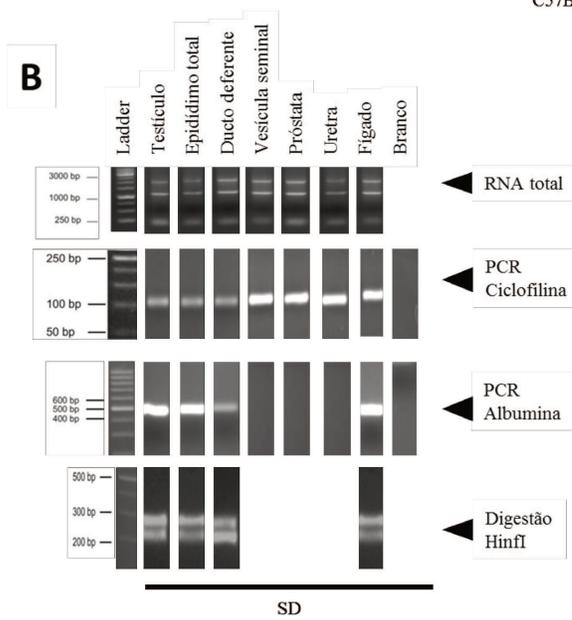


Figura 7.9 *Ensaio representativo da validação do perfil transcricional para RNAm de albumina (RT-PCR) dos genes para GAPDH, ciclofilina e albumina em órgãos do trato reprodutor masculino, fígado e tecido cartilaginoso (cauda).*

(A) Camundongos C57BL/6 de 60dpp (B) ratos SD de 75dpp e (C) NAR de 75dpp. Os ensaios realizados para genes constitutivos GAPDH e Ciclofilina confirmam o sucesso da extração de RNAm e a integridade das amostras de DNAc utilizadas. Os ensaios com os três modelos animais realizados para detecção de transcritos do gene da albumina confirmaram a presença de respectivo RNAm nos órgãos testículo, epidídimo – incluindo para camundongos a compartimentalização em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda – e ducto deferente. O perfil de digestão do produto de PCR pela enzima de restrição HinfI confirmou a identidade da molécula para albumina. A técnica de RT-PCR não indicou a presença de RNAm para albumina nos demais órgãos analisados.

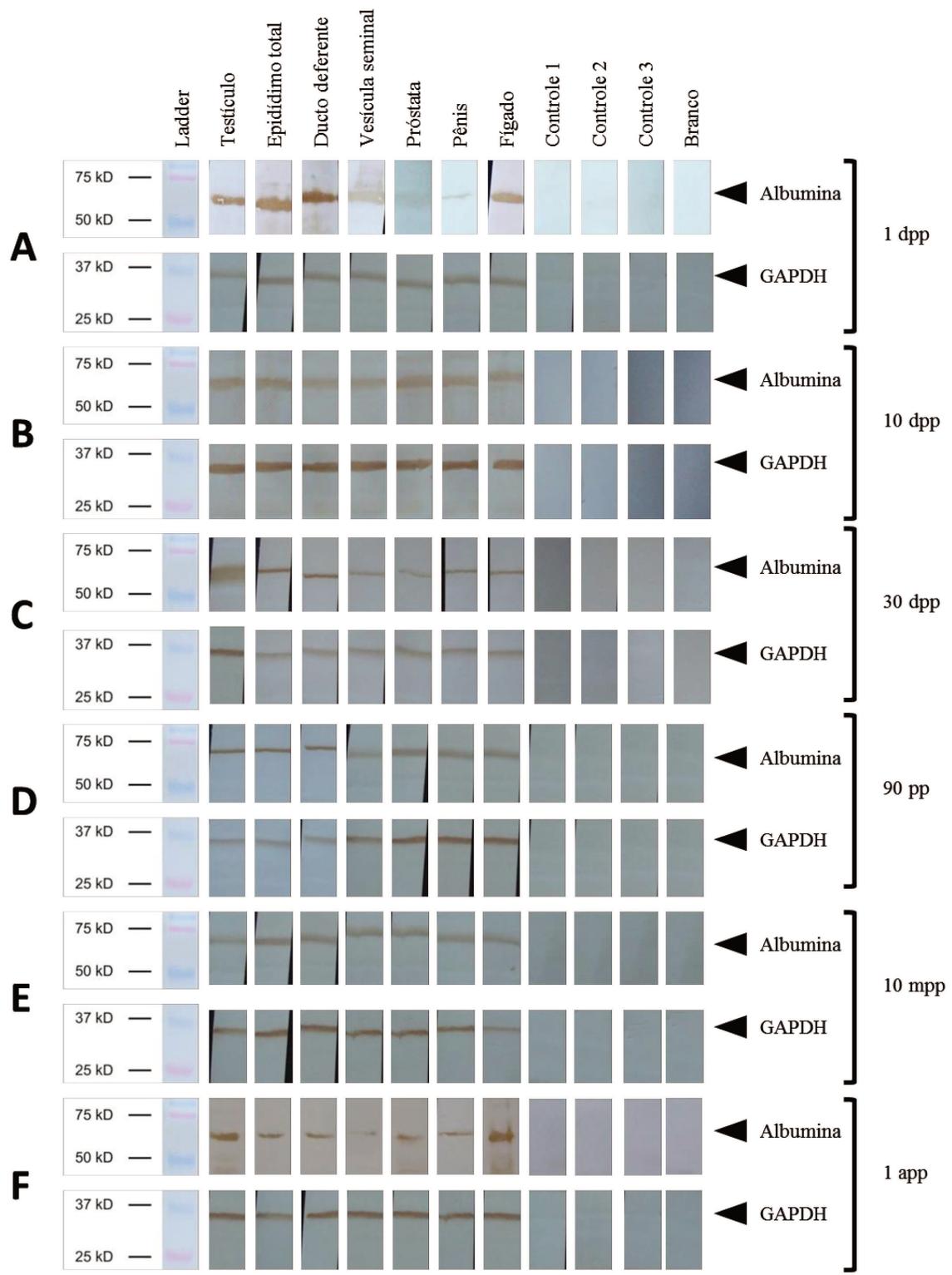


Figura 7.10 Ensaio representativo da validação do perfil imunológico (western blot) das proteínas GAPDH e albumina em fígado e órgãos do trato reprodutor masculino de camundongos C57BL/6 em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.

Os ensaios realizados com o Apc anti-GAPDH para validação da preservação antigênica de todas as amostras evidenciaram banda de PM correspondente ao da proteína GAPDH (37kDa). Os ensaios realizados com o Apc anti-albumina evidenciaram banda de PM correspondente ao da proteína albumina (67kDa) para (A) período neonatal (1dpp) revelou banda consistente para fígado, testículo, epididimo, ducto deferente e vesícula seminal. Bandas fracas são visualizadas para próstata e pênis, de forma que a presença de albumina não pode ser descartada. (B - E) período pré-puberal (10dpp) puberal (30dpp), adulto (90dpp) e idoso (10mpp) revelaram bandas imunorreativas ao Apc anti-albumina, evidenciando a presença da albumina no fígado e todos os órgãos do trato reprodutor nesses períodos. (F) No período idoso (1app) fica sugerida a redução da expressão proteica da albumina em todos os órgãos do trato reprodutor masculino. Os controles negativos (omissão de anticorpos primários) 1, 2 e 3 foram realizados com amostras de fígado, testículo e epidídimo, respectivamente. Branco representa extrato de fígado incubado com os reagentes DAB/peróxido de hidrogênio utilizados na revelação de reações imunológicas (western blot).

Testículo C57BL/6

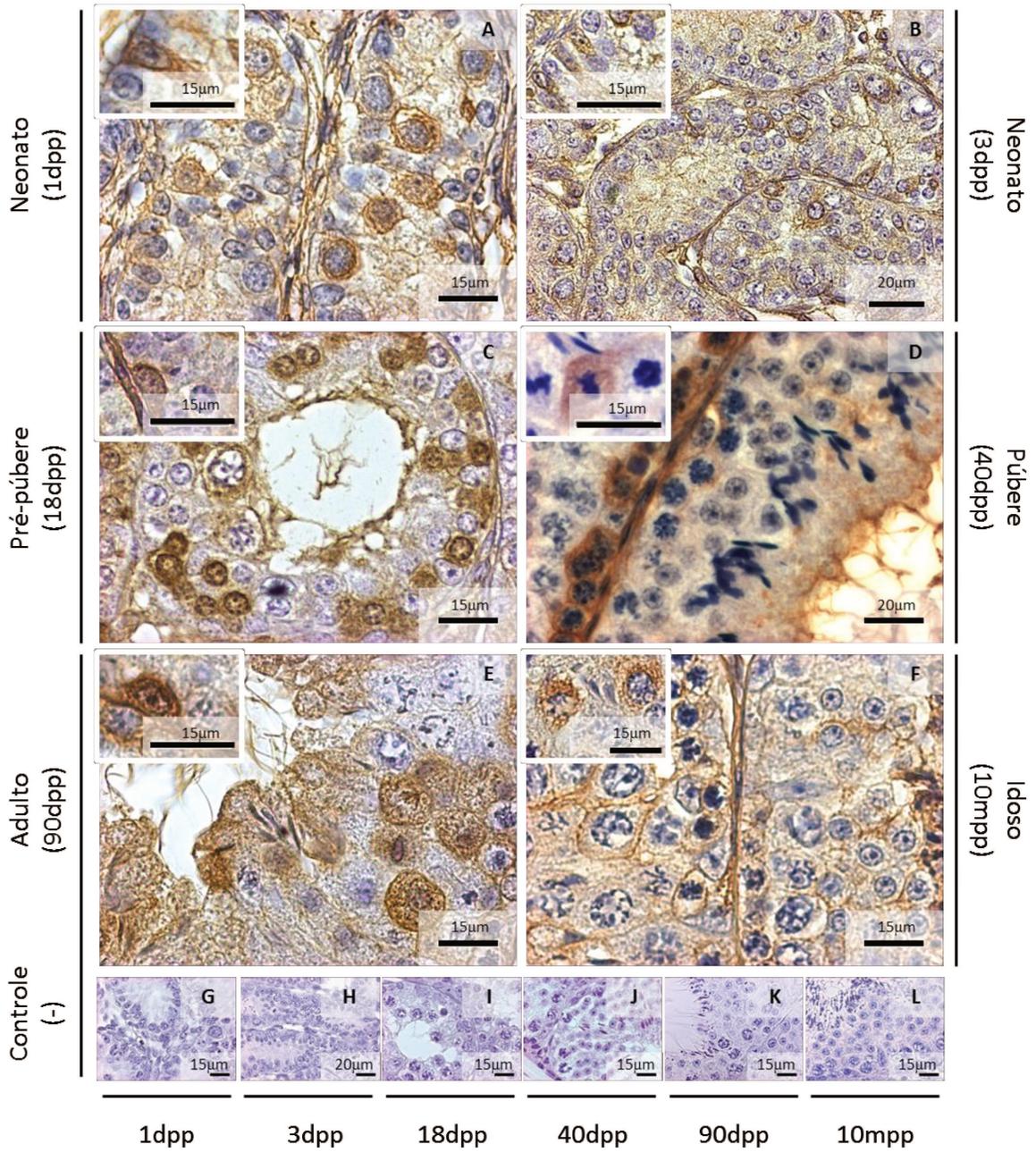


Figura 7.11 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos de testículos de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.

(A) 1dpp e (B) 3dpp – período neonatal. Gonócitos apresentam imunomarcacão citoplasmática para albumina, embora tal reatividade não seja notada para a totalidade dessa população celular. Nos detalhes, representações de célula de Sertoli imunorreativas ao Apc anti-albumina. (C) 18dpp – período pré-puberal. A imunomarcacão dos gonócitos para albumina prevalece. No detalhe, célula germinativa imunorreativa ao Apc anti-albumina está acomodada na região presuntiva do compartimento basal. (D) 40dpp – período puberal. Ampla imunomarcacão de espermaócitos Is no compartimento basal (ver ilustração análoga em Figura 7.6A). Para o compartimento adluminal prevalece a associaçãõ da albumina a espermatozoides luminais (ver ilustração análoga em Figura 7.6H). (E) 90dpp – período adulto. Imunomarcacão para albumina destaca células da linhagem germinativa nas fases de espermatócitos a espermátides (ver ilustração análoga em Figuras 7.6D e 7.6G e H, respectivamente). No detalhe exceçãõ à tendênciã geral de não-reatividade de célula de Sertoli ao Apc anti-albumina. (F) 10mpp – período idoso. O perfil de imunomarcacão citoplasmática dá lugar a imunomarcacão em regiãõ intercelular ou citoplasmática de Sertoli. (G – L) Controles negativos realizados com a omissãõ do anticorpo primário anti-albumina para grupos ordenados como 1ddp, 3dpp, 18dpp, 40dpp, 90dpp e 10mpp.

Epidídimo C57BL/6

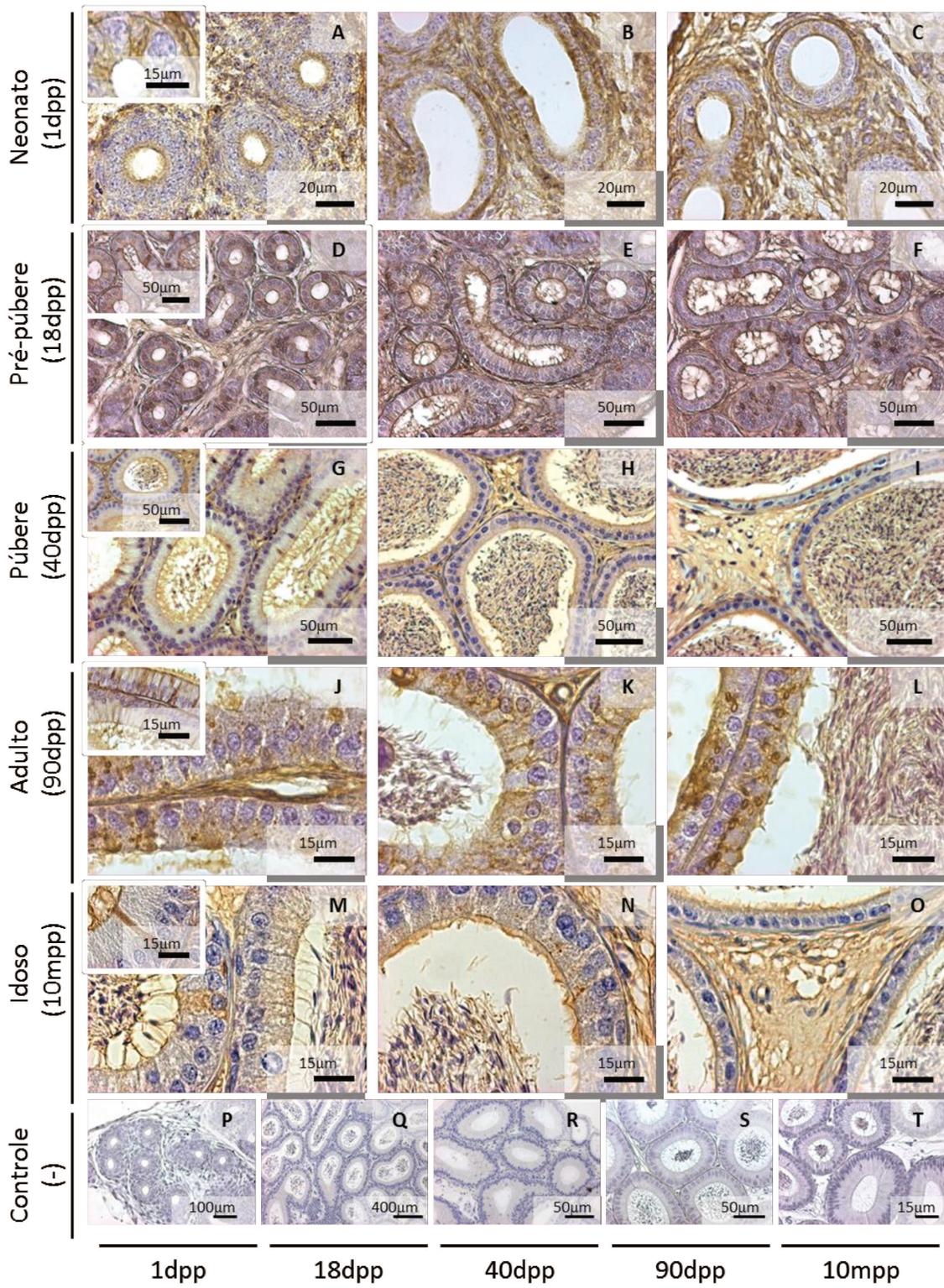


Figura 7.12 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos de epidídimo de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.

Durante todo o desenvolvimento pós-natal do órgão, o interstício mostra-se fortemente imunorreativo ao Apc anti-albumina. (A - C) 1dpp – período neonatal. (A) Região presuntiva de segmento inicial e cabeça com perfil de imunomarcacão na região de estereocílios (ver ilustração análoga em Figura 7.7B). No detalhe, sugestão do inicio da imunomarcacão de célula epitelial de corpo celular total (ver ilustração análoga em Figura 7.7A). Analogamente, em (B) região presuntiva do corpo evidencia discreta imunorreatividade de corpo celular total e região de estereocílios. (C) Somente o perfil de imunomarcacão da região de estereocílio é observado na região presuntiva de cauda. (D-F) 18dpp – período pré-puberal. Perfis de imunomarcacão de corpo celular total e da região de estereocílios nos compartimentos da (D) cabeça e, no detalhe, segmento inicial, (E) corpo e (F) cauda. (G-I) 40dpp – período puberal. Soma-se aos perfis possíveis de imunoreatividade ao Apc anti-albumina o de grânulos supranucleares (ver ilustração análoga em Figura 7.7C) – nesse caso, grânulos finos e bem distribuídos em todos os compartimentos e espermatozoides luminiais (ver ilustração análoga em Figura 7.7F) (G) Cabeça e, no detalhe, segmento inicial, (H) corpo e (I) cauda. (J-L) 90dpp – período adulto. Todos os perfis previamente descritos para o camundongo de 60 dpp (item 4.1) são observados nos compartimentos da (J) cabeça e, no detalhe, segmento inicial, (K) corpo e (L) cauda, inclusive perfis de formação e liberaçãõ de protusões da superfície celular (buds; ver ilustração análoga em Figura 7.7D) e sugestão da presença de albumina na via paracelular (ver ilustração análoga em Figura 7.7E). (M -O) 10mpp – período idoso. No envelhecimento, a imunorreatividade revela perfis de grânulos supranucleares, corpo celular total e na região de estereocílios (M) Cabeça e, no detalhe, segmento inicial, (N) corpo e (O) cauda. (P - T) Controles negativos realizados com a omissãõ do anticorpo primário anti-albumina para grupos ordenados como 1ddp, 18dpp, 40dpp, 90dpp e 10mpp.

Ducto deferente C57BL/6

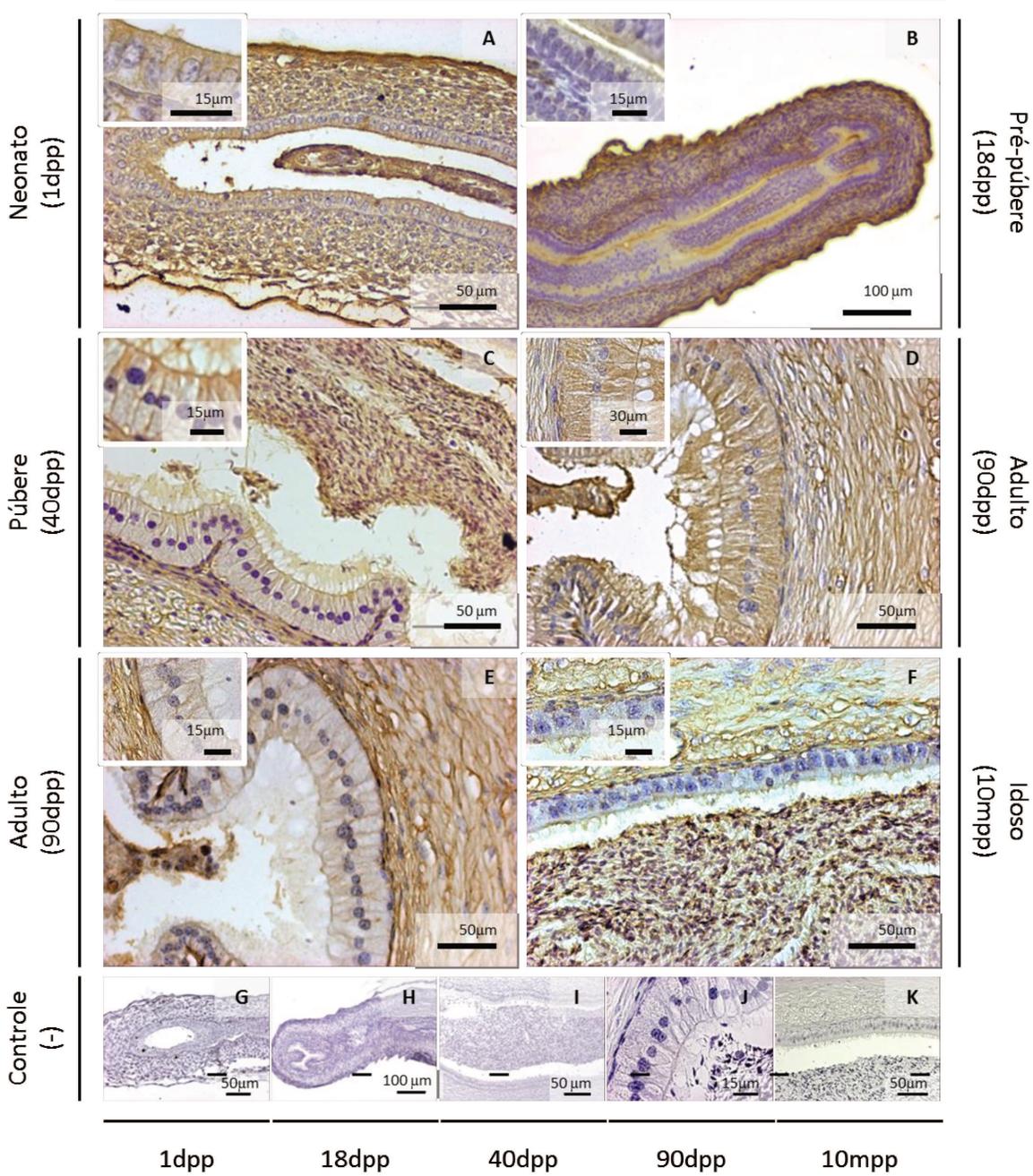


Figura 7.13 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos de ducto deferente de camundongos em diferentes estágios durante o desenvolvimento pós-natal.

Durante todo o desenvolvimento pós-natal do órgão o estroma mostra-se fortemente imunorreativo ao Apc anti-albumina. (A) 1dpp – Período neonatal. Células epiteliais imunomarcadas se revelam, no detalhe, com granulação supranuclear fina e bem distribuída. (B) 18dpp – Período pré-puberal. Imunorreatividade epitelial é traço ou não é identificada. (C) 40dpp – Período puberal. Células epiteliais de imunomarcção sutil e, no detalhe, com estereocílios bastante proeminentes e imunomarcados. (D –E) 90dpp – Período adulto. Cortes da região proximal e distal ao epidídimo, respectivamente, ambos com evidencias de imunomarcção. (D) Adicionalmente ao perfil descrito para a Figura 7.8A, o perfil da imunomarcção aqui evidenciado sugere novo perfil de imunomarcção, com corpo celular total, estereocílios e espermatozoides imunorreativos ao Apc anti-albumina. (E) Apenas espermatozoides apresentam-se imunorreativos. (F) 10mpp – Período idoso. Imunomarcção residual na região de estereocílios e de espermatozoides na luz do ducto. (G–K) Controles negativos realizados com a omissão do anticorpo primário anti-albumina para grupos ordenados como 1dd, 18dpp, 40dpp, 90dpp e 10mpp.

Vesícula seminal C57BL/6

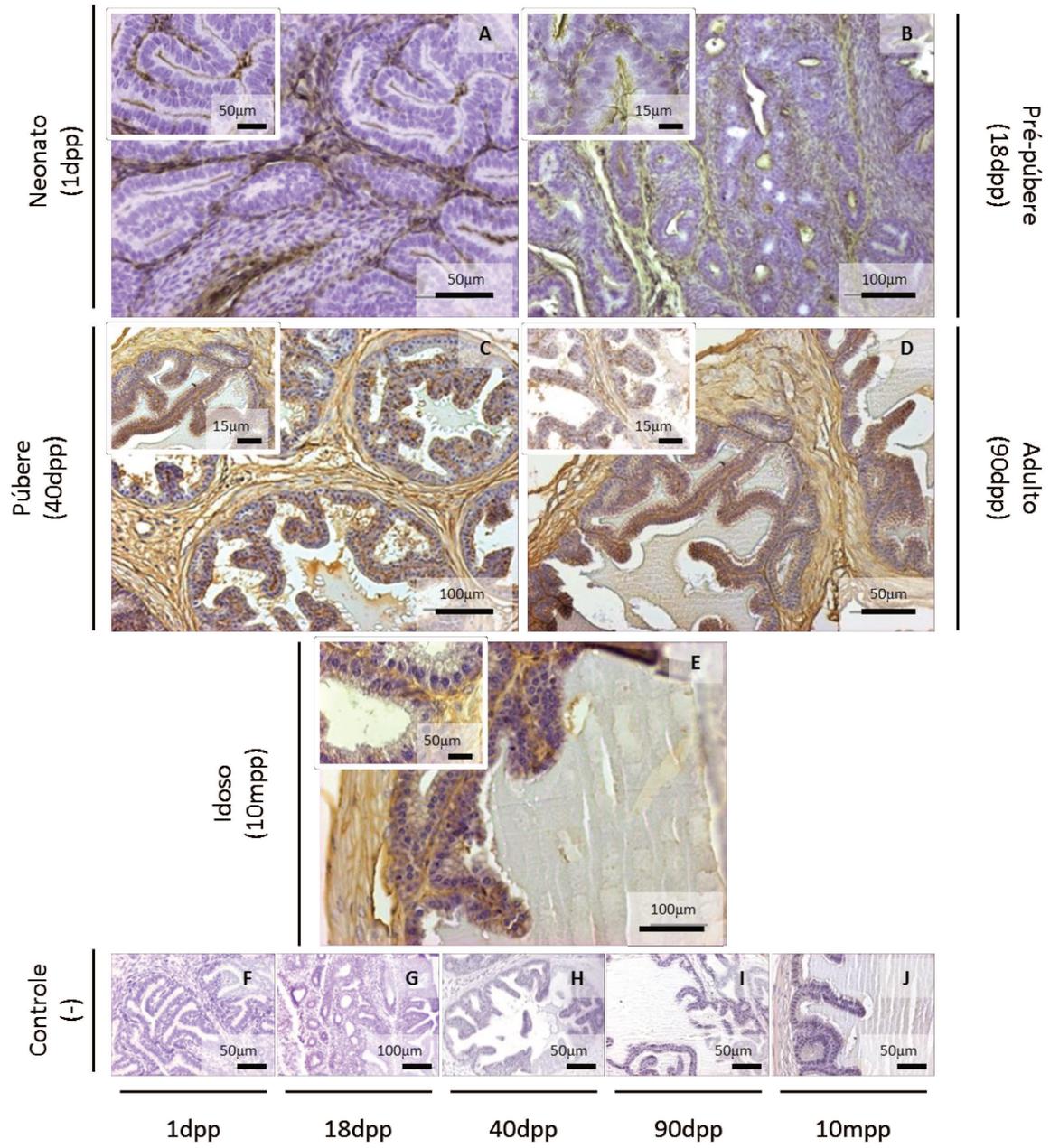


Figura 7.14 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos de vesícula seminal de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.

Durante todo o desenvolvimento pós-natal do órgão o estroma mostra-se fortemente imunorreativo ao Apc anti-albumina. (A-B) 1dpp e 18dpp – período neonatal e pré-puberal, respectivamente. Células epiteliais não evidenciam imunoreatividade. (C–D) 40dpp e 90dpp – período puberal e adulto, respectivamente. Algumas células distinguem-se das células vizinhas por apresentar imunomarcação de corpo celular total para albumina. (E) 10mpp – período idoso. Células epiteliais voltam a não evidenciar imunorreatividade ao Apc anti-albumina. (F–J) Controles negativos realizados com a omissão do anticorpo primário anti-albumina para grupos ordenados como 1ddp, 18dpp, 40dpp, 90dpp e 10mpp.

Próstata C57BL/6

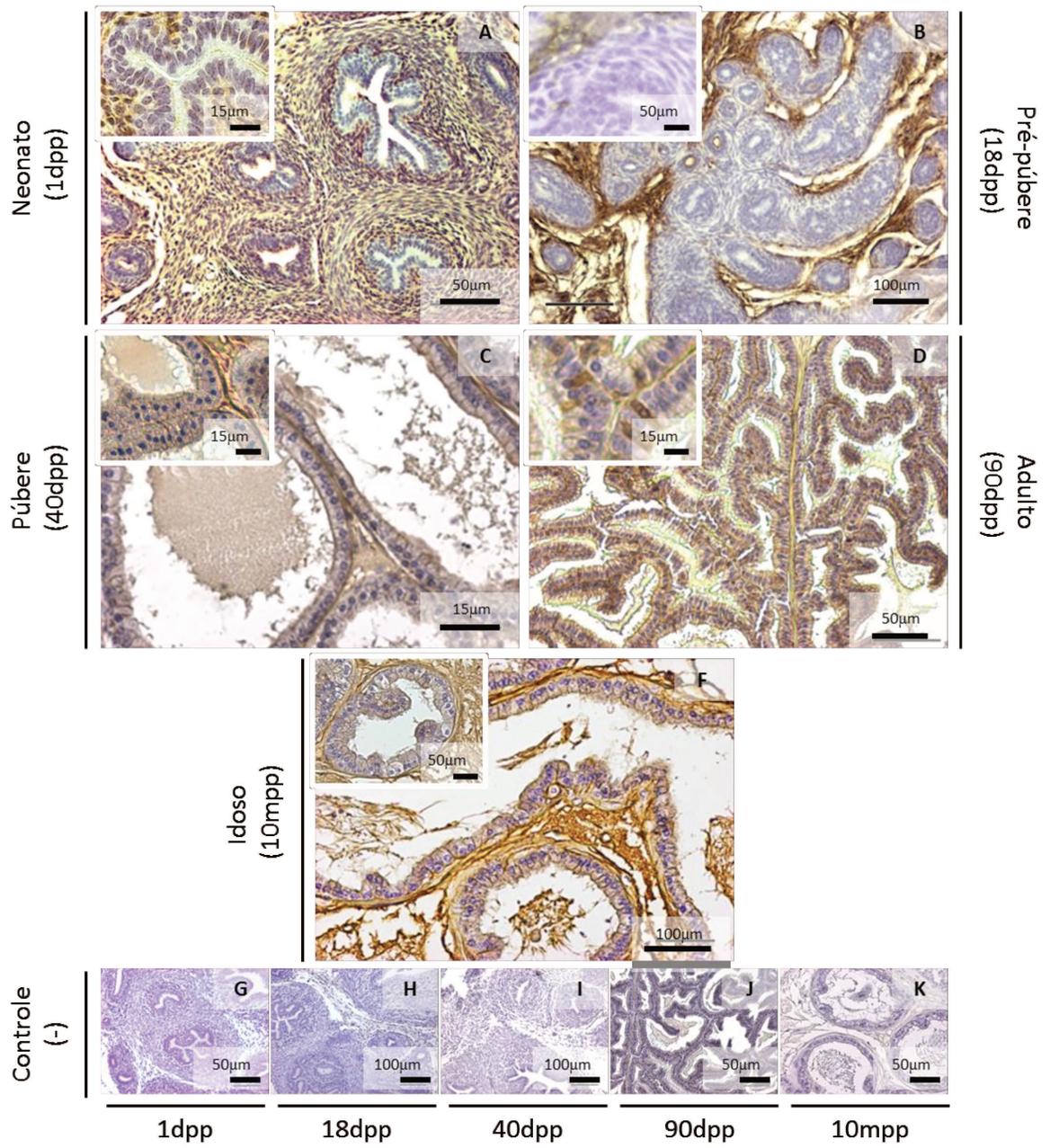


Figura 7.15 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos de próstata de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.

Durante todo o desenvolvimento pós-natal do órgão o estroma mostra-se fortemente imunorreativo ao Apc anti-albumina. (A-C) 1dpp, 18dpp e 40 dpp – períodos neonatal, pré-puberal e puberal, respectivamente. Células epiteliais não evidenciam imunoreatividade. (D) 90dpp – período adulto. Algumas células distinguem-se das células vizinhas por apresentar imunomarcção de corpo celular total para albumina. (E) 10mpp – período idoso. Células epiteliais retomam não-imunorreatividade ao Apc anti-albumina. (F-J) Controles negativos realizados com a omissão do anticorpo primário anti-albumina para grupos ordenados como 1ddp, 18dpp, 40dpp, 90dpp e 10mpp.

Pênis C57BL/6

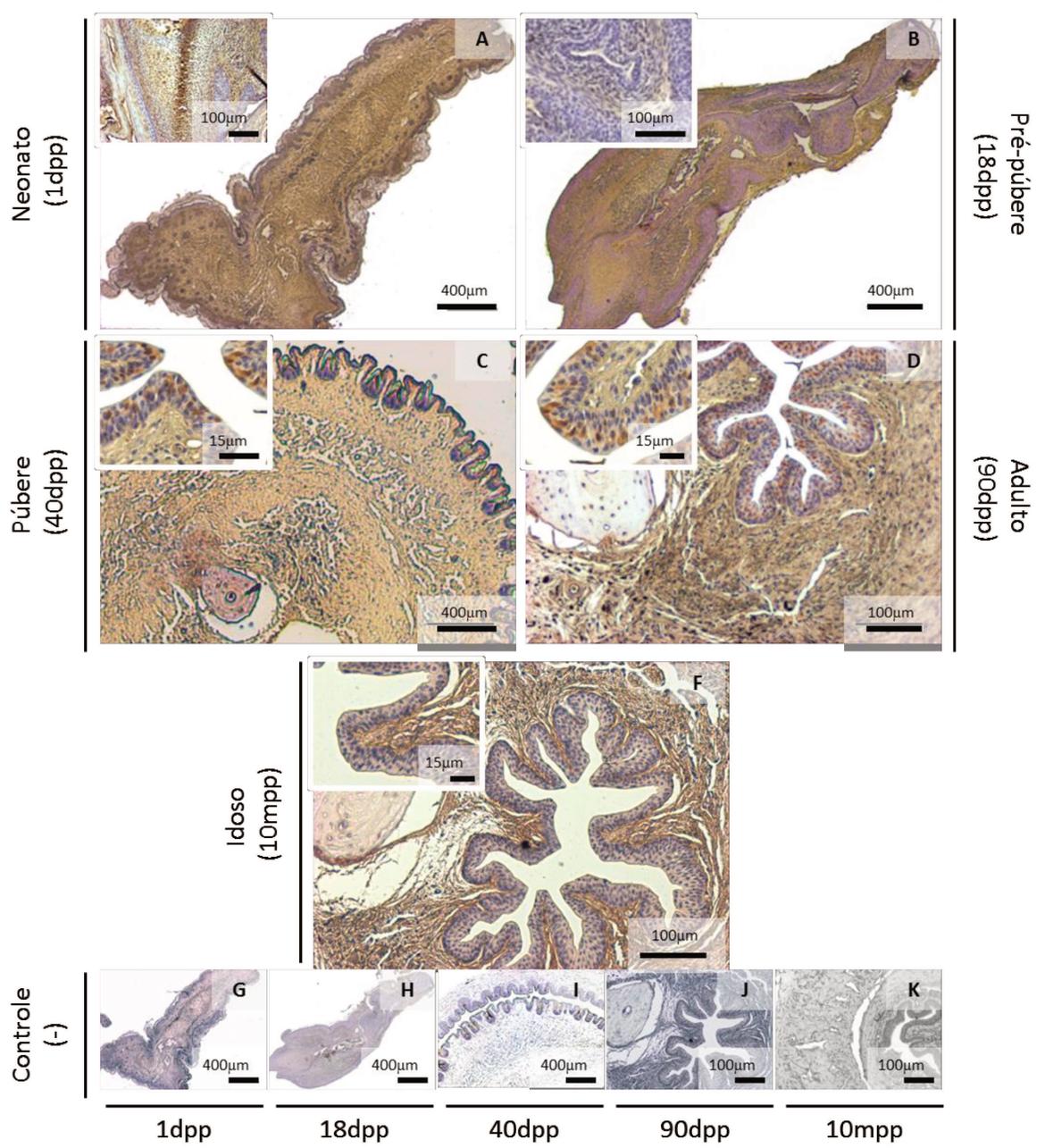


Figura 7.16 Fotomicrografias ilustrativas de ensaios de validação da imunolocalização (imunohistoquímica) de albumina em amostras de tecidos de uretra peniana e pênis de camundongos em diferentes estádios do desenvolvimento pós-natal.

Durante todo o desenvolvimento pós-natal do órgão o estroma mostra-se fortemente imunorreativo ao Apc anti-albumina. (A - B) 1dpp e 18dpp – período neonatal e pré-puberal, respectivamente. Células epiteliais não evidenciam imunoreatividade. Destaque em (A) para imunoreatividade acentuada do tecido conjuntivo sobrejacente à placa uretral. (C) 40dpp – período puberal. Primeiros indícios de imunoreatividade de células epiteliais da uretra peniana ao Apc anti-albumina. (D) 90dpp – período adulto. Algumas células distinguem-se das células vizinhas por apresentar imunomarcção de corpo celular total para albumina. (E) 10mpp – período idoso. Células epiteliais voltam a não evidenciar imunoreatividade ao Apc anti-albumina. (F-J) Controles negativos realizados com a omissão do anticorpo primário anti-albumina para grupos ordenados como 1dpp, 18dpp, 40dpp, 90dpp e 10mpp.

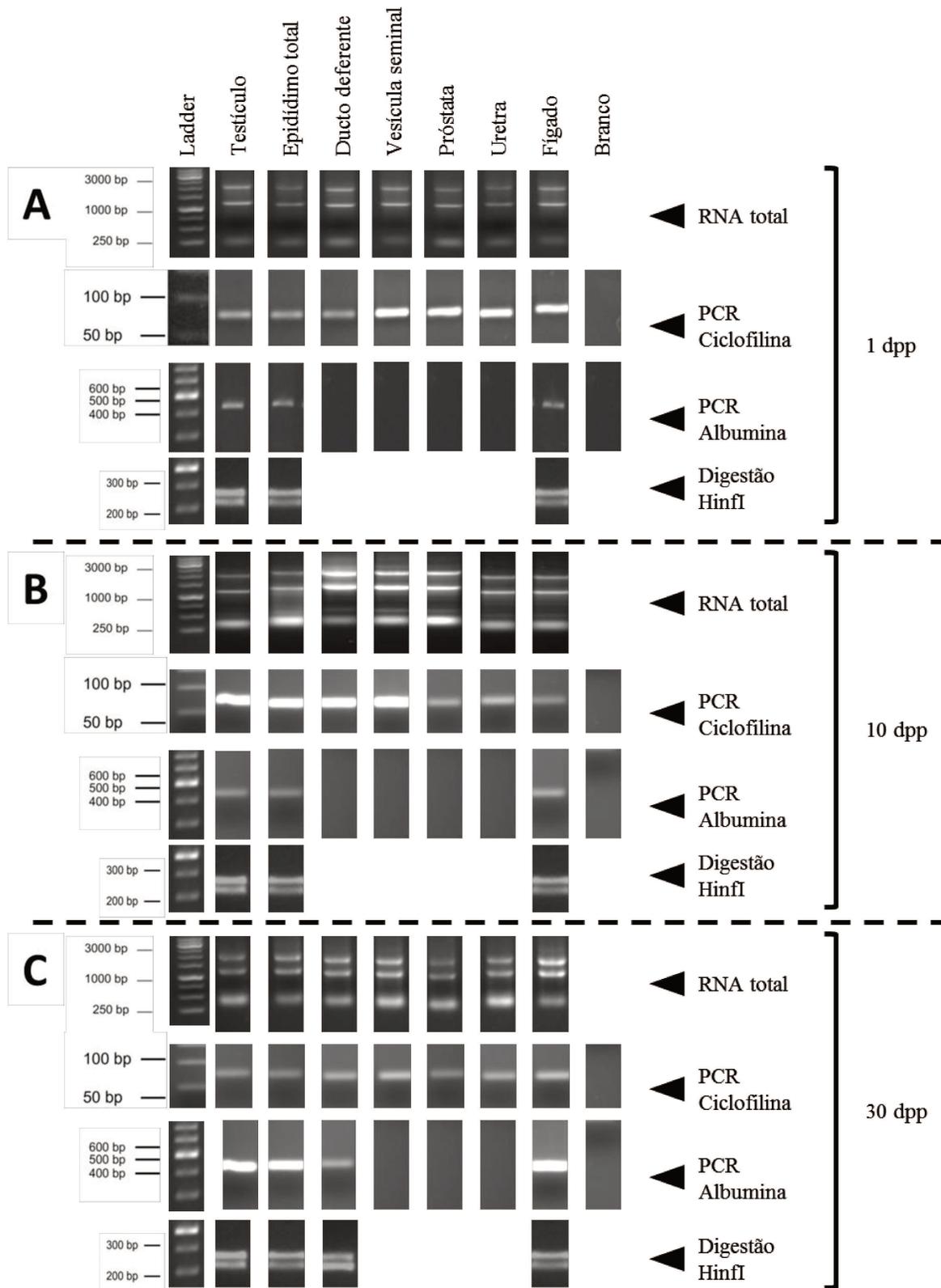


Figura 7.17 *Ensaio representativo da validação do perfil transcricional para RNAm de albumina (RT-PCR) dos genes para GAPDH, ciclofilina e albumina em órgãos do trato reprodutor masculino de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.*

(A) 1ddp – período neonatal; (B) 10dpp – período pré-puberal; (C) 30dpp – período puberal. Os ensaios realizados para genes constitutivos GAPDH e Ciclofilina confirmam o sucesso da extração de RNAm e a integridade das amostras de DNAc utilizadas. Os ensaios realizados para detecção de transcritos do gene para albumina confirmaram a presença de respectivo RNAm nos órgãos fígado, testículo, epidídimo para todos os grupos e, exclusivamente para o grupo de 30dpp (C), também para o ducto deferente. O perfil de digestão do produto de PCR pela enzima de restrição *HinfI* confirmou a identidade da molécula albumina. A técnica de RT-PCR não indicou a presença de RNAm para albumina nas demais análises.

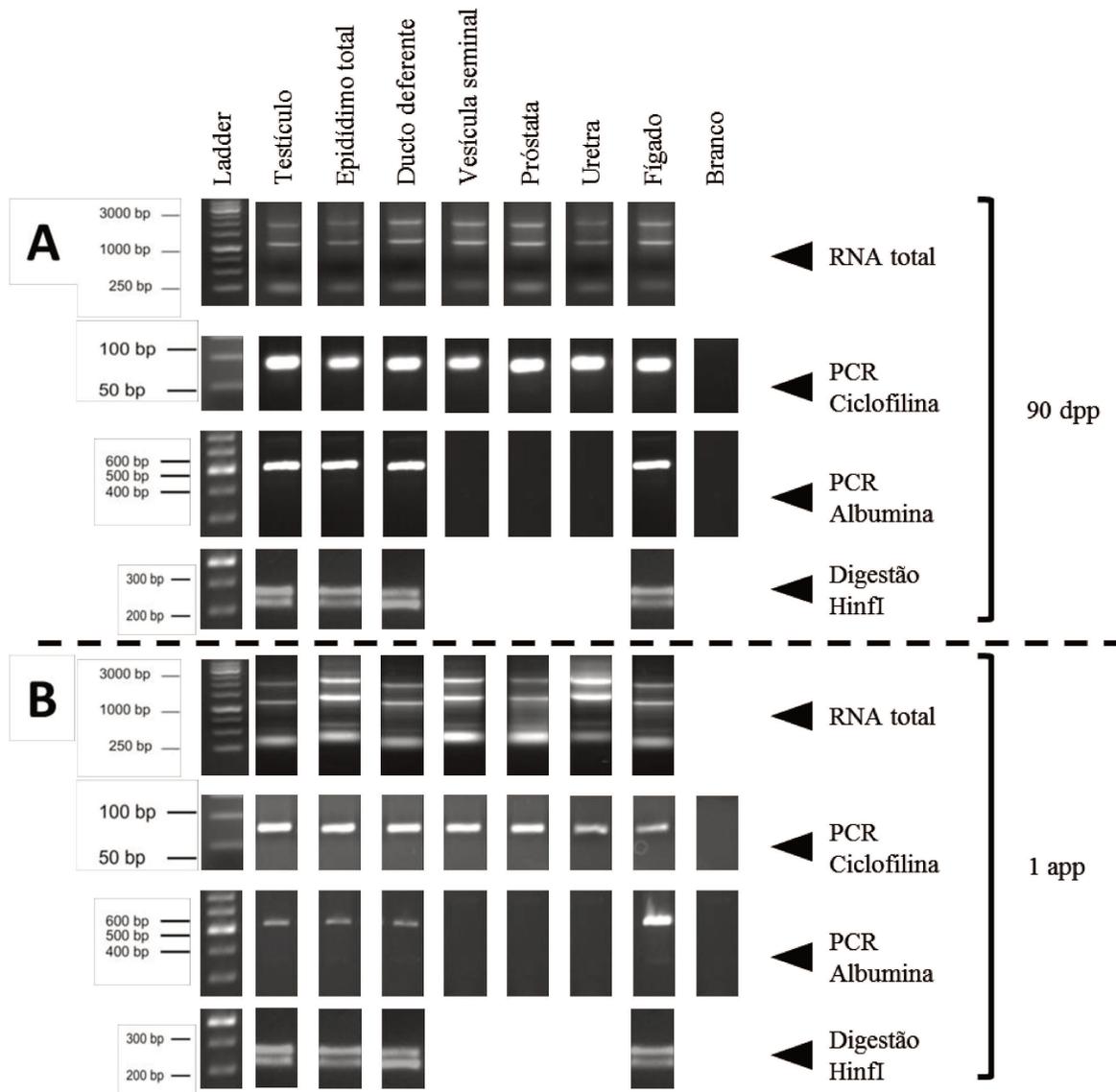


Figura 7.18 Ensaio representativo da validação do perfil transcricional para RNAm de albumina (RT-PCR) dos genes para GAPDH, ciclofilina e albumina em órgãos do trato reprodutor masculino de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal.

(A) 90ddp – período adulto; (B) 1app – período idoso. Os ensaios realizados para genes constitutivos GAPDH e Ciclofilina confirmam o sucesso da extração de RNAm e a integridade das amostras de DNAc utilizadas. Os ensaios realizados para detecção de transcritos do gene da albumina confirmaram a presença de respectivo RNAm nos órgãos fígado, testículo, epidídimo e ducto deferente. O perfil de digestão do produto de PCR pela enzima de restrição HinfI confirmou a identidade da molécula albumina. A técnica de RT-PCR não indicou a presença de RNAm para albumina nas demais análises.

8.

Referências

- Abdel-Hamid IA, Jannini EA, Andersson KE. Premature ejaculation: focus on therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13:175–93.
- Agarwal A, Hoffer AP. Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rats. *J Androl* 1989;10:425–31.
- Ahn SM, Byun K, Cho K, Kim JY, Yoo JS, Kim D, et al. Human microglial cells synthesize albumin in brain. *PLoS One* [periódicos na internet]. 2008 [acesso em 29 fev 2014];30(e2829). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2483733/?report=reader>
- Aitken RNC. Observations on the development of the seminal vesicles, prostate and bulbourethral glands in the ram. *J Anat* 1959;93:43–51.
- Amann RP, Griel LC Jr. Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymidis, and ejaculated semen. *J Dairy Sci* 1974;57:212–19.
- Arango NA, Donahoe PK. Sex differentiation in mouse and man and subsequent development of the female reproductive organs [internet]. In: Lin H, The Stem Cell Research Community (Eds), *StemBook* [livro na internet]. 2010 [acesso em 29 fev 2014] Disponível em: <http://www.stembook.org/node/702>
- Arrotéia KF, Garcia VP, Barbieri MF, Justino ML, Pereira LAVD. The epididymis: embryology, structure, function and its role in fertilization and infertility [internet]. In: Pereira LAVD (Ed). *Embryology - updates and highlights on classic topics*, InTech [livro na internet]. 2012 [acesso em 29 fev 2014] Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/embryology-updates-and-highlights-on-classic-topics/the-epididymis-embryology-structure-function-and-its-role-in-fertilization-and-sterility>
- Arrotéia KF, Joazeiro PP, Yamada AT, Tanaka H, Nishimune Y, Pereira LAV. Identification and characterization of an antigen recognized by monoclonal antibody TRA 54 in mouse epididymis and vas deferens. *J Androl* 2004; 25:914–21.
- Aümüller G, Adler G. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell Tissue Research* 1979;198: 145-58.
- Autiero M, Sansone G, Abrescia P. Relative ratios of lactoferrin, albumin, and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. *J Androl* 1991;12(3):191-200.
- Baker ME. Beyond carrier proteins: Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates. *J Endocrinol* 2002;175:121-27.
- Banerjee PP, Banerjee S, Tilly KI, Tilly JL, Brown TR, Zirkin BR. Lobe- specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. *Endocrinology* 1995;136: 4368-76.
- Banks WA, Kastin AJ. Human interleukin-1 crosses the blood-testis barriers of the mouse. *J Androl* 1992;13(3), 254-59.

- Baraka-Vidot J, Guerin-Dubourg A, Dubois F, Payet B, Bourdon E, Rondeau P. New insights into deleterious impacts of in vivo glycation on albumin antioxidant activities. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(6):3532–41.
- Barbaro B, Kuechle J, Salehi P, Rodriguez L, Qi M, Gangemi A, Benedetti E, Oberholzer J. Increased albumin concentration reduces apoptosis and improves functionality of human islets. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2008;36(1):74-81.
- Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 1977; 25:1–54.
- Bartholow LC, Geyer RP. Sterol release in mammalian cells: The role of a liposomal-free albumin-phospholipid complex. *Biochim Biophys Acta* 1981;665: 40-7.
- Bergmann M, Dierichs R. Postnatal formation of the blood-testis barrier in the rat with special reference to the initiation of meiosis. *Anat Embryol* 1983;168:269–75.
- Bianco J, Handelsman DJ, Pedersen J. Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology* 2002;143: 4922–33.
- Boman H, Hermodson M, Hammond CA, Motulsky AG. Analbuminemia in an American Indian girl. *Clin Genet* 1976;9: 513–26.
- Book BK, Volz MA, Ward EK, Eckert GJ, Pescovitz MD, Wiebke EA. Differences in alloimmune response between elderly and young mice. *Transplant Procedures* 2013;45(5):1838-41.
- Bouffard G. Injection des couleurs de benzidine aux animaux normaux. *Ann Inst Pasteur* 1906;20:539–46.
- Bowles J, Koopman PA. Gonads-mullerian ducts. In: Lanza RP, Gearhart BLM, Melton DA, Pederson R, Thomson MD, West MD (Eds.), *Handbook of stem cells*. USA: Elsevier Academic Press; 2004. p. 345-57.
- Brackett BG, Hall JL, Oh Y-K. In vitro fertilizing ability of testicular, epididymal, and ejaculated rabbit spermatozoa. *Fertil Steril* 1978;29:571–82.
- Braun J, Torres-Boggino F, Hochi S, Ogui N. Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1994;101:319–22.
- Brooks DE, Higgins SJ. Characterization and androgen-dependence of proteins associated with luminal fluid and spermatozoa in the rat epididymis. *J Reprod Fertil* 1980;59(2):363-75.
- Brooks DE. Developmental expression and androgenic regulation of the mRNA for major secretory proteins of the rat epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 1987;53(1-2):59-66.
- Burnstock G, Verkhatsky A. Vas deferens – a model used to establish sympathetic cotransmission. *Trends Pharmacol Sci* 2010;31:131–39.

- Burr FM, Sizonenko PC, Kaplan SL, Grumbach MM. Hormonal changes in puberty. I. Correlation of serum luteinizing hormone and follicle stimulating hormone with stages of puberty, testicular size, and bone age in normal boys. *Pediatr Res* 1970;4:25-35.
- Campbell PN, Stone NE. The synthesis of serum albumin and tissue proteins in slices of rat liver and liver tumor. *Biochem J* 1957;66: 1-31.
- Carles C, Fournier-Delpech S, Ribadeau-Dumas B. Purification of an ovine, an androgen-dependent epididymal protein: Evidence for a strong amino sequence 35 homology with serum albumin. *Reprod Nutr Dev* 1992;32:277-84.
- Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. Review. *Adv Med Sci* 2012;57(1):31-6.
- Chang MC. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 1957;179:258-59.
- Charney CW, Conston AS, Meranze DR. Development of the testis, a histologic study from birth to maturity with some notes on abnormal variations. *Fertil Steril* 1952;3:461-79.
- Cheng CY, Grima J, Lee WM, Bardin CW. The distribution of rat testibumin in the male reproductive tract. *Biol Reprod* 1987;37(4):875-85.
- Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. Review. *Pharmacol Rev* 2012;64(1):16-64.
- Cheng CY, Grima J, Lee WM, Bardin CW. The distribution of rat testibumin in the male reproductive tract. *Biol Reprod* 1987;37:875-85.
- Chinoy NJ. Structure and physiology of mammalian vas deferens in relation to fertility regulation. *J Biosci* 1985;7(2):215-21.
- Chinoy NJ, Kumar RA. Postnatal ultrastructural-changes in rat epididymis. *J Androl* 1983;368:37.
- Christensen AK, Komorowski TE, Wilson B, Ma S, Stevens III RW. The distribution of serum albumin in the rat testis, studied by electron microscope immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. *Endocrinology* 1985;116:1983-96.
- Clermont Y, Perey B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat* 1957;100: 241-60.
- Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963;112: 35-51.
- Corteel JM. Effects of seminal plasma on the survival and fertility of spermatozoa kept in vitro. *Reprod Nutr Dev* 1980;20:1111-23.
- Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update*. 2009;15(2):213-27.

- Cuasnicú PS, González-Echeverría F, Piazza AD, Cameo MS, Blaquier JA. Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *J Reprod Fertil.* 1984;72(2):467-71.
- Culty M. Gonocytes, from the fifties to the present: Is there a reason to change the name? *Biol Reprod* 2013;89(2):46.
- Cunha GR, Donjacour AA. Mesenchymal-epithelial interactions: technical considerations. In: Coffey DS, Bruchovsky N, Gardner WA, Resnick MI, Karr JP (Eds.), *Assessment of current concepts and approaches to the study of prostate cancer.* USA:AR Liss; 1987. p. 273–82.
- Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;92:221-36.
- Cyr DG, Gregory M, Dube E, Dufresne J, Chan PT, Hermo L. Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian J Androl* 2007; 9:463–75.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti LJ, Dacheux F. Epididymal cell secretory activities and the role of the proteins in boar sperm epididymis. *Theriogenology* 2005;63(2): 319-41.
- Dammaco F, Miglietta A, D'Addabbo A, et al. Analbuminemia: Report of a case and review of the literature. *Vox Sanguinis* 1980;39: 153-61.
- Daniel WA, Feinstein RA, Howard-Peebles P, Baxley WD. Testicular volumes of adolescents. *J Pediatr* 1982;101:1010-2.
- Danis MH, Filosa MF, Youson JH. An albumin-like protein in the serum of non-parasitic brook lamprey (*Lampetra appendix*) is restricted to preadult phases of the life cycle in contrast to the parasitic species *Petromyzon marinus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2000;127B: 251-60.
- Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 1990;262: 253-61.
- Davis BK. Influence of serum albumin on the fertilizing ability in vitro of rat spermatozoa. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976;151: 240-43.
- Davis BK, Byrne R, Bedigian K. Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77(3):1546–50.
- De Felici M. Origin, Migration, and proliferation of human primordial germ cells. In: Coticchio G et al. (Eds.), *Oogenesis.* Springer-Verlag: London; 2013. p. 19-37.
- De Kretser DM, Kerr JB. The cytology of the testis. In: Knobil E, Neil JD (Eds.), *The physiology of reproduction.* Raven Press: New York ; 1994. p. 1177-290.

- De Miguel MP, Marino JM, Martinez-Garcia F, Nistal M, Paniagua R, Regadera J. Pre- and post-natal growth of the human ductus epididymidis: A morphometric study. *Reprod Fertil Dev* 1998;10(3): 271-77.
- DeFalco T, Takahashi S, Capel B. Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev Biol* 2011;352(1): 14-26.
- Doolittle RF, Gray JE. Characterization, primary structure, and evolution of lamprey plasma albumin. *Protein Sci* 1992;1:289-302.
- Dorrington JH, Fritz IB, Armstrong DT. Control of testicular estrogen synthesis. *Biol Reprod* 1978;18(1):55-64.
- Dostalova Z, Calvete JJ, Sanz L, Topfer-Peterson E. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1994;1200:48-54.
- Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1970; 3:308-26.
- Dym M, Romrell LJ. Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. *J Reprod Fertil* 1975;42:1-7.
- Ellerman DA, Brantua S, Martinez SP, Cohen DJ, Conesa D, Cuasnicu PS. Potential contraceptive use of epididymal proteins: immunization of male rats with epididymal protein DE inhibits sperm fusion ability. *Biol Reprod* 1998;59(5):1029-36.
- Elzanaty S, Erenpreiss J, Becker C. Seminal plasma albumin: origin and relation to the male reproductive parameters. *Andrologia* 2007;39:60-5.
- Everett NB, Simmons B. Measurement and radioautographic localization of albumin in rat tissues after intravenous administration. *Circ Res* 1958;6:307.
- Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000;1469(3): 197-235.
- Flickinger CT. Regional variations in endoplasmic reticulum in the vas deferens of normal and vasectomised rats. *Anat Rec* 1973;176:205-24.
- Flickinger CJ. The fine structure and development of the seminal vesicles and prostate in the fetal rat. *Z. Zellforsch* 1970;109:1-14.
- Forest MG, Cathiard AM. Pattern of plasma testosterone and Delta4-androstenedione in normal newborns: evidence for testicular activity at birth. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;41: 977-80.
- Forest MG, Cathiard AM, Bertrand JA. Evidence of testicular activity in early infancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;37: 148-51.

- Forti G, Barni T, Vanelli BG, Balboni GC, Orlando C, Serio M. Sertoli cell protein in the human seminiferous tubule. *J Steroid Biochem* 1989;32: 135-44.
- Fouchécourt S, Matayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL. Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod* 2000;62(6): 1790-803.
- Fournier-Delpech S, Courot M, Dubois MP. Decreased fertility and motility of spermatozoa from rats immunized with a prealbumin epididymal-specific glycoprotein. *J Androl* 1985;6:246-50.
- Fournier-Delpech S, Venien AM, Pisselet C, Courot M. Localization, on the head of ram spermatozoa, of affinity sites for the 64kD androgen dependent epididymal prealbumin. *C R Acad Sci III* 1988;306:333-8.
- Fournier-Delpech S, Lewin LM, Oschry Y, Combarous Y. Binding of rat and ovine epididymis-specific prealbumins (PES) to rat spermatozoa without effect of heterologous immunization on rat fertility. *Mol Reprod Dev* 1997;47:483-9.
- Fraser LR. Albumin is required to support the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa in vitro. *J Reprod Fertil* 1985;74:185-96.
- Friend DS, Gilula NB. Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J Cell Biol* 1972; 53:758–76.
- Gelly JL, Richoux JP, Grignon G. Immunolocalization of albumin and transferrin in germ cells and sertoli cells during rat gonadal morphogenesis and postnatal development of the testis. *Cell Tissue Res* 1994;276: 347-51.
- Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 1985;32:145-53.
- Gondos B. Testicular changes associated with the initiation of spermatogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 1975;5: 4-13.
- Gonzales GF. Functional structure and ultrastructure of seminal vesicles. *Arch Androl* 1989;22: 01-13.
- Gonzales GF. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. *Asian J Androl* 2007;3: 251-58.
- Gregory M, Cyr DG. Identification of multiple claudins in the rat epididymis. *Mol Reprod Dev* 2006; 73:580–8.
- Guyton, AC. *Human physiology*. 6th edition. Saunders College Pub:Philadelphia; 1984.
- Hadziselimovic F, Thommen L, Girard J, Herzog B. The significance of postnatal gonadotropin surge for testicular development in normal and cryptorchid testes. *J Urol* 1986;136: 274-6.

- Hammerstedt RH, Keith AD, Boltz RC Jr, Todd PW. Use of amphiphilic spin labels and whole cell isoelectric focusing to assay charge characteristics of sperm surfaces. *Arch Biochem Biophys* 1979;194:565–80.
- Han HL, Mack SR, DeJonge C, Zaneveld LJ. Inhibition of the human sperm acrosome reaction by a high molecular weight factor from human seminal plasma. *Fertil Steril* 1990;54:1177–79.
- Hagglof C, Bergh A. The stroma - a key regulator in prostate function and malignancy. Review. *Cancers* 2012;4:531-48.
- Hannema SE, Hughes IA. Regulation of Wolffian duct development. *Horm Res* 2007;67(3): 142-51.
- Harkness JE, Wagner JE. *The biology and medicine of rabbits and rodents*. 4th edition. Williams and Wilkins: Philadelphia, PA; 1995.
- Hashimoto R. Development of the human Müllerian duct in the sexually undifferentiated stage. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2011;272(2):514–9.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat (Basel)* 1996;155: 81–93.
- Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* 1997;79(Suppl): 18-26.
- Henault MA, Killian GJ, Kavanaugh JF, Griel LCJr. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal spermatozoa to penetrate zona-free bovine oocytes. *Biol Reprod* 1995;52:390–7.
- Hermo L, Oko R, Morales CR. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int Rev Cytol* 1994;154: 106-89.
- Hilger C, Grigioni F, Kohnen M, Hentges F. Sequence of the gene encoding cat (*Felis domesticus*) serum albumin. *Gene* 1996;169: 295-6.
- Hinton BT, Howards SS. Permeability characteristics of the epithelium in the rat caput epididymidis. *J Reprod Fertil* 1981; 63:95–9.
- Hinton BT, Galdamez MM, Sutherland A, Bomgardner D, Xu B, Abdel-Fattah R, Yang L. How do you get six meters of epididymis inside a human scrotum? *J Androl* 2011;32(6):558-64.
- Hoffer AP. The ultrastructure of the ductus deferens in man. *Biol Reprod* 1976;14:425–43.
- Hoffer AP, Hinton BT. Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. *Biol Reprod* 1984;30:991–1004.

- Hosoi Y, Niwa K, Hatanaka S, Iritani A. Fertilization in vitro of rabbit eggs by epididymal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *Biol Reprod.* 1981;24:637–42.
- Huff DS. Early embryology of the genitourinary tract: Bipotential mesonephric and paramesonephric ducts. In: Ernst LM, Ruchelli ED, Huff DS (Eds.), *Color atlas of fetal and neonatal histology.* Springer, New York: Dordrecht Heidelberg, London; 2011. p. 102-203.
- Hurtley S. This week in Science: Sperm production-line maintenance, *Science* 2010;328:14.
- Imperato-McGinley J, Gautier T, Zirinsky K, Hom T, Palomo O, Stein E, et al. Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1022-6.
- Jacob M, Yusuf F, Jacob HJ. Development, differentiation and derivatives of the wolffian and müllerian ducts [internet]. In: Yamada S. (Ed.), *The human embryo, InTech* [livro na internet]. 2012 [acesso em 29 fev 2014] Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/the-human-embryo/development-differentiation-andderivatives-of-the-wolffian-and-m-llerian-ducts>
- Johnson L, Petty CS, Neaves WB. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. *Biol Reprod* 1980;22:1233-43.
- Johnson L, Welsh THJr, Curley, KOJr, Johnston CE. Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. In: Knudsen TB (Ed.), *Reproductive toxicology,* Elsevier; 2010. p.1-54.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- Kerr JB. Functional cytology of the human testis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1992;6(2): 235-50.
- Kormano M. Distribution of injected L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) in the adult rat testis and epididymis. *Acta Physiol Scand* 1967a;71:125–6.
- Kormano M. Dye permeability and alkaline phosphatase activity of testicularcapillaries in the postnatal rat. *Histochemie* 1967b;9:327–38.
- Kormano M. Penetration of intravenous trypan blue into the rat testis and epididymis. *Acta Histochem* 1968;30:133–6.
- Koskimies AI, Kormano M. The proteins in fluids from the seminiferous tubules and rete testis of the rat. *J Reprod Fertil* 1973;34(3):433-4.
- Koslov DS, Andersson KE. Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens - an update. *Front Pharmacol* 2013;4:101.
- Kulandavelu S, Qu D, Sunn N, Mu J, Rennie MY, Whiteley KJ, et al. Embryonic and neonatal phenotyping of genetically engineered mice. *Review. ILAR Journal* 2006;47(2):103-17.

- Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol Rev* 1981;33: 17-53.
- Krishna A, Spanel-Borowski K. Albumin localization in the testis of adult Golden Hamsters by use of immunohistochemistry. *Andrologia* 1990;22:122-8.
- Krutsikh A, De Gendt K, Sharp V, Verhoeven G, Poutanen M, Huhtaniemi I. Targeted inactivation of the androgen receptor gene in murine proximal epididymis causes epithelial hypotrophy and obstructive azoospermia. *Endocrinology* 2011;152(2): 689–96.
- Lan ZJ, Labus JC, Hinton BT. Regulation of Gamma-Glutamyl transpeptidase Catalytic Activity and Protein Level in the Initial Segment of the Rat Epididymis by Testicular Factors: Role of Basic Fibroblast Growth Factor. *Biol Reprod* 1998;58(1): 197-206.
- Lardy HA, Ghosh D. Comparative metabolic behavior of epididymal and ejaculated mammalian spermatozoa. *Ann NY Acad Sci* 1952;55:594–6.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227: 680-5.
- Langlais J, Roberts KD. A molecular membrane of sperm capacitation and the acrosome of mammalian spermatozoa. *Gamete Research* 1985;12:183-224.
- Lee C, Sensibar JA, Dudek SM, Hiipakka RA, Liao ST. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. *Biol Reprod* 1990;43(6):1079-86.
- Lejeune H, Habert R, Saez JM. Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. Review. *J Mol Endocrinol* 1998;20, 1–25.
- Levy S, Serre V, Hermo L, Robaire B. The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood-testis barrier of the Brown Norway rat. *J Androl* 1999;20(3):356-65.
- Liao X, Terada N, Ohno N, Li Z, Fujii Y, Baba T, et al. Immunohistochemical study of serum albumin in normal and cadmium-treated mouse testis organs by "in vivo cryotechnique". *Histol Histopathol* 2006;21(1):35-40.
- Lilja H, Abrahamsson PA, Lundwall A. Semenogelin, the predominant protein in human semen: Primary structure and identification of closely related proteins in the male accessory sex glands and on the spermatozoa. *J. Biol. Chem.*, 1989;25,1894–900.
- Lindholmer C, Carlstrom A, Eliasson R. Occurrence and origin of proteins in human seminal plasma with special reference to albumin. *Andrologia* 1974;6:181-96.
- Lindholmer CH. The importance of seminal plasma for human sperm motility. *Biol Reprod* 1974;10 5533-542.
- Lunenfeld B. Diagnosis of male infertility. In: Insler V, Lunenfeld B (Eds.), *Infertility: Male and female*. London: Churchill Livingstone; 1986. sp.

- Lung B, Cunha GR. Development of seminal vesicles and coagulating glands in neonatal mice. I. The morphogenetic effects of various hormonal conditions. *Anat Rec* 1981;199, 73–88.
- Madden SC, Whipple GH. Plasma proteins: Their source, production, and utilization. *Phys Rev* 1940;146:69-84.
- Maeda T, Goto A, Kobayashi D, Tamai I. Transport of organic cations across the blood-testis barrier. *Mol Pharm* 2007; 4:600–7.
- Mancini RE, Vilar O, Alvarez B, Seiguer AC. Extravascular and intratubular diffusion of labeled serum proteins in the rat testis. *J Histochem Cytochem* 1965;13:376-85.
- Mann T. Fructose, polyols, and organic acids. In: Nam T (Ed.), *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. Methuen: London; 1964. p. 237–64.
- Martinez FE, Martinez M, Garcia PJ, Cagnon VHA, Gralhoz G, Santos CXC. Morfologia da vesícula seminal de chinchila (*Chinchila laniger*). *Revista de Ciências Biomedicas* 1995;16:17-23.
- McCarrey JR. Development of the germ cell. In: Ewing L, Desjardins C (Eds.), *Cellular and Molecular Biology of the Testis*. Oxford University Press: New York; 1993. p. 58–89.
- McGillivray RTA, Chung DW, Davie EW. Biosynthesis of bovine plasma proteins in a cell-free system. Amino-terminal sequence of preproalbumin. *Eur J Biochem* 1979;98:477-85.
- McLachlan RI, Rajpert-De ME, Høi-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis - approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini Review. *Hum Reprod* 2007;22(1): 2–16.
- Meinhardt A, Hedger MP. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. Review. *Mol Cell Endocrinol* 2011;335(1):60-8.
- Melsert R, Hoogerbrugge JW, Rommerts FFG. Albumin, a biologically active protein acting on Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 1989;64:35-44.
- Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(46): 16696–700.
- Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M. The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse testis. *Int J Dev Biol* 1993;37: 407-15.
- Miller LL, Bly CG, Watson ML, Bale WF. The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. *J Exp Med* 1951;94: 431-53.
- Miller LL, Bale WF. Synthesis of all plasma protein fractions except gamma globulins by the liver. *J Exp Med* 1954;99: 125-32.

- Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. Review. Biol Reprod 2011;84(5):851-8.
- Moskaitis JE, Sargent TD, Smith LHJr, Pastori RL, Schoenberg DR. *Xenopus laevis* serum albumin: Sequence of the complementary deoxyribonucleic acids encoding the 68- and 74-kilodalton peptides and the regulation of albumin gene expression by thyroid hormone during development. Mol Endocrinol 1989;3: 464-73.
- Muller J, Skakkebaek NE. Quantification of germ cells and seminiferous tubules by stereological examination of testicles from 50 boys who suffered from sudden death. Int J Androl 1983;6:143-56.
- Muller J, Skakkebaek NE. Fluctuations in the number of germ cells during late foetal and early postnatal periods in boys. Acta Endocrinol (Copenh) 1984;105:271-4.
- Muller J, Skakkebaek NE. The prenatal and postnatal development of the testis. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 1992;6(2): 251-71.
- Nagase S, Shimamune K, Shumiya S. Albumin-deficient rat mutant. Science 1979;205: 590-1.
- Nahon JL, Tratner I, Poliard A, Presse F, Poiret M, et al. Albumin and alpha-fetoprotein gene expression in various nonhepatic rat tissues. J Biol Chem 1988;263:11436-42.
- Nass SJ, Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. Mol Reprod Dev 1990;25: 237-46.
- Nemeth H, Lee C. Prostatic ductal system in rats: Regional variation in stromal organization. Prostate 1996;28: 124-8.
- Neves SMP, Prates FM, Rodrigues LD, dos Santos RA, Fontes RS, Santana RO. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. In: Neves SMP, Filho JM, de Menezes W, Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Instituto de Química (FCF-IQ/USP). 2013.
- Nishimura T, Ichihara I. Nuclear concentration of gold labeled-testosterone-bovine serum albumin conjugate injected intravenously in the hormone-target cells of rat. Cell Struct Funct. 1997;22(4):433-42.
- Nishio H, Dugaiczky A. Complete structure of the human α -albumin gene, a new member of the serum albumin multigene family. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:7557-61.
- Nistal M, Aabaurrea MA, Paniagua R. Morphological and histometric study of human Sertoli cells from birth to the onset of puberty. J Anat 1982;134:351-63.
- Nistal M, Paniagua R, Regadera J, Santamaria L, Amat P. A quantitative morphologic study of human Leydig cells from birth to adulthood. Cell Tissue Res 1986;246:229-36.

- O'Shaughnessy PJ, Sheffield JW. Effect of temperature and the role of testicular descent on post-natal testicular androgen production in the mouse. *J Reprod Fertil* 1991;91(1):357-64.
- O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. The foetal Leydig cell: Differentiation, function and regulation. *Int J Androl* 2006; 29(1):90-5.
- Ogawa K, Inagaki M. Analbuminemic rat model for hepatocyte transplantation [internet]. In: Baptista P (Ed.). *Liver Regeneration*, InTech [livro na internet]. 2012 [acesso em 29 fev 2014] Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/liver-regeneration/analbuminemic-rat-model-for-hepatocyte-transplantation>
- Orlando C, Casano R, Forti G, Barni T, Vannelli GB, Balboni G.C, et al. Immunologically reactive albumin-like protein in human testis and seminal plasma. *J Reprod Fertil* 1988;83:687-92.
- Orgebin-Crist MC. Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature* 1967;216(5117): 816-8.
- Orth JM. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 1982;203:485-92.
- Paniagua R, Nistal M. Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. *J Anat* 1984;139:535-52.
- Parr MB, Ren HP, Russell LD, Prins GS, Parr EL. Urethral glands of the male mouse contain secretory component and immunoglobulin A plasma cells and are targets of testosterone. *Biol Reprod* 1992;47(6):1031-9.
- Patel SM, Skandhan KP, Mehta YB. Seminal plasma fructose and glucose in normal and pathological conditions. *Acta Eur Fertil* 1988;19:329-32.
- Pereira LAVD, Tanaka H, Nagata Y, Sawada K, Mori H, Chimelli LMC, et al. Characterization and expression of a stage specific antigen by monoclonal antibody TRA 54 in testicular germ cells. *Int J Androl* 1998;21:34-40.
- Perheentupa A, Huhtaniemi I. Aging of the human ovary and testis. Review. *Mol Cell Endocrinol* 2009;5;299(1):2-13.
- Peters TJr. Serum albumin: Recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. Review. *Clin Chem* 1977;23:5-12.
- Peters TJr. Serum albumin. Review. *Adv Protein Chem* 1985;37:161-245.
- Peters T. All about albumin: Biochemistry, genetics, and medical applications. San Diego: Academic Press; 1996.
- Petras ML, MacLaren IA. Structural differences between albumin A and albumin C of the house mouse, *Mus musculus*. *Biochem Genet* 1976;14(1-2): 67-73.

- Pietrangelo A, Panduro A, Chowdhury JR, Shafritz DA. Albumin gene expression is down-regulated by albumin or macromolecule infusion in the rat. *J Clin Invest* 1992;89: 1755-60.
- Prins GS, Birch L, Greene GL. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* 1991;129: 3187-99.
- Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 1967; 34:207-17.
- Reimann HA, Medes G, Fisher L. The origin of blood proteins. *Folia Haematologia* 1934;52(1): 87-202.
- Richter E, Connelly RR, Mou JW. The role of pretreatment serum albumin to predict pathological stage and recurrence among radical prostatectomy cases. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2000;3(3):186-190.
- Risbridger GP, Taylor RA. Physiology of the male accessory sex structures: The prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. In: Neill JD (Ed.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, Third Edition, Chapter 23. Elsevier; 2006. p.1149-72.
- Robaire B, Syntin P, Jervis K. The coming of age of the epididymis. In: Jegou B, Pineau C, Saez J, (Eds.), *Testis, epididymis and technologies in the year 2000*. Springer: Hildenberg, New York; 2000. p. 229- 62.
- Robaire B, Hinton B, Orgebin-Crist MC. The Epididymis. In: Neill JD (Ed.), *Physiology of reproduction*, Elsevier; 2006. p. 1071-148.
- Robaire B, Henderson NA. Actions of 5 α -reductase inhibitors on the epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 2006;250(1-2):190-5.
- Robert M, Gagnon C. Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: identity with semenogelin. *Biol Reprod* 1996;55:813-21.
- Rodriguez A, Bustos-Obregón E. Histophysiological and morphometric studies of the post-natal development of rat vas deferens. *Andrologia* 1993;25:29-37.
- Rodriguez EJr, Weiss DA, Ferretti M, Wang H, Menshenia J, Risbridger G, et al. Specific morphogenetic events in mouse external genitalia sex differentiation are responsive/dependent upon androgens and/or estrogens. *Differentiation* 2012;84(3):269-79.
- Rosen AM, Geller DM. Chicken microsomal albumin: Amino terminal sequence of chicken proalbumin. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;78:1060-66.
- Rumke P. The origin of immunoglobulins in semen. *Clin Exp Immunol* 1974;17, 287-97.
- Russell L. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat* 1977; 148:313-28.

- Russell LD. The blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: A lanthanum tracer study. *Anat Rec* 1978; 190:99–111.
- Russell LD, Bartke A, and Goh JC. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am J Anat* 1989;184:179–89.
- Russell LD, Ren HP, Sinhaikim IS, et al. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and numerical densities of selected testis components emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am J Anat* 1990;188: 21- 30.
- Sadler TW. *Lagman, Embriologia Médica*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2013.
- Sakiyama R, Pardridge WM, Musto NA. Influx of testosterone-binding globulin (teBG) and TeBG-bound sex steroid hormones into rat testis and prostate. *Am J Anat* 1990;188(1):21-30.
- Schaefer F, Marr J, Seidel C et al. Assessment of gonadal maturation by evaluation of spermaturia. *Arch Dis Child* 1990; 65(11):1205–07.
- Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen, Embriologia Humana*. Elsevier Brasil: Rio de Janeiro; 2011.
- Scolfaro MR, Cardinalli IAJr, Guerra G. Importância da análise histológica morfométrica gonadal na identificação da gônada disgenética. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003;47/2:128-34.
- Setchell BP. The functional significance of the blood-testis barrier. *J Androl* 1980; 1:3–10.
- Setchell BP, Sharpe RM. Effect of injected human chorionic gonadotrophin on capillary permeability, extracellular fluid volume and the flow of the lymph and blood in the testes of rats. *J Endocrinol* 1981; 91(2):245-54.
- Setchell BP, Pöllänen P, Zupp JL. Development of the blood-testis barrier and changes in vascular permeability at puberty in rats. *Int J Androl* 1988;11(3):225-33.
- Setchell BP. The testis and tissue transplantation: Historical aspects. *J Reprod Immunol* 1990;18:1–8.
- Setchell BP. Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2008;636:212–33.
- Shaha C, Cheng CY, Philips DM, Talwar GP, Bardin CW. Localization of immunoreactive testibumin in the testis and epididymis of adult rats. *Int J Androl* 1988;11(6):547-59.
- Shamay A, Homans R, Fuerman Y, Levin I, Barash H, Silanikove N, et al. Expression of albumin in nonhepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 2005;88(2):569-76.
- Shannon JM, Cunha GR. Autoradiographic localization of androgen binding in the developing mouse prostate. *Prostate* 1983;4:367–73.

- Sharpe RM. Gonadotrophin-induced accumulation of “interstitial fluid” in the rat testis. *J Reprod Fertil* 1979;55(2):365-71.
- Sharpe RM. Paracrine Control of the Testis. *Clin Endocrinol Metab* 1986;15(1):185-207.
- Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(11):6186-91.
- Skinner MK, Fritz IB. Identification of a non-mitogenic paracrine factor involved in mesenchymal-epithelial cell interactions between testicular peritubular cells and Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 1986;44(1):85-97.
- Soltysik-Espanola M, Klinzing DC, Pfarr K, Burke RD, Ernst SG. Endo16, a large multidomain protein found on the surface and ECM of endothelial cells during sea urchin gastrulation, binds calcium. *Dev Biol* 1994;165:73–85.
- Staack A, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, Carroll P. Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation* 2003;71: 402–13.
- Stabenfeldt GH, Edqvist L. Processos reprodutivos do macho. In: Swenson MJ, Reece WO(Eds.), *Dukes: Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A.; 1996. p. 603-14.
- Steinberger E. Maturation of male germinal epithelium. In: Grumbach MM, Grave GD, Mayer FE (Eds.), *The control of the onset of puberty*. New York: Biomedical-Health; 1974. p 386-402.
- Sudweeks AD, Hill RB Jr. Control of liver cell replication by albumin need. *J Cell Biol* 1967; 34(1): 404–6.
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* 1986;34: 961–71.
- Sullivan R. Male fertility markers, myth or reality. *Anim Reprod Sci* 2004;82- 83:341-7.
- Shroyer KR, Nakane PK. Immunohistochemical localization of albumin and *in situ* hybridization of albumin RNAm. *Cell Biochem Funct* 1987;5(3): 195–210.
- Takeda H, Mizuno T, Lasnitzki I. Autoradiographic studies of androgen-binding sites in the rat urogenital sinus and postnatal prostate. *J Endocrinol* 1985;104(1):87-92.
- Takeda H, Chang C. Immunohistochemical and in-situ hybridization analysis of androgen receptor expression during the development of the mouse prostate gland. *J Endocrinol* 1991;129(1):83-9.
- Tarnoky AL. Genetic and drug-induced variation in serum albumin. *Adv Clin Chem* 1980;21: 101–46.
- Thomson AA, Marker PC. Branching morphogenesis in the prostate gland and seminal vesicles. Review. *Differentiation* 2006;74(7):382-92.

- Timms BG, Mohs TJ, Didio LJA. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. *J Urol* 1994;151(5):1427-32.
- Timms BG. Prostate development: A historical perspective. Review. *Differentiation* 2008;76:565–77.
- Toyama Y, Ohkawa M, Oku R, Maekawa M, Yuasa S. Neonatally administered diethylstilbestrol retards the development of the blood-testis barrier in the rat. *J Androl* 2001;22:413–23.
- Troiano JC, Vidal JC, Gould EF, Malinskas G, Gould J, Scaglione M, et al. Haematological and blood chemical values from *Bothrops ammodytoides* (ophidia-crotalidae) in captivity. *Comp Haematol Int* 1999;9(1): 31-5.
- Trow AV, Rozanski EA, De Laforcade AM, Chan DL. Evaluation of use of human albumin in critically ill dogs: 73 cases (2003–2006). *J Am Vet Med Assoc* 2008;233(4):607-12.
- Turner TT, Riley TA, Mruk DD, Cheng CY. Obstruction of the vas deferens alters protein secretion by the rat caput epididymidal epithelium in vivo. *J Androl* 1999;20(2):289-97.
- Vilar O. Histology of the human testis from neonatal period to adolescence. In: Rosenberg E, Paulsen CA (Eds.), *Advances in experimental medicine and biology: The human testis*. New York, London: Plenum Press; 1970. p 95-111.
- Virtanen I, Kallojoki M, Narvanen O. Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments. *Anat Rec* 1986;215:10-20.
- Vitale-Calpe R, Fawcett DW, Dym M. The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *Anat Rec* 1973;176(3):331-44.
- Von Horsten HH, Johnson SS, SanFrancisco SK, Hastert MC, Whelly SM, Cornwall GA. Oligomerization and transglutaminase cross-linking of the cystatin CRES in the mouse epididymal lumen: Potential mechanism of extracellular quality control. *J Biol Chem* 2007;282(45):32912-23.
- Way AL, Griel LC Jr, Killian GJ. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J Androl* 2000;21(2):213-9.
- Weinstock J, Baldwin GS. Nucleotide sequence of porcine liver albumin. *Nucleic Acids Res* 1988;16(18): 9045.
- Weiss DA, Rodriguez EJr, Cunha T, Menshenina J, Barcellos D, Chan LY; et al. Morphology of the external genitalia of the adult male and female mice as an endpoint of sex differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 2012;354(1-2):94-102.
- Winter JSD, Hughes IA, Reyes FI, Faiman C. Pituitary-gonadal relations in infancy: 2. Patterns of serum gonadal steroid concentrations in man from birth to two years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;42(4):679-86.

- Wolffe AP, Glover JF, Martin SC, Tenniswood MPR, Williams JL, Tata JR. Deinduction of transcription of *Xenopus* 74-kDa albumin genes and destabilization of RNAm by estrogen in vivo and in hepatocyte cultures. *Eur J Biochem* 1985;146: 489-96.
- Wright WW, Musto NA, Mather JP, Bardin CW. Sertoli cells secrete both testis-specific and serum proteins. *Proc Nat Acad Sci USA* 1981;78(12): 7565-69.
- Yamamoto M, Hibi H, Miyake K. Effect of albumin on proluminal movement of 3h-androgen into seminiferous and epididymal tubules and androgen binding in the interstitium of the testis and epididymis after perfusion with fluid containing albumin. *Nagoya J Med Sci* 1994;57:133-42.
- Yanagimachi R, Kamiguchi Y, Mikamo K, Suzuki F, Yanagimachi H. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *Am J Anat* 1985;172(4):317-30.
- Yazama F. Continual maintenance of the blood-testis barrier during spermatogenesis: the intermediate compartment theory revisited. *J Reprod Dev* 2008;54(5):299-305.
- Yazama F, Tai A. Unexpected role of α -fetoprotein in spermatogenesis. *PLoS One* [periódicos na internet]. 2011 [acesso em 29 fev 2014];6(5):e19387. Disponível em:
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0019387;jsessionid=73DB247F4D59EC31F6E1B71943FD2321>
- Ye L, Su Z, Ge R. Inhibitors of Testosterone Biosynthetic and Metabolic Activation Enzymes. Review. *Molecules* 2011;16, 9983-10001.
- Zoellner H, Höfler M, Beckmann R, Hufnagl P, Vanyek E, Bielek E, et al. Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells. *J Cell Sci* 1996;109(10):2571-80.
- Zogbi C, Tesser RB, Encinas G, Miraglia SM, Stumpp T. Gonocyte development in rats: Proliferation, distribution and death revisited. *Histochem Cell Biol* 2012;138(2):305-22.

9.

Anexo

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "ESTUDO DA EXPRESSÃO DA ALBUMINA NO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO TRATO REPRODUTOR MASCULINO DE MURINOS".

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2855-1(A). Instituição: Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Biologia (IB/UNICAMP).

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Aluna: Mainara Ferreira Barbieri

Orientador: Luis Antonio Violin Dias Pereira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura