



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Célia Cristina Leme Beu

**Características estruturais e bioquímicas de segmentos epididimários do
hamster dourado *Mesocricetus auratus*.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

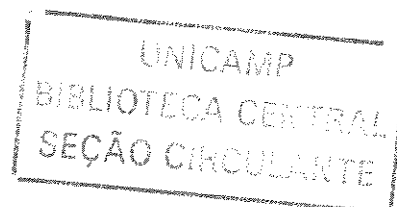
CÉLIA CRISTINA LEME BEU

S/O

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural
na área de Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	+UNICAMP
	B466c
V	EX
TOMBO BC/	65090
PROC.	16-P.00086 05
C ☐	D ☒
PREÇO	11,00
DATA	03/08/05
Nº CPD	

BIBID - 359637

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B466c

Beu, Célia Cristina Leme

Características estruturais e bioquímicas de
segmentos epididimários do hamster dourado
Mesocricetus auratus / Célia Cristina Leme Beu. --
Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Antonio Marcos Orsi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Epidídimo. 2. Morfologia. 3. Bioquímica.
I. Antonio Marcos Orsi. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdet/ib)

Título em inglês: Structural and biochemical characteristics of epididymal segments of the golden hamster *Mesocricetus auratus*.

Palavras-chave em inglês: epididymis, morphology, biochemistry.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Doutorado.

Banca examinadora: Antonio Marcos Orsi, Mary Anne Heidi Dolder, Silvana Martinez Baraldi Artoni, Maíra Aparecida Stefanini, Sebastião Roberto Taboga.

Data da defesa: 31/05/2005.

Campinas, 31 de maio de 2005.

Banca examinadora

Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi



Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder



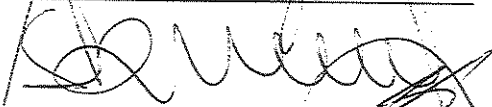
Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi-Artoni



Profa. Dra. Máira Aparecida Stefanini



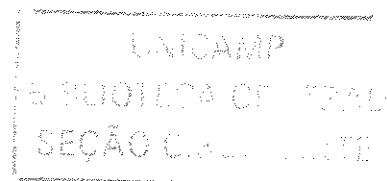
Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga



Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez

200516086



AGRADECIMENTOS

Às universidades UNESP e UNICAMP pela formação obtida enquanto acadêmica nos cursos de graduação e pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Ao Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, bem como aos seus docentes e funcionários técnicos-acadêmicos.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP – Botucatu.

Ao Biotério Central da UNESP.

À Biblioteca da UNESP – Botucatu.

À Biblioteca do Instituto de Biologia da UNICAMP.

À Seção de Fotografias da UNESP – Botucatu.

À Profa. Dra. Maria Júlia Marques.

À Profa. Shirlei Maria Recco Pimentel.

À Sra. Liliam Alves S. Panagio pela atenção dispensada e pela extrema competência.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini.

À Profa. Dra. Patrícia F. F. Pinheiro por todo apoio, amizade e pelas valiosas sugestões. À minha amiga Raquel F. Domeniconi pela amizade, pelos votos de confiança, pela ótima parceria no trabalho e pela força dada nos momentos decisivos para conclusão desta jornada.

Aos meus colegas de trabalho Josiane M. de Mello, Márcia Miranda Torrejais, Nelson O. Osaku e Lucinéia de F. C. Ribeiro pela amizade e apoio.

Aos meus colegas de pós-graduação Karina Simões, Camila Contin, Luís F. Farje, Virginia Richini, Tânia Mara Segatelli e Patrícia Mazzolin.

A todos aqueles que por ventura foram injustamente esquecidos.

Muito obrigada.

Ao Professor Dr. Antonio Marcos Orsi,

Minha eterna gratidão pela sabedoria, generosidade, conhecimento e por todos os ensinamentos transmitidos desde os primeiros passos iniciados ainda na graduação. Que eu não me esqueça disso enquanto viver.

Agradeço a minha família por me esperar, pela paciência e pela compreensão apesar da distância e das minhas ausências.

Agradeço a minha mãe por ser minha primeira orientadora na vida, nos primeiros rabiscos, letras e leituras; e aos meus pais pelo amor incondicional.

Obrigada meu Grande Amor, Omar, pelo companheirismo, por me esperar e pelo amor.

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
INTRODUÇÃO GERAL.....	03
PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS.....	08
1º ARTIGO: “Estudo morfológico e morfométrico do epitélio de revestimento do hamster dourado <i>Mesocricetus auratus</i> ”.....	09
2º ARTIGO: “Regional biochemical analysis of total proteins and LDH in the epididymis of Golden hamster”.....	31
3º ARTIGO: “Biochemical analysis of alkaline phosphatase in regions of the epididymis of the Golden hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>).....	41
4º ARTIGO: “Estrutura do epitélio de revestimento da cauda do epidídimo do hamster dourado”.....	52
CONCLUSÕES GERAIS.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

RESUMO

O epitélio de revestimento do epidídimo do hamster dourado *Mesocricetus auratus* foi estudado nas regiões de segmento inicial, cabeça, corpo e cauda distal. As análises histológicas permitiram identificar células principais, basais, claras, halo e delgadas formando o epitélio de revestimento epididimário. As células principais predominaram na constituição do epitélio epididimário, apresentando contribuição relativa de 67,8% a 74,9% em sua formação. Células claras estavam presentes apenas na cauda distal, enquanto que as células delgadas não ocorreram apenas na cauda epididimária. As análises morfométricas mostraram que a altura epitelial variou ao longo do ducto epididimário, sendo que a maior altura ocorreu no segmento inicial (46,4 μm) e a menor, na cauda distal (12,6 μm). As análises bioquímicas mostraram que as enzimas lactato desidrogenase e fosfatase alcalina apresentaram maior atividade na cauda epididimária. A maior concentração de proteínas totais ocorreu no segmento inicial com redução progressiva ao longo dos segmentos tubulares mais distais. Entre as células principais, claras e basais da cauda distal foram observados grandes espaços intercelulares, preenchidos com restos de membrana, estruturas semelhantes a figuras de mielina, vesículas, corpos multivesiculares ou material floculento. A observação destes espaços entre as células epiteliais da cauda distal sugere que há ocorrência de transcitose na cauda epididimária do hamster dourado, com possível passagem de água, entre outras substâncias, a partir do lúmen. A transcitose, possivelmente, influencia a formação do microambiente luminal epididimário. Os achados permitiram inferir que as regiões de cabeça e corpo do epidídimo estão envolvidas com as atividades iniciais de maturação dos espermatozóides e a cauda, além de armazenar os espermatozóides, deve ser o principal sítio para aquisição do potencial de fertilização.

Palavras-chave: Epidídimo, morfologia, análises bioquímicas, morfometria.

ABSTRACT

The epididymis epithelium of the Golden hamster *Mesocricetus auratus* was studied at the initial segment, caput, corpus and distal cauda regions. The histological analyses identified principal, basal, clear, halo and narrow cells forming the epithelial lining of the epididymis. The principal cells predominated in the epididymis epithelium, contributing from 67.8% to 74.9% in its constitution. Clear cells were present only in the distal cauda, while the narrow cells did not appear only in the epididymal cauda. The morphometric analyses showed that the height of epithelial cells varied along the epididymal duct; the highest were observed at the initial segment (46.4 μm) and the lowest in the distal cauda (12.6 μm). The biochemical analyses showed that the lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase were more active in the epididymis cauda. The highest concentration of total proteins was verified in the initial segment with progressive reduction along the more distal segments. Among the principal, clear and basal cells of the distal cauda large intercellular spaces were observed, being filled with membrane remains, structures like myelin figures, vesicles, multivesicular bodies or flocculent material. The observation of these spaces among the epithelial cells of the distal cauda suggested that transcytosis occurred in the epididymal cauda of the Golden hamster, with possible transit of water and other substances from the lumen. Transcytosis possibly influenced the formation of the epididymis luminal microenvironment. From these observations it can be deduced that the caput and corpus regions of the epididymis were related to specific activities of spermatozoa maturation and the cauda, besides storing of spermatozoa, could be the main site to acquire of the fertilization ability.

Key words: Epididymis, morphology, biochemical analyses, morphometric.

INTRODUÇÃO GERAL

Hamsters são roedores da família Cricetidae, cujas 54 espécies e variedades são caracterizadas em 5 gêneros diferentes. Três destas espécies, de 3 gêneros diferentes, são muito utilizadas em pesquisas biomédicas e, ainda, são populares como animais de adorno e estimação. Assim sendo, o *Mesocricetus auratus*, cujas variedades são o hamster dourado e o hamster champanha, tem sido a espécie de hamster mais extensivamente usada como animal de laboratório.

Estudos sobre a via espermática do hamster dourado enfocando, em conjunto, rede testicular, ductos eferentes e ducto epididimário não se encontram na literatura. No entanto, foram realizados estudos isolados sobre o epidídimo, abordando a sua histologia e estrutura no hamster dourado (Nicander e Glover, 1973). Há relatos abordando estudos histológicos, ultra-estruturais, citoquímicos e da composição do fluido epididimário (Johnson e Howards, 1977; Nagy *et al.*, 1982) realizados em outras variedades e espécies de hamster, assim como há descrição da própria histologia regional epididimária no hamster champanha (Vicentini, 1985; Vicentini e Orsi, 1987; Vicentini e Orsi, 1989; Vicentini *et al.*, 1990).

Conhece-se que os espermatozóides produzidos nos túbulos seminíferos de mamíferos são conduzidos dos testículos à uretra masculina através do sistema de ductos condutores de espermatozóides originados a partir do testículo para serem liberados durante a ejaculação. Este sistema de ductos condutores é formado, seqüencialmente, pela rede testicular, ductos eferentes, ducto epididimário e ducto deferente. Os espermatozóides liberados pelos túbulos seminíferos são imaturos e ao transitarem por este sistema de ductos, principalmente pelo ducto epididimário, adquirem capacidade de fertilizar os oócitos. Logo, os ductos da via espermática não são condutos meramente passivos, mas representam um sistema dinâmico que influencia o microambiente no qual os espermatozóides se encontram, sendo estes submetidos a alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas relacionadas com a sua maturação (Setchell *et al.* 1994).

O epidídimo é formado por um ducto único longo e enovelado. Anatomicamente, o epidídimo de mamíferos é dividido nas regiões de cabeça, corpo e cauda. Estudos histológicos permitiram observar diferenças regionais características na estrutura do epitélio epididimário de várias espécies de mamíferos (Robaire e Hermo, 1988). Talvez, primeiramente Benoit (1926) introduziu o conceito de segmento inicial, caracterizando-o como uma região do ducto epididimário localizada entre os ductos eferentes e a cabeça do epidídimo. Em cobaias, Laurent (1933) adicionou uma zona secretória e uma zona de reserva; Nicander (1957, 1958) propôs uma subdivisão do epidídimo em 6 a 8 regiões epididimárias diferentes, a qual poderia ser usada para

coelhos, cavalos, touros e carneiros. Em ratos, Reid e Cleland (1957) também apresentaram uma divisão histológica epididimária em 6 zonas diferentes, enquanto Holstein (1969) descreveu 8 regiões histologicamente distintas no epidídimo humano.

O epitélio tubular epididimário é colunar e pseudoestratificado, sendo que geralmente há 5 tipos celulares epiteliais característicos que o constituem: as células principais, basais, claras, halo e delgadas (Robaire e Hermo, 1988; Setchell *et al.*, 1994; Serre e Robaire, 1998). Dentre estas, as mais abundantes são as células principais, que estão envolvidas em processos de absorção de fluido luminal e secreção de substâncias como proteínas, do epitélio para o lúmen epididimal (Hamilton, 1975). As células principais do epidídimo são muito ativas em síntese protéica porque possuem retículo endoplasmático granular e complexo de Golgi bem desenvolvidos (Liu *et al.*, 1991).

As células basais são encontradas em menor número, comparativamente às células principais, porém estão presentes ao longo de todo o epitélio de revestimento do ducto epididimário. As funções deste tipo celular não estão, contudo, muito bem definidas. Estudos histoquímicos demonstrando esterase não-específica nas células basais, permitiram sugerir o envolvimento destas células em atividades macrofágica e de degradação intracitoplasmática de substâncias (Suzuki e Glover, 1973). Trabalhos recentes, demonstrando a presença de enzimas associadas à via de síntese das prostaglandinas, sugeriram que as células basais, através da secreção de ânions, tomam parte ativa na formação do fluido intraluminal epididimário (Wong *et al.*, 1999).

As células halo são consideradas como linfócitos intra-epiteliais ou macrófagos, proposta essa corroborada através de estudos ultraestruturais e imunohistoquímicos (Hoffer *et al.*, 1973; Dym e Romrell, 1975; Wang e Holstein, 1983; Nashan *et al.*, 1989).

As células claras localizam-se, principalmente, no epitélio da cauda do epidídimo, tendo sido relacionadas às atividades de absorção de íons salinos e proteínas presentes no fluido luminal epididimário (Flickinger *et al.*, 1978). Células delgadas não têm um significado funcional totalmente esclarecido; é possível que tenham capacidade de reabsorção e acidificação do fluido epididimário (Martinez-García *et al.*, 1995).

A presença dos diferentes tipos celulares no epitélio epididimário de mamíferos varia regionalmente, sendo que determinadas células ocorrem com maior frequência em alguns segmentos do que em outros. O epitélio epididimário é caracterizado não só pelos diferentes tipos celulares que o constituem mas também por diferenças da altura epitelial e dos diâmetro tubular e

luminal ao longo do seu comprimento, conforme vários relatos publicados (Robaire e Hermo, 1988; Setchell *et al.*, 1994; Serre e Robaire, 1998).

Estudos feitos sobre as células epididimárias em microscopia eletrônica de transmissão mostraram que elas possuem organelas citoplasmáticas envolvidas na síntese de proteínas e de outras substâncias (Nicander, 1965; Hamilton, 1971; Robaire e Hermo, 1988). A presença do complexo de Golgi bem desenvolvido é uma característica conhecida das células principais do epitélio epididimário de mamíferos e toma parte ativa na formação de muitos lisossomos presentes em seus citoplasmas (Nicander e Glover, 1973).

As atividades metabólicas variam ao longo das diversas regiões do ducto epididimário, criando desta forma microambientes intraluminais nos quais os espermatozóides sofrem maturação. Evidências de endocitose de fase fluida foram observadas em todos os segmentos epididimários, no entanto esta atividade parece ser mais intensa no segmento médio do que no segmento inicial e, ainda, parece ser inconstante no segmento terminal de mamíferos como o coelho, rato e hamster (Nicander e Glover, 1973; Hermo *et al.*, 1994).

O segmento terminal do hamster dourado, normalmente, parece não ter atividade metabólica notável quando comparado aos demais segmentos epididimários, uma vez que as atividades de suas células podem ser influenciadas por fatores diferentes daqueles que atuam sobre as células do restante do epitélio do ducto epididimário (Nicander e Glover, 1973). Vitale-Calpe e Aoki (1970) relataram que no hamster as células principais do segmento terminal tornam-se mais altas, 1 hora após o coito e que aparentemente o complexo de Golgi torna-se menor e os grânulos eletrondensos desaparecem. Assim sendo, parece que a frequência de ejaculação seria um dos fatores que influenciam as atividades do segmento terminal, mas não dos demais segmentos epididimários (Vitale-Calpe e Aoki, 1970).

O epidídimo é capaz de absorver água e líquidos, bem como íons sódio e cloreto; sendo estes últimos absorvidos assim que o fluido luminal passa dos testículos para os ductulos eferentes e, destes para o epidídimo (Scott *et al.*, 1963; Robaire e Hermo, 1988). Atividades de absorção ocorrem nas porções proximais do epidídimo, onde o epitélio transfere fluido do lúmen para o interstício tubular e absorve material particulado do lúmen epididimal. O material absorvido pelas células principais do epitélio epididimário é transferido para corpos multivesiculares e, presumivelmente, é digerido por enzimas proteolíticas e hidrolíticas lisossomais, caracterizando-se um processo de digestão heterofágica (Robaire e Hermo, 1988).

Secreção é outra função atribuída ao epitélio epididimário, que é capaz de secretar no lúmen tubular uma variedade de substâncias, entre elas íons salinos, pequenas moléculas

orgânicas, proteínas e glicoproteínas (Flickinger, 1983; Robaire e Hermo, 1988; Setchell *et al.*, 1994). Por exemplo, estudos dos padrões eletroforéticos de bandas protéicas, obtidas de diferentes segmentos do epidídimo do rato, deram evidências de ocorrência de secreção de proteínas (Olson e Hinton, 1985). Também, o aumento da densidade do material luminal deve refletir a secreção de proteínas no segmento inicial e cabeça do epidídimo (Robaire e Hermo, 1988). Há mais proteínas nos fluidos dos ductos epididimário e deferencial do que no fluido testicular (Scott *et al.*, 1963). O padrão de proteínas presentes no fluido epididimário altera-se ao longo do ducto do epidídimo e há padrões característicos de polipeptídios e glicoproteínas sintetizados e secretados em segmentos tubulares específicos (Olson e Hinton, 1985).

As enzimas fosfatases ácida e alcalina apresentam localizações histoquímicas distintas no epitélio epididimário, segundo Nicander (1957, 1958). Nestes estudos a fosfatase alcalina, presente na fração microsomal, reagiu positivamente nos estereocílios em todo o epidídimo, enquanto que a fosfatase ácida lisossomal reagiu fortemente apenas nos dois segmentos epididimários proximais de coelho, cavalo, touro e carneiro (Nicander, 1957; 1958).

Atividades de fosfatase alcalina foram detectadas em testículos, ductulos eferentes, epidídimos e ductos deferentes (Alsum e Hunter, 1978). A maior atividade das células basais epididimárias foi detectada no corpo e na cauda proximal. Moniem e Glover (1972) localizaram fosfatase alcalina em gotas citoplasmáticas de espermatozóides de carneiro e de coelho. Contudo, não localizaram atividades histoquímicas similares da fosfatase alcalina em epidídimos do hamster e rato, a despeito dos altos níveis desta enzima notados no fluido epididimário (Moniem e Glover, 1972). Foi sugerido que a fosfatase alcalina tem participação em processos de defosforilação realizados pela célula principal e no transporte de grupos fosfato entre o fluido epididimário e os espermatozóides, assim estando envolvida na maturação de espermatozóides (Moniem e Glover, 1972).

A ausência de açúcares redutores e a baixa concentração de ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo do fluido epididimário de carneiro, suscita a questão do tipo de substrato para o metabolismo dos espermatozóides. Logo, as condições metabólicas no epidídimo devem ser aeróbicas, e se os espermatozóides estão quiescentes pelo menos metabolismo basal ocorre, com o objetivo de manter a integridade dos mesmos. Ácido láctico, em altas concentrações, foi encontrado no fluido luminal da cabeça e cauda epididimais, podendo ser um possível substrato para o metabolismo dos espermatozóides (Scott *et al.*, 1963).

O ducto epididimário propicia microambientes complexos e indispensáveis à maturação e sobrevivência dos espermatozóides, além de ser um sítio de estocagem dos espermatozóides,

sendo, portanto, fundamental no processo reprodutivo. Embora vários estudos tenham abordado o ducto epididimário de mamíferos, ele apresenta características variáveis de acordo com a espécie estudada. Também em um mesmo ducto epididimário, variações regionais são encontradas, visto que há diferentes tipos celulares em seu epitélio de revestimento que variam em sua distribuição e características morfológicas, de acordo com a região epididimária estudada. Assim, justifica-se, neste trabalho, definir as características morfológicas nas diferentes regiões do epitélio de revestimento do ducto epididimário do hamster dourado e estabelecer correlações morfofisiológicas a partir dos dados obtidos das análises bioquímicas. Tais informações obtidas, poderão dar suporte em estudos futuros sobre a ação de determinadas drogas sobre o epitélio de revestimento epididimário e, conseqüente, a interferência das mesmas em processos reprodutivos.

PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS

- 1 – Realizar estudos morfológicos no epitélio de revestimento das regiões segmento inicial, cabeça, corpo e cauda distal do ducto epididimário do hamster dourado *Mesocricetus auratus*. Os estudos morfológicos incluem análises histológicas e morfométricas realizadas em microscopia de luz, bem como análises ultra-estruturais do epitélio de revestimento epididimário do hamster.
- 2 – Realizar análises bioquímicas dos tecidos epididimários das regiões segmento inicial, cabeça, corpo e cauda distal do hamster dourado.

Logo, os objetivos deste trabalho, com base no exposto em proposições, foram: determinar as variações regionais das características estruturais, morfométricas, ultraestruturais e bioquímicas que ocorrem no segmento inicial, cabeça, corpo e cauda distal do ducto epididimário do hamster dourado *Mesocricetus auratus*, bem como estabelecer as possíveis correlações morfofisiológicas dos eventos observados ao longo do ducto.

1º Artigo: Elaborado conforme normas do periódico "Anatomia, Histologia, Embryologia"

Estudo morfológico e morfométrico do epitélio epididimário do hamster dourado
Mesocricetus auratus

Célia C. L. Beu^{1,2}, Antonio M. Orsi^{3,4}, Raquel F. Domeniconi²

¹ Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade do Oeste do Paraná, Cascavel, PR

² Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, SP

³ Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP

⁴ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Marília, Marília, SP

Resumo. Os estudos realizados no epidídimo do hamster dourado mostraram que as diferentes regiões do órgão podem ser definidas com base em critérios morfológicos, bem como através de análises morfométricas. O segmento inicial apresentou estereocílios longos e a luz tubular freqüentemente vazia, sendo provavelmente uma região de trânsito rápido de espermatozóides. No segmento inicial a altura do epitélio, com valor médio de 46,38 µm, foi a maior comparativamente à altura epitelial das demais regiões epididimárias. Outra característica observada no segmento inicial foi o maior número de células delgadas presentes neste segmento. Os segmentos de cabeça e corpo do epidídimo apresentaram pequenas diferenças nos valores médios de altura epitelial com 32 µm e 34,85 µm em média, respectivamente quando comparados entre si. Os valores médios obtidos para os diâmetros tubulares foram de 175,73 µm para a cabeça e de 261,93 µm para o corpo epididimários. As características observadas nos segmentos de cabeça e corpo, tais como o grande número de espermatozóides presentes na luz tubular e o citoplasma supranuclear das células principais rico em vacúolos, sugerem o envolvimento destas regiões em processos de maturação de espermatozóides com intensa atividade metabólica epididimal. A cauda distal foi o segmento que apresentou epitélio mais baixo com valor médio de 12,6 µm dentre todos os segmentos estudados e a luz tubular estava muito aumentada. A ocorrência de células claras

exclusivamente no epitélio da cauda epididimal foi outra característica marcante observada no ducto epididimário do hamster dourado.

Palavras-chave: Epidídimo, morfometria, morfologia, absorção, secreção, maturação de espermatozóides, estocagem de espermatozóides.

Summary. Studies of the Golden hamster's epididymis showed that different regions of the organ could be defined on the basis morphological criteria, as well as through morphometric analysis of some tubular parameters. The initial segment showed long apical microvilli and the tubular lumen was seen frequently empty suggesting of rapid transit of spermatozoa. Also in the initial segment a tall pseudostratified columnar epithelium was noted, with 46.38 μm of height on the average. Another typical feature of the initial segment of hamster's epididymis was the presence of the highest number of narrow cells. The caput and corpus epididymidis showed a small difference between their respective epithelial cell heights which were 32.0 μm in the first and 34.85 μm in the second segment. These values were smaller than the value observed for the initial segment, as previously reported. The average values taken for the tubular diameters were respectively 175.73 μm for the epididymal caput and 261.93 μm for the epididymal corpus. Morphological characteristics observed in caput and corpus epididymidis, such as the great number of spermatozoa inside the tubular lumen and occurrence of a great number of vacuoles present in the supranuclear cytoplasm of principal cells, suggested relationships of these cells to spermatozoa maturation and a high metabolic activity of the epithelium compartment. The distal cauda of the hamster's epididymis showed the lowest epithelial height of 12.6 μm , comparatively to the other epididymidis regions of the Golden hamster. Hitherto the most striking feature verified in this organ was the occurrence of clear cells present only in the cauda epithelium.

Key words: Epididymis, morphometry, morphology, cellular absorption, secretory function, spermatozoa maturation, spermatozoa storage.

INTRODUÇÃO

A divisão do ducto epididimário de mamíferos em regiões histológicas distintas é baseada em parâmetros morfométricos como variações de altura epitelial e dos diâmetros tubular e luminal

(Ramos e Dym, 1977; Goyal, 1985; Orsi *et al.*, 1985; Serre e Robaire, 1998), e presença de diferentes tipos celulares que constituem o epitélio de revestimento epididimário. Glover e Nicander (1971) propuseram que o epidídimo de mamíferos poderia ser dividido em três regiões principais, os segmentos: inicial (Benoit, 1926), médio e terminal. Flickinger *et al.* (1978) consideraram no hamster dourado a presença das regiões de segmento inicial, cabeça, corpo, cauda proximal e cauda distal.

Nicander (1958) estudando a histologia regional do epidídimo em touro, cavalo e carneiro descreveu 6 zonas histologicamente definidas, sendo três delas localizadas na cabeça, duas no corpo e, uma na cauda (Nicander, 1958). Holstein (1969) descreveu oito regiões histológicas no epidídimo humano. Às regiões epididimárias atribuíram-se diferentes funções quanto aos espermatozóides à medida que eles transitam ao longo do compartimento luminal do ducto. As regiões inicial e média têm sido relacionadas com a maturação e emissão de espermatozóides, enquanto que à região terminal é atribuída a função de estocagem de espermatozóides até o momento da ejaculação (Setchell *et al.*, 1994). Os tipos celulares presentes no epitélio de revestimento epididimário do rato albino são as células principais, basais, claras, halo e delgadas (Robaire e Hermo, 1988; Adamali e Hermo, 1996; Serre e Robaire, 1998). Todos estes tipos celulares variam na porcentagem relativa em que contribuem para a constituição do epitélio de revestimento em cada um dos segmentos epididimários, sendo que as células principais apresentam a maior porcentagem relativa na constituição do epitélio em todos os segmentos do epidídimo do rato (Serre e Robaire, 1998). As células principais epididimárias estão envolvidas em processos de absorção de fluido luminal e secreção, sendo ativas na síntese protéica (Liu *et al.*, 1991, Setchell *et al.*, 1994). As células basais com participação relativamente expressiva na constituição do epitélio epididimário são encontradas em todas as regiões epididimárias (Robaire e Hermo, 1988; Setchell *et al.*, 1994; Serre e Robaire, 1998). A estas células foi atribuída a função de proteção epitelial, atuando contra choque eletrofilico ou atuando como macrófagos (Veri *et al.*, 1993; Yeung e Cooper, 1994). Mais recentemente, foi relatado que as células basais atuam ativamente na formação do fluido luminal, secretando a prostaglandina E (PGE), substância que influencia na secreção de íons salinos e de água no lúmen epididimário (Wong *et al.*, 1999).

As células claras ocorrem apenas nas regiões de cabeça, corpo e cauda do epidídimo do rato albino (Robaire e Hermo, 1988; Serre e Robaire, 1998). Células claras também foram identificadas no epitélio epididimário do camundongo (Robaire e Hermo, 1988) e do gambá (Orsi, 1980; Orsi *et al.*, 1980). No entanto, estas células não foram observadas no epitélio epididimário de touro (Goyal, 1985), porco (Orsi *et al.*, 1985) e macaco Rhesus (Ramos e Dym, 1977). Às

células claras foi proposto que poderiam atuar captando componentes luminiais presentes no ducto epididimário (Flickinger *et al.*, 1978; Moore e Bedford, 1979a) e na eliminação dos conteúdos das gotas citoplasmáticas liberadas durante trânsito dos espermatozóides ao longo do epidídimo (Herms *et al.*, 1988; Serre e Robaire, 1998). Células delgadas são encontradas no epitélio epididimário de rato exclusivamente no segmento inicial e podem estar envolvidas na degradação de proteínas endocitadas (Robaire e Herms, 1988; Serre e Robaire, 1998). Células halo são encontradas no epitélio de revestimento de todo o ducto epididimário (Robaire e Herms, 1988; Setchell *et al.*, 1994; Serre e Robaire, 1998). Estas células têm sido observadas no epitélio de revestimento do ducto epididimário de todos os mamíferos nos quais o epidídimo foi estudado, sendo notavelmente similares em todas essas espécies (Robaire e Herms, 1988). Células halo têm sido referidas como linfócitos intraepiteliais, afirmação esta feita com base em estudos ultraestruturais e imunohistoquímicos (Hoffer *et al.*, 1973; Dym e Romrell, 1975).

O ducto epididimário é uma parte do sistema de ductos excretores do testículo de extrema importância para a maturação, sobrevivência e manutenção dos espermatozóides intraluminais. Visto que é uma estrutura fundamental na fertilidade masculina e apresenta características marcantes e variáveis, o objetivo deste trabalho foi estudar e padronizar as características morfológicas e morfométricas do epitélio epididimário do hamster dourado em microscopia de luz e eletrônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Hamsters dourados, *Mesocricetus auratus*, adultos, provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, SP, foram utilizados. Os animais foram mantidos em condições controladas de luz e temperatura, com água e comida fornecidas “ad libitum”. Foram sacrificados mediante saturação anestésica por éter etílico. Os epidídimos de 5 hamsters foram imediatamente coletados, reduzidos em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda distal e fixados por 24 horas em solução de Bouin. Após fixação, os tecidos foram lavados em álcool 70% e submetidos à rotina histológica. Os fragmentos foram desidratados em séries alcoólicas ascendentes, diafanizados em xileno (Merck® Brasil) e incluídos em Paraplast PlusTM (Oxford Labware, St. Louis, USA). Secções de 7µm foram coradas com H/E, tricrômicos de Masson e Mallory, Azan-Hendel-Mallory, examinadas e documentadas em microscópio Olympus BH-2.

Os epidídimos de 2 outros hamsters foram coletados, após perfusão com solução fixadora de MacDowell, pH 7.3, 0,1M, via o ventrículo cardíaco esquerdo. Após coleta, os epidídimos

foram seccionados em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda distal e mantidos no mesmo fixador por 4 h a 4°C. Em seguida, os tecidos foram lavados em tampão fosfato de sódio pH 7,4, 0,1M, desidratados em séries alcoólicas ascendentes e incluídos em historesina (Historesin Leica Jung, Alemanha). Secções de 3 µm foram coradas com azul de toluidina 0,1%/fucsina básica 0,5% (AT/FUC) e hematoxilina/floxina B (H/F) e examinadas em microscópio Zeiss (Alemanha).

As análises morfométricas foram realizadas em secções de 7 µm incluídas em Paraplast PlusTM e coradas com H/E. Secções histológicas epididimais de 3 animais foram examinadas, sendo que foram utilizadas 10 lâminas de cada epidídimo para as mensurações. As mensurações foram feitas utilizando ocular micrométrica em microscópio Olympus BH-2 (Japão).

A distribuição relativa dos diferentes tipos de células nos quatro segmentos epididimários, designados para os estudos, foi estimada por contagem das células nas secções do túbulo, sendo feitas contagens em 10 secções por epidídimo e por animal em cada um dos segmentos. Os valores obtidos das contagens de células foram corrigidos, com base em trabalho prévio (Amann, 1962), aplicando-se fórmula específica cujo resultado forneceu o valor corrigido do número de células contadas.

Os epidídimos de outros 2 hamsters foram utilizados para análises à microscopia eletrônica de transmissão. Os fragmentos de tecidos coletados foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,3) a 4°C por 2 horas. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, desidratadas em acetona e incluídas em Araldite (Polysciences, USA). Secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As telas com os cortes foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Phillips CEM 100.

As análises estatísticas utilizaram delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os valores médios obtidos foram analisados pelo teste t de Tukey a 5%.

RESULTADOS

Os resultados obtidos dos estudos morfométricos realizados nas regiões de segmento inicial, cabeça, corpo e cauda distal do epidídimo do hamster dourado são mostrados na tabela 1 e nas figuras 1, 2 e 3. Os resultados da porcentagem relativa de cada tipo celular na constituição do epitélio são apresentados na tabela 1. As análises dos dados morfométricos de altura média do epitélio mostraram que a altura do epitélio diminui da porção proximal para a porção distal do

ducto (Fig. 1), sendo que a maior altura epitelial ocorre no segmento inicial ($46,38 \pm 0,24 \mu\text{m}$) e a menor, na cauda do epidídimo ($12,60 \pm 0,12 \mu\text{m}$, Fig. 1). Em relação aos dados morfométricos obtidos a partir das mensurações do diâmetro médio luminal, observou-se que há aumento notável deste diâmetro da porção proximal para a distal do ducto epididimário (Fig. 2). O menor diâmetro médio luminal ocorre no segmento inicial ($100,36 \pm 1,88 \mu\text{m}$), e o maior na cauda distal ($530,65 \pm 11,42 \mu\text{m}$, Fig. 2). Em relação ao diâmetro médio tubular, observou-se que o menor diâmetro ocorre na cabeça ($175,73 \pm 1,95 \mu\text{m}$) e o maior diâmetro na cauda distal do epidídimo ($556,96 \pm 11,02 \mu\text{m}$, Fig. 3).

O epitélio de revestimento do epidídimo do hamster dourado pode ser caracterizado como pseudoestratificado colunar e estereociliado, sendo constituído por diferentes tipos celulares como as células principais, basais, halo, delgadas e claras (Figs. 4 e 5). A distribuição relativa dos diferentes tipos celulares que formam o epitélio varia ao longo das diferentes regiões epididimárias (tabela 1). As células principais, embora estejam presentes em todas as regiões do epidídimo, apresentam maior contribuição relativa na formação do epitélio na cauda distal, enquanto que as células delgadas estão presentes em maior número no epitélio do segmento inicial do epidídimo (tabela 1). Dois tipos celulares do epitélio de revestimento epididimário podem ser destacados por serem encontrados restritos às regiões epididimárias. Esse é o caso das células claras, que ocorrem apenas no epitélio da cauda e das células delgadas ausentes na cauda e presentes no epitélio das demais regiões do ducto epididimário do hamster dourado.

No segmento inicial epididimal do hamster as células principais são altas, com núcleos ovóides ou arredondados e localizados, predominantemente, no 1/3 basal do citoplasma celular (Figs. 4 e 6). No citoplasma supranuclear das células principais é possível observar uma região clara, a qual tem sido caracterizada como correspondente à zona de Golgi (Figs. 6 e 9). As células principais do epitélio epididimal das regiões de cabeça e corpo apresentam núcleo arredondado, freqüentemente localizado no 1/3 basal do citoplasma (Figs. 7 e 8). Em algumas destas células, os núcleos estão dispostos à meia altura do ápice citoplasmático (Figs. 7 e 8), neste caso sendo denominadas como células apicais. O citoplasma supranuclear das células principais apresenta um grande número de vacúolos (Figs. 7 e 8).

Na cauda distal, as células principais são predominantemente cúbicas baixas tendo núcleo oval, com localização basal no citoplasma celular (Figs. 5 e 9). Na região supranuclear das células principais deste segmento pode-se notar também a existência da zona de Golgi (Fig. 9), porém não tão nítida quanto aquela observada nas células principais dos demais segmentos.

As células basais apresentam núcleo ovalado e algumas vezes arredondado no segmento inicial, cabeça e corpo do epidídimo (Figs. 4, 7 e 8). As células basais do epitélio de revestimento da cauda são pavimentosas e localizam-se, como nos demais segmentos, adjacentes à membrana basal tubular (Figs. 5 e 9).

As células halo são pequenas, apresentam núcleo denso, arredondado ou ovalado estando, freqüentemente, circundado por uma estreita faixa de citoplasma (Figs. 4, 7 e 8). Estas células podem ser observadas em diferentes alturas do epitélio ao longo do ducto epididimário, podendo estar localizadas desde uma posição justabasal (Fig. 4 e 8) até próximo ao ápice epitelial (Fig. 7).

Células delgadas, presentes em maior número no segmento inicial (Tab. 1), são caracterizadas por apresentar núcleo alongado e, geralmente, estreitado (Figs. 4, 6 e 10), o qual se localiza apicalmente no epitélio do ducto (Figs. 4, 7 e 10). Observações feitas em microscopia eletrônica de transmissão mostraram que o citoplasma das células delgadas é mais eletrondenso do que aquele das células principais adjacentes (Figs. 12 e 13). No citoplasma supranuclear das células delgadas podem ser visualizados vesículas, vacúolos com conteúdo claro e vacúolos com restos de membrana, corpos lisossomais e mitocôndrias (Figs. 12, 13 e 14). O citoplasma infranuclear aparentemente se liga à membrana basal por fina trave citoplasmática (Figs. 10 e 11) e algumas vezes parece não manter nenhuma conexão com a membrana basal (Figs. 4 e 6).

As células claras são cúbicas baixas e aparentam ter a mesma altura que as células principais e aparentam superar as células principais, em termos comparativos, com relação à largura (Figs. 5 e 9). As observações realizadas em microscopia de luz de secções histológicas incluídas em Paraplast PlusTM, mostram que o citoplasma das células claras tem aspecto hialino (Fig. 5). As observações feitas em secções incluídas em historesina mostram que o citoplasma deste tipo celular é repleto de vacúolos e grânulos de tamanhos diversos. Estes últimos parecem ser de natureza lisossomal (Fig. 9).

O aspecto do conteúdo luminal apresentou características diferentes ao longo do ducto epididimário. No segmento inicial, o lúmen geralmente aparece vazio e com longos estereocílios projetados para o seu interior (Figs. 4 e 6), enquanto que o lúmen da cauda distal encontra-se repleto de espermatozóides e com estereocílios muito curtos (Fig. 9), comparativamente ao observado no segmento inicial.

Tabela 1 – Distribuições relativas (% do total $\pm$ desvio padrão) dos diferentes tipos celulares no epitélio das regiões de segmento inicial, cabeça, corpo e cauda distal do epidídimo do hamster dourado:

Regiões epididimárias	Tipos celulares				
	Principal	Basal	Halo	Delgada	Clara
Segmento inicial	67,8 $\pm$ 4,6	11,0 $\pm$ 0,6	17,0 $\pm$ 4,6	4,0 $\pm$ 0,2	-
Cabeça	73,1 $\pm$ 1,6	11,8 $\pm$ 1,2	12,2 $\pm$ 0,6	2,9 $\pm$ 0,9	-
Corpo	72,6 $\pm$ 2,1	11,4 $\pm$ 0,9	14,7 $\pm$ 2,0	1,2 $\pm$ 0,4	-
Cauda distal	74,9 $\pm$ 1,8	12,5 $\pm$ 1,6	5,6 $\pm$ 1,2	-	6,9 $\pm$ 1,2

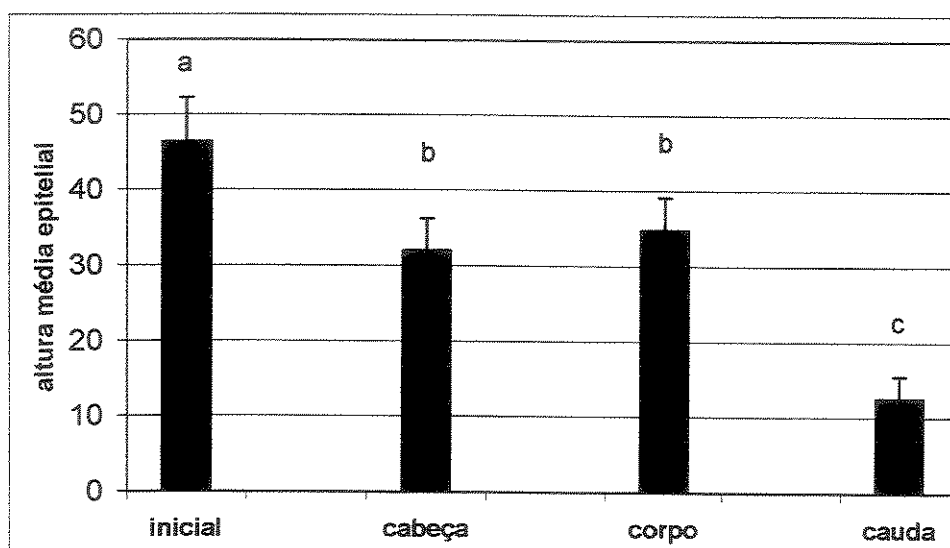


Fig. 1 – Altura média epitelial (μm) das regiões segmento inicial, cabeça, corpo e cauda distal do epidídimo do hamster dourado. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão; mesmas letras indicam que os valores não diferem significativamente, $p < 0,05$.

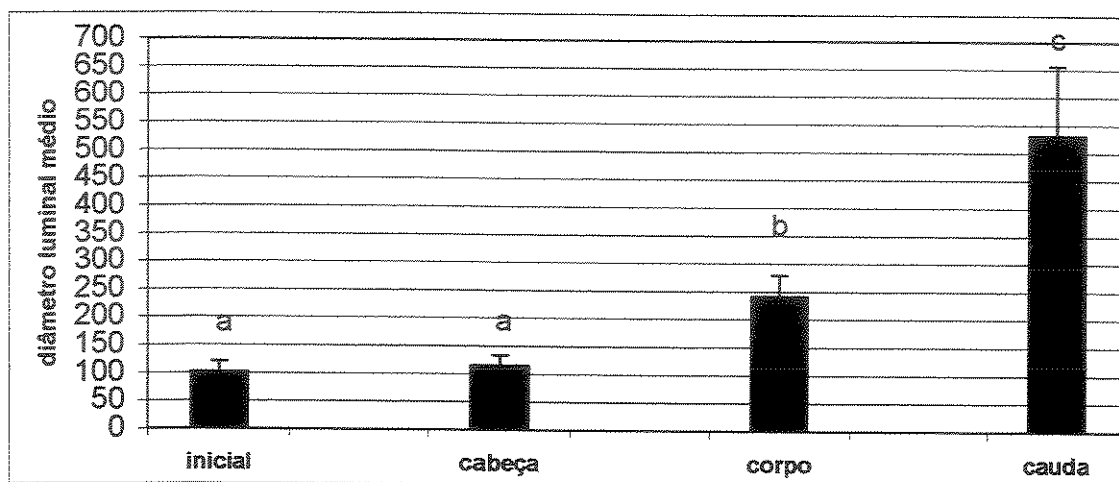


Fig. 2 – Diâmetro médio luminal (μm) das regiões segmento inicial, cabeça, corpo e cauda distal do epidídimo do hamster dourado. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão; mesmas letras indicam que os valores não diferem significativamente, $p < 0,05$.

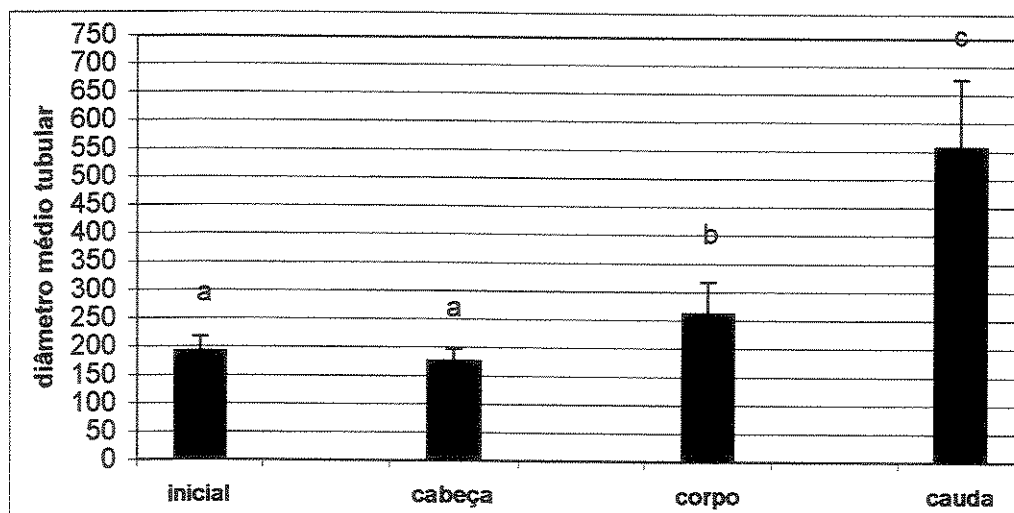
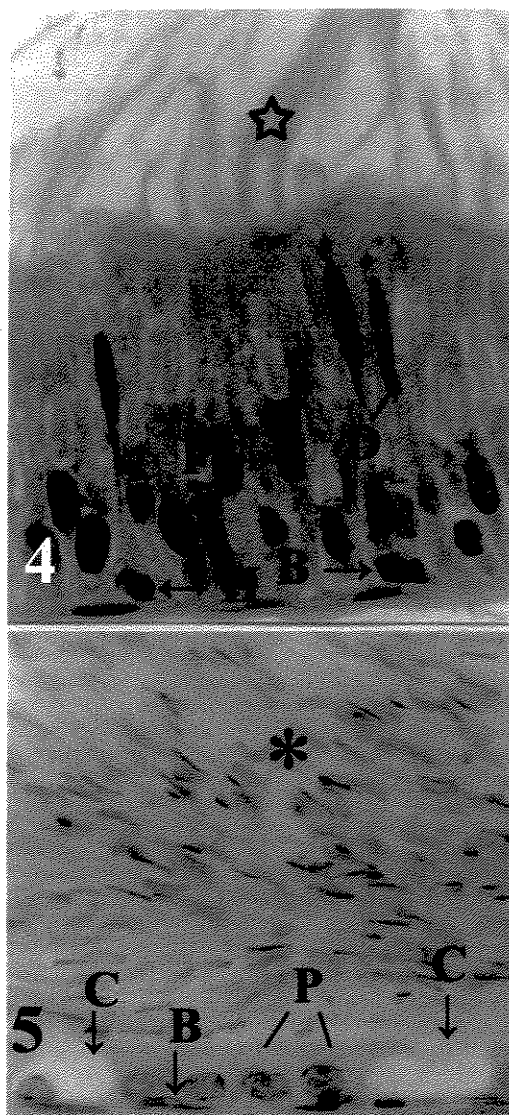
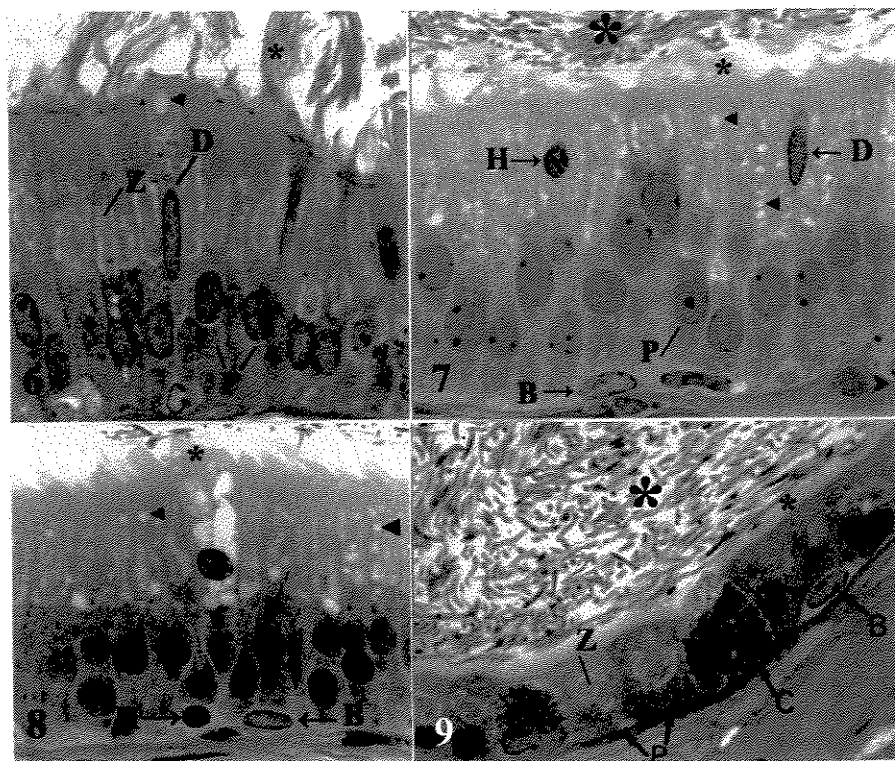


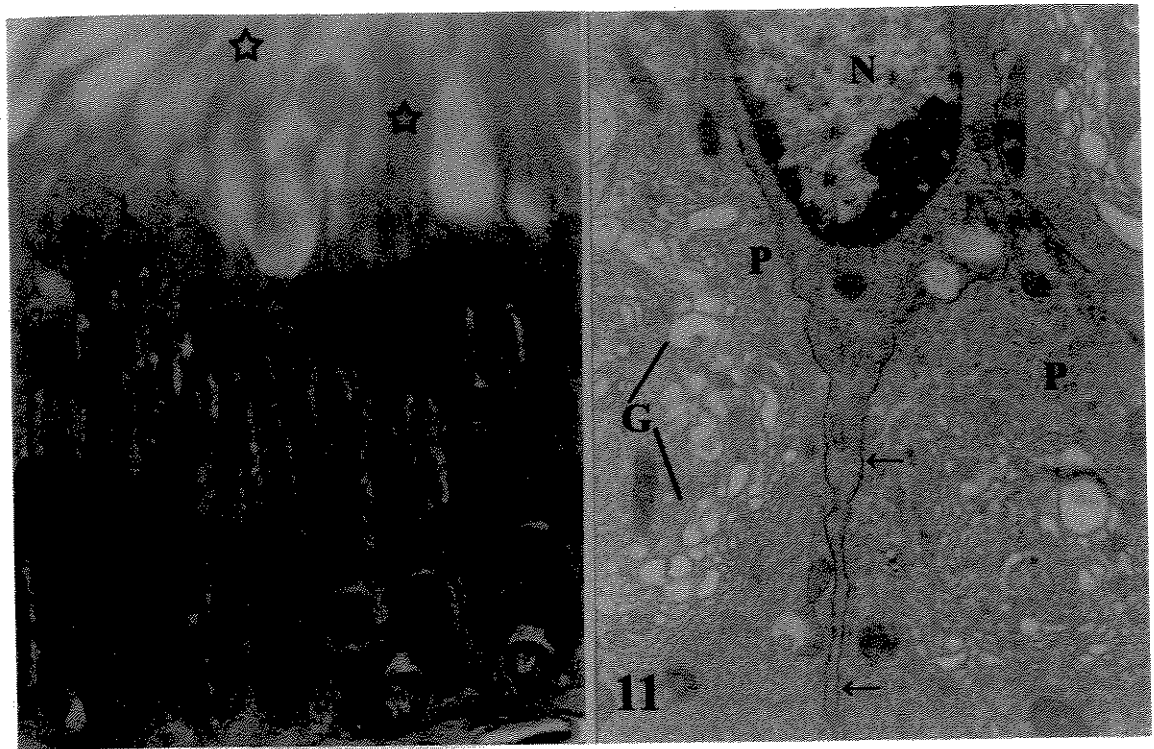
Fig. 3 – Diâmetro médio tubular (μm) das regiões segmento inicial, cabeça, corpo e cauda distal do epidídimo do hamster dourado. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão; mesmas letras indicam que os valores não diferem significativamente, $p < 0,05$.



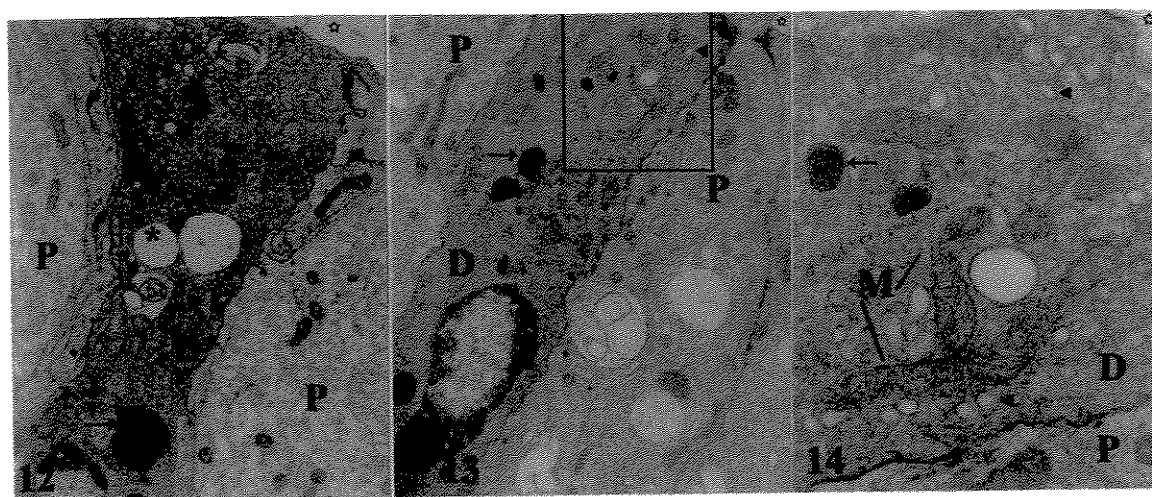
Figs. 4 e 5 - Fotomicrografias do segmento inicial (em 4) e da cauda distal (em 5) do epidídimo do hamster dourado, mostrando: células principais (P), basais (B), delgadas (D), halo (H) e claras (C), estereocílios (estrela) e espermatozóides na luz do túbulo (asterisco). AT em 4 e H/E em 5. 100x.



Figs. 6 - 9 - Fotomicrografias do segmento inicial (6), cabeça (7), corpo (8) e cauda distal (9) do epidídimo do hamster dourado, mostrando: células principais (P), basais (B), delgadas (D), halo (H) e clara (C), vesículas no citoplasma supranuclear (cabeças-de-seta), zona de Golgi (Z), estereocílios (asteriscos pequenos) e espermatozóides (asteriscos grandes) na luz do túbulo. AT/F em 6 e AT em 7, 8 e 9. 100x.



Figs. 10 e 11 – Fotomicrografia do segmento inicial (10) e eletromicrografia do corpo (11) do epidídimo do hamster dourado. Em 10 são indicados: célula principal (P), trave citoplasmática da célula delgada (setas), zona de Golgi (Z) e estereocílios (estrelas). Em 11 são indicados: núcleo da célula delgada (N), citoplasma das células principais (P), complexo de Golgi (G) e trave citoplasmática na região infranuclear da célula delgada (setas). AT. 100x em 10 e 1950x em 11.



Figs. 12 - 14 - Eletromicrografias da cabeça do epidídimo do hamster dourado, mostrando: células principais (P), células delgadas (D), vesículas (cabeças-de-seta), mitocôndrias (M), vacúolos (asteriscos), corpos densos (seta), luz tubular (estrela). Fig. 14 mostra detalhe da região apical da célula delgada da Fig. 13. 2650x em 12 e 13 e 11500x em 14.

DISCUSSÃO

A variação observada de alturas epiteliais ao longo do epidídimo do hamster dourado foi uma das características que deram suporte à divisão do ducto epididimário em regiões. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a altura máxima do epitélio ocorreu no segmento inicial, enquanto que a menor altura epitelial ocorreu na cauda distal, o que é concordante com o que foi relatado para o gambá (Orsi, 1980), o bovino (Orsi *et al.*, 1984; Goyal, 1985), o suíno (Orsi *et al.*, 1985), o rato (Serre e Robaire, 1998) e o gerbilo (Domeniconi, 2004). No entanto, estas observações foram, comparativamente, diferentes daquelas feitas no epidídimo do macaco *Rhesus* (Alsum e Hunter, 1978) no qual a maior altura epitelial ocorreu na cabeça distal, enquanto que no ducto epididimário do marsupial *Honey possum* a maior altura epitelial ocorreu no segmento terminal do epidídimo e a menor no segmento inicial (Cummins *et al.*, 1986).

Algumas características do epitélio de revestimento do epidídimo do hamster dourado foram descritas em dois relatos anteriores (Nicander e Glover, 1973; Flickinger *et al.*, 1978), os quais abordaram estudos feitos em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Nicander e Glover (1973) descreveram o epitélio de revestimento das regiões denominadas segmentos inicial, médio e terminal do ducto epididimário e neste relato a altura epitelial das regiões estudadas foi comparada, sem estudos morfométricos, com base apenas nas observações feitas em microscopia de luz. O relato feito por Flickinger *et al.* (1978) apresentou dados morfométricos sobre a altura do epitélio do segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo, cujos dados relativos à altura das regiões de cabeça e corpo discordaram daqueles obtidos neste estudo, visto que para aqueles autores a altura do epitélio da cabeça era maior que a do corpo, enquanto nossas observações mostraram que a altura do epitélio do corpo foi maior do que a da cabeça. Os dados obtidos de estudos morfométricos realizados no epitélio epididimário do hamster champanha (Vicentini e Orsi, 1987) são, em linhas gerais, concordantes com os resultados aqui obtidos, resguardadas as peculiaridades específicas de ambas variedades do *Mesocricetus auratus*.

Os dados obtidos de diâmetro luminal mostrando diâmetro do corpo maior do que o correspondente da cabeça são comparáveis àqueles observados no macaco *Rhesus* (Alsum e Hunter, 1978). No entanto, no bovino (Goyal, 1985) e no rato (Serre e Robaire, 1998) o diâmetro luminal da cabeça foi maior que o do corpo epididimal. Os maiores diâmetros luminal e tubular encontrados na cauda epididimária, caracterizando uma luz tubular bastante aumentada, provavelmente estariam relacionados à função de estocar espermatozóides, realizada pela cauda do epidídimo. Embora os relatos, citados anteriormente, tenham abordado a estrutura do ducto

epididimário do hamster dourado, nenhum deles apresentaram dados morfométricos relativos aos diâmetros tubular e luminal do ducto epididimário nesta espécie como se fez neste estudo. Sendo o epidídimo do hamster mais "padronizado" do que o do camundongo (Nicander e Glover, 1973), foi importante aqui estabelecer parâmetros de estudos morfométricos deste ducto para estudos posteriores de possíveis alterações morfológicas ou histofisiológicas do epidídimo.

As células típicas do epitélio de revestimento do epidídimo, ou seja, as células principais, basais, halo, claras e delgadas foram observadas no epidídimo do hamster dourado. Diferentemente das observações feitas para o hamster dourado, no hamster champanha foram descritas apenas as células principais, basais, claras e apicais constituindo o epitélio de revestimento epididimário (Vicentini, 1985; Vicentini e Orsi, 1987, Vicentini *et al.*, 1990). Nicander e Glover (1973) denominaram as células halo presentes no epitélio epididimário de pequenas células claras e, as células claras foram denominadas de células colunares claras vacuolizadas por estes autores.

Embora as células principais, basais, halo, claras e delgadas estejam presentes no epitélio epididimário do hamster dourado, alguns tipos celulares como as células claras e delgadas não foram observados em todas regiões. Células claras estavam presentes apenas na cauda epididimária do hamster dourado diferindo do que foi relatado para o gerbilo, no qual as células claras foram observadas em todos os segmentos epididimários (Domeniconi, 2004). Células delgadas estavam ausentes na cauda epididimária do hamster dourado, enquanto que no gerbilo este tipo celular não foi encontrado em nenhum dos segmentos epididimários (Domeniconi, 2004). No rato, células delgadas foram observadas apenas no segmento inicial, enquanto que as células claras foram observadas na cabeça, corpo e cauda do epitélio epididimário (Serre e Robaire, 1998).

No bovino (Goyal, 1985) não foram relatadas células delgadas no segmento inicial, enquanto que as células claras não foram encontradas em nenhum dos segmentos epididimários de bovinos (Goyal, 1985), suínos (Orsi *et al.*, 1985) e macacos (Ramos e Dym, 1977).

Estudos abordando o desenvolvimento dos tipos celulares presentes no epitélio epididimário (Sun e Flickinger, 1979), bem como análises das características ultraestruturais, histoquímicas e imunohistoquímicas (Palacios *et al.*, 1991; Adamali e Hermo, 1996) demonstraram que as células principais e delgadas são tipos celulares distintos não só quanto à morfologia bem como em relação à função que cada uma destas células exerce. Às células delgadas atribui-se um papel de absorção de eletrólitos, degradação de proteínas endocitadas e acidificação do conteúdo luminal com base em estudos imunohistoquímicos demonstrando a presença de anidrase carbônica (Adamali e Hermo, 1996). Enquanto que às células principais são

atribuídas como principais funções absorção de fluido luminal e secreção, sendo ativas na síntese protéica (Liu *et al.*, 1991, Setchell *et al.*, 1994, Serre e Robaire, 1998).

Poucos estudos abordaram a contribuição de cada um dos tipos celulares na constituição do epitélio de revestimento das regiões epididimárias. No rato (Serre e Robaire, 1998), as células principais contribuíram com a maior porcentagem relativa no segmento inicial, constituindo cerca de quase 70% da população celular do epitélio desta região epididimária. Estas observações diferiram dos resultados obtidos neste estudo, uma vez que as células principais estavam presentes em maior porcentagem relativa na cauda distal, onde contribuíam com 74,9% da população celular desta região. As células halo foram encontradas em maior porcentagem no segmento inicial do epitélio epididimário do hamster dourado, diferindo das observações feitas no epidídimo do rato (Serre e Robaire, 1998), posto que as células halo estiveram presentes em menor número no segmento inicial e em maior número na cabeça do epidídimo do rato. As células delgadas estiveram presentes em maior porcentagem no epitélio do segmento inicial do hamster dourado, contribuindo com 4,0%, no rato, estas células contribuíram com cerca de 5% da população celular ativa do segmento inicial (Serre e Robaire, 1998). As células claras foram observadas em maior porcentagem relativa na cauda do epidídimo do rato (Serre e Robaire, 1998), contribuindo com quase 20% da população celular nesta região. No hamster dourado a contribuição deste tipo celular foi de apenas 6,9%.

A célula clara foi um tipo celular peculiar e que despertou a atenção pelas características que apresenta. As células claras observadas neste estudo diferiram daquelas descritas para o hamster champanha (Vicentini e Orsi, 1989). No hamster champanha (Vicentini e Orsi, 1989) estas células foram descritas como células alongadas, colunares e com núcleo alongado, enquanto que as células claras observadas no hamster dourado foram típicas células baixas cúbicas.

As células claras exibiam um tipo celular conspícuo que gerou controvérsias quanto à definição de suas funções. Moore e Bedford (1979a e b) relataram que as células claras eram capazes de captar grandes quantidades do marcador “horseradish peroxidase” e, também observaram vesículas em forma de C possivelmente envolvidas em endocitose na região apical do citoplasma das células claras do epidídimo de rato (Moore e Bedford, 1979a e b). Ainda com relação às células claras, foi relatado que elas são ricas em anidrase carbônica, um componente enzimático do epitélio concernente à atividade de absorção (Cohen *et al.*, 1976), indício que suportaria a hipótese formulada por Flickinger *et al.* (1978) de que as células claras devam estar envolvidas com a absorção de íons salinos e de proteínas presentes no fluido luminal da cauda do epidídimo.

Às células claras foi atribuída a capacidade de captar componentes luminais e de reconhecer e internalizar a gota citoplasmática liberada pelos espermatozóides ou os seus remanescentes (Moore e Bedford, 1979a; Clermont e Hermo, 1985; Robaire e Hermo, 1988; Hermo *et al.*, 1988). Outra atividade atribuída às células claras foi a espermiofagia; logo, a presença delas estaria relacionada à capacidade de eliminar espermatozóides alterados da luz do túbulo epididimário (Moore e Bedford, 1979a).

As características morfométricas e histológicas do epidídimo do hamster dourado pareciam indicar que o segmento inicial era uma área provável de trânsito rápido de espermatozóides, uma vez que este segmento, freqüentemente, apareceu com o lúmen vazio ou com poucos espermatozóides. Foi sugerido que nessa região possa ocorrer secreção de macromoléculas (Viotto *et al.*, 1988). Estudos realizados em camundongos estimaram que na região proximal do epidídimo, os espermatozóides eram transportados dez ou mais vezes mais rapidamente do que na região distal do órgão (Abe e Takano, 1988), sugerindo-se que absorção de fluido luminal testicular seria a principal função do segmento inicial (Abe e Takano, 1988).

O epitélio das regiões de cabeça e corpo epididimários do hamster dourado apresentou o citoplasma supranuclear de células principais rico em vacúolos, sugerindo a ocorrência de atividade metabólica intensa e de processos de absorção e de secreção celulares. Estas atividades de absorção e secreção realizadas pelas células epiteliais epididimárias seriam fundamentais para a manutenção dos espermatozóides, uma vez que a condensação do DNA dos espermatozóides torna-os limitados em sua capacidade biossintética (Fouchécourt *et al.*, 2000). Assim uma das principais funções das regiões de cabeça e corpo do epidídimo do hamster dourado seria a de garantir a viabilidade dos espermatozóides.

As regiões de cabeça e corpo do epidídimo do hamster dourado também estariam envolvidas nas atividades iniciais do processo de maturação, uma vez que foi usual a observação de uma grande concentração de espermatozóides na luz destas regiões. No hamster champanha, a região de corpo foi caracterizada como região de trânsito e inter-relações tróficas para o amadurecimento dos espermatozóides (Vicentini, 1985; Vicentini e Orsi, 1987; Vicentini *et al.*, 1990). No gerbilo (Domeniconi, 2004) foi sugerido que o início do processo de maturação ocorre no segmento inicial, já que foi observado um grande número de espermatozóides nesta região. Esta afirmação foi feita com base nos resultados obtidos de reações histoenzimáticas (Domeniconi, 2004) diferentemente do observado neste estudo.

Durante o processo de maturação, os espermatozóides sofrem remodelagem pós-testicular de sua membrana, podendo ocorrer alteração em lipídios, perda ou modificação de glicoproteínas e

incorporação de novas glicoproteínas (Fouchécourt *et al.*, 2000). Estudos imunohistoquímicos mostraram que glicoproteínas específicas são secretadas em regiões imediatamente distais ao segmento inicial no rato (Lea *et al.*, 1978), no coelho e no hamster (Moore, 1980). Abe e Takano (1988) observaram no epidídimo de camundongo, que material PAS-positivo estava presente na luz tubular e em inclusões das células epiteliais do segmento correspondente ao corpo epididimário. Estes autores, com base em suas observações, afirmaram que glicoproteínas epididimárias eram produzidas na cabeça proximal e seu excesso era absorvido no corpo epididimário (Abe e Takano, 1988).

A passagem dos espermatozóides através da cabeça epididimária seria essencial para a aquisição do potencial de fertilização, embora o sítio de aquisição do potencial possa variar em algumas espécies (Robaire e Hermo, 1988). Os segmentos de cabeça e corpo seriam os sítios epididimários onde a maturação dos espermatozóides efetivamente ocorreu em eqüinos (Orsi *et al.*, 1981), suínos (Orsi *et al.*, 1985), no gato (Viotto *et al.*, 1988) e na maioria dos mamíferos (Waites, 1980; Setchell *et al.*, 1994).

A presença de células claras apenas na cauda do epidídimo, possivelmente, é um indicativo de que o sítio no qual os espermatozóides efetivamente adquirem seu potencial para fertilizar oócitos é a cauda do epidídimo no hamster dourado. A hipótese de que a cauda epididimária é o sítio no qual os espermatozóides adquirem seu potencial de fertilização é concordante com os relatos feitos para o hamster sírio (Horan e Bedford, 1972), rato (Dyson e Orgebin-Crist, 1973), camundongo (Hoppe, 1975) e homem (Hinrichsen e Blaquier, 1980).

A cauda distal é a região epididimária do hamster dourado envolvida na estocagem dos espermatozóides até o momento da ejaculação, uma vez que o lúmen esteve grandemente aumentado e repleto de espermatozóides em todas as preparações estudadas. Além das observações quanto ao diâmetro luminal e presença de espermatozóides, há evidências a partir de observações realizadas no camundongo de que a passagem de espermatozóides na cauda é muito lenta (Abe e Takano, 1988). No bovino zebu (Orsi *et al.*, 1984) foi sugerido que a parte proximal do segmento terminal (cauda proximal) é a principal região de estocagem, uma vez que a parte distal se encontrava vazia, sugerindo-se que a mesma fosse uma grande área de peristalse para esvaziar as partes proximais a ela (Orsi *et al.*, 1984). No hamster champanha, além do papel de estocagem foi atribuído ao segmento terminal um papel secretor, com base em observações histoquímicas (Vicentini, 1985; Vicentini e Orsi, 1989).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, K. and H. Takano, 1988: Changes in distribution and staining reactivity of PAS-positive material in the mouse epididymal duct after efferent duct ligation. *Arch. Histol. Cytol.* 51, 433–441.
- Adamali, H.I. and L. Hermo, 1996: Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J. Androl.* 17, 208–222.
- Alsum, D.J. and A.G. Hunter, 1978: Regional histology and histochemistry of the ductus epididymis in the Rhesus monkey (*Macaca mullata*). *Biol. Reprod.* 19, 1063–1069.
- Amann, R.P., 1962: Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency unilateral vasectomy and age on spermatogenesis. *Am. J. Anat.* 110, 49–67.
- Benoit, J., 1926: Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule, chez les mammifères. *Arch. Anat. Microsc.* 5, 173–412.
- Clermont, Y. and L. Hermo, 1985: Ultrastructure of the lamina propria of the vas deferens in the rat. *Anat. Rec.* 211, 42A.
- Cohen, J.P., A.P. Hoffer and S. Rosen, 1976: Carbonic anhydrase localization in the epididymis and testis of the rat: histochemical and biochemical analysis. *Biol. Reprod.* 14, 339–346.
- Cummins, J.M., P.D. Temple-Smith and M.B. Benfree, 1986: Reproduction in the male Honey possum (*Tarsipes rostratus*: Marsupialia): the epididymis. *Am. J. Anat.* 177, 385–401.
- Domeniconi, R.F., 2004: Morfologia e histoquímica do epidídimo do gerbilo, *Meriones unguiculatus*. Campinas, Dissertação (Mestrado) Instituto de Biologia, UNICAMP, 70p.
- Dym, M. and L.J. Romrell, 1975: Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and Rhesus monkeys. *J. Reprod. Fertil.* 42, 1–7.
- Dyson, A.L.M.B. and M.-C. Orgebin-Crist, 1973: Effects of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology* 93, 391–402.
- Flickinger, C.J., S.S. Howards and H.P. English, 1978: Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. *Am. J. Anat.* 15, 557–586.
- Fouchécourt, S., S. Métayer, A. Locatelli, F. Dacheux and J.-L. Dacheux, 2000: Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol. Reprod.* 66, 1790–1803.

- Glover, T.D. and L. Nicander, 1971: Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. *J. Reprod. Fertil. suppl.* 13, 39-50.
- Goyal, H.O., 1985: Morphology of the bovine epididymis. *Am. J. Anat.* 172, 155-172.
- Hermo, L., J. Dworkin and R. Oko, 1988: Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am. J. Anat.* 183, 107-124.
- Hinrichsen, M.J. and J.A. Blaquier, 1980: Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 60, 291-294.
- Hoffer, A.P., D.W. Hamilton and D.W. Fawcett, 1973: The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. *Anat. Rec.* 175, 169-202.
- Holstein, A.F., 1969: Morphologische Studien am Nebenhoden des Menschen. *Zwanglose Abhandl. Gebiet Norm. Pathol. Anat.* 20, 1-91.
- Hoppe, P.C., 1975: Fertilizing ability of mouse sperm from different epididymal regions and after washing and centrifugation. *J. Exp. Zool.* 192, 219-222.
- Horan, A.H. and J.M. Bedford, 1972: Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the Syrian hamster. *J. Reprod. Fertil.* 30, 417-423.
- Lea, O.L.A., P. Petrusz and F.S. French, 1978: Purification and localization of acidic epididymal glycoprotein (AEC): a sperm coating protein secreted by the rat epididymis. *Int. J. Androl. suppl.* 2 596-607.
- Liu, H.W., S.T. Shang, C.F. Chao and C. Muller, 1991: The secretion of two sperm related glycoproteins in BALB/c mouse epididymis. *Cell Tissue Res.* 265, 409-414.
- Moore, H.D.M., 1980: Localization of specific glycoproteins secreted by the rabbit and hamster epididymis. *Biol. Reprod.* 22, 705-718.
- Moore, H.D.M. and J.M. Bedford, 1979a: The differential absorptive capacity of epithelial cells of the rat epididymides before and after castration. *Anat. Rec.* 193, 313-328.
- Moore, H.D.M. and J.M. Bedford, 1979b: Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anat. Rec.* 193, 293-312.
- Nicander, L., 1958: Studies on the regional histology and citochemistry of the ductus epididymidis in stallions, rams and bulls. *Acta Morphol. Neerscand.* 1, 337-362.
- Nicander, L. and T.D. Glover, 1973: Regional histology and fine structure of the epididymal duct in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Anat.* 114, 347-364.

- Orsi, A.M., 1980: Estudo morfológico do epidídimo do gambá sul-americano (*Didelphys azarae*). Histologia regional. Ciênc. Cult. 32, 1679–1683.
- Orsi, A.M., V.R. de Melo, A.L. Ferreira and V.J.M. Campos, 1980: Morphology of the epithelial cells of the epididymal duct of the South American opossum (*Didelphys azarae*). Anat. Anz. 148, 7-13.
- Orsi, A.M., C.A. Vicentini, V.R. Melo and E. Dias, 1981: Reexame da morfologia do epidídimo do cavalo (*Equus caballus*, L.). Acta Biol. Leopold. 3, 195–202.
- Orsi, A.M., C.A. Vicentini, V.R. Melo, V. Dall Pai and E.A. Gregório, 1984: Sobre a morfologia da via seminífera extratesticular no bovino zebu (*Bos indicus*). II. Reexame da histologia regional do epidídimo. Ciênc. Cult. 36, 236–238.
- Orsi, A.M., S. Mello Dias, M.M. Valente and C.A. Vicentini, 1985: Histologia regional do epidídimo do porco (*Sus scrofa domestica*). Estudo de microscopia óptica. Rev. Port. Ciênc. Vet. 80, 215–224.
- Palacios, J., J. Regadera, M. Nistal and R. Paniagua, 1991: Apical mitochondria-rich cells in the human epididymis: an ultrastructural, enzymohistochemical, and immunohistochemical study. Anat. Rec. 231: 82-88.
- Ramos, A.S.J. and M. Dym, 1977: Fine structure of the monkey epididymis. Am. J. Anat. 149, 501–532.
- Robaire, B. and L. Hermo, 1988: The physiology and reproduction. Raven Press, New York.
- Serre, V. and Robaire, B. 1998: Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. Biol. Reprod. 58, 497–513.
- Setchell, B.P., S. Maddocks and D.E. Brooks, 1994: The physiology and reproduction. Raven Press, New York.
- Sun, E.L. and, C.J. Flickinger, 1979: Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. Am. J. Anat. 154: 27-56.
- Veri, J.P., L. Hermo and B. Robaire, 1993: Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. J. Androl. 14, 23-44.
- Vicentini, C.A., 1985: Contribuição ao estudo morfológico do epidídimo do hamster chapanha (*Mesocricetus auratus*). I. Anatomia e histologia regional. Botucatu, Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, UNESP, p. 110 Tese de Mestrado.
- Vicentini, C.A. and A.M. Orsi, 1987: Histologia regional do epidídimo no hamster variedade chapanha (*Mesocricetus auratus*). Rev. Brasil. Biol. 47, 277-281.

- Vicentini, C.A. and A.M. Orsi, 1989: Características citoquímicas e ultraestruturais do epitélio de revestimento na parte distal do epidídimo do hamster (*Mesocricetus auratus*). Rev. Brasil. Biol. 49, 291-301.
- Vicentini, C.A., A.M. Orsi and M.R.F. Boaro Martins, 1990: Considerações sobre o desenvolvimento pós-natal do epidídimo do hamster (*Mesocricetus auratus*). Naturalia 15, 35-45.
- Viotto, M.J.S., A.M. Orsi, C.A. Vicentini, W.A. Fernandes and S. Mello Dias, 1988: Estudos histoquímicos no epidídimo do gato (*Felis domestica*, L.). Naturalia 13, 15-21.
- Yeung, C.H. and T.G. Cooper, 1994: Basal cells of the human epididymis – Antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. Biol. Reprod. 50, 917-926.
- Waites, G.M.H., 1980: Functional relationships of the mammalian testis and epididymis. Aust. J. Biol. Sci. 33, 355-370.
- Wong, P.Y.D., H.C. Chan, P.S. Leung, Y.W. Chung, Y.L. Wong, W.M. Lee, V. Ng and N.J. Dun, 1999: Regulation of anion secretion by cyclooxygenase and prostanoids in cultured epididymal epithelia from the rat. J. Physiol. 514, 809-820.

2º artigo: submetido ao periódico "Memórias do Instituto Oswaldo Cruz"

Title paper

Regional biochemical analysis of total proteins and LDH in the epididymis of Golden hamster

Beu CCL^{1,2}, Orsi AM³, Novelli ELB⁴, Diniz YS⁴, Rodrigues HG⁴, Faine LA⁴

¹ Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, São Paulo, Brasil.

² Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil.

³ Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³ Centro da Saúde, Faculdade de Medicina e Enfermagem, Universidade de Marília, Marília, São Paulo, Brasil.

⁴ Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Short title: protein lactate dehydrogenase epididymis

Key words: proteins, lactate dehydrogenase, epididymis, Golden hamster, biochemistry.

Postal address:

Antonio Marcos Orsi

Docente Voluntário da UNESP

Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu
Rubião Júnior, Botucatu, SP, Brasil

18618-000

Phone number: (0XX14) 3811-6040

Telefax: (0XX14) 3815-3744

e-mail: amorsi@ibb.unesp.br

Regional biochemical analysis of total proteins and LDH in the epididymis of Golden hamster

Summary – The aim of this study was to determine the relative concentration of total proteins and lactate dehydrogenase (LDH) in homogenates of regions of the Golden hamster epididymidis, including the initial segment, caput, corpus and distal cauda epididymidis. The concentration of total protein measured by the photolorimetric method (reported as units per 100 mg tissue) decreased from the initial segment to the cauda epididymidis, with the difference between the two regions being significant. This observation seems to be closely related to an increased synthesis and secretion of proteins to the lumen in the proximal segments of the epididymal duct, mainly in the initial segment, as proposed for other rodents. LDH activity was higher in the initial segment and distal cauda epididymidis than in the caput and corpus, although no significant differences in mean values were observed. The high LDH activity observed in the initial segment and cauda epididymidis was probably related to an expressive metabolic activity of the epithelium in these regions. This metabolic activity is important to guarantee the survival of the sperm stored in the cauda epididymis. The lower LDH activity noted in the caput and corpus epididymidis might be related to a progressive reduction of the glycolysis in initial maturation of spermatozoa, mainly in the corpus epididymidis.

Key words: proteins, lactate dehydrogenase, epididymis, Golden hamster, biochemistry.

Introduction

The various components of the epididymal fluid comprised glycoproteins and proteins, including enzymes such as lactate dehydrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27). Most proteins presented in the epididymal fluid were synthesized and secreted by the lining epithelium of the epididymal duct and were located in specific epithelial regions (Dacheux et al. 1989, Syntin et al. 1996). Moreover, there were proteins associated with the surface of intraluminal spermatozoa (Dacheux & Paquignon, 1980, Jones et al. 1983, Dacheux et al. 1989). Epididymal proteins had two major roles; one consisted of regulation of the structural and functional integrity of the epididymal epithelium, while the other was related to a direct action on spermatozoa in order to protect them

and promote their maturation during epididymal transit (Jones et al. 1983, Robaire & Hermo, 1988, Syntin et al. 1996). Possibly, proteins interact with spermatozoa changing their membrane properties in different ways, and could be absorbed by the spermatozoal surface or modify preexisting compounds on the plasma membrane through the action of proteases, glucosaminidases or glycosyltransferases (Syntin et al. 1996).

The development of sperm motility possibly required changes in the metabolic mechanism which supplies energy for flagellar movements. One of the most specific parts of this metabolic mechanism is the LDH (Vermouth et al. 1986). LDH isoenzyme, LDH-X or C₄, specific to the testes and epididyme of various mammalian species (Blanco & Zinkhan, 1963), showed unique catalytic properties (Blanco et al. 1976). LDH was a highly specialized enzyme and was related to metabolic processes of energy supply for sperm motility and survival (Gerez de Burgos et al. 1978). According to Storey & Kaney (1977), LDH played a role in the pyruvate-lactate shuttle system, transferring reducing equivalents from the cytosol to mitochondria.

In view of the importance of proteins and LDH in the process of sperm maturation and metabolism, the aim of this study was to determine the presence and concentration of total proteins and LDH in the initial segment, caput, corpus and distal cauda of epididymis of adult Golden hamsters.

Materials and Methods

Biochemical analysis for the determination of total proteins and LDH (E.C. 1.1.1.27) activity was performed on epididymal tissue samples from 14 adult Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) obtained from the Central Animal House of UNESP, Botucatu Campus. The rodents were maintained under a 12-h light/dark cycle at a controlled temperature, with water and food available *ad libitum*. The animals were sacrificed with an ethyl ether overdose, and the epididymes were collected and divided into the initial segment, caput, corpus and cauda distal. The epididymal tissues were weighed and frozen until the time for the biochemical analysis. Three samples of each epididymal regions were used for biochemical analysis, with each sample weighing on the average 135 mg. The samples were homogenized in 5 ml sodium phosphate buffer, pH 7.4 with a Potter-Elvehjem homogenizer (Curtin Matheson Scientific, Houston, TX, USA) using a Teflon® pestle. The homogenates obtained were centrifuged in a refrigerated

centrifuge at 10,000 rpm for 15 min at -4°C , and the resulting supernatants were used for the biochemical determinations.

Total proteins were determined in 50 μl supernatant of each sample by colorimetric method using the CELM kit for total protein (Modern Laboratory Equipment Company, São Paulo, Brazil). Absorbance was read with a spectrophotometer at 540 nm. The results were reported as mg protein per 100 mg tissue.

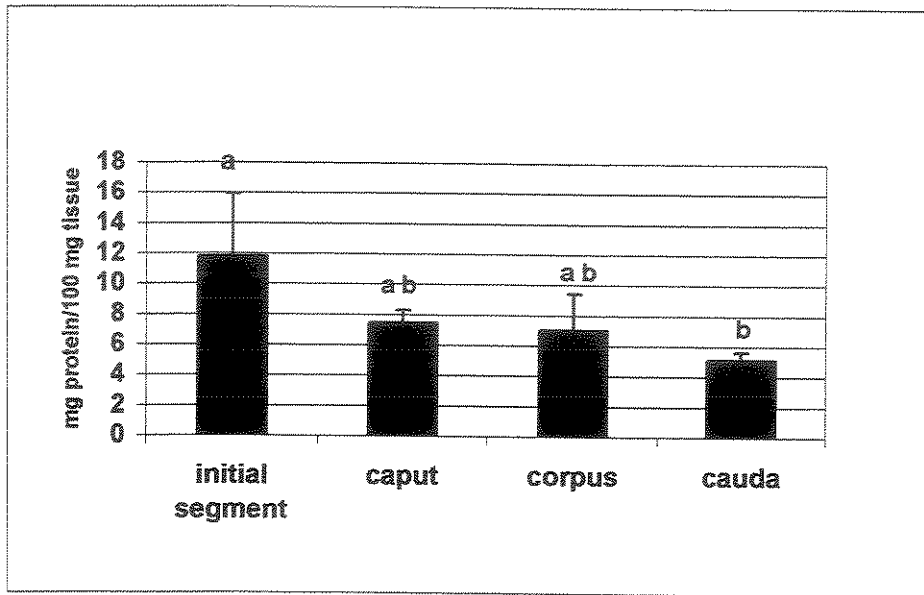
LDH was determined in 15 μl supernatant of each sample using the CELM kit (Modern Laboratory Equipment Company), a UV method optimized for the determination of LDH. LDH activity was determined at 25°C and absorbance at 340 nm was read after 1, 2 and 3 minutes with an ELISA microplate reader (Bio-tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). LDH activity was reported as units per 100 mg tissue (U/100 mg tissue).

Statistical analysis consisted of a completely random design, with four treatments and three replicates. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and mean values were compared by the 5% Tukey test.

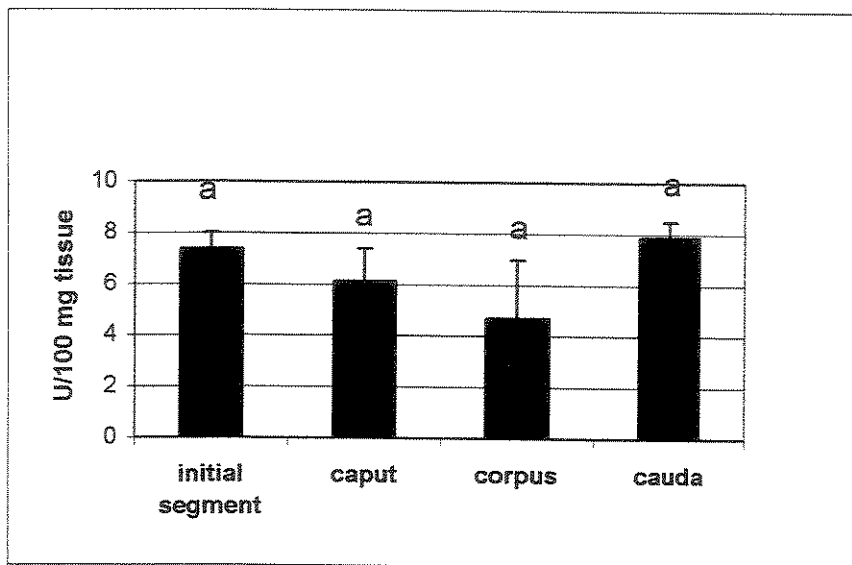
Results

Analysis of the results showed a decline in total protein concentration along the epididymal segments. The highest concentration was observed in the initial segment (11.8 ± 4.12 mg protein/100 mg tissue) and the lowest concentration in the cauda epididymidis (5.1 ± 0.48 mg protein/100 mg tissue), with the difference being significant. Intermediate and similar total protein concentrations were observed for the caput and corpus epididymidis (7.4 ± 0.83 and 7.0 ± 2.39 mg protein/100 mg tissue, respectively), with no significant differences between these two regions or between the caput, corpus and distal cauda epididymidis or between initial segment, caput and corpus epididymidis (Graph 1).

The highest LDH activity was observed in the cauda epididymidis (7.88 ± 0.60 U/100 mg tissue), while the lowest activity was found in the corpus epididymidis (4.70 ± 2.28 U/100 mg tissue). Intermediate values were observed for the initial segment (7.38 ± 0.61 U/100 mg tissue) and the caput epididymidis (6.11 ± 1.27 U/100 mg tissue) (Graph 2). Statistical analysis showed no significant differences in mean LDH activity between the epididymal segments studied.



Graph 1 - Total protein concentration in different regions (initial segment, caput, corpus and distal cauda) of the Golden hamster epididymidis. Data were reported as mean $\pm$ SD. The same letters indicate that the values did not differ significantly one from the other (Tukey test, 5%).



Graph 2 - Lactate dehydrogenase in different regions (initial segment, corpus, corpus and distal cauda) of the Golden hamster epididymidis. Data were reported as mean $\pm$ SD. The same letters indicated that the values did not differ significantly one from the other (Tukey test, 5%).

Discussion

The epididymal epithelium synthesizes and secretes numerous proteins, with synthesis and secretion varying in accordance with the epididymal region (Syntin et al. 1996). These regional variations were confirmed in the present study showing differences in total protein expression in the epididymal duct of the Golden hamster.

An investigation comparing rabbit, rat, dog, sheep, monkey and humans (Riar et al. 1973) demonstrated that in only two of the species studied, i.e., dog and man, were total protein concentrations lower in the caput epididymidis than in the cauda. In rat, rabbit and sheep, the highest total protein concentration was observed in the proximal and distal corpus and the lowest levels in the cauda epididymidis (Riar et al. 1973). The results, in this last investigation, indicated that absorption of fluid deriving from the testis is higher in the caput epididymidis and that testicular fluid contributes to the high protein content found in this region (Riar et al. 1973).

Furthermore protein content was high in the epididymal plasma obtained from the caput epididymidis of bulls and even higher in the proximal corpus (Crabo, 1965). The data obtained with studies of rabbit and sheep (Riar et al. 1973) and possibly of bull (Crabo, 1965), suggested that the resorption area extended to or exceeded the limits of the proximal corpus (Riar et al. 1973). In golden hamster, the highest total protein concentration was observed in the initial segment, an area of intense seminal fluid absorption in rodents (Robaire & Hermo, 1988).

The number and concentration of proteins presented in the epididymal luminal fluid changed along the organ (Dacheux & Paquignon, 1980). Electrophoretic analysis detected few common proteins secreted in several points along the epididymis, indicating that its epithelium secreted regionalized components into the tubular lumen (Syntin et al. 1996). The proximal portion of the epididymis is the most active region in terms of protein secretion, in agreement with the present results. In swine, the high synthesis activity of the proximal epididymidis was related to secretion of only two main components which account for 34.5% and 31.4% of total proteins secreted by this organ (Syntin et al. 1996). In contrast, in rodents, which probably include the hamster, an elevated number of proteins was secreted into the luminal fluid (Robaire & Hermo, 1988).

Autoradiographic studies on protein synthesis in mice have showed a higher activity in the initial segment, as also observed here for the hamster, with a progressive decline of synthesis in the middle and terminal epididymal segments (Kopečný & Pech, 1977). In bulls (Lavon et al. 1971) and rats (Jones et al. 1983), a decrease in spermatozoal protein content was observed during epididymal maturation, with total protein levels resulting from the balance between synthesis and

degradation of proteins. Previous studies regarding the presence of proteins in rat spermatozoa during epididymal transit (Vermouth et al. 1986) confirmed the evident predominance of protein degradation in spermatozoa during their progression through the epididymal duct and we agree with this affirmation based on the present results.

Our results were in agreement with those reported by other authors (Kopečný & Pech, 1977), showing a higher total protein concentration in the initial segment and a progressive reduction along the more distal tubular segments. The results obtained showed intense epithelial activity of protein synthesis in the proximal regions of the epididymal duct. Moreover, different patterns of protein degradation or resorption could be suggested, with most proteins secreted by the epididymal epithelium being rapidly degraded or resorbed after secretion. In swine, most proteins found in fluid *in vivo* probably did not result from abundant secretion by the different regions but rather correspond to less degraded or less resorbed proteins (Syntin et al. 1996). The hamster, a rodent, similarly to the rat (Olson & Hinton, 1985) and mouse (Robaire & Hermon, 1988), possibly secretes a larger number of proteins through the epididymal epithelium which are incorporated into the seminal fluid.

Studies on the activity and function of dehydrogenases in the epididymal duct suggested that they acted on the process of glycolysis, which played an important role in epididymal metabolism (Delhon & Lawzewitsch, 1994). LDH had been related to the fertility of mature human spermatozoa due to its role in energy metabolism (Blanco, 1980), since low LDH levels were associated with a partial or total reduction in sperm concentration and motility (O'Flaherty et al., 2002).

Histochemical studies of epididymal LDH demonstrated species-specific variations in the epithelial reactivity observed in the different epididymal regions. Intense sperm LDH activity was detected in the cauda epididymidis of most species (Allen & Slater, 1961; Blackshaw & Samisoni, 1967; Tingari & Moniem, 1979). An observation consistent with sperm storage attributed to this epididymal region (Delhon & Lawzewitsch, 1994), which may explain the marked LDH activity observed here in the distal cauda of the Golden hamster epididymis.

A study on rats (Vermouth et al. 1986) showed that the transit of spermatozoa through the epididymis was accompanied by a reduction of LDH activity from the caput to the corpus, and was not significant compared to the cauda epididymidis. The changes in LDH reported for the rat (Vermouth et al. 1986) were suggestive of a reduction in the capacity of spermatozoa to oxidate glucose while they matured. Similarly, a decline in tissue activity could be noted in epididymal

homogenates of the Golden hamster from the initial segment to the corpus, with the corpus representing the regions of initial activities of sperm maturation.

A reduction in the oxidative utilization of glucose in mature spermatozoa compared to testicular utilization has been demonstrated in sheep and bull (Voglmayr, 1975; Dacheux & Paquignon, 1980). The profile of LDH reduction resembled that observed for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Ford & Harrison, 1983). Since both enzymes were integrated in the Embden-Meyerhoff pathway, a decrease in their activities was correlated with lower glycolysis in the spermatozoa (Ford & Harrison, 1983).

The results showed that, in Golden hamster, the LDH activity gradually decreased from the initial segment to the corpus epididymidis, and increased in the cauda. These results were in agreement with those reported for other species (Zinkham et al. 1964). LDH was found to be the most active dehydrogenase in the camel epididymidis when compared to succinate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, with higher LDH activity being observed in the distal segment (Tingari & Moniem, 1979). These findings suggested the importance of glycolytic pathways in the mammalian epididymis. The higher LDH activity observed in the terminal segment (cauda) of the hamster epididymis indicated a highly metabolic activity of the lining epithelium to provide energy for sperm survival, consistent with the function attributed to the cauda epididymidis as a storage site for spermatozoa (Tingari & Moniem, 1979).

References

- Allen JM, Slater JJ 1961. A cytochemical analysis of lactic dehydrogenase diphosphoridine nucleotide-diaphorase system in the epididymis on the mouse. *J Histochem Cytochem* 9: 221-233.
- Blackshaw AW, Samisoni JJ 1967. Histochemical localization of some dehydrogenases enzymes in the bull testis and epididymis. *J Dairy Sci* 50: 747-752.
- Blanco A 1980. On the functional significance of LDH X. *Johns Hopkins Med J* 146: 231-235.
- Blanco A, Zinkhan WH 1963. Lactate dehydrogenases in human testes. *Science* 139: 601-602.
- Blanco A, Burgos C, Gerez de Burgos NM, Montamat EE 1976. Properties of testicular lactate dehydrogenase isoenzyme. *Biochem J* 153: 165-172.
- Crabo B 1965. Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars. *Acta Vet Scand suppl* 6 (5): 1-94.

- Dacheux JL, Paquignon M 1980. Relations between the fertilizing ability motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reprod Nutr Dev* 20: 1085-1099.
- Dacheux JL, Dacheux F, Paquignon M 1989. Changes in sperm surface membrane and luminal proteins fluid content during epididymal transit in the boar. *Biol Reprod* 40: 635-651.
- Delhon G, Lawzewitsch I 1994. Ductus epididymis compartments and morphology of epididymal spermatozoa in llamas. *Anat Histol Embryol* 23: 217-225.
- Ford WCL, Harrison A 1983. The activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in spermatozoa from different regions of the epididymis in laboratory rodents treated with α -chlorohydrin or 6-chlor-deoxyglucose. *J Reprod Fertil* 69: 147-156.
- Gerez de Burgos NM, Burgos C, Montamat EE, Moreno J, Blanco A 1978. A shuttle system for the transfer of reducing equivalents in mouse sperm mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 81: 644-649.
- Jones R, von Glos KJ, Brown CR 1983. Changes in protein composition of rat spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil* 67: 299-306.
- Kopečný V, Pech V 1977. An autoradiographic study of macromolecular synthesis in the epithelium of the ductus epididymis in the mouse. II. Incorporation of L-fucose- 1^3H . *Histochemistry* 50: 229-238.
- Lavon U, Volcani R, Danon D 1971. The proteins of bovine spermatozoa from the caput and cauda epididymis. *J Reprod Fertil* 24: 219-232.
- O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT 2002. Lactate dehydrogenase-C4 is involved in heparin- and NADH-dependent bovine sperm capacitation. *Andrologia* 34: 91-97.
- Olson GE, Hinton B 1985. Regional difference in luminal fluid polypeptides of the rat testis and epididymis revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J Androl* 6: 20-34.
- Riar SS, Setty BS, Kar AB 1973. Studies on the physiology and biochemistry of mammalian epididymis: biochemical composition of epididymis. A comparative study. *Fertil Steril* 24(5): 355-363.
- Robaire B, Hermo L 1988. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: E Knobil, JD Neill, *The physiology of reproduction*, Raven Press, New York. p. 999-1080.
- Storey BT, Kayne BJ 1977. Energy metabolism of spermatozoa. VI. Direct intramitochondrial lactate oxidation by rabbit sperm mitochondria. *Biol Reprod* 16: 549-556.

- Syntin P, Dacheux F, Druart X, Gatti JL, Okamura N, Dacheux JL 1996. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol Reprod* 55: 956-974.
- Tingari MD, Moniem KA 1979. On the regional histology and histochemistry of the epididymis of the camel (*Camelus dromedaries*). *J Reprod Fertil* 57: 11 20.
- Vermouth NT, Carriazo CS, Ponce RH, Blanco A 1986. Lactate dehydrogenase X, malate dehydrogenase and total protein in rat spermatozoa during epididymal transit. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 83: 381-384.
- Voglmayr JK 1975. Metabolic changes in spermatozoa during epididymal transit. In: DW Hamilton, RO Greep, *Handbook of Physiology*, Raven Press, New York, p. 437-451.
- Zinkham WH, Blanco A, Clowry J 1964. An unusual isozyme of lactate dehydrogenase in mature testes: localization, ontogeny and kinetic properties. *Ann N Y Acad Sci* 121: 571-588.

3º artigo: submetido ao periódico "Theriogenology"

Title page

**Biochemical analysis of alkaline phosphatase in regions of the epididymis of the
Golden hamster (*Mesocricetus auratus*)**

M. Sc. Célia Cristina Leme Beu ^{1,2}, Dr. Antonio Marcos Orsi^{3,4,a}, Dr. Ethel Lourenzi Barbosa Novelli ⁵, Bachelor Raquel Fantin Domeniconi ¹, Bachelor Regina Coeli Burneiko ⁵, Bachelor Cristiano Machado Galhardi ⁵

¹ Department of Cellular Biology, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

² Center of Medical and Pharmaceutic Sciences, UNOESTE, Cascavel, Paraná, Brazil.

³ Department of Anatomy, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

⁴ Health Center, School of Medicine and Nursery, Universidade de Marília, Marília, São Paulo, Brazil.

⁵ Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

This work was performed at the Anatomy and the Chemistry and Biochemistry Departments, Bioscience Institute, UNESP, Rubião Júnior district, s/n, Botucatu, São Paulo, Brazil

^a Correspondence to Antonio Marcos Orsi

Depto. de Anatomia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu
Rubião Júnior, Botucatu, SP, Brasil

18618-000

Phone number: (0XX14) 3811-6040

Telefax: (0XX14) 3815-3744

e-mail: amorsi@ibb.unesp.br

Biochemical analysis of alkaline phosphatase in regions of the epididymis of the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*)

Abstract – The present study was carried out to determine alkaline phosphatase (ALP; E.C. 3.1.3.1) activity in homogenates obtained from different regions of the Golden hamster epididymis (initial segment, head, body and tail). No significant differences in mean ALP activity, reported as unit/100 mg tissue, were observed between the initial segment (0.92 ± 0.28 U/100 mg tissue), head (1.07 ± 0.67 U/100 mg tissue) and body (0.77 ± 0.23 U/100 mg tissue) of the epididymis. However, mean ALP activity was significantly higher in the epididymal tail (8.94 ± 0.40 U/100 mg tissue) compared to the other segments. The results suggest that ALP plays a significant role in the tail of the Golden hamster epididymis by to supply the androgens necessary to maintaining epithelial integrity, and probably acts on the transport of substances between the luminal fluid and spermatozoon membrane. Thus, the high concentration of ALP in the epididymal tail indicates the importance of this enzyme in the metabolism and maintenance of stored spermatozoa, influencing normal reproductive physiology.

Key words: epididymis, biochemistry, alkaline phosphatase, Golden hamster.

Introduction

The epididymis is part of the excretory duct system of the testis and represents an important structure for the maturation and storage of spermatozoa. Although consisting of a single duct, the epididymis has shown regional differences in histological, biochemical and histochemical studies conducted on various mammalian species [1-8]. Secretion and absorption activities of the epididymal epithelial lining cells create inside the tubular lumen an adequate intraluminal microenvironment for the maturation of spermatozoa [9].

The epididymal luminal fluid is composed of various biochemical substances. Among them are phosphatases, enzymes that catalyze the hydrolysis of phosphoric acid esters, releasing phosphate ions [8]. Alkaline phosphatase (ALP; E.C. 3.1.3.1) is a dephosphorylation enzyme that is active in many tissues and organs, including bone, liver, kidney, intestine, lung, and placenta. Variable levels of ALP have also been detected in the seminal fluid of different mammalian

species such as man, buffalo, pig and sheep [10], with the probable involvement of ALP in glycolytic reactions and the formation of fructose [11].

Histochemical studies on ALP from various mammalian groups species such as dog [5,12], rabbit [13], sheep [14] and bull [15] have shown different activities of this enzyme along the epididymal segments.

The site of ALP formation has been determined in some species and seems to depend on the species studied. Biochemical investigations [16] demonstrated that ALP activity levels in normal stallions are significantly higher in the testis and in the epididymis than in any other tissue of the reproductive tract of these animals. Data obtained in the same study [16] support the statement that ALP activity is not uniform in the epididymis but is concentrated at extremely high levels in the lumen of the epididymal tail.

In view of the importance of the activity of ALP in the epididymis for the maturation of spermatozoa, the objective of the present biochemical study was to determine ALP activity along the epididymal duct in the initial segment, head, body and tail of the adult Golden hamster .

Materials and methods

Biochemical analysis for the determination of ALP kinetics was performed on epididymal tissue samples from 14 young adult Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*, 60 days old) obtained from the Central Animal House of UNESP, Botucatu Campus. The animals were maintained under a 12-h light/dark cycle at a controlled temperature, with water and food available *ad libitum*. The animals were sacrificed with an anesthetic overdose of ethyl ether. Next, the epididymis was collected and divided into the initial segment, head, body and distal tail [9]. The epididymal tissues were weighed and frozen until time for the biochemical analysis. Three samples of each epididymal region were used for biochemical analysis, with each sample weighing on average 135 mg. The samples were homogenized in 5 mL sodium phosphate buffer pH 7.4 with a Potter-Elvehjem homogenizer (Curtin Matheson Scientific, Houston, TX, USA) using a Teflon® pestle. The homogenates obtained were centrifuged in a refrigerated centrifuge at 10,000 rpm for 15 min at -4 °C, and the resulting supernatants were used for the biochemical determinations.

ALP was determined in 3 µL supernatant of each sample using the CELM alkaline phosphatase kit (Modern Laboratory Equipment Company, São Paulo, Brazil). Kinetic analysis of ALP was carried out at 25 °C and absorbance at 405 nm, read after 1, 2 and 3 min with an ELISA

microplate reader (Bio-tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). The results are reported as unit per 100 mg tissue (U/100 mg tissue).

Statistical analysis consisted of a completely random design, with four treatments and three replicates. The data were submitted to the analysis of variance (ANOVA) and mean values were compared by the 5% Tukey test.

Results

The results of the biochemical analysis of ALP activity in the epididymal regions of the Golden hamster are shown in Fig. 1. The lowest ALP activity was observed in the epididymal body (0.77 ± 0.23 U/100 mg tissue), while the highest activity was detected in the tail (8.94 ± 0.40 U/100 mg tissue). Intermediate values were observed in the initial segment (0.92 ± 0.28 U/100 mg tissue) and in the head (1.07 ± 0.67 U/100 mg tissue). Statistical analysis revealed a significant difference in mean ALP activity between the tail and the other epididymal segments, while no significant differences were observed between the initial segment, head and body.

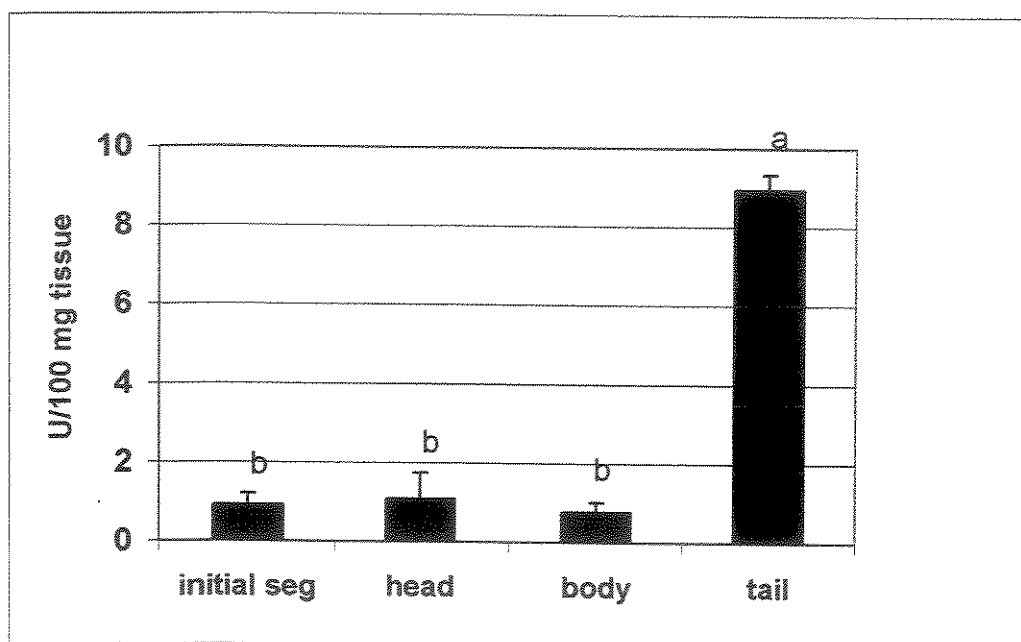


Fig. 1. Alkaline phosphatase activity in the different regions (initial segment, head, body and tail) of the Golden hamster epididymis. Data are reported as means $\pm$ SD. The same letters indicate that the values did not differ significantly from one another (Tukey test, $p < 0.05$).

Discussion

ALP of mammals are ectoenzymes bound to the plasma cell membrane through phosphatidylinositol glycan anchors [17]. These enzymes are glycosylated and possesses variable amounts of sialic acid, which is responsible for their electrophoretic mobility [18]. ALP catalyzes the hydrolysis of monophosphate esters and is mainly a plasma membrane enzyme located on the absorptive or secretory surface of cells. ALP is found in various organs but tends to be biochemically unique in each tissue [19].

High ALP activity can be detected in absorptive epithelia such as those of the intestine and proximal convoluted tubules of the kidneys. Due to the reactivity of these epithelia to ALP, a relationship between ALP activity and the transport of fluid across the plasma membrane has been postulated [15]. Other proposals have suggested that ALP plays a role in the transport of sugars and other organic molecules across membranes, and also assists in the transport of molecules between the principal cells and capillaries of the subepithelial connective tissue [20]. These

considerations support the results obtained in the present study on ALP activity in the hamster epididymis, which showed that the principal cells of the epididymal epithelium are directly involved in the process endocytosis, protein secretion and absorption, and apparent transluminal transport of different substances between the interstitium and tubular lumen [9,21,22].

Another hypothesis suggests a possible role of ALP in androgen transfer between the peritubular interstitium and the seminiferous tubules [23]. The epididymis receives a double androgen hormone supply through the luminal fluid and the peritubular blood vessels, and it has been postulated that maintenance of the integrity of the lining tubular epithelium is dependent on intraluminal androgens [15]. Thus, it is expected that the enzymatic activity of ALP present in the luminal borders and in the basement membrane of the epididymal epithelium supplies the epithelium with the androgens necessary for maintaining epithelial integrity [15]. This thesis supports the present observations, since the epithelium of the epididymal tail, a storage region for epididymal spermatozoa, is theoretically submitted to a higher pressure due to the large volume of luminal content and the strong emission of spermatozoa during the process of sperm ejaculation [24].

The sites of ALP formation in the male reproductive tract have been determined for some species, and there seem to be species-specific variations. In dogs, most ALP is produced in the epididymis [25]. In rabbits, it has been shown that the testis, epididymis, deferent duct and the ampulla of vas deferens synthesize significant amounts of ALP [13], while in bulls most ALP originates from the seminal vesicles and, to a lesser extent, from the testes and epididymis [26]. In stallions [16], most ALP was found to originate from the seminal plasma and not from the spermatozoa, an observation made on the basis of the analysis of non-processed ejaculates and spermatozoon-free ejaculates [16]. This finding agrees with studies on human sperm in which ALP activity was lower in isolated spermatozoa compared to the higher activity observed in seminal plasma [27]. In the Golden hamster, strong expression of ALP production was observed in the epididymis, in agreement with the present biochemical results and with histochemical observations recently reported for the this same species [7].

ALP has been demonstrated in various mammalian species; its distribution, however, shows species-specific variations. In this respect, ALP was observed at very high concentrations ($> 10,000$ U/l) in the epididymal fluid of dogs, while only small amounts of ALP were detected in the prostate and testis [28]. In the dog, histochemical analysis has shown ALP activity in epithelial cells of the head, body and tail, emphasizing a higher reactivity in the last segment [12], in agreement with the ALP activity characterized here for the epididymal tail of the golden hamster.

ALP reactivity was also demonstrable in the seminiferous tubules, although the reaction in the testes was less intense than that observed in the epididymis. Observations made on the rabbit epididymis [13] agree with those reported for dogs but differ from the results obtained for other species. The results regarding general epididymal ALP activity in the hamster are in accordance with those reported for rabbits [13] and dogs [12].

In humans, ALP reactivity has been found to be weak in the epididymal epithelium, while in goats ALP activity decreased during the transport of epididymal spermatozoa [14]. These findings disagree with the present results showing a weak reaction in the initial segment, head and body and a marked increase in the epididymal tail, thus revealing a parallelism between an increase in the activity of this enzyme and the transport of epididymal spermatozoa.

The location of ALP in the epididymal epithelium has also been found to differ between species. In the dog, ALP activity was detected in the luminal border of epithelial cells and also in stereocilia, but not in the basement membrane [12]. In contrast, in swamp buffalos intense activity was observed along the basal region of the epithelium throughout the epididymis, while in the luminal border reactivity was only detected in zone II of the epididymal head [8]. Observations made on bulls showed strongly positive reactions in the stereocilia and apical border of zones I to III, in the basement membrane and in peritubular smooth muscle cells along the epididymis [15]. Positive ALP reactivity in epididymal stereocilia has also been reported for sheep and bulls [29], hamsters [30] and rabbits [31], but not for rats [32]. In Guinea pigs, ALP reactivity was only observed in the basement membrane of the epididymal epithelium [20]. The studies on swamp buffalos [8] and bulls [15], in which strongly positive reactions were demonstrated in the proximal regions of the epididymis, differ from the present investigation in which ALP activity in the epididymal duct was higher in the distal part, i.e., at the distal tail.

Histochemical studies on the epididymis of the camel have shown a positive reaction in subepithelial connective tissue, blood vessels and stereocilia, with subepithelial and vascular reactions being common to almost all species [33]. The location of ALP in stereocilia and subepithelial connective tissue is consistent with a possible function of active transport between vascular structures and epithelial cells on the one hand, and between epithelial cells and luminal content on the other [6].

In some species, ALP reactivity has been detected in the epididymal lumen and in cytoplasmic droplets of spermatozoa. In Rhesus monkeys [4], ALP activity was higher in the lumen than in the epididymal epithelial lining, with the most intense reaction being observed in the region of the body. ALP activity has been demonstrated in cytoplasmic droplets of sheep and

rabbit spermatozoa [34]. However, no positive reaction was observed in hamster or rat spermatozoa despite the high levels of the enzyme in epididymal plasma [34]. The location of ALP in cytoplasmic droplets of spermatozoa raises the hypothesis that ALP catalyzes dephosphorylation and the transport of phosphate groups between the luminal fluid and spermatozoa and, consequently, is involved in the maturation of spermatozoa in the epididymis [34].

Our results showed that ALP activity was highest in the distal tail, while it was low in the other regions (initial segment, head and body). These findings are in contrast to a previous study [7] conducted on some mammals including the hamster, which showed no ALP activity in the initial segment, head and body, and maximum and moderate activity in the proximal and distal tail, respectively. The present results also disagree with those reported for sheep, rabbits and rats in that same study [7], with moderate activity being observed in the initial segment and head of the sheep epididymis, and no activity in the body or tail. In the rat, no activity was detected in any of the segments, while in the rabbit all segments showed reactivity to ALP, with activity being observed in the head, strong reactions in the initial segment, body and proximal tail, and a moderate reaction in the distal tail [7], observations that also contrast with those obtained in the present biochemical study.

The histochemical observations of ALP activity in cytoplasmic droplets of mammalian spermatozoa, including the hamster [34], confirmed that the strongly positive reaction demonstrated in the tail of the hamster epididymis derive from cytoplasmic droplets. The hypothesis raised on the basis of studies conducted on Rhesus monkeys [4] disagrees with the statement following the analysis of ALP in cytoplasmic droplets [34], since, according to Moniem e Glover [34], ALP is sequestered in cytoplasmic droplets and released into the lumen during maturation and, therefore, the stronger positive reaction detected in the epididymal lumen would originate from the cytoplasmic droplets and not from the lining epithelium. However, the cytoplasmic droplet is endocytosed by clear cells along the trajectory of spermatozoa through the epididymal lumen [9], and is theoretically not present in the lumen of the epididymal tail. In conclusion, the biochemical results obtained in the present study, together with the histochemical findings of previous investigations obtained for cytoplasmic droplets of mammalian spermatozoa [34], support the hypothesis that in the hamster epididymis ALP is secreted by the epididymal epithelium and accumulates in the epididymal tail, and is essential for the metabolism and maintenance of stored spermatozoa and, consequently, for normal reproductive physiology.

References

1. Blackshaw AW, Samisoni JI. Histochemical localization of some dehydrogenases enzymes in the bull testis and epididymis. *J Dairy Sci* 1967; 50: 747-752.
2. Erkmann G. Histologische und histochemische Untersuchungen zur Segmenteinteilung des Nebenhodens von Rind vor und nach der Geschlechtsreife. *Cytobiologie* 1971; 3: 37-69.
3. Riar SS, Setty BS, Kar AB. Studies on the physiology and biochemistry of mammalian epididymis: biochemical composition of epididymis. A comparative study. *Fertil Steril* 1973; 24: 355-363.
4. Alsum DJ, Hunter AG. Regional histology and histochemistry of the ductus epididymis in the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Biol Reprod* 1978; 19: 1063-1069.
5. Sinowatz F, Skolek-Winnisch K, Lipp W. Histological localization of hydrolases in the epididymis of the dog. *Acta Anat* 1979; 105: 514-523.
6. Tingari MD, Moniem KA. On the regional histology and histochemistry of the epididymis of the camel (*Camelus dromedaries*). *J Reprod Fertil* 1979; 57: 11-20.
7. Moniem KA. Comparative histochemical localization of some hydrolytic enzymes in mammalian epididymis. *J Anat* 1980; 108: 301-309.
8. Ariyaratna HBS, Gunawardana VK, Navaratna MA. The epididymis of the prepubertal Swamp buffalo (*Bubalus bubalis*): histochemistry of phosphatases. *Anat Histol Embryol* 1996; 25: 161-165.
9. Robaire B, Hermo L. In Knobil E, Neill JD (eds): The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 1988; 999-1080.
10. Bell DJ, Lake PE. A comparison of phosphomonoesterase activities in the seminal plasma of the domestic cock, turkey, tom, boar, bull, buck, rabbit and man. *J Fertil* 1962; 3: 262-268.
11. Mann T. The biochemistry of semen. London: Methuen and Co Ltda, 1964.
12. Kutzler MA, Solter PF, Hoffman WE, Volkmann DH. Characterization and localization of alkaline phosphatase in canine seminal plasma and gonadal tissues. *Theriogenology* 2003; 60: 299-306.
13. Muller B. Genital tract proteins in the male rabbit II: alkaline phosphatase – enzyme action and site synthesis. *Andrologia* 1983; 15: 676-681.
14. Bhattacharyya A, Bhattacharyya AK. Biochemical changes in some acrosomal enzymes of spermatozoa during maturation. *Experientia* 1985; 41: 62-63.
15. Goyal HO, Vig MM. Histochemical activity of alkaline phosphatase. *Am J Vet Res* 1984; 15: 444-450.

16. Turner RMO, MacDonnell SM. Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. *Theriogenology* 2003; 60: 1-10.
17. Low MG, Saltiel AR. Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. *Science* 1988; 239: 268-275.
18. Eckersall PD, Nash AS. Isoenzymes of canine plasma alkaline phosphatase: an investigation using isoelectric focusing and related to diagnosis. *Res Vet Sci* 1983; 34: 310-314.
19. Hoffmann WE, Kramer J, Main AR. In Loeb WF, Quimby FW (eds): The clinical chemistry of laboratory animals. New York: Pergamon Press, 1989; 237-278.
20. Adams CS. Localization of alkaline phosphatase and NADH diaphorase in the principal cells of the Guinea pig epididymis. *Acta Anat* 1983; 116: 146-151.
21. Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE. In Knobil E, Neill JD (eds): The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 1994; 1063-1175.
22. Hermo L, Oko R, Morales C. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int Rev Cytol* 1994; 154: 105-189.
23. Gunawardana VK. Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in the intertubular tissue of the testes in the domestic fowl. *Tissue Cell* 1990; 22: 113-121.
24. Pabst R. Untersuchungen über Bau und Funktion des menschlichen Samenleiters. *Z Anat Entwickl.-Gesch.* 1969; 129: 154-176.
25. Frenette G, Dube JY, Tremblay RR. Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. *Arch Androl* 1986; 16: 235-241.
26. Alexander FC, Zemjanis R, Graham EF, Schmehl ML. Semen characteristics and chemistry from bulls before and after seminal vesiculectomy and after vasectomy. *J Dairy Sci* 1971; 54: 1530-1535.
27. Singer R, Barnet M, Allalouf D, Schwartzman S, Sagin M, Landau B et al. Some properties of acid and alkaline phosphatase in seminal fluid and isolated sperm. *Arch Androl* 1980; 5: 195-199.
28. Johnston SD. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1991; 21: 545-551.
29. Nicander L. Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymis in stallions, rams and bulls. *Acta Morph Neerl-Scand* 1958; 1: 337-362.
30. Malone TE, Bower ML. Regional localization of polysaccharide complexes and alkaline phosphatase in hamster epididymis. *Am Zool* 1962; 2: 427-428.
31. Linnetz LJ, Amann RP. Histochemistry of the epididymis and ampulla as influence by sperm output. *J Reprod Fertil* 1968; 16: 343-350.

32. Maneely RB. The distribution of polysaccharide complexes and of alkaline glycerophosphatase in the epididymis of the rat. *Acta Anat* 1955; 24: 314-328.
33. Martan J. Epididymal histochemistry and physiology. *Biol Reprod* 1969; Suppl. 1: 134-154.
34. Moniem KA, Glover TD. Alkaline phosphatase in the cytoplasmic droplet of mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1972; 29: 65-69.

4º artigo: elaborado conforme normas do periódico “Annals of Anatomy”

Estrutura do epitélio de revestimento da cauda do epidídimo do hamster dourado

Célia C. L. Beu^{1,2}, Antonio M. Orsi³, Raquel F. Domeniconi¹

¹ Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

² Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, UNIOESTE, Cascavel, PR, Brasil

³ Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil

Resumo

O ducto epididimário é a parte do sistema de ductos excretores do testículo capaz de armazenar os espermatozóides e promover a sua maturação. O epidídimo é formado pelas regiões de segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. A principal função da cauda do epidídimo é o armazenamento dos espermatozóides, no entanto esta região provavelmente está envolvida em outros papéis funcionais. O objetivo deste trabalho foi estudar as características estruturais do epitélio de revestimento da cauda do epidídimo do hamster dourado, que possam indicar a ocorrência de outras atividades além do armazenamento de espermatozóides. Os resultados mostraram que a porcentagem relativa dos tipos celulares presentes na cauda do epidídimo, ou seja, as células principais, claras, basais e halo constituíram 74,9%, 6,9%, 12,5% e 5,6%, respectivamente. Foram observados grandes espaços intercelulares, entre as membranas plasmáticas das células principais e dos outros tipos celulares. Estes espaços intercelulares estavam preenchidos por corpos multivesiculares, figuras de mielina, restos e espirais de membranas ou material floculento. As células claras tinham a maior parte do citoplasma, os $\frac{3}{4}$ basais preenchida por lisossomos e, no $\frac{1}{4}$ apical numerosos vacúolos e vesículas estavam presentes. As células principais apresentaram no citoplasma supranuclear complexos de Golgi, mitocôndrias, corpos multivesiculares, vesículas e vacúolos. As observações realizadas neste trabalho permitiram inferir que as células claras devem atuar ativamente em processos absorptivos e endocitóticos; possivelmente deve haver passagem de água do lúmen para o espaço intersticial através do epitélio. Outro processo que pode ocorrer na cauda do epidídimo do hamster dourado é aquele de transporte entre as células epiteliais adjacentes denominado de transcitose.

Palavras-chave: Epidídimo, compartimento epitelial, transcitose, papéis fisiológicos, hamster dourado.

Summary

The ductus epididymidis of the Golden hamster, as in other mammals, is part of the excurrent duct system of the testis with the histophysiologic roles of maturation and storage of spermatozoa, which occur inside its luminal compartment. So, the main function of the epididymis cauda is the storage of spermatozoa, however this specific region exerts other morphophysiologic roles. Based on this information, this study was made to investigate structural features of the cauda epididymidis epithelium, which could to indicate other roles taking place in the cauda besides spermatozoa storage. It was shown that the relative percentage of cell types present in cauda lining epithelium were: 74.9% of principal cells, 6.9% of clear cells, 12.5% of basal cells and 5.6% of halo cells. Characteristically, large intercellular spaces were seen between the lateral plasma membranes of adjacent principal cells or between these cells and other epithelium cell types. These intercellular spaces were frequently filled with multivesicular bodies, myelin figures, scrolls and debris of membranes or flocculent dense material. Clear cells had the most part of their cytoplasm filled with lysosomes present in the basal three quarters of the cytoplasm. Numerous vacuoles and vesicles of different shapes and sizes filled the complementary one quarter of the apical cytoplasm. The observations here made suggest that clear cells could act in processes of endocytosis and fluid-phase endocytosis as well as water transfer from the epididymal lumen to the interstitium through the epithelium compartment. Moreover, another process that may occur at the cauda epididymidis of Golden hamster is active transport between adjacent epithelial cells, called transcytosis.

Key words: Epididymis, epithelium compartment, transcytosis, physiologic roles, Golden hamster.

Introdução

Estudos feitos sobre o epidídimo de mamíferos mostraram que este órgão pode ser dividido em regiões distintas, com base nas características morfológicas e morfométricas do seu epitélio de revestimento. Várias divisões foram propostas e uma das mais utilizadas é a que divide o órgão em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Serre e Robaire, 1998).

O ducto epididimário é um dos componentes do sistema de ductos condutores de espermatozóides, portanto, o transporte de espermatozóides é uma das funções atribuídas ao epidídimo. Não sendo um mero ducto transportador de espermatozóides, no lúmen epididimal os espermatozóides são submetidos a microambientes regionais complexos e variados enquanto são transportados ao longo do ducto epididimário, sofrendo maturação e adquirindo a capacidade potencial de fertilização dos oócitos (Robaire e Hermo, 1988). Além destas funções, o epidídimo também armazena os espermatozóides que são armazenados na cauda epididimária até o momento da emissão e posterior ejaculação (Hib et al., 1982).

O epitélio de revestimento tubular epididimário é caracterizado por apresentar alguns tipos celulares distintos em sua constituição ao longo do ducto epididimário. As atividades desempenhadas pelas células deste epitélio são responsáveis pela criação dos microambientes regionais nos quais os espermatozóides sofrem maturação. As características destas células epiteliais, observadas em nível ultraestrutural, indicam que há ocorrência de atividades secretória e absorptiva no epitélio epididimário (Robaire e Hermo, 1988).

Os estudos que abordaram as regiões epididimárias indicaram que funções ou atividades funcionais específicas podem ocorrer, predominantemente em determinados segmentos tubulares e que, também, estas funções podem ser espécies-específicas (Robaire e Hermo, 1988; Setchell et al., 1994). Assim, foi sugerido que a principal função do segmento inicial é a absorção de fluido (Abe e Takano, 1988), enquanto que para a cauda, o segmento terminal do epidídimo, foi atribuída, como função principal, o armazenamento dos espermatozóides, podendo ocorrer ainda atividade absorptiva nesta região (Robaire e Hermo, 1988). Com relação à cauda do epidídimo, também foi verificado, em algumas espécies como o rato (Blandau e Rumery, 1964; Dyson e Orgebin-Crist, 1973) e o camundongo (Pavlok, 1974; Hoppe, 1975), que a cauda é o sítio aproximado em que os espermatozóides adquirem o seu potencial para fertilizar os oócitos, enquanto que no coelho (Bedford, 1966), porco (Holtz e Smidt, 1976) e carneiro (Fournier-Delpech et al., 1977), este sítio é encontrado no corpo do epidídimo.

Sendo a cauda do epidídimo uma região envolvida, muito provavelmente, em outros papéis funcionais, além do armazenamento de espermatozóides, o objetivo deste trabalho foi estudar, nesta região epididimária em hamster dourado, as características estruturais do epitélio tubular que possam indicar a ocorrência de outros processos ou atividades, além da já claramente estabelecida função de armazenamento de espermatozóides.

Materiais e métodos

Neste estudo foram utilizados os epidídimos de 7 hamsters dourados, *Mesocricetus auratus*, adultos com 60 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UNESP. Os animais foram mantidos em condições controladas de luz e temperatura e receberam água e comida *ad libitum*. Após sacrifício dos animais, os epidídimos foram coletados e reduzidos para obtenção do segmento terminal (cauda distal do epidídimo) e imediatamente fixados.

As amostras teciduais, provenientes da cauda epididimária de 3 animais, foram fixadas por 24 horas em solução de Bouin. Após fixadas, as amostras foram lavadas em álcool 70% e submetidas à rotina histológica para inclusão em Paraplast PlusTM (Oxford Labware, St. Louis, USA). Secções de 7 µm foram coradas com H/E e utilizadas para análises morfológicas. As análises morfológicas foram feitas utilizando 10 lâminas de cada epidídimo dos 3 animais. As mensurações de altura epitelial das células principais foram feitas com o uso de ocular micrométrica em microscópio Olympus BH-2, na objetiva de 40x.

A distribuição relativa dos diferentes tipos celulares na cauda epididimária foi estimada por contagem das células em diferentes secções do ducto. As contagens foram feitas em 10 secções por epidídimo de cada animal. O resultado bruto obtido a partir das contagens foi corrigido, aplicando-se a fórmula proposta por Amann (1962), mostrada abaixo, cujo resultado forneceu o valor corrigido do número de células contadas nos cortes histológicos.

nº corrigido de tipo de célula = nº total de tipo de célula

$$\frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte}} + \sqrt{\left[\frac{AD}{2} \right]^2 - \left[\frac{AD}{4} \right]^2}$$

sendo:

AD: diâmetro médio do núcleo de 10 células

As análises ao nível de microscopia eletrônica de transmissão utilizaram materiais de cauda epididimária de outros 4 animais. Os fragmentos de tecidos coletados foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,3) a 4°C por 2 horas. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, desidratadas em acetona e

incluídas em Araldite (Polysciences, USA). Secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As telas com os cortes foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Phillips CEM 100.

Resultados

O epitélio de revestimento da cauda do epidídimo do hamster dourado apareceu baixo e, predominantemente constituído por células cúbicas baixas (Figs. 1a e 1b), cujo valor médio de altura epitelial foi de $12,6 \pm 0,12\mu\text{m}$.

Os tipos celulares presentes nesta parte do ducto epididimário foram as células claras, basais, halo e principais (Fig. 1), sendo que estas últimas predominaram, constituindo 74,9% da população celular do ducto, enquanto as células claras, basais e halo constituíram, respectivamente, 6,9%, 12,5% e 5,6% das células presentes no revestimento epitelial da cauda epididimária. A luz da cauda do epidídimo esteve constantemente repleta de espermatozóides (Figs. 1a e 1b).

A observação em microscopia eletrônica de transmissão mostrou a presença de grandes espaços intercelulares dispostos entre as células epiteliais da cauda epididimária. Os espaços intercelulares observados ocorreram entre as membranas laterais das células principais, claras e basais adjacentes (Figs. 2 e 3). Na superfície basal do epitélio, as células mantinham contatos através de prolongamentos citoplasmáticos laterais (Figs. 2, 4a e 4b), sendo que alguns destes prolongamentos adjacentes, aparentemente, não mantinham contato entre si (Fig. 4a).

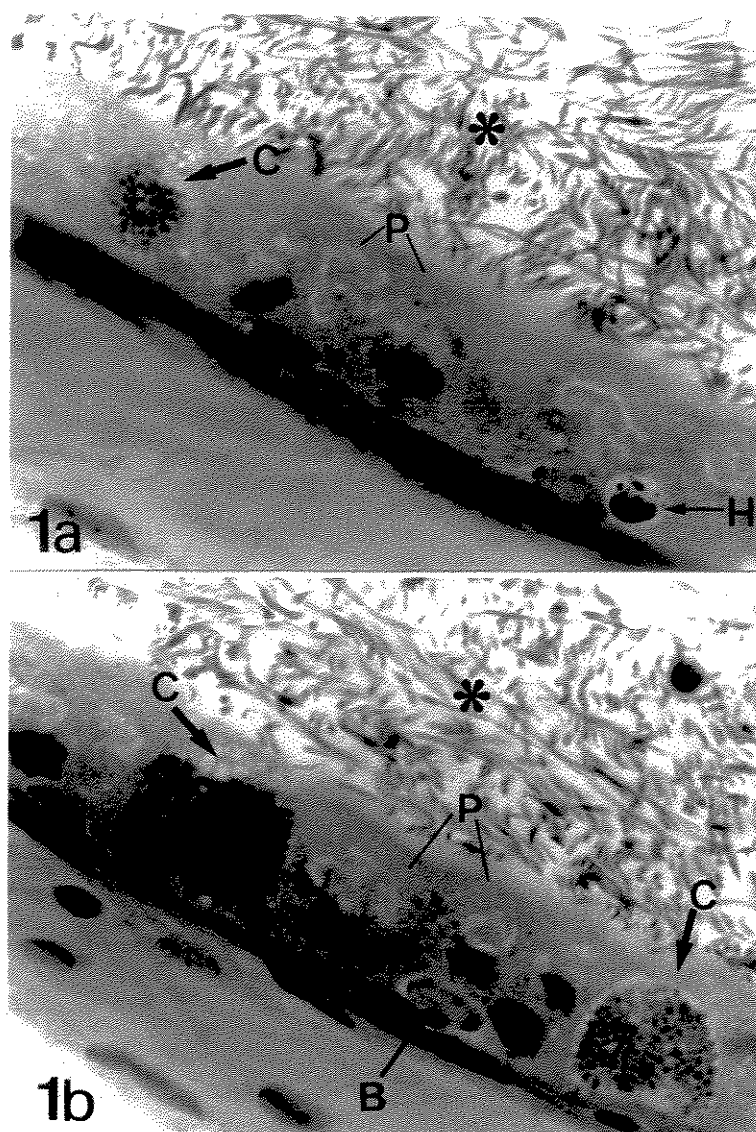
As células principais apareciam mais eletrondensas do que as células basais e as células claras (Figs. 2, 3 e 9a). O núcleo das células principais era irregular e denteado, localizando-se na região basal do citoplasma (Fig. 2). A superfície apical das células principais tinha um grande número de estereocílios projetados para o lúmen tubular (Figs. 2 e 5). No citoplasma supranuclear foram observadas mitocôndrias, complexos de Golgi, vesículas, corpos multivesiculares e lisossomos (Figs. 5, 6 e 7). A região apical continha mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, cisternas e vesículas revestidas por membrana e corpos multivesiculares (Figs. 6 e 8). No citoplasma infranuclear puderam ser observados mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e lisossomos (Fig. 4b).

O citoplasma das células claras mostrou-se, predominantemente, ocupado por corpos eletrondensos, semelhantes a lisossomos, ocupando os $\frac{3}{4}$ basais do citoplasma (Fig. 3). Estes

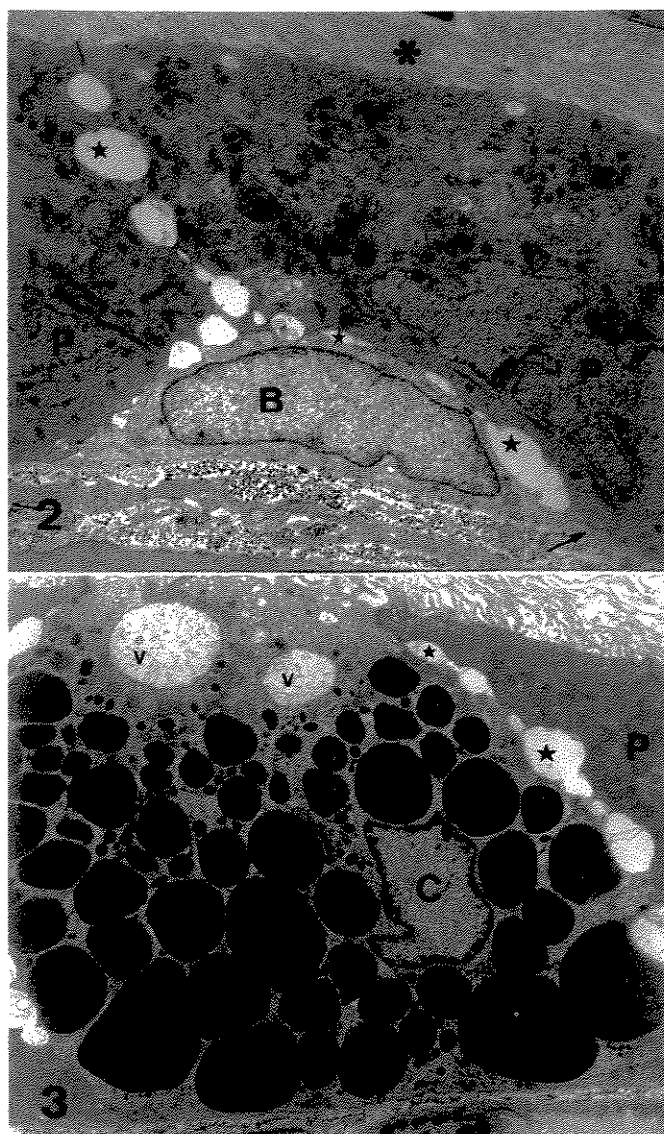
corpos lisossomais estavam gradativamente aumentados de tamanho desde a região apical para a região basal do citoplasma e, alguns destes lisossomos aparentemente superaram o núcleo, quanto ao tamanho (Fig. 3). Os lisossomos menores, ocuparam o $\frac{1}{4}$ apical do citoplasma (Figs. 3 e 9a). O citoplasma apical aparecia altamente vacuolizado, sendo que os numerosos vacúolos, vesículas e corpos multivesiculares eram de tamanhos variados e seus conteúdos eram, geralmente, eletrólucos (Figs. 9a e 9b). Os vacúolos maiores continham material fino e floculento (Figs. 9a e 9b). Na superfície luminal, poucos estereocílios projetavam-se desta para a luz tubular (Figs. 9a e 9b). Um grande número de vesículas revestidas por membrana foram observadas apicalmente; estas tinham tamanhos e formas variadas, notando-se vesículas ovais, tubulares e em forma de C (Fig. 9b).

As extremidades citoplasmáticas apicais entre células principais e entre células claras e principais adjacentes estavam unidas por complexos juncionais de membrana típicos, constituídos por junções de oclusão, de aderência e desmossomos (Figs. 8 e 10). Os espaços intercelulares apareciam eletrólucos e seus conteúdos eram variáveis (Figs. 2, 3, 4 e 8). No interior destes espaços foram observados corpos multivesiculares, material fino e floculento, restos de membranas, estruturas semelhantes a corpos de mielina e expansões do conteúdo citoplasmático na superfície não citoplasmática dos espaços intercelulares (Figs. 4, 5, 8, 11 e 13c). Referente ainda aos espaços intercelulares, foi usual a observação de projeções citoplasmáticas interdigitadas de células adjacentes dirigidas para os espaços intercelulares (Fig. 11d).

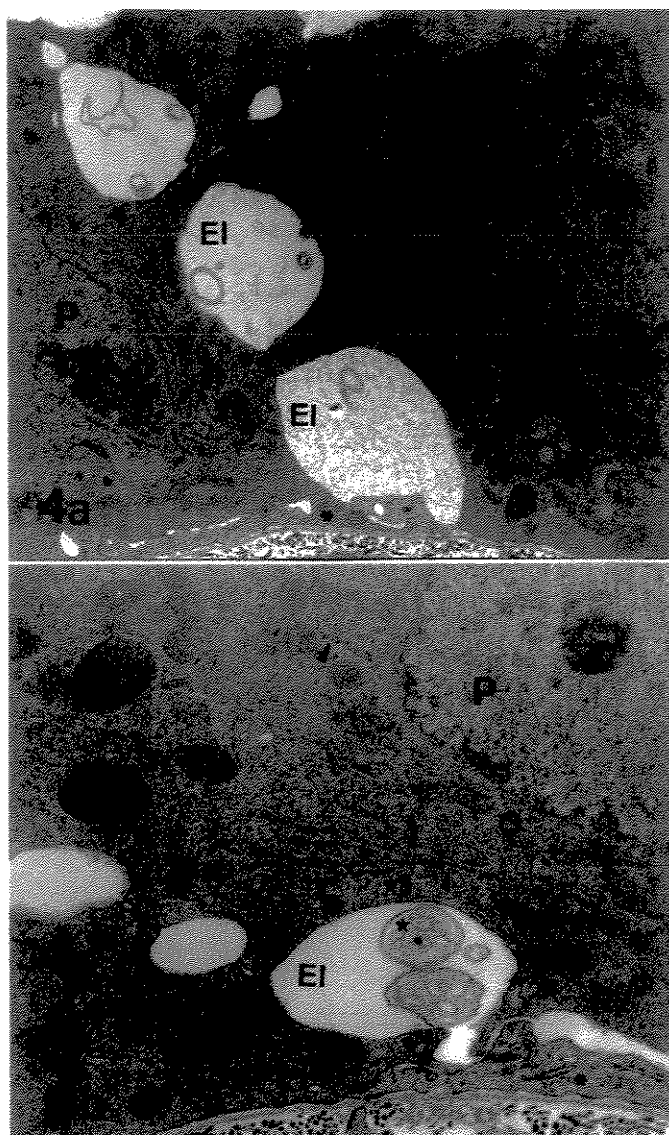
Adjacentes aos espaços intercelulares, foram observadas mitocôndrias, corpos multivesiculares, complexos de Golgi, lisossomos e vesículas (Figs. 6, 7, 8 e 11). Algumas vesículas estavam muito próximas aos espaços intercelulares agregando-se às membranas plasmáticas delas delimitantes (Fig. 12). Outro possível processo de agregação, foi a observação de endossomos que aparentemente se fundiam, via os plasmalemas adjacentes, aos espaços intercelulares (Figs. 13a e 13b), bem como eram vistos corpos multivesiculares, lisossomos e endossomos coalescentes entre si nas adjacências dos espaços intercelulares (Fig. 13).



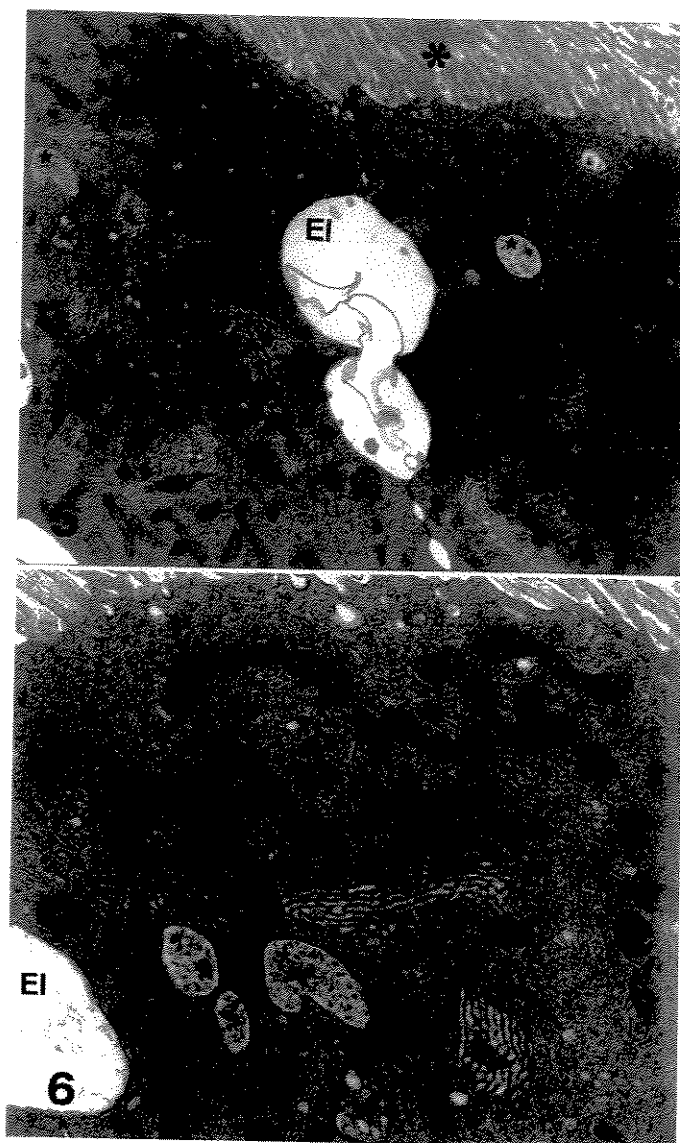
Figs. 1a e 1b – Fotomicrografias da cauda do epidídimo do hamster dourado. São indicados: célula principal (P), célula clara (C), célula basal (B), célula halo (H) e espermatozóides no lúmen epididimário (asterisco), H/F. x400.



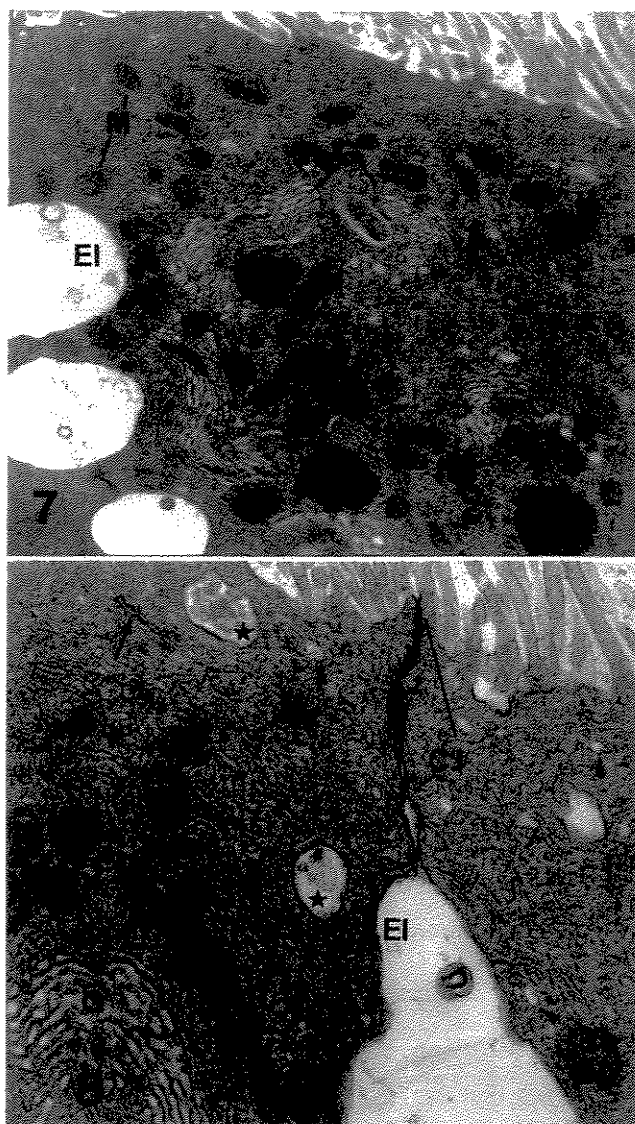
Figs. 2 e 3 – Eletromicrografias da cauda do epidídimo do hamster. São indicados: célula principal (P), núcleo da célula basal (B), núcleo da célula clara (C), lisossomos (L), espaço intercelular (estrela), vacúolos (v), prolongamento citoplasmático lateral na superfície basal do epitélio (seta) e estereocílios no lúmen epididimário (*). x1950 em 2 e x870 em 3.



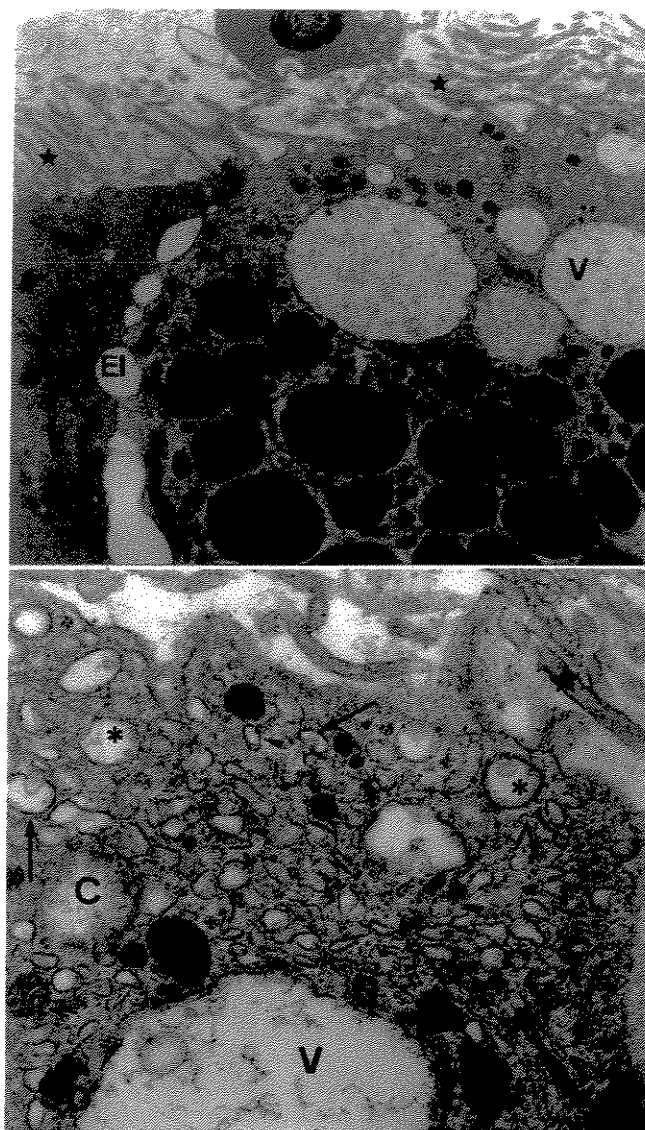
Figs. 4a e 4b – Eletromicrografias da região basal do epitélio da cauda epididimária do hamster. São indicados: núcleo da célula principal (P), espaço intercelular (EI), prolongamento citoplasmático lateral na superfície basal do epitélio (*), retículo endoplasmático rugoso (cabeça-de-seta), lisossomo (L) e corpo multivesicular no espaço intercelular (estrela). x1950 em 4a e x3400 em 4b.



Figs. 5 e 6 – Eletromicrografias de células principais (em 5) e da região supranuclear e apical de uma célula principal (em 6) da cauda do epidídimo do hamster. São indicados: espaço intercelular (EI), corpos multivesiculares (estrelas), complexos de Golgi (G), mitocôndrias (M) e estereocílios no lúmen epididimário (*). x1950 em 5 e x4600 em 6.



Figs. 7 e 8 – Eletromicrografias das regiões supranuclear e apical de uma célula principal (em 7) e da região apical de duas células principais (em 8) da cauda epididimária do hamster dourado. São indicados: espaço intercelular (EI), complexos de Golgi (G), vesículas (cabeça-de-seta), lisossomo (L), corpos multivesiculares (estrelas), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático (seta), complexo juncional (CJ). x3400 em 7 e x8400 em 8.



Figs. 9a e 9b – Eletromicrografias das regiões apicais do epitélio da cauda epididimária do hamster. São indicados: célula clara (C), lisossomo (L), vacúolo (v) e estereocílios (estrela). 9a: célula principal (P) e espaço intercelular (EI); 9b: vesícula em forma de C (seta longa), corpo multivesicular (*), vesícula (cabeça-de-seta). x3400 em 9a e x8400 em 9b.

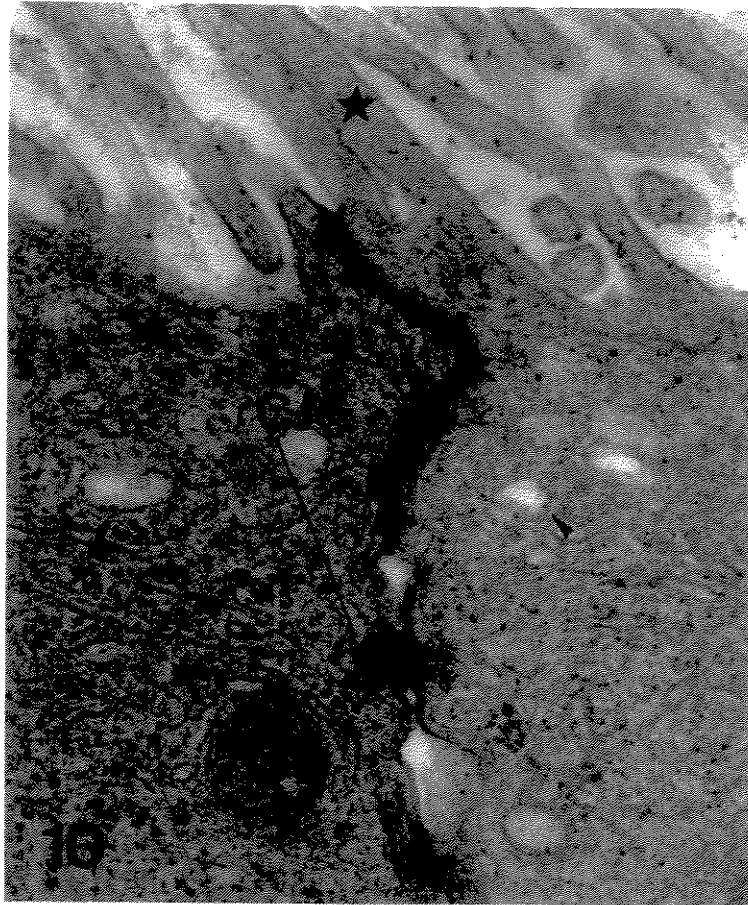
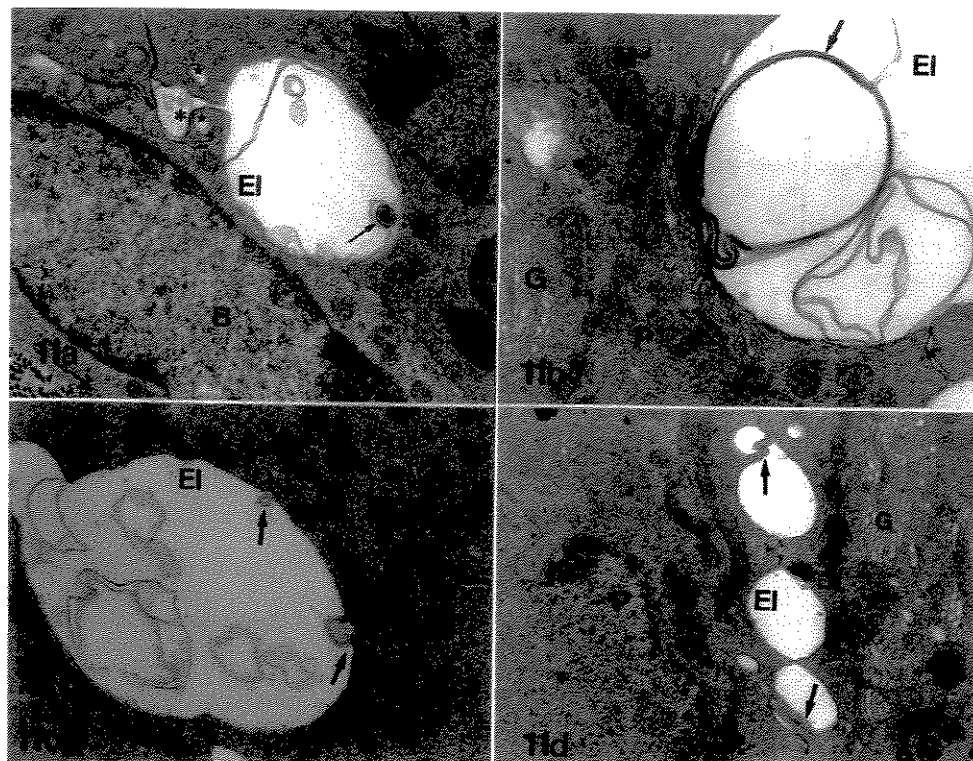


Fig. 10 – Eletromicrografia da região apical de duas células principais da cauda do epidídimo do hamster dourado. São indicados: complexo juncional (CJ), vesícula (cabeça-de-seta) e estereocílio (estrela). x8400.



Figs. 11a, 11b, 11c, 11d – Eletromicrografias do epitélio da cauda epididimária do hamster dourado. São indicados: célula principal (P) e espaço intercelular (EI). 11a: núcleo da célula basal (B), lisossomo (L), vesículas (estrela), corpo multivesicular (*) e figura de mielina (seta) no espaço intercelular; 11b: mitocôndrias (M), complexo de Golgi (G) e espiral de membranas no espaço intercelular (seta); 11c: brotamento citoplasmático no espaço intercelular (seta); 11d: complexo de Golgi (G) e projeção da membrana plasmática lateral para o espaço intercelular (seta). x6300 em 11a, x8400 em 11b, x4600 em 11c e x3400 em 11d.

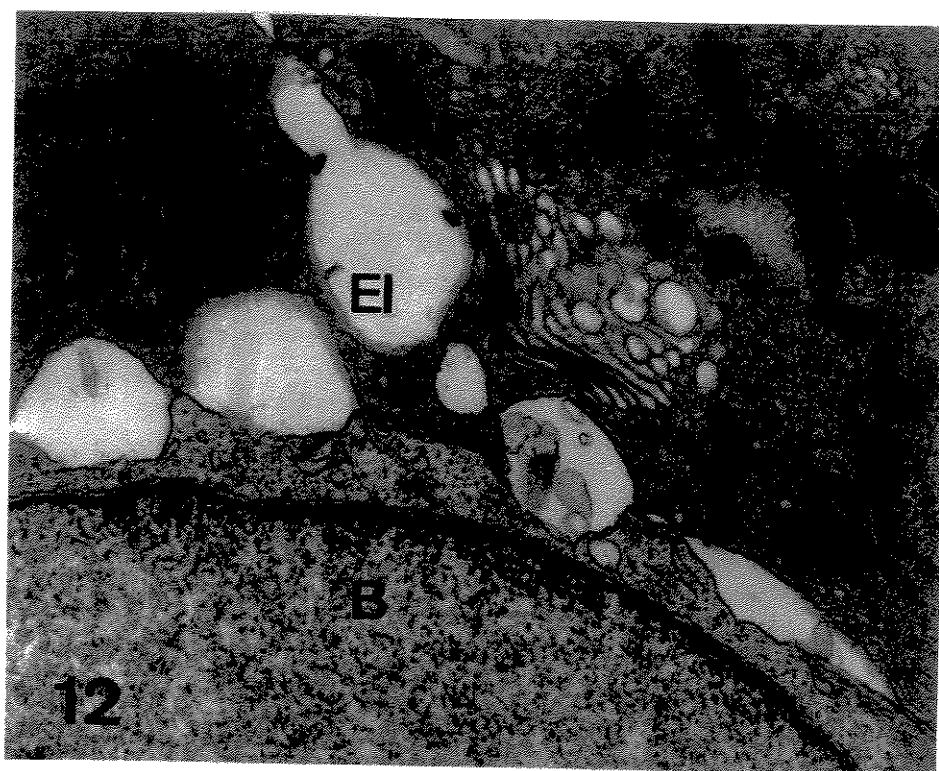
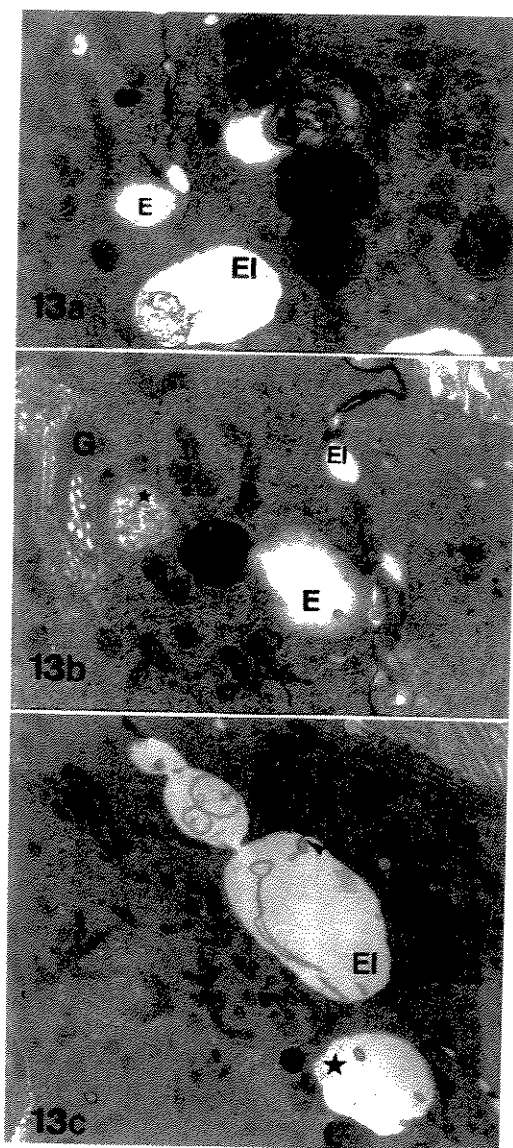


Fig. 12 – Eletromicrografia da região basal do epitélio da cauda epididimária. São indicados: núcleo da célula basal (B), célula principal (P), espaço intercelular (EI), complexo de Golgi (G) e vesícula fundindo-se com espaço intercelular (cabeça-de-seta). x6300.



Figs. 13a, 13b e 13c: Eletromicrografias de células principais do epitélio da cauda epididimária do hamster dourado. São indicados: espaço intercelular (EI), lisossomo (L), corpo multivesicular (estrela), endossomo (E) e complexo de Golgi (G). 13a e 13b: endossomo confluindo em espaço intercelular (seta); 13c: brotamento citoplasmático no espaço intercelular (cabeça-de-seta). x4600 em 13a e 13b, x3400 em 13c.

Discussão

As células claras são um dos tipos celulares que formam o epitélio de revestimento do ducto epididimário de alguns mamíferos (Robaire e Hermo, 1988). No entanto, este tipo celular não está presente ao longo de todas as regiões do epidídimo do hamster dourado. No rato, as células claras foram encontradas na cabeça, corpo e cauda (Serre e Robaire, 1998), diferindo das observações feitas no epidídimo do hamster dourado cujas células claras estavam presentes apenas na cauda epididimária e ausentes nas demais regiões (Beu et al., 2001). A presença e a distribuição das células claras no epidídimo parecem ser espécie-específica, porque embora estas células estivessem presentes nos epidídimos do rato e do hamster, não foram encontradas em nenhum dos segmentos epididimários do bovino (Goyal, 1985), do porco (Orsi et al., 1985) e do macaco (Ramos e Dym, 1977).

As observações quanto à contribuição dos tipos celulares na constituição do epitélio da cauda epididimal, mostraram que há diferenças espécie-específicas em relação ao rato e ao hamster. No rato, as células principais contribuíram com pouco mais que 50% da população celular na constituição do epitélio da cauda (Serre e Robaire, 1998), enquanto que no hamster, contribuíram com 74,9%. Referente às células claras, também foram observadas diferenças; no rato constituíram cerca de 20% da população celular do epitélio da cauda (Serre e Robaire, 1998) e, no hamster apenas 6,9%, segundo as observações feitas neste trabalho.

As células claras têm gerado controvérsias quanto à definição de suas funções. Estudos utilizando marcadores celulares demonstraram que estas células foram capazes de captar grandes quantidades de marcadores (Moore e Bedford, 1979a). Também foi demonstrado que as células claras são ricas em anidrase carbônica (Cohen et al., 1976), um componente enzimático do epitélio, concernente à capacidade de absorção, indício que suporta a hipótese de que as células claras podem estar envolvidas em absorção de íons salinos e proteínas presentes na cauda do epidídimo (Flickinger et al., 1978).

Vesículas em forma de C, observadas na porção apical das células claras do epidídimo do rato, possivelmente estariam envolvidas em endocitose (Moore e Bedford, 1979a; 1979b). Vesículas similares, relatadas nas células de Leydig em ratos, eram responsáveis por endocitose adsorptiva (Hermod et al., 1985). Esta atividade endocitótica foi muito maior nas células claras do que nas células principais adjacentes, particularmente na cauda do epidídimo de roedores (Moore e Bedford, 1979a; 1979b; Robaire e Hermo, 1988). As características ultra-estruturais das células claras, observadas no epidídimo do hamster, como o grande número de vesículas, vacúolos,

vesículas em forma de C e lisossomos, caracterizam que elas devem atuar ativamente nos processos absorptivos e endocitóticos, concordantemente com os relatos feitos para o rato (Moore e Bedford, 1979a; 1979b; Robaire e Hermo, 1988).

Observação de células claras, apenas no epitélio da cauda do epidídimo do hamster, permitiu inferir que o sítio no qual os espermatozóides adquirem seu potencial de fertilização nesta espécie é a cauda do epidídimo. Às células claras foi atribuída ainda a capacidade de eliminação da gota citoplasmática liberada pelos espermatozóides na luz tubular (Robaire e Hermo, 1988; Setchell et al., 1994). Isto porque se sabe que o local da liberação da gota citoplasmática pelos espermatozóides indica o sítio onde eles se tornam potencialmente aptos para fertilizar os oócitos (Robaire e Hermo, 1988). Esta hipótese justificaria a presença deste tipo celular apenas na cauda do epidídimo, uma vez que é na cauda proximal que os espermatozóides do hamster efetivamente iniciam a liberação da gota citoplasmática, conforme as observações aqui feitas.

Outra atividade atribuída às células claras foi a espermiófagia. Assim sendo, a presença destas células na cauda do epidídimo seria consistente com a capacidade de eliminar espermatozóides alterados da luz do túbulo epididimário segundo Moore e Bedford (1979a), papel funcional este que, no entanto, mereceria novos estudos, visto que neste trabalho não foram vistas células claras "endocitando" espermatozóides.

Um destaque para um papel morfofuncional das células claras, reportado para o epitélio da cauda epididimária no hamster dourado da variedade champanha, foi a consideração de possível ocorrência de secreção de glicoconjugados nesta região epididimária (Vicentini e Orsi, 1989). Esta afirmação foi feita com base em estudos histoquímicos em microscopia de luz comparando observações feitas nesta dimensão com outras obtidas em microscopia eletrônica de transmissão onde estruturas subcelulares foram comparadas com os grânulos PAS-positivos, sugerindo-se correspondência entre eles no trabalho citado. Para tanto, houve embasamento inclusive em trabalhos anteriores (Scott et al., 1963; Martan, 1969; Risley, 1970; Kopecny e Pech, 1977).

Apesar desta última consideração, transcorridos aproximadamente 15 anos do último relato (Vicentini e Orsi, 1989), a partir de outros relatos feitos com base em re-estudos da população celular do epitélio epididimário do rato albino e de outros mamíferos (Herme et al., 1994), os conceitos morfofuncionais para as células claras mudaram no sentido de caracterizá-las como elementos celulares voltados especificamente para processos de endocitose de fase fluida (pinocitose) e de endocitose adsorptiva (fagocitose), papéis funcionais com os quais se concorda neste trabalho, tendo em vista as observações ultra-estruturais aqui realizadas.

As células epiteliais da cauda do epidídimo do hamster dourado estavam firmemente unidas entre si, em seus pólos apicais, através de complexos juncionais de membrana típicos, apresentando entre si espaços intercelulares. Conhece-se que os elementos estruturais dos complexos juncionais propiciam forte aderência entre células adjacentes e servem de barreira de permeabilidade. Esta última função é atribuída principalmente às junções de oclusão, caracteristicamente presentes em epitélios que delimitam compartimentos que têm composição química distinta (Ross et al., 1993).

No epidídimo, os complexos juncionais de membrana têm a sua importância enfatizada por serem os sítios da barreira hemato-epididimária. A primeira evidência morfológica para a existência da barreira, mostrou a existência de extensas junções "tight" entre as células principais adjacentes do epidídimo de rato (Friend e Gilula, 1972). Posteriormente, foi demonstrado que nem os capilares nem as células mióides peritubulares eram eficazes em bloquear a passagem do marcador lantânio, enquanto que os complexos juncionais típicos foram efetivos em bloquear a passagem deste marcador (Hoffer e Hinton, 1984).

Várias evidências mostraram que a barreira hemato-epididimária, é estável e existe funcionalmente devido às grandes diferenças existentes na concentração de compostos orgânicos e inorgânicos entre o fluido luminal e o sangue (Robaire e Hermo, 1988). A estabilidade da barreira propicia a criação de um ambiente altamente definido, onde muitos íons e moléculas são seletivamente excluídos ou concentrados (Robaire e Hermo, 1988). Aparentemente, esta barreira se faz conspícua no ducto epididimal de hamster, mostrando-se fechada e funcionalmente eficaz em face da integridade e constância dos complexos juncionais dos plasmalemas das células epiteliais adjacentes.

Espaços intercelulares presentes entre as células epiteliais do epidídimo do hamster dourado mostraram-se característicos de epitélios ativamente envolvidos no transporte de líquidos, ou seja, no movimento de líquidos saindo do lúmen em direção ao tecido conjuntivo subjacente, passando através do epitélio. Assim, espaços intercelulares, similares a estes encontrados no epitélio epididimário do hamster dourado, foram observados no epitélio intestinal (Gonnella e Neutra, 1984; Ross et al., 1993), bem como em outros epitélios onde líquidos são transportados ativamente como no epidídimo (Robaire e Hermo, 1988). As células epiteliais intestinais, unidas por complexos juncionais que separam o lúmen intestinal do espaço intercelular, estão organizadas de forma a atuarem no transporte de líquidos. Entre as células intestinais, os espaços intercelulares muitas vezes estão dilatados, principalmente, durante o transporte de líquidos (Ross et al., 1993). Nos espaços intercelulares do epitélio intestinal, a presença de projeções da membrana plasmática

lateral, interdigitadas entre si, é um indício da ocorrência de processos de transporte de água e íons salinos (Junqueira e Carneiro, 2004).

As observações, realizadas neste trabalho, mostraram que espaços intercelulares, similares àqueles presentes entre as células epiteliais intestinais (Gonnella e Neutra, 1984; Junqueira e Carneiro, 2004), também ocorreram entre as células epiteliais adjacentes da cauda do epidídimo. Os espaços intercelulares na cauda do epidídimo estavam dilatados e à semelhança do que foi descrito para as células intestinais (Junqueira e Carneiro, 2004), também apresentaram projeções de membrana voltadas para os espaços intercelulares. A existência destes espaços no epitélio da cauda epididimal, permite sugerir que há passagem de água a partir do lúmen, através do epitélio da cauda do epidídimo, uma vez que na cauda epididimária a concentração de espermatozóides está grandemente aumentada.

O mecanismo responsável pela absorção de água no epidídimo de rato é a difusão passiva (Wong et al., 1978). Neste processo, o carreador para o transporte de água, na cauda do epidídimo, é o íon sódio (Wong et al., 1978). Os resultados obtidos a partir de estudos das concentrações de sódio, potássio, cloreto e fosfato presentes no fluido luminal do epidídimo de rato, mostraram que há decréscimo da concentração do íon sódio na cauda epididimal ao se comparar a concentração deste íon nos segmentos proximais epididimários (Robaire e Hermo, 1988). Esses dados reforçam a hipótese que o íon sódio, além de atuar como molécula direcionadora, é absorvido pelo epitélio epididimário (Wong et al., 1978). No intestino, a absorção de água envolve o transporte de sódio do lúmen intestinal para as células epiteliais e, posteriormente, para os espaços intercelulares. O aumento na concentração de sódio no espaço intercelular retira água da célula epitelial por osmose, e por sua vez, da luz intestinal (Ross et al., 1993). É possível que na cauda do epidídimo do hamster dourado, os espaços intercelulares dilatados ocorram devido à alta absorção de água carreada pelos íons sódio.

Os espaços intercelulares observados na cauda do epidídimo do hamster dourado são similares aos espaços observados em epitélios onde ocorre transcitose. Transcitose é o transporte de cargas macromoleculares de um lado a outro de uma célula, dentro de um carreador revestido por membrana (Tuma e Hubbard, 2003). Este processo é uma estratégia usada por organismos multicelulares para mover seletivamente material entre dois ambientes diferentes, enquanto mantém composições distintas entre estes ambientes (Tuma e Hubbard, 2003). Esse processo de transporte celular foi observado no epitélio da túnica coriódica, nas células epiteliais intestinais, em células epiteliais glandulares, em hepatócitos e nas células foliculares da glândula tireóide

(Herzog, 1983; Tuma e Hubbard, 2003), parecendo ocorrer também nas células epididimais conforme nossas observações.

Embora transcitose tenha sido descrita em células de vários epitélios, há poucos relatos na literatura sobre a ocorrência deste processo no epitélio do sistema de ductos excretórios do testículo. Entretanto, a ocorrência de transcitose foi relatada nas células epiteliais da rede testicular de rato (Morales et al., 1984) e nas células epiteliais do ducto deferente de rato (Hermo e De Melo, 1987). As evidências aqui apresentadas, sugerem que este processo também deve ocorrer nas células epiteliais da cauda do epidídimo do hamster dourado. Além dos espaços intercelulares, a ocorrência de elementos vesiculares em continuidade com as membranas plasmáticas laterais suportariam a presença de transcitose. Assim, observações similares a estas foram relatadas para as células epiteliais envolvidas em transcitose no ducto deferente do rato (Hermo e De Melo, 1987).

A natureza das vesículas envolvidas em transcitose nas células epiteliais da rede testicular não foi determinada (Morales et al., 1984). Em relação às células epiteliais do ducto deferente do rato, possivelmente o processo de transcitose era seletivo porque ferritina nativa não foi encontrada nas vesículas endocitóticas (Hermo e De Melo, 1987). Sugeriu-se que o epitélio do ducto deferente estaria envolvido no transporte de “ligantes” específicos do lúmen deferencial para o espaço do tecido conjuntivo subepitelial ou para os vasos sangüíneos (Hermo e De Melo, 1987), hipótese que deve ser considerada também para o epitélio epididimal do hamster dourado.

Referências

- Abe, K., Takano, H., 1988. Changes in distribution and staining reactivity of PAS-positive material in the mouse epididymal duct after efferent duct ligation. *Arch. Histol. Cytol.* 51, 433-441.
- Amann, R.P., 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency unilateral vasectomy and age on spermatogenesis. *Am. J. Anat.* 110, 49-67.
- Bedford, J.M., 1966. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. *J. Exp. Zool.* 163, 319-329.
- Beu, C.C.L., Orsi, A.M., Stefanini, M.A., Cruz, C., 2001. Morphological and morphometric characteristics of the epididymal initial segment of the Golden hamster. *Braz. J. Morphol. Sci.* 18, 133.

- Blandau, R.J., Rumery, R.E., 1964. The relationship of the swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity. *Fertil. Steril.* 15, 571-579.
- Cohen, J.P., Hoffer, A.P., Rosen, S., 1976. Carbonic anhydrase localization in the epididymis and testis of the rat: histochemical and biochemical analysis. *Biol. Reprod.* 14, 339-346.
- Dyson, A.L.M., Orgebin-Crist, M.C., 1973. Effects of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology* 93: 391-402.
- Flickinger, C.J., Howards, S.S., English, H.P., 1978. Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. *Am. J. Anat.* 15, 557-586.
- Fournier-Delpech, S., Colas, G., Courot, M., Ortavant, R., 1977. Observations on the motility and fertilizing ability of ram epididymal spermatozoa. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 17: 987-990.
- Friend, D.S., Gilula, N.B., 1972. Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J. Cell. Biol.* 53, 758-776.
- Gonnella, P.A., Neutra, M.K., 1984. Membrane-bound and fluid-phase macromolecules enter separate prelysosomal compartments in absorptive cells of suckling rat ileum. *J. Cell. Biol.* 99, 909-917.
- Goyal, H.O., 1985. Morphology of the bovine epididymis. *Am. J. Anat.* 172, 155-172.
- Hermo, L., Clermont, Y., Lalli, M., 1985. Intracellular pathways of endocytosed tracers in Leydig cells of the rat. *J. Androl.* 6, 231-224.
- Hermo, L., De Melo, V., 1987. The endocytic apparatus and transcytosis in epithelial cells of the vas deferens in the rat. *Anat. Rec.* 217, 153-163.
- Hermo, L., Oko, R., Morales, C.R. 1994. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract – a role in sperm maturation. *Int. Rev. Cytol.* 154, 105-189.
- Herzog, V., 1983. Transcytosis in thyroid follicle cells. *J. Cell. Biol.* 97, 607-617.
- Hib, J., Ponzio, R., Vilar, O., 1982. Contractility of the rat cauda epididymidis and vas deferens during seminal emission. *J. Reprod. Fertil.* 66, 47-50.
- Hoffer, A.P., Hinton, B.T., 1984. Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. *Biol. Reprod.* 30, 991-1004.
- Holtz, W., Smidt, D., 1976. The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 46, 227-229.
- Hoppe, P.C., 1975. Fertilizing ability of mouse sperm from different epididymal regions and after washing and centrifugation. *J. Exp. Zool.* 192, 219-222.

- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2004. Histologia básica. 10^a. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Kopečný, V., Pech V., 1977. An autoradiographic study of macromolecular synthesis in the epithelium of the ductus epididymis in the mouse. II. Incorporation of L-fucose-1³H. Histochemistry 50, 229-238.
- Martan, J., 1969. Epididymal histochemistry and physiology. Biol. Reprod. 1, 134-154.
- Morales, C., Hermo, L., Clermont, Y., 1984. Endocytosis in the epithelial cells lining the rete testis of the rat. Anat. Rec. 209, 185-195.
- Moore, H.D., Bedford, J.M., 1979a. Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. Anat. Rec. 193: 293-312.
- Moore, H.D., Bedford, J.M., 1979b. The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymis before and after castration. Anat. Rec. 193, 313-328.
- Orsi, A.M., Mello Dias, S., Valente, M.M., Vicentini, C.A., 1985. Histologia regional do epidídimo do porco (*Sus scrofa domestica*). Estudo de microscopia óptica. Rev. Port. Ciênc. Veter. 80, 215-224.
- Pavlok, A., 1974. Development of the penetration activity of mouse epididymal spermatozoa in vivo and in vitro. J. Reprod. Fertil. 36, 203-205.
- Ramos, A.S.J., Dym, M., 1977. Fine structure of the monkey epididymis. Am. J. Anat. 149, 501-532.
- Risley, P.L., 1970. Fluorescence of holocrine epithelial cells of the epididymis. Biol. Reprod. 3, 65-75.
- Robaire, B., Hermo, L., 1988. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation, in: Knobil, E., Neill, J. (Ed.) The Physiology of Reproduction, chapt 23. Raven Press, New York, pp. 999-1080.
- Ross, M.H., Reith, E.J., Romrell, L.J., 1993. Histologia: texto e atlas, 2^a. ed. Panamericana, São Paulo.
- Scott, T.W., Wales, R.G., Wallace, J.C., White, I.G., 1963. Composition of ram epididymal and testicular fluid and the biosynthesis of glycerilphosphorilcholine by the rabbit epididymis. J. Reprod. Fertil. 6, 49-59.
- Serre, V., Robaire, B., 1998. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. Biol. Reprod. 58 497-513.

- Setchell, B.P., Maddocks, S., Brooks, D.E., 1994. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract, in: Knobil, E., Neill, J.D. (Ed.) *The Physiology of Reproduction*, chapt. 18, 2nd ed. Raven Press, New York, pp. 1063–1175.
- Tuma, P.L., Hubbard, A.L., 2003. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol. Rev.* 83, 871-932.
- Vicentini, C.A., Orsi, A.M., 1989. Características citoquímicas e ultraestruturais do epitélio de revestimento na parte distal do epidídimo do hamster (*Mesocricetus auratus*). *Rev. Brasil. Biol.* 49, 291-301.
- Wong, P.Y.D., Au, C.L., Ngai, H.K., 1978. Electrolyte and water transport in rat epididymis; its possible role in sperm maturation. *Int. J. Androl.* 2, 608-628.

CONCLUSÕES GERAIS

- 1 – O progressivo aumento dos diâmetros tubular e luminal da cabeça para a cauda do epidídimo, sendo estes diâmetros marcadamente maiores na cauda em relação às outras regiões, corroboram a conclusão de que a cauda é efetivamente a região de estocagem dos espermatozóides em trânsito pelo epidídimo.
- 2 – A variação de altura do epitélio de revestimento do ducto epididimário nesta espécie com diminuição relativa da cabeça, nela incluso o segmento inicial, para a cauda epididimária ocorre como significado de uma compensação também relativa ao aumento progressivo do diâmetro luminal do segmento inicial para a cauda. O elevado valor de altura epitelial notada na porção proximal do epidídimo do hamster ademais poderia estar relacionado ao papel morfofuncional aí caracterizado, concernente principalmente à ocorrência de endocitose de fase fluida, tipicamente observada no segmento inicial.
- 3 – Existe uma proporção relativamente maior de células principais presentes na população celular do epitélio de revestimento do ducto epididimário do hamster dourado; há um relativo aumento do valor médio do número das células principais do segmento inicial para a cauda epididimária; um valor médio equilibrado, ou não muito diferente, de número das células basais nos quatro segmentos investigados; uma diminuição do valor médio numérico das células halo e das células delgadas entre o segmento inicial e o corpo epididimário; menor número relativo de células halo presentes no epitélio da cauda; ausência de células delgadas na população celular do epitélio da cauda e presença de células claras apenas no epitélio da cauda epididimária. O aumento da proporção das células principais e basais nos segmentos distais ocorre como compensação da diminuição da proporção dos demais tipos celulares.
- 4 – A aparência do conteúdo luminal do ducto epididimário do hamster dourado mostrou características diferentes ao longo de sua extensão, aparecendo freqüentemente vazio e com longos estereocílios projetados em seu interior no segmento inicial; moderadamente preenchido por espermatozóides e com estereocílios e esfoliações celulares no corpo, e repleto de espermatozóides e com estereocílios muito curtos observados na luz da cauda epididimária. Estas caracterizações depõem favoravelmente às características histofisiológicas das regiões tubulares, quanto ao trânsito rápido de espermatozóides observados nos segmentos proximais do ducto; trânsito mais

lento na parte média tubular visando o início do processo de habilitação dos espermatozóides predominantemente notado no corpo epididimário, e, enfim parada relativa do fluxo intraluminal do fluido seminal junto com os espermatozóides na região da cauda objetivando estocagem destas células.

5 – As características morfológicas das células principais do ducto epididimário do hamster, como a presença da zona de Golgi supranuclear, suporta a afirmação de que ocorre um processo secretório de proteínas com diminuição da secreção do segmento inicial para a cauda distal. Esta caracterização tem suporte nas análises bioquímicas do epidídimo de hamster em que a proporção relativa de proteínas totais apareceu menor na cauda epididimária desta espécie.

6 – As células basais, desprovidas de superfície luminal, foram observadas em todas as regiões tubulares epididimárias do hamster dourado, porém seu papel morfofuncional não pode ser esclarecido com base nas observações aqui realizadas. Células halo foram também notadas em todas as regiões epididimárias do hamster, concluindo-se que devem atuar como linfócitos intraepiteliais com base nas observações histológicas realizadas.

7 – Células delgadas, presentes em maior proporção relativa no segmento inicial, devem exercer elevada atividade metabólica. Assim, a sua ausência na cauda epididimária depõe a favor de ser a cauda uma região em que as atividades metabólicas diminuem em detrimento de ser um sítio “mais passivo” de estocagem dos espermatozóides.

8 - A despeito desta conclusão, por outro lado, a cauda epididimal do hamster mostrou elevada atividade bioquímica de fosfatase alcalina, levando à conclusão de que há alta atividade absorptiva no epitélio tubular desta região, bem como transferência ativa de andrógenos entre o interstício e o lúmen tubular epididimários.

9 – As células claras, presentes apenas no epitélio tubular da cauda epididimária, exercem predominante papel endocitótico, conclusão feita a partir de observações das características morfológicas destas células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSUM, D.J.; HUNTER, A.G. Regional histology and histochemistry of the ductus epididymis in the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Biol. Reprod.*, v. 19, p. 1063–1069, 1978.
- BENOIT, J. Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule, chez les mammifères. *Arch. Anat. Microsc.*, v. 5, p. 173–412, 1926.
- DYM, M.; ROMRELL, L.J. Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and Rhesus monkeys. *J. Reprod. Fertil.*, v. 42, p. 1-7, 1975.
- FLICKINGER, C.J.; HOWARDS, S.S.; ENGLISH, H.P. Synthesis and secretion of glycoprotein by epididymal epithelium. *J. Androl.*, v. 4, p. 157-161, 1983.
- FLICKINGER, C.J.; HOWARDS, S.S.; ENGLISH, H.P. Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. *Am. J. Anat.*, v. 15, p. 557-586, 1978.
- HAMILTON, D.W. Steroid function in the mammalian epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, v. 13, p. 89-97, 1971.
- HAMILTON, D.W. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis, and ductus deferens in the rat. In: GREEP, R.O.; ASTWOOD, E.B. (Eds). *Handbook of Physiology*. Sect. 7, Endocrinology. Washington: American Physiology Society, 1975. p. 259-301.
- HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C.R. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract – a role in sperm maturation. *Int. Rev. Cytol.*, v. 151, p. 105-189, 1994.
- HOFFER, A.P.; HAMILTON, D.W.; FAWCETT, D.W. The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. *Anat. Rec.*, v. 175, p. 169-202, 1973.

- HOLSTEIN, A.F. Morphologische studien am Nebenhoden des Menschen. *Zwanglose Abhandl. Gebiet Norm. Pathol. Anat.*, v. 20, p. 1-91, 1969.
- JOHNSON, A.L.; HOWARDS, S.S. Hiperosmolarity in intraluminal fluids from hamster testis and epididymis: a micropuncture study. *Science*, v. 195, p. 492-933, 1977.
- LAURENT, G. Recherches anatomiques et histo-physiologiques sur l'epididyme de Cobaye. II. Existence d'une zone lipidique constae et circonstric. *Arch. Biol.*, v. 44, p. 607-620, 1933.
- LIU, H.-W.; SHANG, S.-T.; CHAO, C.-F.; MULLER, C. The secretion of two sperm maturation-related glycoproteins in BALB/c mouse epididymis. *Cell Tissue Res.*, v. 265, p. 409-414, 1991.
- MARTINEZ-GARCÍA, F.; REGADERA, J.; COBO, P.; PALACIOS, J.; PANIAGUA, R.; NISTAL, M. The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia*, v. 27, p. 195-206, 1995.
- MONIEM, K.A.; GLOVER, T.D. Alkaline phosphatase in the cytoplasmatic droplet of mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v. 29, p. 65-69, 1972.
- NAGY, F.; PENDERGRASS, P.B.; SCOTT, J.N. Structural features of a specialized region of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *J. Submicrosc. Cytol.*, v. 14 (4), p. 673-682, 1982.
- NASHAN, D.; MALORNY, U.; SORG, C.; COOPER, T.; NIESCHLAG, E. Immunocompetent cells in the murine epididymis. *Int. J. Androl.*, v. 12, p. 85-94, 1989.
- NICANDER, L. On the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymis in rabbits. *Acta Morph. Neerscand.*, v. 1, p. 99-108, 1957.
- NICANDER, L. Studies on the regional histology and citochemistry of the ductus epididymis in rabbits. *Acta Morph. Neerscand.*, v. 1, p. 337-362, 1958.

NICANDER, L. An electron microscopical study of absorbing cells in the posterior caput epididymis of rabbits. *Zeitschrift Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, v. 66, p. 829-847, 1965

NICANDER, L.; GLOVER, T.D. Regional histology and fine structure of the epididymal duct in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Anat.*, v. 114, p. 347-364, 1973.

OLSON, G.E.; HINTON, B.T. Regional differences in luminal fluid polypeptides of the rat testis and epididymis revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Androl*, v.6, p.20-34, 1985.

REID, B.L.; CLELAND, K.W. The structure and function of the epididymis. I. The histology of the rat epididymis. *Austr. J. Zool.*, v. 5, p. 223-256, 1957.

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

SCOTT, T.W.; WALES, R.G.; WALLACE, J.C.; WHITE, I.G. Composition of ram epididymal and testicular fluid and the biosynthesis of glycerylphosphorylcholine by the rabbit epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, v. 6, p. 49-59, 1963.

SERRE, B.P.; ROBAIRE, B. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. *Biol. Reprod.*, v. 58, p. 497-513, 1998.

SETCHELL, B.P.; MADDOCKS, S.; BROOKS, D.E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds). *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1994. p. 1063-1175.

SUZUKI, F.; GLOVER, T.D. The effect of castration on the epididymal epithelium of the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Reprod. Fertil.*, v. 35, p. 584-585, 1973.

VICENTINI, C.A. *Contribuição ao estudo morfológico do epidídimo do hamster champanha (Mesocricetus auratus)*. I. Anatomia e histologia regional. 1985. 110p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

VICENTINI, C.A.; ORSI, A.M. Histologia regional do epidídimo no hamster variedade champanha (*Mesocricetus auratus*). *Rev. Brasil. Biol.*, v. 47, p. 277-281, 1987.

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

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

VITALE-CALPE, R.; AOKI, A. The hamster cauda epididymidis after coitus. *Acta Anat.*, v. 77, p. 98-108, 1970.

WANG, Y.P.; HOLSTEIN, A.F. Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human epididymis. *Cell Tissue Res.*, v. 233, p. 517-521, 1983.

WONG, P.Y.D.; CHAN, H.C.; LEUNG, P.S.; CHUNG, Y.W.; WONG, Y.L.; LEE, W.M.; NG, V.; DUN, N.J. Regulation of anion secretion by cyclooxygenase and prostanoïdes in cultured epididymal epithelia from the rat. *J. Physiol.*, v. 514, p. 809-820, 1999.