BÁRBARA DO CARMO SIMÕES DA SILVA

Estudo do metabolismo energético durante a maturação espermática em bovinos

São Paulo

2018

BÁRBARA DO CARMO SIMÕES DA SILVA

Estudo do metabolismo energético durante a maturação espermática em bovinos

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcilio Nichi

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2018

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3652
FMVZ

Silva, Bárbara do Carmo Simões da
Estudo do metabolismo energético durante a maturação espermática em bovinos /
Bárbara do Carmo Simões da Silva. – 2018.
87 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcilio Nichi.

1. Espermatozoides bovinos. 2. Maturação espermática. 3. Status oxidativo. 4. Status
metabólico. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo do metabolismo energético durante a maturação espermática em bovinos.", protocolada sob o CEUA nº 8285290216, sob a responsabilidade de **Marcílio Nichi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 18/05/2016.

We certify that the proposal "Study of energetic metabolism during sperm maturation in cattle.", utilizing 10 Bovines (10 males), protocol number CEUA 8285290216, under the responsibility of **Marcílio Nichi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/18/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [04/2016](#) a [02/2018](#)

Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Amostras biológicas estocadas](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [1 a 4 anos](#)

N: [10](#)

Linhagem: [SRD](#)

Peso: [300 a 500 kg](#)

Resumo: Evidências sugerem que, há cerca de dois bilhões de anos, algumas bactérias passaram a ser capazes de metabolizar o oxigênio, passando a se beneficiar de um mecanismo extremamente eficiente de produção de energia, a fosforilação oxidativa. Estas bactérias foram absorvidas por células eucariontes na qual a bactéria era protegida pela célula hospedeira e esta última era beneficiada pela energia produzida de forma mais eficiente. A partir desta relação simbiótica, seres mais complexos passaram a se desenvolver e esta bactéria passou a fazer parte das células destes organismos como organela, a mitocôndria. Tal mecanismo foi proposto por Lynn Margulis (1970), e as evidências, como a presença de ribossomos e DNA no interior das mitocôndrias, parece confirmar esta teoria. Além da produção de ATP, a mitocôndria tem uma série de importantes funções em células aeróbicas tais como a participação na homeostase de cálcio, na geração de espécies reativas de oxigênio, no mecanismo intrínseco da apoptose e na biossíntese de hormônio esteroides, entre outras. O espermatozoide, em particular, por ser uma célula aeróbica, possui em seu interior uma cadeia de mitocôndrias localizada na peça intermediária. Durante anos acreditou-se que sua função primordial seria a de fornecer ATP para a manutenção da motilidade espermática. No entanto, alguns estudos em humanos e camundongos verificaram que a glicólise teria um papel ainda mais importante que a fosforilação oxidativa para a manutenção da motilidade nestas espécies. Por outro lado, a mitocôndria é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio no espermatozoide, importantíssimas para diversos e importantes eventos fisiológicos quando em concentrações moderadas. No entanto, disfunções nesta organela possuem um papel fundamental no desequilíbrio oxidativo, afetando a função espermática. A maturação espermática é o processo em que o espermatozoide se torna capaz de realizar suas funções, ou seja, adquirir capacidade fecundante, através da reorganização da membrana e da aquisição da motilidade. Ao passo que as mudanças morfológicas estejam acontecendo durante esta etapa, paralelamente, acredita-se que também haja uma ativação progressiva da atividade mitocondrial durante a passagem das células espermáticas pelo epidídimo. De fato, alguns trabalhos observaram um aumento gradativo da atividade mitocondrial espermática durante a maturação espermática em cães, indicando um sistema de inibição fisiológica desta organela.

Local do experimento: Laboratório de Andrologia (Universidade de São Paulo - FMVZ)

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Bárbara do Carmo Simões

Título: **Estudo do metabolismo energético durante a maturação espermática em bovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, sem eles, nem aqui estaria.

Aos meus avós, meus ídolos e exemplos de vida.

Ao meu amor, Vitor, por acreditar em mim, me apoiar e abrir meus olhos quando foi preciso.

À Tetê, símbolo de renovação na minha vida.

À toda minha amada família.

AGRADECIMENTOS

“Sou muito grato às adversidades que apareceram na minha vida, pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades, eu jamais conheceria. ”

Napoleon Hill

Primeiramente, agradecer a Deus, pelas oportunidades e pelas adversidades. Por me abrir as portas por onde passei, por me permitir adquirir conhecimento e experiências com todas as pessoas com quem tive a oportunidade de conhecer e conviver.

Agradecer a minha família, Pai, Mãe, meus avós, Tetê, meus tios e primos, pelo apoio, incentivo e por compreender as minhas ausências quando foram necessárias. Amo vocês! Não seria nada sem vocês!

Agradecer ao Vitor, aquele que nunca me abandonou, sempre me apoiou e me incentivou, me ensinou e me mostrou um mundo muito maior do que eu conhecia. Sou muito grata e feliz por ter você em minha vida! Eu te amo!

Agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Marcilio Nichi, ou simplesmente Marcilio, por toda a orientação e por ter aberto as portas do Departamento de Reprodução de Reprodução Animal e do Laboratório de Andrologia para mim. Obrigada por confiar e acreditar em mim!

Gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório e departamento que participaram, de alguma maneira, da minha trajetória ao longo do mestrado: Giulia, Diego, Brunão, Nívea, Daniel, Luana, Jéssica, Marcel, Carol, Andressa, Gabriel, Bobbie, Rapha... O meu muito obrigada! Esse trabalho não existiria sem vocês!

Agradecer aos professores do VRA que também foram fundamentais durante esses anos, e me serviram e me servem de exemplo, para a vida: Prof. Mayra, Prof. Claudia, Prof. Camila, Prof. Mário Binelli, Prof. Ricardo, Prof. André, Prof. Carla, muito obrigada!

Agradecer ao laboratório BioSptz por todo suporte e apoio que me deram durante as análises no Citômetro de Fluxo e pelo material de matadouro. Sem isso, os experimentos não teriam acontecido. E gostaria de agradecer grandemente à Camilla, por toda parceria, paciência e análises. Muito, muito obrigada!

Agradecer ao Prof. Dr. Julio Ferreira por abrir as portas de seu laboratório para nós realizarmos as dosagens de ATP e análise de GADPH, e permitir que a sua doutoranda Kátia me ajudasse em cada etapa. Kátia, muito obrigada por sua gentileza e por sempre estar disposta em nos ajudar. Vocês foram fundamentais para a concretização deste projeto. Muito obrigada!

Gostaria de agradecer a Harumi, que sempre esteve à disposição para me ajudar e me orientar nas questões burocráticas do PPGRA, e pelos bate-papos e almoços. Obrigada por tudo, Harumi!

Agradecer a Roberta e a Loide também por sempre estarem à disposição para o que precisássemos.

Agradecer aos tratadores Irailton, Belau (*in memorian*) e Luis por sempre me ajudarem e me ensinarem a trabalhar com os animais. Ira, obrigada pelas nossas conversas.

Agradecer a todo o Programa de pós-graduação em Reprodução Animal.

Agradecer ao CNPq pelo auxílio financeiro.

“Jesus jamais dividiu pães e peixes. Se tivesse feito isso, jamais teria alimentado tantos. Ele ‘repartiu’, partilhou. O que se divide, acaba. O que se partilha, se multiplica. ”

Mário Sérgio Cortella

RESUMO

SILVA, B. C. S. **Estudo do metabolismo energético durante a maturação espermática em bovinos.** [Study of energetic metabolism during sperm maturation in cattle]. 2018. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A espermatogênese é um processo orquestrado e coordenado pelo qual os espermatozoides são produzidos. Ao final deste processo, o excesso de citoplasma presente nas espermátides é fagocitado, permanecendo um resíduo denominado de gota citoplasmática. Os espermatozoides em fase de maturação apresentam gota, que migra da região proximal para regiões mais distais da célula espermática. Estudos relacionam o remanescente citoplasmático à proteção antioxidante e à ativação metabólica de espermatozoides imaturos. Os mecanismos fisiológicos da maturação e os *status* oxidativo e metabólico em células epididimárias de bovinos são pobremente elucidados. Desta forma, foram realizados dois experimentos com o objetivo de caracterizar o *status* oxidativo e metabólico de espermatozoides bovinos durante a maturação espermática, e os possíveis papéis da gota citoplasmática envolvidas nesse processo. Para tal, amostras espermáticas foram recuperadas dos três segmentos epididimários (Cabeça, corpo e cauda) e submetidas às avaliações de cinética espermática (CASA) e testes morfofuncionais. Foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes SOD e GPx e mensurados os níveis de ATP em cada amostra epididimária. Espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo apresentaram maior porcentagem de células móveis e progressivas e elevados níveis de ATP em comparação aos demais grupos. As células provenientes do corpo apresentaram maior susceptibilidade à peroxidação lipídica e membranas plasmática e acrossomal lesionadas. Foi nesse segmento que também observamos a migração da gota e o início da aquisição da motilidade, e correlação negativa entre gota distal e susceptibilidade à peroxidação. Em amostras da cabeça, houve correlação positiva entre produção de EROs e níveis de ATP, e alto PMM; e correlação negativa entre atividade da SOD e susceptibilidade à peroxidação lipídica em amostras da cabeça. Não foram observadas diferenças significativas em relação ao potencial de membrana mitocondrial (PMM) e a atividade da SOD e da GPx entre os diferentes segmentos. Por meio dos principais resultados, pudemos sugerir que as células presentes na cauda do epidídimo apresentam o aparato energético ativo, devido à alta porcentagem de células móveis e níveis de ATP. As amostras provenientes do corpo evidenciam que é neste segmento em que a motilidade se inicia e que ocorre os principais remodelamentos de membrana. As correlações observadas nos permitem inferir que as mitocôndrias de

espermatozoides bovinos imaturos já estivessem ativas desde o início da maturação, produzindo energia e EROs. Além disso, a correlação nos mostra o papel protetor da SOD contra à peroxidação lipídica. Paralelamente, sugerimos que a gota participe firmemente da ativação da motilidade e desempenhe papel antioxidante contra as EROs. Assim, concluímos que as modificações celulares inerentes ao processo de maturação e a presença da gota citoplasmática sejam cruciais no *status* oxidativo e metabólico de espermatozoides bovinos imaturos, afim desenvolver a capacidade fecundante do espermatozoide.

Palavras-chave: Espermatozoides bovinos. Maturação espermática. Status oxidativo. Status Metabólico. Gota citoplasmática.

ABSTRACT

SILVA, B. C. S. **Study of energetic metabolism during sperm maturation in cattle.** [Estudo do metabolismo energético durante a maturação espermática em bovinos]. 2018. **87 f.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Spermatogenesis is an orchestrated and coordinated process by which sperm are produced. In the end of this process, the excess cytoplasm present in the spermatids is phagocytosed, remaining a called cytoplasmic droplet. Spermatozoa in the stage of maturation present cytoplasmic droplet, which migrates from the proximal region to more distal regions in sperm cell. Studies relate the cytoplasmic remnant to the antioxidant protection and to metabolic activation of immature sperma. The physiological mechanisms of maturation and the oxidative and metabolic status of bovine epididymal cells are poorly elucidated. Thus, two experiments aimed to characterize the oxidative and metabolic status of bovine sperm during epididymal maturation, and the possible cytoplasmic droplet roles involved in this process. For this, sperm samples were recovered from the three epididymal segments (Caput, corpus and cauda) and submitted to spermatoc kinetics analysis (CASA) and morphofunctional tests. The activities of the antioxidant enzymes SOD and GPx were evaluated and the levels of ATP in each epididymal sample. Sperm cells recovered from the cauda of the epididymis showed a higher percentage of motile and progressive cells and high levels of ATP compared to the other groups. Cells from the corpus showed elevated susceptibility to lipid peroxidation and lesioned plasma and acrosomal membranes. It was in this segment that we also observed the migration of cytoplasmic droplet and the beginning of the acquisition of motility, and negative correlation between distal droplet and susceptibility to peroxidation. In samples from the caput, there was a positive correlation between ROS production and ATP levels, and high PMM; and negative correlation between SOD activity and susceptibility to lipid peroxidation in caput samples. No significant differences were observed in relation to mitochondrial membrane potential (PMM) and SOD and GPx activity among the different segments. By means of the main results, we could suggest that cells present in the cauda of the epididymis present the active energy apparatus, due to the high percentage of mobile cells. Samples from the corpus show that is in this segment that the motility begins and the main membrane remodeling occurs. The observed correlations allow us to infer that mitochondria of immature bovine sperm are already active since the beginning of maturation, producing energy and ROS. In addition, the correlation

shows us the protective role of SOD against lipid peroxidation. In parallel, we suggest that cytoplasmic droplet participates firmly in the activation of motility and plays an antioxidant role against ROS. Thus, we conclude that the cellular modifications inherent in the sperm maturation process and the presence of cytoplasmic droplet are crucial in the oxidative and metabolic status of immature bovine spermatozoa, in order to develop fecundant capacity.

Key-words: Bovine sperm. Sperm maturation. Oxidative Status. Metabolic Status. Cytoplasmic droplet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental – São Paulo – 2018.....	32
Figura 2 - Atividade mitocondrial de amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018.....	40
Figura 3 - Susceptibilidade à Peroxidação Lipídica de amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018	41
Figura 4 - Potencial de Membrana Mitocondrial de amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018	42
Figura 5 - Delineamento Experimental – São Paulo – 2018	59
Figura 6 - <i>Status</i> oxidativo em amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018	68
Figura 7 - Potencial de Membrana Mitocondrial de amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018	69
Figura 8 - Atividade mitocondrial de amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018	70
Figura 9 - Níveis de ATP em amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros da cinética espermática de amostras provenientes dos diferentes segmentos do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) – São Paulo – 2018	38
Tabela 2 - Porcentagem de gota citoplasmática proximal e distal em amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018	39
Tabela 3 - Integridade das membranas acrossomal e permeabilidade da membrana plasmática em amostras da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018	39
Tabela 4 - Atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GPx) em amostras da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018	42
Tabela 5 - Parâmetros da cinética espermática de amostras da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018	65
Tabela 6 - Porcentagem de gota citoplasmática proximal e distal em amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018	66
Tabela 7 - Integridade das membranas acrossomal e plasmática de amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo – São Paulo – 2018	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 MATURAÇÃO ESPERMÁTICA.....	21
2.1.1 Secreção e Absorção Epididimal.....	21
2.1.2 Caracterização dos Espermatozoides Epididimários.....	22
2.1.3 <i>Status</i> metabólico e oxidativo durante a maturação espermática.....	23
2.2 GOTA CITOPLASMÁTICA.....	24
3 CAPÍTULO 2: PAPEL DA GOTA CITOPLASMÁTICA NO <i>STATUS</i> OXIDATIVO DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS EM MATURAÇÃO EPIDIDIMÁRIA	28
3.1 INTRODUÇÃO.....	31
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.2.1 Materiais.....	33
3.2.2 Delineamento Experimental.....	33
3.2.3 Métodos.....	33
3.2.3.1 Colheita dos espermatozoides epididimários.....	34
3.2.3.2 Avaliações espermáticas.....	34
3.2.3.2.1 Avaliação da cinética espermática (CASA).....	34
3.2.3.2.2 Integridade de membrana plasmática e presença de gota citoplasmática.....	35
3.2.3.2.3 Integridade acrossomal	35
3.2.3.2.4 Atividade mitocondrial.....	36
3.2.3.2.6 Avaliação da peroxidação lipídica	36
3.2.3.2.7 Avaliação da atividade enzimática de antioxidantes.....	37
3.2.3.2.7.1 Superóxido Dismutase (SOD).....	37
3.2.3.2.7.2 Glutathione Peroxidase (GSH – PX).....	38
3.2.4 Análise estatística.....	38
3.3 RESULTADOS.....	39
3.3.1 Cinética espermática.....	39
3.3.2 Presença de Gota Citoplasmática.....	40
3.3.3 Integridade de Acrossomo e Membrana Plasmática.....	40
3.3.4 Atividade Mitocondrial.....	40
3.3.5 Peroxidação lipídica.....	41
3.3.6 Potencial de membrana mitocondrial.....	42
3.3.7 Atividade das enzimas antioxidantes – SOD e GPx.....	43
3.4 DISCUSSÃO.....	44
3.5 CONCLUSÃO.....	48
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

4 CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DO STATUS METABÓLICO E O PAPEL DA GOTA CITOPLASMÁTICA DURANTE A MATURAÇÃO ESPERMÁTICA EM BOVINOS.....	54
4.1 INTRODUÇÃO	57
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.2.1 Materiais.....	59
4.2.2 Delineamento Experimental.....	59
4.2.3 Métodos.....	60
4.2.3.1 Colheita dos espermatozoides epididimários.....	60
4.2.3.2 Avaliações espermáticas.....	60
4.2.3.2.1 Avaliação da cinética espermática (CASA).....	60
4.2.3.2.2 Presença de gota citoplasmática.....	61
4.2.3.2.3 Citometria de Fluxo.....	61
4.2.3.2.3.1 Integridade de membrana plasmática e acrossomal.....	61
4.2.3.2.3.2 Suscetibilidade da cromatina à denaturação ácida.....	62
4.2.3.2.3.3 <i>Status</i> Oxidativo.....	62
4.2.3.2.3.4 Potencial da membrana mitocondrial.....	63
4.2.3.2.3.4 Atividade mitocondrial.....	63
4.2.3.2.3.5 Níveis de ATP.....	64
4.2.4 Análise estatística.....	64
4.3 RESULTADOS.....	65
4.3.1 Cinética espermática.....	65
4.3.2 Gotas citoplasmáticas proximais e distais.....	66
4.3.3 Integridade das membranas acrossomal e plasmática.....	66
4.3.4 Suscetibilidade da cromatina à denaturação ácida.....	67
4.3.5 Avaliação do <i>status</i> oxidativo.....	67
4.3.6 Potencial de membrana mitocondrial.....	68
4.3.7 Atividade Mitocondrial.....	70
4.3.8 Níveis de ATP.....	71
4.4 DISCUSSÃO.....	72
4.5 CONCLUSÃO.....	75
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
5 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

Os espermatozoides são produzidos por um processo coordenado e especializado denominado espermatogênese. As células da linhagem germinativa se diferenciam, por meio de divisões mitóticas e meióticas, dando origem à espermatogônias, espermatócitos (primários e secundários) e espermátides (Okabe, Ikawa, & Ashkenas, 1998). Ao final do processo, durante a espermiogênese, parte do citoplasma presente nas espermátides é fagocitado pelas células de Sertoli, gerando um corpo residual conhecido por gota citoplasmática (Cooper, 2005; Oko, Hermo, Chan, Fazel, & Bergeron, 1993). O citoplasma residual é observado em células espermáticas presentes no trato epididimário, onde acontece o processo de maturação espermática (Cooper & Yeung, 2003).

Ao longo da maturação, os espermatozoides transitam pelos segmentos do epidídimo (Cabeça, corpo e cauda), ocorrendo modificações estruturais e funcionais nos espermatozoides, como a ativação metabólica gradual, aquisição da motilidade e da capacidade fecundante (Cooper, 2011; Flesch & Gadella, 2000; Gibb & Aitken, 2016; Mukai & Okuno, 2004; Zhang & Lin, 2002). Paralelamente à maturação epididimária, ocorre o fenômeno de migração da gota citoplasmática da região proximal (gota citoplasmática proximal) para regiões mais distais da peça intermediária (gota citoplasmática distal) (Cooper & Yeung, 2003). Durante a maturação, o metabolismo energético de espermatozoides imaturos sofre mudanças relacionadas também à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ao *status* oxidativo (D. S. Angrimani et al., 2014), fazendo com que estas células sejam dependentes da ação de antioxidantes, como a Superóxido Dismutase (SOD) e a Glutathione Peroxidase (GPx).

O *status* oxidativo e metabólico de espermatozoides bovinos durante a maturação epididimária ainda é pouco elucidado. Os estudos em fisiologia da reprodução são essenciais para compreender mecanismos fisiológicos envolvidos, contribuindo para produção de novas biotecnologias e direcionando para tratamentos de patologias reprodutivas relacionadas às disfunções epididimárias (Ma et al., 2013; O'Rand, Hamil, Adevai, & Zelinski, 2018). A escolha de bovinos como modelo experimental está relacionada a sua grande importância zootécnica além de poder ser utilizado como modelo experimental para o estudo da fisiologia humana. Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar o *status* oxidativo e metabólico de espermatozoides bovinos e os papéis que a gota citoplasmática possa desempenhar durante a maturação espermática

Capítulo 1

2 CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

Embora as presentes pesquisas estejam relacionadas a fisiologia de touros, a revisão de literatura abrangendo diferentes modelos animais se faz necessária afim de apresentar as particularidades do processo de maturação espermática e gota citoplasmática.

2.1 MATURAÇÃO ESPERMÁTICA

A maturação espermática é o processo que engloba o trânsito de espermatozoides pelo epidídimo, as interações da célula com os componentes do fluido epididimário, promovendo modificações morfológicas e bioquímicas, resultando na aquisição da capacidade fecundante (Cooper & Yeung, 2003; Fernandez-Fuertes et al., 2016; Robaire & Viger, 1995).

O epidídimo é um tubo enovelado e dividido anatomicamente em três segmentos. O segmento inicial é chamado de cabeça do epidídimo, por onde os espermatozoides permanecem assim que saem do lúmen testicular. O segmento intermediário e alongado é chamado de corpo. O segmento distal em que os espermatozoides maduros permanecem até a ejaculação é denominado cauda (Fernandez-Fuertes et al., 2016; Sullivan & Mieusset, 2016). A interação entre hormônios esteroides, como 5α -diidrotestosterona (DHT) e 5α -androstene-3,17 β -diol (3 α -diol), fatores testiculares, e elementos como pressão osmótica, temperatura e pH pertinentes a cada segmento faz com que sejam ambientes fisiológicos únicos (Hinton, Lan, Rudolph, Labus, & Lye, 1998; Robaire & Viger, 1995).

A maturação espermática ocorre à medida que os espermatozoides imaturos migram da cabeça em direção à cauda do epidídimo. Este trânsito ocorre por meio de contrações do tecido epididimário, mediadas por prostaglandinas (Cosentino, Takihara, Burhop, & Cockett, 1984), sendo que o tempo que o espermatozoide imaturo leva para percorrer todo o epidídimo varia de 3 a 14 dias, dependendo da espécie (Cooper, 2011). Em bovinos, a passagem dos espermatozoides pelo canal epididimário leva de 8 a 12 dias (Rahman et al., 2011).

2.1.1 Secreção e Absorção Epididimal

O ambiente epididimário é fundamental para que a maturação ocorra normalmente. Estudos realizados por Girouard et al. (2011) e Sullivan et al. (2007) indicam a presença de

vesículas no epitélio do epidídimo chamadas de epididimossomos, que são responsáveis por secretar proteínas no lúmen do epidídimo que podem interagir com a superfície de células em maturação e modificar o próprio meio. Ademais, há secreção de proteínas específicas em cada segmento, afetando o processo de maturação de maneira direta ou indireta.

Já foram descritas inúmeras proteínas secretadas no lúmen epididimário, como a Clusterina (Glicoproteína sulfatada-2 - SGP-2) (Robaire & Viger, 1995), presente na cabeça do epidídimo de roedores e humanos, e a Glutathione S-Transferase (Robaire & Viger, 1995) presente em todo canal epididimário de mamíferos com componentes eletrofílicos, desempenhando papel protetor contra produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). No lúmen epididimário de bovinos foram encontradas as proteínas lipocalina 5 (LCN5), NADP⁺ dependente de prostaglandina desidrogenase (PTGDS), Glutathione Peroxidase tipo 5 (GPx 5), e clusterina (CLU) (Belleannee et al., 2011). A síntese e secreção, assim como a degradação e reabsorção de proteínas ocorrem constantemente ao longo do epidídimo. Entretanto, Belleannee et al. (2011) descreve a cabeça como segmento que secreta a maioria das proteínas envolvidas durante a maturação.

2.1.2 Caracterização dos Espermatozoides Epididimários

Em cada segmento do epidídimo, é possível notar diferenças no padrão de motilidade, atividade mitocondrial e remodelamento de membranas em espermatozoides imaturos (D. S. R. Angrimani et al., 2017; Schlegel et al., 1986). Estudos com espermatozoides caninos (D. S. R. Angrimani et al., 2017), humanos (Jow, Steckel, Schlegel, Magid, & Goldstein, 1993), roedores e primatas (Xu, Yuan, Zheng, & Yan, 2013) foram realizados afim de compreender e caracterizar as modificações que a célula espermática sofre durante o processo de maturação. Em bovinos tais modificações ainda são pouco elucidados.

Contudo, os espermatozoides são descritos de acordo com o segmento que foram recuperados. As células presentes na cabeça do epidídimo são imóveis, e sugerem que esteja ocorrendo o início das modificações da membrana, como adição de glicoproteínas e alteração do perfil lipídico da membrana plasmática (Cooper, 2011; Kobayashi, Miyazaki, Natori, & Nozawa, 1991; Rejraji et al., 2006). Supostamente, as mitocôndrias presentes na bainha mitocondrial estão inativas ou com baixa atividade mitocondrial (D. S. R. Angrimani et al., 2017). Em células presentes no corpo do epidídimo é possível observar a presença de poucas células com movimento vibratório, indicando que o metabolismo espermático esteja ativando de forma gradual, e sua consequência é a motilidade (Au et al., 2015). As modificações mais

expressivas das membranas plasmática e acrossomal estão ocorrendo neste segmento (D. S. R. Angrimani et al., 2017). E por fim, as células presentes na cauda do epidídimo já são funcionais, apresentando motilidade e atividade mitocondrial, e as modificações de membrana já concluídas (Chaveiro, Cerqueira, Silva, Franco, & Moreira da Silva, 2015; Cooper, 2011). A porção distal do epidídimo é descrita como local de armazenamento de espermatozoides maduros, uma vez este segmento está ligado diretamente ao ducto deferente (Sullivan & Mieusset, 2016).

Todas as modificações relatadas demonstram o preparo que está ocorrendo no espermatozoide, objetivando a aquisição de motilidade e produção de energia para alcançar o sítio de fertilização, e se ligar e degradar a zona pelúcida por meio dos remodelamentos de membrana plasmática e acrossomo (Aitken et al., 2007; Fernandez-Fuertes et al., 2016; Schlegel et al., 1986; Tulsiani, 2006).

2.1.3 Status metabólico e oxidativo durante a maturação espermática

Robaire e Viger (1995) descrevem duas principais fontes de EROs no trato reprodutivo masculino: leucócitos e espermatozoides imaturos. Os autores designam esta relação à célula epididimária devido a ativação do aparato energético e a aquisição da motilidade que ocorrem durante a maturação espermática. Paralelamente à ativação mitocondrial, há a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (D. S. R. Angrimani et al., 2017; de Lamirande, Jiang, Zini, Kodama, & Gagnon, 1997; Losano et al., 2017).

As EROs são formadas como subprodutos necessários durante, principalmente, as reações mitocondriais. Sob condições aeróbias, espermatozoides de mamíferos exibem uma grande capacidade de gerar EROs, tais como, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido ($\bullet O_2^-$) e o radical hidroxila ($OH\bullet$). Em condições fisiológicas, são fundamentais no processo de reação acrossomal, capacitação e hiperativação espermática (de Lamirande et al., 1997; Du Plessis, Agarwal, Halabi, & Tvrda, 2015; Goncalves, Barretto, Arruda, Perri, & Mingoti, 2010). No entanto, devido à sua natureza altamente reativa, as EROs podem se combinar com outras moléculas, causando a oxidação de componentes celulares e levando a alterações estruturais e funcionais que podem resultar em dano celular. As EROs, quando em desequilíbrio com os níveis de antioxidantes, levam ao estresse oxidativo, pondo a fertilidade masculina em risco (Aitken, Jones, & Robertson, 2012; Bansal & Bilaspuri, 2010).

Os antioxidantes são uma alternativa de combate ao estresse oxidativo. Estes debelam as EROs fazendo com que percam a sua capacidade citotóxica. Há dois tipos de antioxidantes,

e são: antioxidantes enzimáticos, como Superóxido dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx) e Catalase; e os não enzimáticos, como as vitaminas C e E (Bansal & Bilaspuri, 2010; Capucho et al., 2012; Vieira et al., 2018).

Estudos anteriores demonstram o importante papel das enzimas antioxidantes SOD e GPx durante a maturação espermática contra a produção das EROs (Alvarez, Touchstone, Blasco, & Storey, 1987; D. S. Angrimani et al., 2014; Nichi et al., 2007; Robaire & Viger, 1995). O mecanismo de ação da SOD é debelar o ânion superóxido, transformando-o em uma molécula de Oxigênio (O_2) e uma de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). Para que o peróxido de hidrogênio não seja tóxico para a célula, é necessário a ação da Catalase ou da Glutathione peroxidase, transformando-a em água e evitando a formação do radical Hidroxila, a ERO mais prejudicial ao espermatozoide (Nichi et al., 2007). Se esse sistema estiver em homeostase, não ocorrerá o estresse oxidativo.

Entretanto, os espermatozoides são células extremamente susceptíveis ao ataque das EROs, e a razão deste fato se dá em sua própria morfologia celular. Devido ao seu escasso citoplasma, a quantidade de antioxidantes intracelulares que combatem o estresse oxidativo é reduzida. Ainda, a membrana plasmática é rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), lipídios de cadeia insaturada. A presença de duplas ligações faz com que a molécula se torne mais susceptível ao ataque das EROs, quebrando as ligações e resultando na perda da fluidez da membrana (Alvarez et al., 1987; Nichi et al., 2007). Ao tratarmos de espermatozoides epididimários, estes não possuem a proteção de antioxidantes presentes no plasma seminal da mesma maneira que os espermatozoides no ejaculado, fazendo com que sejam alvos ainda mais expressivos do estresse oxidativo. Porém, espermatozoides imaturos podem contar com a proteção de antioxidantes presentes no fluido epididimário (D. S. Angrimani et al., 2014; Capucho et al., 2012; Robaire & Viger, 1995). Ademais, estudos recentes sugerem que há uma estrutura presente em células epididimárias que possa desempenhar o papel protetor contra o ataque das EROs. Essa estrutura é denominada de gota citoplasmática (D. S. Angrimani et al., 2014; Nichi et al., 2007).

2.2 GOTA CITOPLASMÁTICA

A gota citoplasmática é uma pequena bolsa (2 μm de diâmetro) localizada na região do colo de espermatozoides em fase de maturação epididimária (Hermo, Dworkin, & Oko, 1988). Descrita por Retzius (1909), esse remanescente citoplasmático é formado ao final da espermatogênese, na fase de espermiogênese, por meio da fagocitose realizada pelas células de

Sertoli, com a função de retirar o excesso de citoplasma proveniente de uma célula circular, para dar origem a uma célula especializada, quiescente, e transcripcionalmente e traducionalmente silenciada (Hermo et al., 1988).

À medida que o espermatozoide percorre o canal epididimário, ocorre a migração da gota citoplasmática pela peça intermediária, da região do colo até a junção entre a peça e o flagelo (Hermo et al., 1988). A gota citoplasmática localizada no colo é denominada de gota proximal, enquanto a gota localizada na porção distal da peça intermediária é chamada de gota distal (Cooper & Yeung, 2003). O mecanismo de como a migração da gota ocorre ainda não foi completamente elucidado (Cooper, 2011). Além disso, a composição interna da gota e suas principais funções ainda são pouco compreendidos.

Estudo realizado por Oko et al. (1993), utilizando espermatozoides de roedores, avaliou a composição interna da gota citoplasmática. Por microscopia eletrônica, Oko et al. observaram a presença de cisternas achatadas e vesículas de diversos tamanhos concentradas em um polo da gota. As cisternas são derivadas da fragmentação e desempacotamento do Complexo de Golgi de espermátides, estágio celular que passou por espermiogênese. O Complexo de Golgi é ausente em espermatozoides maduros e tem a função de armazenar, modificar, empacotar e secretar substâncias, como proteínas e enzimas. Tal resultado sugere que as funções do complexo podem ter sido atribuídas à gota citoplasmática, principalmente, em secretar substâncias que atuam durante o processo de maturação espermática.

Contudo, estudos sugerem inúmeros papéis pertencentes à funcionalidade da gota citoplasmática em eventos ocorridos durante a maturação espermática, como a ativação metabólica, aquisição da motilidade, e exerça papel antioxidante (D. S. Angrimani et al., 2014; D. S. R. Angrimani et al., 2017; Au et al., 2015; Cooper, 2011; Nichi et al., 2007).

Angrimani e colaboradores (2017) analisaram espermatozoides caninos durante a maturação epididimária. Recuperaram amostras da cabeça, corpo e cauda do epidídimo e analisaram a porcentagem de gotas citoplasmáticas proximais e distais, aquisição da motilidade e ativação mitocondrial. Os autores observaram que amostras da cabeça do epidídimo apresentaram maior porcentagem de gotas proximais em relação aos demais segmentos. Já amostras provenientes do corpo e da cauda apresentaram maior porcentagem de gotas distais. Além disso, observaram um aumento na porcentagem de células móveis em amostras do corpo do epidídimo, juntamente com o aumento da atividade mitocondrial. Os pesquisadores sugeriram que a aquisição da motilidade e ativação mitocondrial ocorreram no corpo do epidídimo, paralelamente à migração da gota citoplasmática, sugerindo que houve participação do remanescente citoplasmático na ativação metabólica de espermatozoides imaturos de cães.

Além de relacionar a migração da gota citoplasmática com a ativação mitocondrial, é possível que a gota estimule a motilidade através da glicólise. Yuan et al. (2013) descreveu a presença de enzimas glicolíticas no interior da gota, assim como Garbers et al. (1970) e Oko et al. (1993) descreveram a presença de hidrolases lisossomais e enzimas participantes da via glicolítica, como a lactato desidrogenase. Esses resultados podem sugerir a regulação da motilidade também por meio da glicólise, e não somente por ativação mitocondrial.

O possível papel antioxidante da gota citoplasmática foi discutido por Angrimani e colaboradores (2014). Foram recuperados espermatozoides caninos provenientes dos três segmentos epididimários (Cabeça, corpo e cauda) e avaliados quanto a atividade de enzimas antioxidantes SOD e GPx. Os pesquisadores verificaram o mesmo nível de atividade enzimática em todos os segmentos epididimários, e ainda, correlação positiva entre atividade SOD e gota distal em amostras da cabeça. Os resultados sugeriram que, por não haver variação na atividade dos antioxidantes, as enzimas são recrutadas constantemente durante todo processo de maturação. A correlação positiva observada pode estar relacionada ao papel protetor que a gota citoplasmática possui.

Ademais, Nichi et al. (2007) avaliaram espermatozoides bovinos provenientes da cauda de epidídimo quanto à porcentagem de gotas citoplasmáticas e susceptibilidade à peroxidação lipídica. Assim, observaram correlação negativa entre gota distal e susceptibilidade à peroxidação lipídica. Esse resultado sugeriu que a gota distal desempenhe um papel protetor contra o ataque de EROs em espermatozoides imaturos, reforçando a teoria de que a gota desempenhe um papel antioxidante ao longo da maturação espermáticas.

Nesse sentido, estudos mais aprofundados devem ser realizados afim de elucidar os mecanismos fisiológicos envolvidos durante a maturação espermática e os papéis da gota citoplasmática ao longo do canal epididimário. Ainda, estudos em fisiologia da reprodução podem contribuir para o desenvolvimento de novas biotecnologias (O'Rand, Hamil, Adevai, & Zelinski, 2018).

Capítulo 2

3 CAPÍTULO 2: PAPEL DA GOTA CITOPLASMÁTICA NO *STATUS* OXIDATIVO DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS EM MATURAÇÃO EPIDIDIMÁRIA

RESUMO

A maturação espermática, evento fisiológico que ocorre no epidídimo, é um processo importante para que o espermatozoide adquira capacidade fecundante. Neste processo, ocorre a migração da gota citoplasmática de uma posição proximal para a distal. Estudos sugerem a participação deste remanescente citoplasmático durante o processo e ainda, que esteja envolvido no *status* oxidativo de células epididimárias. Pouco se sabe sobre o papel da gota citoplasmática e o *status* oxidativo durante a maturação espermática em espermatozoides bovinos. Deste modo, objetivamos caracterizar o status oxidativo de espermatozoides bovinos durante a maturação espermática e o papel da gota citoplasmática neste processo. Para tal, amostras espermáticas (N= 11 testículos) foram recuperadas dos três segmentos epididimários (Cabeça, corpo e cauda) e submetidas às avaliações de cinética espermática (CASA), presença de gota citoplasmática (Eosina/Nigrosina), integridade acrossomal (Fast Green/Rosa Bengala), integridade de membrana plasmática (Eosina/Nigrosina), atividade mitocondrial (DAB), susceptibilidade a peroxidação lipídica (TBARS), ao potencial de membrana mitocondrial (JC-1) e à atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GPx). Amostras provenientes da cauda do epidídimo apresentaram maior porcentagem de células móveis e progressivas, integridade de acrossomo, membrana plasmática impermeável, e células com alta atividade mitocondrial. Amostras do corpo apresentaram maior susceptibilidade à peroxidação lipídica. Espermatozoides recuperados da cabeça apresentam maior porcentagem de gotas proximais, oposto ao observado em células do corpo e da cauda, que apresentaram maior porcentagem de gotas distais. Não foram observadas diferenças significativas em relação à alto potencial de membrana mitocondrial (PMM) e atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPX. Em amostras da cabeça, houve correlação positiva entre alto PMM e alta atividade mitocondrial, e negativa entre atividade da SOD e susceptibilidade à peroxidação. Em amostras do corpo, observamos correlação positiva entre gota distal e alto PMM, e negativa entre gota distal e susceptibilidade à peroxidação. Em amostras da cauda, houve tendência à correlação positiva entre gota distal e alta atividade mitocondrial, e correlação negativa entre gota distal e porcentagem de células móveis. Sugerimos que a gota citoplasmática exerça papel antioxidante e esteja envolvido na aquisição da motilidade e ativação mitocondrial durante a maturação espermática. Além disso, as

concentrações de SOD e GPx não apresentarem diferença nos indica que possa haver um expressivo recrutamento de antioxidantes durante todo processo. A maior susceptibilidade à peroxidação lipídica pelos espermatozoides do corpo evidencia a intensa remodelação de membrana inerente ao processo de maturação, e hipotetizamos que a migração da gota influencie a maior susceptibilidade à peroxidação apresentada. Assim, concluímos que a gota citoplasmática seja essencial ao *status* oxidativo de espermatozoides imaturos, e que as enzimas antioxidantes SOD e GPx sejam fundamentais e recrutadas durante toda maturação espermática em bovinos.

Palavras-chave: Status oxidativo. Maturação espermática. Gota citoplasmática. Antioxidantes. Bovino.

3.1 INTRODUÇÃO

Durante a espermiogênese, parte do citoplasma presente no espermatozoide é fagocitado pelas células de Sertoli, gerando um corpo residual conhecido por gota citoplasmática (Cooper, 2005; Oko, Hermo, Chan, Fazel, & Bergeron, 1993). Descrito por Retzius (1909), a gota citoplasmática é observada em células espermáticas presentes no trato epididimário, onde acontece o processo de maturação espermática (Cooper & Yeung, 2003).

Ao longo da maturação espermática, ocorrem modificações estruturais e aquisição de motilidade à medida que espermatozoides imaturos passam pelos segmentos do epidídimo (Cabeça, corpo e cauda) (Fernandez-Fuertes et al., 2016; Robaire & Viger, 1995). No decorrer do trânsito epididimário, ocorre o fenômeno no qual a gota citoplasmática migra da região proximal para regiões distais da peça intermediária (Cooper & Yeung, 2003). Trabalhos relacionam a migração da gota citoplasmática com aumento da atividade mitocondrial, ganho de motilidade e papel antioxidante contra estresse oxidativo (D. S. Angrimani et al., 2014; D. S. R. Angrimani et al., 2017; Nichi et al., 2007; Yuan, Zheng, Zheng, & Yan, 2013).

Durante a maturação, o metabolismo energético de espermatozoides imaturos sofre mudanças relacionadas também à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ao status oxidativo (D. S. Angrimani et al., 2014). Espermatozoides epididimários se tornam mais susceptíveis à ação das EROs devido a alterações bioquímicas e morfológicas inerentes ao processo de maturação (Irvine et al., 2000). Células espermáticas do epidídimo ainda não entraram em contato com o plasma seminal proveniente das glândulas anexas, que é rico em antioxidantes. Assim, não possuem a proteção que espermatozoides presentes no ejaculado possuem (Bansal & Bilaspuri, 2010; Kim & Parthasarathy, 1998). Além disso, pouca quantidade de citoplasma presente na célula faz com que a concentração de antioxidantes intracelulares seja reduzida. Outro ponto importante é a presença de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) em grande quantidade na membrana plasmática do espermatozoide o que aumenta a susceptibilidade à peroxidação lipídica (Nichi et al., 2007; Vieira et al., 2018). Entretanto, as EROs, em baixas concentrações, são essenciais na homeostase espermática, reação acrossomal, hiperativação, capacitação espermática e interação espermatozoide-oócito (de Lamirande, Jiang, Zini, Kodama, & Gagnon, 1997; Du Plessis, Agarwal, Halabi, & Tvrda, 2015; Goncalves, Barretto, Arruda, Perri, & Mingoti, 2010). Quando ocorre um desequilíbrio entre os níveis de EROs e antioxidantes, ocorre um quadro conhecido como estresse oxidativo (Aitken, Jones, & Robertson, 2012; Bansal & Bilaspuri, 2010).

Ademais, espermatozoides imaturos também dependem de antioxidantes presentes no fluido epididimário para manter a homeostase oxidativa (Capucho et al., 2012). As enzimas antioxidantes SOD e GPx participam da maturação espermática, garantindo a motilidade espermática, integridade de membranas, integridade de DNA e atuando contra a peroxidação lipídica (Alvarez, Touchstone, Blasco, & Storey, 1987; Capucho et al., 2012). Contudo, a SOD e a GPx também desempenham a função de corrigir danos causados pelo estresse oxidativo. Angrimani e colaboradores (2014) sugeriram que as enzimas antioxidantes atuam em todo o processo de maturação e que há um consumo constante de SOD e GPx ao longo dos segmentos epididimários.

Além do papel que a gota citoplasmática possa desempenhar na ativação do metabolismo energético do espermatozoide, estudos sugerem que a gota também possa exercer papel antioxidante, promovendo a homeostase espermática durante a maturação espermática (D. S. Angrimani et al., 2014; Nichi et al., 2007). Nichi et al. (2007), utilizando espermatozoides epididimários bovinos como modelo, apontou o papel protetor contra os ataques das EROs à gota citoplasmática distal na cauda do epidídimo, devido à presença de antioxidantes no resíduo citoplasmático.

O status oxidativo de espermatozoides bovino durante a maturação epididimária ainda é pouco elucidado. Os estudos em fisiologia da reprodução são fundamentais para compreender mecanismos fisiológicos pouco esclarecidos, podendo contribuir para produção de novas biotecnologias (Ma et al., 2013; O'Rand, Hamil, Adevai, & Zelinski, 2018). Além disso, o conhecimento da fisiologia da maturação espermática pode direcionar tratamentos para patologias reprodutivas relacionadas às disfunções epididimárias (Fernandez-Fuertes et al., 2016). A escolha de bovinos como modelo experimental está relacionada a sua grande importância zootécnica além de poder ser utilizado como modelo experimental para o estudo da fisiologia humana. Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar o status oxidativo de espermatozoides bovinos durante a maturação espermática.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes éticas para experimentos com animais e aprovado pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) sob protocolo número 8285290216. A menos que indicado de outra forma, os reagentes utilizados nas análises espermáticas foram adquiridos da empresa Sigma Chemical® (St. Louis, MO, USA).

3.2.2 Delineamento Experimental

A colheita das amostras e as análises seminais foram realizadas no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Foram coletadas amostras da cabeça, do corpo e da cauda de epidídimos de touros (N= 11 testículos) sexualmente maduros, provenientes de abatedouro comercial.

Figura 1: Delineamento experimental. Amostras espermáticas coletadas dos três segmentos do epidídimo (Cabeça, corpo e cauda) de testículos de touros provenientes de abatedouro. As amostras foram avaliadas quanto à cinética espermática, à presença de gota citoplasmática; à integridade acrossomal, à integridade de membrana plasmática, à atividade mitocondrial, à susceptibilidade a peroxidação lipídica, ao potencial de membrana mitocondrial e à atividade das enzimas antioxidantes.

3.2.3 Métodos

3.2.3.1 Colheita dos espermatozoides epididimários

Logo após o abate, os conjuntos testículo-epidídimo foram coletados e armazenados a 4°C em recipiente térmico para serem transportados até o laboratório.

Amostras das regiões da cabeça, corpo e cauda do epidídimo foram coletadas pelo método de fatiamento, como descrito por Nichi e colaboradores (2007). Nesta técnica, cada segmento epididimário foi limitado com o auxílio de uma pinça hemostática para proporcionar uma pressão interna local e uma maior fluidez da amostra durante a coleta. Em seguida, com lâmina de bisturi, foram realizadas incisões de, aproximadamente, 2 mm, evitando regiões irrigadas e, conseqüentemente, a contaminação por sangue. Por fim, as amostras foram recuperadas com o auxílio de pipeta automática e diluídas em 1 mL de Tampão Fosfato-Salino (PBS-Phosphate Buffer Saline; pH= 7,4; 0,01M) à temperatura ambiente.

3.2.3.2 Avaliações espermáticas

Após a coleta, as amostras foram avaliadas quanto à cinética espermática, testes morfofuncionais de integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial. Posteriormente, as amostras também foram avaliadas quanto à presença de gota citoplasmática, atividade mitocondrial, susceptibilidade à peroxidação lipídica e quanto a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx.

3.2.3.2.1 Avaliação da cinética espermática (CASA)

A avaliação da cinética espermática foi realizada pelo sistema computadorizado de análise espermática (CASA - *Computer Assisted Sperm Analysis*; Hamilton Thorne IVOS 12.3, USA) logo após a coleta das amostras. Para tal, uma alíquota das amostras de cada segmento epididimário foi pipetada em lâmina pré-aquecida, coberta com lamínula. As configurações utilizadas foram 30 quadros a uma taxa de 60 quadros/s, e o número de células avaliadas foi de, aproximadamente, 1000 células por lâmina. Foram analisados parâmetros de motilidade espermática total (Motilidade, %), motilidade espermática progressiva

(Movimento progressivo, %), velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade retilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do movimento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), retilinearidade ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP}$, %), e linearidade ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$, %). Adicionalmente, os espermatozoides foram divididos em 4 grupos, baseando-se nas velocidades: Rápidos (RAPID; $\text{VAP} > 50 \mu\text{m/s}$; %), Médios (MEDIUM; $30 \mu\text{m/s} < \text{VAP} < 50 \mu\text{m/s}$; %), lentos (SLOW; $\text{VAP} < 30 \mu\text{m/s}$ ou $\text{VSL} < 15 \mu\text{m/s}$; %) e espermatozoides imóveis (STATIC; %).

3.2.3.2.2 Integridade de membrana plasmática e presença de gota citoplasmática

Para avaliar a integridade da membrana plasmática e a presença de gota citoplasmática proximal e distal foi utilizada a coloração Eosina/Nigrosina. Nesta técnica, os espermatozoides com lesões ou alterações de permeabilidade de membrana são corados em rosa, indicando a entrada do corante na célula através da membrana, enquanto os espermatozoides íntegros são visualizados em branco ao contrastar com a coloração de fundo da Nigrosina (BARTH, 1989). A técnica consiste em adicionar uma alíquota de $5\mu\text{L}$ do corante a $5\mu\text{L}$ de amostra sobre lâmina pré-aquecida de microscopia para realizar o esfregaço, incubando por 30 segundos. As lâminas foram analisadas em microscópio convencional em magnificação de 1000x sob óleo de imersão. Foram contadas 100 células por amostra e classificadas em íntegras e lesionadas. O resultado foi expresso em porcentagem de células com membrana íntegra.

3.2.3.2.3 Integridade acrossomal

A integridade acrossomal foi avaliada utilizando a coloração *Fast Green* - Rosa Bengala, na qual o acrossomo íntegro é corado em roxo, mais escuro que a região pós-acrossomal, enquanto o acrossomo lesionado apresenta coloração rósea, mais clara que a região pós acrossomal (POPE, 1991). Para a realização da técnica, uma alíquota de $5\mu\text{L}$ de corante é adicionada a $5\mu\text{L}$ de amostra sobre lâmina de microscopia pré-aquecida, incubando por 60 segundos, e então, feito um esfregaço. As lâminas foram analisadas em microscópio convencional em magnificação de 1000x sob óleo de imersão. Foram contadas 100 células por amostra e classificadas em íntegras e lesionadas. O resultado foi expresso em porcentagem de células com acrossomo íntegro.

3.2.3.2.4 Atividade mitocondrial

A avaliação da atividade mitocondrial foi realizada pela técnica citoquímica que utiliza o reagente 3'3 Diaminobenzidina (Ensaio DAB), o qual é oxidado pela enzima Citocromo C-Oxidase e forma um complexo de coloração marrom que se deposita em mitocôndrias ativas (HRUDKA, 1987). Para tal, uma alíquota de 20µL da amostra foi incubada com 20µL de 3'3 Diaminobenzidina em um tubo de microcentrífuga âmbar durante 1 hora em banho-seco a 37°C. Após a incubação, a mistura foi depositada em lâminas de microscopia em local protegido da luz. As lâminas foram fixadas em formaldeído 10% por 10 minutos e secas no ar ao abrigo da luz. A leitura das lâminas foi realizada em microscopia com contraste de fase em magnificação de 1000x sob óleo de imersão, onde foram contadas 100 células. A atividade mitocondrial foi classificada em 4 classes de acordo com a porcentagem de mitocôndrias coradas em marrom, ou seja, ativas: alta atividade mitocondrial (Classe I – 100% da peça intermediária corada média (Classe II – até 50% da peça intermediária corada), baixa (Classe III – menos de 50% da peça intermediária corada) e ausência de atividade mitocondrial (Classe IV – Peça intermediária sem coloração).

3.2.3.2.5 Avaliação da Susceptibilidade à Peroxidação lipídica

A avaliação da susceptibilidade a peroxidação lipídica foi realizada pelo Ensaio TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – Ensaio TBARS), desenvolvido por Ohkawa et al. (1979) por meio da indução da peroxidação lipídica. A lipoperoxidação foi induzida pela incubação de 200µL de amostra com 50µL de ácido ascórbico (20mM) e sulfato de ferro (4mM) em tubo de microcentrífuga com tampa aberta, em banho-seco a 37°C, durante 90 minutos. Após a indução, foram adicionados 600µL de ácido tricloroacético 10% (TCA, 10%) à 5°C. As amostras foram centrifugadas na capacidade máxima de rotação da centrífuga (20800 xg) durante 15 minutos a 5 °C para precipitação de proteínas e debris. Alíquotas de 800µL de sobrenadante foram recuperadas e transferidas para criotubos, nos quais 800µL de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA, 1%) foram adicionados. Os tubos foram submetidos à 95°C em banho-maria durante 15 minutos para promover a reação entre as moléculas de malondialdeído (MDA; principal produto da peroxidação lipídica) e TBA, sendo em seguida imersos em gelo para interromper a reação. Após a indução da peroxidação lipídica da membrana espermática, ocorre a formação do malondialdeído, que ao reagir com o TBA produz uma solução de

coloração rósea. A coloração resultante foi quantificada em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 PRO®, Amersham Biosciences, EUA) com comprimento de onda de 532 nanômetros. A avaliação da susceptibilidade a peroxidação lipídica está expressa em nanogramas de TBARS/ 10^6 espermatozoides (OHKAWA, 1979).

3.2.3.2.6 Potencial de membrana mitocondrial

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi utilizada a sonda fluorescente JC-1 (iodeto de 5,5',6,6' – tetracloro - 1,1,3,3' – tetraetilbenzimidazolilcarbocianina, 5mg/mL, Invitrogen), utilizando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System (Guava Technologies) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, seguindo a metodologia descrita por Hamilton e colaboradores (2016). Para tal, 187.500 espermatozoides foram diluídos em 12,5µL de meio TALP, foi adicionado 0,5µL da sonda fluorescente JC-1 (76,5 µM) e incubados a 37°C durante 5 minutos. Nesta técnica, as membranas mitocondriais com alto potencial emitem fluorescência amarela em alta intensidade (Hamilton et al., 2016). As amostras foram classificadas em porcentagens de espermatozoides com alto, intermediário e baixo potencial de membrana mitocondrial. Para a leitura, foram excitadas a 488nm e detectadas a 590nm. Todos os resultados foram analisados utilizando o software FlowJo versão 8.7 (Ashland, OR, USA).

3.2.3.2.7 Avaliação da atividade enzimática de antioxidantes

A atividade enzimática foi determinada pela mensuração das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GSH-PX) por espectrofotometria (Ultrospec 3300 PRO®, Amersham Biosciences, EUA).

3.2.3.2.7.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi mensurada indiretamente através da redução do Citocromo C pelo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), utilizando o protocolo descrito em (Nichi et al., 2006). O sistema xantina-xantina oxidase é gerado constantemente pelo $O_2^{\cdot-}$, que reduz o citocromo C. A SOD presente nas amostras compete com citocromo C, convertendo o radical livre superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), e assim, diminuindo a taxa de redução

do citocromo C. A avaliação da atividade da enzima antioxidante SOD nas amostras epididimárias foi descrita por Nichi e seus colaboradores (2006). A concentração de xantina oxidase foi calculada para gerar a máxima quantidade de O^{2-} com a consequente redução do citocromo C, que foi calculado utilizando a taxa de redução de 0,025 unidades de absorbância por minuto. A base para esse cálculo foi de 1 unidade da atividade total da SOD correspondendo à 50% deste valor. Portanto, a atividade da SOD na amostra diminuiu a taxa de redução do citocromo C quando comparado a amostra branca. A atividade da SOD foi quantificada em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 PRO®, Amersham Biosciences, EUA) com comprimento de onda de 550 nanômetros, à 25° C.

3.2.3.2.7.2 Glutathione Peroxidase (GSH – PX)

A determinação da atividade enzimática da GSH-PX foi feita através de uma modificação do método de Beutler (Beutler, 1975). Esse método é baseado na mensuração do consumo de NADPH. A reação entre hidroperóxido e glutathione reduzida, catalisada pela GSH-PX e pela enzima Glutathione Redutase (GSSGR), foi induzida. Essa reação resulta na conversão da Glutathione Dissulfídica (GSSH – Glutathione oxidada) em GSH, que consome o NADPH.

A amostra submetida à avaliação da atividade da enzima antioxidante GSH-PX seguiu a metodologia descrita por Nichi et al. (2007). O consumo de NADPH foi detectado em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 PRO®, Amersham Biosciences, EUA) com comprimento de onda de 340 nanômetros, por 10 minutos à 37° C (Mensurações feitas a cada 5 segundos). Os resultados de GSH-PX foram expressos em unidade de GSH-PX/mL de amostra, e calculados utilizando 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹, como coeficiente de extinção do NADPH.

3.2.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo programa SAS System for Windows 9.3 (SAS, 2000). Os dados foram testados para normalidade dos resíduos (Distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias utilizando o aplicativo *Guided Data Analysis*. Transformações foram feitas quando necessárias. Os diferentes segmentos epididimários (Cabeça, corpo e cauda) foram comparados por meio da análise One Way ANOVA utilizando o teste LSD (*Least Significant Difference for multiple comparisons*). Foram feitas análises de correlação em cada segmento. Para variáveis paramétricas, foi utilizado o teste de Person, e para variáveis não paramétricas, foi utilizado o teste de Spearman. Foi considerado um valor de probabilidade de $P < 0.05$ para determinar resultados estatisticamente relevantes. Os resultados foram descritos por médias $\pm$ erro padrão não transformados.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Cinética espermática

Os espermatozoides recuperados da região da cauda do epidídimo apresentaram maior porcentagem de células móveis e progressivas em comparação às células provenientes da cabeça e corpo do epidídimo. Além disso, os espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo apresentaram maiores valores para Velocidade média de percurso (VAP), Velocidade retilínea (VSL), Velocidade curvilínea (VCL) e amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento cruzado (BCF), quando comparadas aos demais segmentos (Tabela 1). Ademais, o mesmo padrão foi observado para as velocidades espermáticas (rápidos, médios e lentos, Tabela 1). Por fim, não foi possível observar diferenças significativas para as variáveis retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) nas diferentes estruturas do epidídimo (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros da cinética espermática de amostras provenientes dos diferentes segmentos do epidídimo (cabeça, corpo e cauda). (A, B) Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

	Cabeça	Corpo	Cauda
Motilidade (%)	0,54 $\pm$ 0,39 ^B	2,5 $\pm$ 1,04 ^B	60 $\pm$ 4,59 ^A
VAP ($\mu\text{m/s}$)	39,53 $\pm$ 14,47 ^B	61,7 $\pm$ 14,25 ^B	130,9 $\pm$ 6,77 ^A
VSL ($\mu\text{m/s}$)	19,95 $\pm$ 5,8 ^B	39,41 $\pm$ 8,84 ^B	97,9 $\pm$ 5,61 ^A
VCL ($\mu\text{m/s}$)	74,24 $\pm$ 25,76 ^B	106,2 $\pm$ 25,04 ^B	246,35 $\pm$ 12,34 ^A
ALH (μm)	2,17 $\pm$ 1,129 ^B	3,57 $\pm$ 1,16 ^B	10,18 $\pm$ 0,49 ^A
BCF (Hz)	21,23 $\pm$ 5,43 ^{AB}	18,09 $\pm$ 4,51 ^B	33,03 $\pm$ 1,15 ^A
STR (%)	49,18 $\pm$ 12,8	52,45 $\pm$ 12,06	72,09 $\pm$ 1,47
LIN (%)	33,27 $\pm$ 10,55	39,81 $\pm$ 10,18	40,09 $\pm$ 1,67
Movimento progressivo (%)	0,09 $\pm$ 0,09 ^B	0,9 $\pm$ 0,43 ^B	34,81 $\pm$ 3,53 ^A
Rápidos (%)	0,18 $\pm$ 0,12 ^B	1,7 $\pm$ 0,77 ^B	55,36 $\pm$ 9 ^A
Médios (%)	0,36 $\pm$ 0,27 ^B	1 $\pm$ 0,35 ^B	4,72 $\pm$ 0,73 ^A
Lentos (%)	2,3 $\pm$ 1,23 ^B	5,72 $\pm$ 1,34 ^B	12,18 $\pm$ 1,7 ^A
Células estáticas (%)	94,54 $\pm$ 3,21 ^A	89,9 $\pm$ 2,87 ^A	27,72 $\pm$ 3,85 ^B

3.3.2 Gotas citoplasmáticas proximal e distal

Em amostras recuperadas da cabeça do epidídimo, observamos maior porcentagem de células com gota citoplasmática proximal quando comparada aos demais segmentos (Tabela 2). Ademais, observamos que as amostras epididimárias do corpo e da cauda apresentaram maior número de gotas distais em relação as amostras da cabeça (Tabela 2).

Tabela 2 – Porcentagem de gota citoplasmática proximal e distal em amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. (A, B) Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

	Cabeça	Corpo	Cauda
Gota proximal (%)	49,66 $\pm$ 3,72 ^A	5,37 $\pm$ 2,41 ^B	4,18 $\pm$ 1,27 ^B
Gota distal (%)	9 $\pm$ 1,92 ^B	42,5 $\pm$ 7,56 ^A	41,09 $\pm$ 7,75 ^A

3.3.3 Integridade de Acrossomo e Membrana Plasmática

Observamos maior número de células com acrossomo e membrana plasmática pouco permeáveis em amostras espermáticas da cauda do epidídimo em comparação aos demais segmentos epididimários (Tabela 3).

Tabela 3 – Permeabilidade das membranas acrossomal e plasmática em amostras da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. (A, B) Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

	Cabeça	Corpo	Cauda
Acrossomo (%)	93,09 $\pm$ 1,2 ^B	92,63 $\pm$ 1,03 ^B	97,36 $\pm$ 0,63 ^A
Membrana (%)	73,72 $\pm$ 3,62 ^B	70,54 $\pm$ 3,64 ^B	85,63 $\pm$ 1,95 ^A

3.3.4 Atividade Mitocondrial

Observamos maior número de células com alta atividade mitocondrial (DAB – Classe I) em amostras espermáticas da cabeça (78,54 $\pm$ 3,71%) e da cauda (77,4 $\pm$ 3,39%) do epidídimo quando comparadas as amostras do corpo (66,81 $\pm$ 2,65%) (Figura 2).

Não foram observadas diferenças entre os segmentos em relação a atividade mitocondrial intermediária (DAB – Classe II; 13,45 $\pm$ 3,32%, 14,36 $\pm$ 3,28%, 14,5 $\pm$ 3,85%,

respectivamente) e ausência de atividade (DAB – Classe IV; $4,9 \pm 1,51\%$, $5,3 \pm 1,4\%$, $4,3 \pm 1,11\%$, respectivamente; Figura 2).

Amostras do corpo do epidídimo apresentaram maior número de células ($6,1 \pm 1,24\%$) com baixa atividade mitocondrial (DAB – Classe III) quando comparadas às células provenientes da cabeça do epidídimo. Células recuperadas da cauda ($3,6 \pm 0,76\%$) do epidídimo apresentaram resultados de baixa atividade mitocondrial semelhantes às células recuperadas da cabeça ($3,09 \pm 1,02\%$) e do corpo (Figura 2).

Figura 2: Atividade mitocondrial de amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. Dab I: Alta atividade mitocondrial; Dab II: Atividade mitocondrial intermediária; Dab III: Baixa atividade mitocondrial; Dab IV: ausência de atividade mitocondrial. (A, B) Diferentes índices indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

3.3.5 Suscetibilidade à Peroxidação lipídica

Observamos maior susceptibilidade à peroxidação lipídica em células pertencentes ao corpo ($42,69 \pm 15,54\%$) do epidídimo em relação as células da cabeça ($14,21 \pm 2,71\%$) e da cauda ($9,16 \pm 1,73\%$) (Figura 3).

Figura 3: Susceptibilidade à Peroxidação Lipídica de amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. (A, B) Diferentes índices indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

3.3.6 Potencial de membrana mitocondrial

Amostras espermáticas da cabeça, corpo e cauda do epidídimo não apresentaram diferenças significativas na porcentagem de células ($54,39 \pm 7,48\%$; $46,99 \pm 5,55\%$; $56,9 \pm 4,5\%$, respectivamente) com alto potencial de membrana mitocondrial (PMM, Figura 4). As amostras epididimárias da cauda apresentaram maior porcentagem de células com intermediário PMM em relação as demais amostras. As amostras do corpo não diferiram estatisticamente em relação às amostras da cabeça e da cauda ($14,56 \pm 6,64\%$; $14,94 \pm 3,77\%$ e $23,04 \pm 4,19\%$; Figura 4). Além disso, observamos maior número de células com baixo PMM em amostras do corpo ($38,82 \pm 3,35\%$) do epidídimo (Figura 4).

Figura 4: Potencial de Membrana Mitocondrial de amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. População de espermatozoides com alto, intermediário e baixo Potencial de Membrana Mitocondrial. (A, B) Diferentes índices indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

3.3.7 Atividade das enzimas antioxidantes – SOD e GPx

Observamos atividades semelhantes das enzimas antioxidantes SOD e GPx nos espermatozoides e fluidos epididimários da cabeça, corpo e cauda do epidídimo (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GPx) em amostras da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

	Cabeça	Corpo	Cauda
SOD (U/mL)	34,62 $\pm$ 5,09	29,08 $\pm$ 5,94	43,58 $\pm$ 8,7
GPx (U/mL)	21,39 $\pm$ 1,37	20,11 $\pm$ 1,23	19,49 $\pm$ 1,4

Considerando a análise de correlação, houve correlação positiva entre células com alto PMM e alta atividade mitocondrial (DAB – Classe I; $r = 0,63$ e $p = 0,05$), e tendência à correlação negativa entre atividade da enzima SOD e susceptibilidade à peroxidação lipídica ($r = -0,67$ e $p = 0,05$) na cabeça do epidídimo. No corpo do epidídimo, observamos correlação positiva entre gota citoplasmática distal e alto PMM ($r = 0,78$ e $p = 0,01$), porém observamos uma correlação negativa entre gota citoplasmática distal e susceptibilidade à peroxidação lipídica ($r = -0,91$ e

$p= 0,001$). Na cauda do epidídimo, por sua vez, observamos tendência à correlação positiva entre gota citoplasmática distal e alta atividade mitocondrial (DAB – Classe I; $r= 0,70$ e $p= 0,05$), bem como correlação negativa entre gota distal e porcentagem de células móveis ($r= - 0,81$ e $p= 0,005$).

3.4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, objetivamos caracterizar o status oxidativo de espermatozoides bovinos durante a maturação espermática.

Não observamos diferença estatística na porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial (PMM) entre os três segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). Desta forma, podemos sugerir que ao longo de todo ducto epididimário, as mitocôndrias espermáticas já possuem habilidade de manter um gradiente eletroquímico. Sabe-se que o potencial de membrana mitocondrial é um fator limitante para a produção de ATP, no entanto, em estudo realizado por nosso grupo (Dados não publicados), aparentemente a energia mitocondrial durante a maturação epididimária parece não estar relacionada à aquisição da motilidade. De fato, estudos sugerem que o espermatozoide esteja se preparando para processos dependentes de energia, seja para eventos durante a maturação espermática, como o remodelamento de membranas (Fernandez-Fuertes et al., 2016), como para eventos pós-ejaculatórios, como a capacitação e hiperativação (Cooper, 2011; Mukai & Okuno, 2004).

Apesar de termos observado alto PMM e alta atividade mitocondrial (DAB – Classe I) em amostras espermáticas da cabeça do epidídimo, os espermatozoides só adquiriram motilidade ao longo de seu transporte pelos os segmentos epididimários, sendo que a cinética espermática foi evidenciada na cauda do epidídimo. Além disso, houve correlação positiva entre alto PMM e alta atividade mitocondrial (DAB – Classe I) em amostras da cabeça do epidídimo. Desta forma, hipotetizamos que o metabolismo energético espermático é ativado na cabeça do epidídimo, e que a mitocôndria desempenhe um papel de manter a homeostase celular durante o início da maturação, fornecendo energia para processos inerentes à maturação, como os remodelamentos de membrana acrossomal e plasmática.

À medida que o espermatozoide imaturo transitou pelos segmentos epididimários, observamos a ocorrência do fenômeno da migração da gota citoplasmática (Cooper & Yeung, 2003). Amostras espermáticas da cabeça do epidídimo apresentaram maior porcentagem de gotas proximais em relação aos demais segmentos. Já amostras do corpo e cauda do epidídimo apresentaram maior porcentagem de espermatozoides com gotas distais. Paralelamente, observamos que houve aumento de células móveis em amostras do corpo. Tais resultados nos permitem inferir que haja relação entre a migração da gota citoplasmática e aquisição de motilidade. Xu e colaboradores (2013) realizaram um estudo utilizando amostras espermáticas da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de roedores e primatas para avaliar o papel da gota citoplasmática na aquisição da motilidade durante a maturação. As amostras foram incubadas

em meio HTF-HEPES e avaliadas quanto à motilidade. Em espermatozoides imaturos de roedores, observaram maior porcentagem de células móveis com gota citoplasmática e baixa porcentagem de células imóveis com gota, nos três segmentos epididimários. Já em espermatozoides de primatas, os pesquisadores analisaram a porcentagem de células móveis e a migração da gota citoplasmática, e observaram que amostras da cabeça possuíam maior porcentagem de gota proximal e pouca motilidade, diferindo das amostras do corpo e da cauda do epidídimo, que possuíam gota distal e maior porcentagem de células móveis. Yuan afirma que a presença de gota citoplasmática está relacionada com o potencial de desenvolvimento da motilidade. A maioria dos espermatozoides que apresentaram motilidade inicial e progressiva possuía gota citoplasmática, e os que não possuíam, raramente a desenvolvia ou conseguia mantê-la. Assim, sugeriram que a gota citoplasmática esteja relacionada com a motilidade, possuindo um papel em desenvolvê-la durante a maturação epididimária.

Além disso, observamos correlação positiva entre gota distal e alto PMM em amostras do corpo do epidídimo. Ainda, em amostras da cauda, houve correlação positiva entre gota distal e alta atividade mitocondrial (DAB – Classe I), e correlação negativa entre gota distal e porcentagem de células móveis. Estes resultados reforçam a evidência de que a migração ao longo da peça intermediária possa estar relacionada à aquisição da motilidade. Angrimani et al. (2017) avaliou a influência da gota citoplasmática na funcionalidade mitocondrial em espermatozoides imaturos de cães. Assim, observaram que houve aumento gradual da atividade mitocondrial concomitante à migração da gota citoplasmática. Além disso, houve correlação positiva entre alta atividade mitocondrial e motilidade, em amostras espermáticas da cauda do epidídimo. Os resultados obtidos neste estudo nos mostram que a mitocôndria já estava ativa em espermatozoides bovinos presentes na cabeça do epidídimo, mas não apresentavam motilidade. A gota citoplasmática, em espermatozoides bovinos, não deve ativar as mitocôndrias, e sim de ativar a motilidade por outra via, como a glicólise (Mukai & Okuno, 2004). No entanto, mais estudos são necessários para verificar esta hipótese.

Uma vez que o maquinário energético do espermatozoide esteja ativo ao longo do processo de maturação, como produto intrínseco das vias metabólicas, ocorre maior produção de EROs. O desequilíbrio entre as concentrações de radicais livres e antioxidantes pode levar ao estresse oxidativo (Bansal & Bilaspuri, 2010). Os espermatozoides, por possuírem pouco citoplasma e sua membrana ser rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), são mais susceptíveis a peroxidação lipídica (de Lamirande et al., 1997; OHKAWA, 1979). Assim, observamos que amostras do corpo do epidídimo são mais susceptíveis à peroxidação lipídica. Estudos evidenciam este segmento como local onde se iniciam os remodelamentos de

membrana mais expressivos para o espermatozoide em maturação (D. S. R. Angrimani et al., 2017; Fernandez-Fuertes et al., 2016; Narciandi, Lloyd, Chapwanya, C, & Meade, 2011). Além disso, observamos em amostras provenientes do corpo do epidídimo a migração da gota citoplasmática, da porção proximal para a porção distal da peça intermediária. Nichi et al. (2007) sugeriu que a gota distal possa ter um papel protetor e antioxidante. À medida que a gota transite pela peça intermediária, hipotetizamos uma possível instabilidade de seu poder antioxidante, sugerindo a razão de os espermatozoides provenientes do corpo serem mais susceptíveis à peroxidação. Angrimani et al. (2014) também observou correlação negativa entre células sem gota citoplasmática e atividade enzimática da SOD, evidenciando o possível papel antioxidante que a gota distal possa desempenhar durante a maturação espermática.

As enzimas antioxidantes SOD e GPx atuam contra o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica em espermatozoides (D. S. Angrimani et al., 2014; Hamilton et al., 2016; Nichi et al., 2007). A ação da SOD está relacionada à funcionalidade espermática, especialmente à motilidade, integridade de DNA e fertilidade (Irvine et al., 2000; Kobayashi, Miyazaki, Natori, & Nozawa, 1991). Assim como a GPx, também relacionada à aquisição de motilidade e à integridade de membrana plasmática contra a peroxidação lipídica (Rejraji et al., 2006). As atividades dos antioxidantes SOD e GPx foram detectadas em todos os segmentos epididimários. No entanto, não foram observadas diferenças na atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx entre os segmentos do epidídimo, e não houveram correlações entre elas. Tal resultado reforça a hipótese de Angrimani et al. (2014) de que as enzimas atuam em toda maturação espermática e, por não haver diferenças de atividade, corrobora também com a ideia de que haja um consumo constante das enzimas em todo o segmento epididimário. Contudo, a SOD e a GPx desempenham a função de corrigir danos causados pelo estresse oxidativo. Em amostras da cabeça do epidídimo, observamos correlação negativa entre SOD e susceptibilidade à peroxidação lipídica. Em reações catalisadas pela SOD, ocorre a transformação do ânion superóxido em uma molécula de Oxigênio e uma de Peróxido de Hidrogênio. Para que o peróxido de hidrogênio não seja tóxico para a célula, é necessário a ação da Catalase ou da GPx, transformando-a em água e evitando a formação do radical Hidroxila, a ERO mais prejudicial ao espermatozoide (Nichi et al., 2007). Se esse sistema estiver em homeostase, não ocorrerá o estresse oxidativo. Assim, hipotetizamos que o peróxido de hidrogênio desempenhe um papel fisiológico em amostras espermáticas da cabeça, devido à correlação negativa encontrada entre SOD e susceptibilidade á peroxidação lipídica. Entretanto, mais estudos seriam necessários para verificar esta hipótese.

Durante o evento de maturação, espermatozoides sofrem remodelamentos e alterações na membrana acrossomal e plasmática (Fernandez-Fuertes et al., 2016; Narciani et al., 2011; Tulsiani, 2006). Neste trabalho, observamos maior porcentagem de acrossomo íntegro e membrana plasmática impermeável nas amostras provenientes da cauda do epidídimo em comparação às demais. Esse resultado era esperado pois espermatozoides presentes na cauda do epidídimo já passaram pelo processo de maturação e, portanto, possuem capacidade fecundante (Cooper, 2011; Robaire & Viger, 1995).

Os resultados de integridade acrossomal e de membrana plasmática obtidos podem significar a ocorrência de remodelamentos, adição de diferentes proteínas ao longo do epidídimo, e alteração do perfil lipídico da membrana, modificações fisiológicas e necessárias durante o processo de maturação espermática (Fernandez-Fuertes et al., 2016; R. Jones, 1998a; R. C. Jones, 1998b; Rejraji et al., 2006). Dessa forma, acreditamos que a ocorra uma maior permeabilidade da membrana plasmática das amostras do corpo não relacionadas às lesões. Tal resultado pode indicar que possíveis terapias com moléculas que normalmente não passariam pela membrana seriam mais eficazes nesta região.

Um resultado obtido neste estudo e que merece destaque é a evidência de que mitocôndrias presentes em espermatozoides bovinos imaturos estão ativos durante todo o processo de maturação espermática, divergindo com resultados provenientes de espermatozoides imaturos caninos (D. S. R. Angrimani et al., 2017). Além disso, a gota citoplasmática, em espermatozoides bovinos, não deve ativar as mitocôndrias, e sim ativar a motilidade por outra via (Mukai & Okuno, 2004). Acreditamos que estudos mais aprofundados devam ser realizados para compreender o *status* metabólico e o papel da gota citoplasmática durante a maturação espermática em bovinos.

3.5 CONCLUSÃO

Concluimos que a gota citoplasmática é fundamental para o *status* oxidativo de espermatozoides bovinos durante a maturação, pois está envolvida em diversas funções ao longo do epidídimo. Além disso, a migração da gota citoplasmática da região proximal para regiões distais da célula espermática pode estar relacionada à homeostase espermática e proteção antioxidante em espermatozoides imaturos. Nossos resultados também sugerem que a ação das enzimas antioxidantes SOD e GPx sejam essenciais e recrutadas constantemente ao longo do processo de maturação espermática em bovinos.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken, R. J., Jones, K. T., & Robertson, S. A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health. *J Androl*, 33(6), 1096-1106. doi: 10.2164/jandrol.112.016535
- Alvarez, J. G., Touchstone, J. C., Blasco, L., & Storey, B. T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl*, 8(5), 338-348.
- Angrimani, D. S., Losano, J. D., Lucio, C. F., Veiga, G. A., Pereda, M. C., Nichi, M., & Vannucchi, C. I. (2014). Role of residual cytoplasm on oxidative status during sperm maturation in dogs. *Anim Reprod Sci*, 151(3-4), 256-261. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.10.023
- Angrimani, D. S. R., Losano, J. D. A., Lucio, C. F., Veiga, G. A. L., Landim, F. C., Nichi, M., & Vannucchi, C. I. (2017). Cytoplasmic droplet acting as a mitochondrial modulator during sperm maturation in dogs. *Anim Reprod Sci*, 181, 50-56. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.03.014
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2010). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*, 2010. doi: 10.4061/2011/686137
- BARTH, A. D., OKO, R. J. (1989). Abnormal morphology of bovine spermatozoa. . Ames: University Press, 285.
- Beutler, E. (1975). Red cell metabo-lism, a manual of biochemical methods. *New York: Grune & Stratton*, 112 - 114.
- Capucho, C., Sette, R., de Souza Predes, F., de Castro Monteiro, J., Pigoso, A. A., Barbieri, R., . . . Severi-Aguiar, G. D. (2012). Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. *Food Chem Toxicol*, 50(11), 3956-3962. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.027

- Cooper, T. G. (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod*, 20(1), 9-11. doi: 10.1093/humrep/deh555
- Cooper, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl*, 13(1), 130-138. doi: 10.1038/aja.2010.97
- Cooper, T. G., & Yeung, C. H. (2003). Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech*, 61(1), 28-38. doi: 10.1002/jemt.10314
- de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., & Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*, 2(1), 48-54.
- Du Plessis, S. S., Agarwal, A., Halabi, J., & Tvrda, E. (2015). Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J Assist Reprod Genet*, 32(4), 509-520. doi: 10.1007/s10815-014-0425-7
- Fernandez-Fuertes, B., Narciandi, F., O'Farrelly, C., Kelly, A. K., Fair, S., Meade, K. G., & Lonergan, P. (2016). Cauda Epididymis-Specific Beta-Defensin 126 Promotes Sperm Motility but Not Fertilizing Ability in Cattle. *Biol Reprod*, 95(6), 122. doi: 10.1095/biolreprod.116.138792
- Fetic, S., Yeung, C. H., Sonntag, B., Nieschlag, E., & Cooper, T. G. (2006). Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *J Androl*, 27(2), 294-301. doi: 10.2164/jandrol.05122
- Goncalves, F. S., Barretto, L. S., Arruda, R. P., Perri, S. H., & Mingoti, G. Z. (2010). Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod Domest Anim*, 45(1), 129-135. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01272.x
- Hamilton, T. R., de Castro, L. S., Delgado Jde, C., de Assis, P. M., Siqueira, A. F., Mendes, C. M., . . . D'Avila Assumpcao, M. E. (2016). Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. *Reproduction*, 151(4), 379-390. doi: 10.1530/REP-15-0403

HRUDKA, F. (1987). Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *International Journal of Andrology*, 10(6), 809 - 828.

Irvine, D. S., Twigg, J. P., Gordon, E. L., Fulton, N., Milne, P. A., & Aitken, R. J. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*, 21(1), 33-44.

Jones, R. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl*, 53, 73-84.

Jones, R. C. (1998). Evolution of the vertebrate epididymis. *J Reprod Fertil Suppl*, 53, 163-181.

Kim, J. G., & Parthasarathy, S. (1998). Oxidation and the spermatozoa. *Semin Reprod Endocrinol*, 16(4), 235-239. doi: 10.1055/s-2007-1016283

Kobayashi, T., Miyazaki, T., Natori, M., & Nozawa, S. (1991). Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod*, 6(7), 987-991.

Ma, L., Yu, H., Ni, Z., Hu, S., Ma, W., Chu, C., . . . Zhang, Y. (2013). Spink13, an epididymis-specific gene of the Kazal-type serine protease inhibitor (SPINK) family, is essential for the acrosomal integrity and male fertility. *J Biol Chem*, 288(14), 10154-10165. doi: 10.1074/jbc.M112.445866

Mukai, C., & Okuno, M. (2004). Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod*, 71(2), 540-547. doi: 10.1095/biolreprod.103.026054

Narciandi, F., Lloyd, A. T., Chapwanya, A., C, O. F., & Meade, K. G. (2011). Reproductive tissue-specific expression profiling and genetic variation across a 19 gene bovine beta-defensin cluster. *Immunogenetics*, 63(10), 641-651. doi: 10.1007/s00251-011-0551-7

Nichi, M., Bols, P. E., Zuge, R. M., Barnabe, V. H., Goovaerts, I. G., Barnabe, R. C., & Cortada, C. N. (2006). Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, 66(4), 822-828. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.01.056

Nichi, M., Goovaerts, I. G., Cortada, C. N., Barnabe, V. H., De Clercq, J. B., & Bols, P. E. (2007). Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. *Theriogenology*, 67(2), 334-340. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.08.002

O'Rand, M. G., Hamil, K. G., Adevai, T., & Zelinski, M. (2018). Inhibition of sperm motility in male macaques with EP055, a potential non-hormonal male contraceptive. *PLoS One*, 13(4), e0195953. doi: 10.1371/journal.pone.0195953

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. et al. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351 - 358.

Oko, R., Herno, L., Chan, P. T., Fazel, A., & Bergeron, J. J. (1993). The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. *J Cell Biol*, 123(4), 809-821.

POPE, C. E., ZHANG, Y. Z., DRESSER, B. L. (1991). A Simple Staining Method for Evaluating Acrosomal Status of Cat Spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 22(1), 87 - 95.

Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J. M., . . . Drevet, J. R. (2006). Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod*, 74(6), 1104-1113. doi: 10.1095/biolreprod.105.049304

Retzius, G. (1909). Die Spermien der Nagetiere. *Biol Untersuch*, XIV, 153 - 156.

Robaire, B., & Viger, R. S. (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod*, 52(2), 226-236.

Tulsiani, D. R. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Mol Cell Endocrinol*, 250(1-2), 58-65. doi: 10.1016/j.mce.2005.12.025

Vieira, N. M. G., Losano, J. D. A., Angrimani, D. S. R., Kawai, G. K. V., Bicudo, L. C., Rui, B. R., . . . Nichi, M. (2018). Induced sperm oxidative stress in dogs: Susceptibility against different reactive oxygen species and protective role of seminal plasma. *Theriogenology*, 108, 39-45. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.020

Xu, H., Yuan, S. Q., Zheng, Z. H., & Yan, W. (2013). The cytoplasmic droplet may be indicative of sperm motility and normal spermiogenesis. *Asian J Androl*, 15(6), 799-805. doi: 10.1038/aja.2013.69

Yuan, S., Zheng, H., Zheng, Z., & Yan, W. (2013). Proteomic analyses reveal a role of cytoplasmic droplets as an energy source during epididymal sperm maturation. *PLoS One*, 8(10), e77466. doi: 10.1371/journal.pone.0077466

Capítulo 3

4 CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DO STATUS METABÓLICO E O PAPEL DA GOTA CITOPLASMÁTICA DURANTE A MATURAÇÃO ESPERMÁTICA EM BOVINOS

RESUMO

Ao final da espermatogênese, espermatozoides imaturos migram do testículo para o epidídimo e passam pelo processo de maturação espermática. Ao passar pelos segmentos epididimários, as células espermáticas sofrem modificações funcionais e alterações em seu *status* metabólico e afim de gerar uma célula com capacidade fecundante. Estudos evidenciam um papel metabólico da gota citoplasmática durante a maturação. Em bovinos, o *status* metabólico de espermatozoides durante a maturação epididimária ainda é pouco elucidado. Assim, objetivamos avaliar o possível papel da gota citoplasmática no *status* metabólico e as modificações funcionais de espermatozoides bovinos durante a maturação epididimária. Para tal, amostras espermáticas (N= 10 testículos) foram recuperadas dos três segmentos epididimários (Cabeça, corpo e cauda) e submetidas às avaliações de cinética espermática (CASA), presença de gota citoplasmática (Eosina/Nigrosina), integridade acrossomal e de membrana plasmática (FITC-PSA), fragmentação de DNA espermático (SCSA), *status* oxidativo (CellROX® green), potencial de membrana mitocondrial (JC-1), atividade mitocondrial (DAB), e níveis de ATP (Luminescência). Amostras recuperadas da cauda do epidídimo apresentaram maior porcentagem de células móveis e progressivas, e níveis elevados de ATP. Espermatozoides provenientes da cabeça apresentaram maior porcentagem de gotas proximais, diferindo do corpo e da cauda que possuíam maior porcentagem de gotas distais. Amostras oriundas do corpo apresentaram maior porcentagem de células com acrossomo e membrana lesionados, e alta produção de EROs. Células provenientes da cabeça e da cauda apresentaram alta atividade mitocondrial. Não houveram diferenças significativas para potencial de membrana mitocondrial (PMM) e fragmentação de DNA. Houve correlação positiva entre produção de EROs e níveis de ATP, e alto PMM, em amostras da cabeça; correlação positiva entre níveis de ATP e gota distal, em amostras do corpo; e correlação positiva entre gota distal e alta atividade mitocondrial, motilidade, acrossomo e membrana íntegros, e alto PMM. Sugerimos que a migração da gota citoplasmática pela peça intermediária esteja relacionada com a ativação do aparato energético de espermatozoides imaturos, desde o início da maturação. Assim, concluímos que a presença e migração da gota citoplasmática seja

fundamental para que o espermatozoide possa adquirir motilidade e desenvolver a capacidade fecundante.

Palavras-chave: Metabolismo espermático. Gota citoplasmática. Maturação epididimária. ATP. Bovinos.

4.1 INTRODUÇÃO

A espermatogênese é um processo coordenado e especializado pelo qual os espermatozoides são produzidos. Por meio de divisões mitóticas e meióticas, células da linhagem germinativa se diferenciam originando espermatogônias, espermatócitos (primários e secundários) e espermátides (Okabe, Ikawa, & Ashkenas, 1998). Ao final da espermatogênese, fase denominada espermiogênese, grande parte do citoplasma presente nas espermátides é fagocitado pelas células de Sertoli. No entanto, ocorre a persistência residual do citoplasma, conhecido como gota citoplasmática (Cooper, 2005; Oko et al., 1993). Posteriormente, ao final da espermiogênese, espermatozoides imaturos migram do testículo para o epidídimo e passam pelo processo de maturação espermática (Mukai & Okuno, 2004). Os espermatozoides presentes ao longo do canal epididimário possuem gota citoplasmática. Porém, ao longo do processo de maturação espermática e passagem dos espermatozoides pelos segmentos do epidídimo (Cabeça, corpo e cauda), ocorre o fenômeno de migração da gota citoplasmática da região proximal (gota citoplasmática proximal) para regiões mais distais da peça intermediária (gota citoplasmática distal) (Cooper & Yeung, 2003). Estudos mencionam maior porcentagem de espermatozoides com gota citoplasmática proximal no segmento da cabeça do epidídimo, enquanto que nos segmentos do corpo e da cauda, há predominância de espermatozoides com gotas distais (D. S. Angrimani et al., 2014; Hermo, Dworkin, & Oko, 1988; Xu et al., 2013).

Simultaneamente à migração dos resíduos citoplasmáticos, ocorrem diversas alterações estruturais e funcionais dos espermatozoides, incluindo a ativação metabólica gradual, aquisição da motilidade e da capacidade fecundante (Cooper, 2011; Flesch & Gadella, 2000; Gibb & Aitken, 2016; Mukai & Okuno, 2004; Zhang & Lin, 2002).

A motilidade espermática, crucial para que os espermatozoides alcancem o sítio de fertilização, é um evento celular dependente de energia, na forma de ATP, proveniente da fosforilação oxidativa, reação presente em mitocôndrias ativas. Entretanto, estudos recentes sugerem a participação da glicólise como reguladora do início da motilidade e mantenedora do movimento (Mukai & Okuno, 2004). Entretanto, ainda há controvérsias sobre as vias metabólicas que atuam e sustentam a cinética espermática, pois, devido à falta de dados que corroborem esta hipótese, a aquisição da motilidade e ativação mitocondrial são diretamente relacionadas, juntamente com o possível indício de que a gota citoplasmática regule a ocorrência desses eventos.

De fato, Angrimani et al. (2017) verificaram que ocorre a ativação mitocondrial dos espermatozoides de cão a medida que os resíduos de citoplasma migram ao longo da peça

intermediária, sugerindo que a gota citoplasmática possui um papel essencial na ativação do metabolismo espermático durante sua maturação no epidídimo. Além disto, estudos de Au et al. (2015), Xu et al. (2013) e Cooper et al. (2005) verificaram que a gota citoplasmática possui um importante papel na ativação metabólica e aquisição da motilidade. Em bovinos, pouco se sabe sobre a influência da gota citoplasmática durante a maturação epididimária do espermatozoide.

Desta forma, o objetivo de nosso estudo foi avaliar o possível papel da gota citoplasmática no *status* metabólico e as modificações funcionais de espermatozoides bovinos durante a maturação epididimária.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes éticas para experimentos com animais e aprovado pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) sob protocolo número 8285290216. A menos que indicado de outra forma, os reagentes utilizados nas análises espermáticas foram adquiridos da empresa Sigma Chemical® (St. Louis, MO, USA).

4.2.2 Delineamento Experimental

A colheita das amostras e as análises seminais foram realizadas no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Foram coletadas amostras da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de touros (N= 10 testículos) sexualmente maduros, provenientes de abatedouro comercial.

Figura 5: Delineamento Experimental. Amostras espermáticas coletadas dos três segmentos do epidídimo (Cabeça, corpo e cauda) de testículos de touros provenientes de abatedouro. As amostras foram avaliadas quanto à cinética espermática, à presença de gota citoplasmática, à integridade acrossomal, à integridade de membrana plasmática, à fragmentação de DNA espermático, ao status oxidativo, ao potencial de membrana mitocondrial, atividade mitocondrial, e aos níveis de ATP.

4.2.3 Métodos

4.2.3.1 Colheita dos espermatozoides epididimários

Os conjuntos testículo-epidídimo foram coletados e armazenados a 4°C em recipiente térmico logo após o abate, e transportados até o laboratório.

Foram coletadas amostras das regiões da cabeça, corpo e cauda do epidídimo pelo método de fatiamento, como descrito por Nichi e colaboradores (2007). Esta técnica baseia-se em limitar o segmento epididimário de interesse com o auxílio de uma pinça hemostática, afim de proporcionar uma pressão interna local e uma maior fluidez da amostra durante a coleta. Com lâmina de bisturi, foram realizadas incisões de, aproximadamente, 2 mm de comprimento, evitando regiões irrigadas e, conseqüentemente, a contaminação por sangue. Por fim, as amostras foram recuperadas com o auxílio de pipeta automática e diluídas em 1 mL de Tampão Fosfato-Salino (PBS-Phosphate Buffer Saline; pH= 7,4; 0,01M) à temperatura ambiente.

4.2.3.2 Avaliações espermáticas

Após a coleta, as amostras foram avaliadas quanto à cinética espermática, testes morfofuncionais de integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial. Posteriormente, as amostras também foram avaliadas quanto à presença de gota citoplasmática, atividade mitocondrial, status oxidativo e aos níveis de ATP.

4.2.3.2.1 Avaliação da cinética espermática (CASA)

A avaliação da cinética espermática foi realizada pelo sistema computadorizado de análise espermática (CASA - *Computer Assisted Sperm Analysis*; Hamilton Thorne IVOS 12.3, USA) logo após a coleta das amostras. Para tal, uma alíquota das amostras de cada segmento epididimário foi pipetada em lâmina pré-aquecida, coberta com lamínula. Foram analisadas, aproximadamente, 1000 células por lâmina. As configurações utilizadas foram 30 quadros a uma taxa de 60 quadros/s. Foram analisados parâmetros de motilidade espermática total (Motilidade, %), motilidade espermática progressiva (Movimento progressiva, %), velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade retilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do movimento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), retilinearidade ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP}$, %), e linearidade ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$, %). Ainda,

os espermatozoides foram divididos em 4 grupos, baseando-se nas velocidades e na configuração selecionada: Rápidos (RAPID; VAP > 50 $\mu\text{m/s}$; %), Médios (MEDIUM; 30 $\mu\text{m/s}$ < VAP < 50 $\mu\text{m/s}$; %), lentos (SLOW; VAP < 30 $\mu\text{m/s}$ ou VSL < 15 $\mu\text{m/s}$; %) e espermatozoides imóveis (STATIC; %).

4.2.3.2.2 Presença de gota citoplasmática

Para avaliar a presença de gota citoplasmática foi utilizada a coloração Eosina/Nigrosina, de modo a proporcionar melhor visualização das células e das gotas citoplasmáticas. Em lâmina de microscopia foram pipetadas uma alíquota de 5 μL do corante em 5 μL de amostra para realizar o esfregaço, incubando por 30 segundos. As lâminas foram analisadas em microscópio convencional em magnificação de 1000x sob óleo de imersão. Foram contadas 100 células por amostra e classificadas em células com gota citoplasmática proximal, gota distal e células sem gota citoplasmática. O resultado foi expresso em porcentagem de células com gotas citoplasmáticas proximal e distal.

4.2.3.2.3 Citometria de Fluxo

As análises de integridade de membrana plasmática e acrossomal, susceptibilidade da cromatina ao estresse ácido, *status* oxidativo e potencial de membrana mitocondrial e foram realizadas em citômetro de fluxo Guava EasyCyte mini (Guava® Technologies, Merck-Millipore) no Laboratório de Biologia do Espermatozoide do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo conforme descrito por (Hamilton et al., 2016).

4.2.3.2.3.1 Integridade de membrana plasmática e acrossomal

A integridade das membranas plasmática e acrossomal foi avaliada por citometria de Fluxo pela associação de sondas fluorescentes Iodeto de Propídio (PI), e *Pisum sativum* conjugada a Isotiocinato de fluoresceína (FITC-PSA). Resumidamente 187.500 células de cada segmento epididimário foram diluídas em TALP modificado e incubadas durante 5 minutos a 37°C, com 10 μM de PI e 24,3 $\mu\text{g/ml}$ de FITC-PSA. As fluorescências foram excitadas no laser 488 nm e detectadas a 630–650 nm (PI) e 515–530 nm (FITC). As populações de espermatozoides foram divididas em quatro grupos baseadas em validações

realizadas utilizando amostras com lesão induzida. Desta maneira, foram obtidos quatro grupos: acrossomo e membrana plasmática íntegros (AIMI), acrossomo lesionado e membrana plasmática íntegra (ALMI), acrossomo íntegro e membrana plasmática lesionada (AIML) e acrossomo e membrana plasmática lesionados (ALML). As amostras foram avaliadas em citômetro de fluxo, excitadas a 488nm e detectadas a 630–650nm (PI) e 515–530nm (FITC). Todos os resultados foram analisados utilizando o software FlowJo versão 8.7 (Ashland, OR, USA).

4.2.3.2.3.2 Suscetibilidade da cromatina à denaturação ácida

Para avaliar a susceptibilidade da cromatina por denaturação ácida, foi realizado o ensaio da estrutura da cromatina espermática adaptado do protocolo descrito por (Simões et al., 2013). Esta técnica determina quantitativamente a integridade da cromatina espermática, definida pela susceptibilidade do DNA à denaturação ácido-induzida “*in situ*”. A denaturação leva a quebra das pontes de hidrogênio que unem a dupla fita de DNA. Este ensaio utilizou o fluoróforo metacromático Laranja de Acridina (LA), que excitado no laser 488 nm emite fluorescência verde (525 nm) na presença de DNA dupla-fita (dsDNA - double-stranded DNA), e fluorescência amarela (590 nm) na presença de DNA fita simples (ssDNA - single-stranded DNA), indicando denaturação da estrutura da cromatina. Cerca de 187.500 células foram diluídas em 50 µl do tampão neutro TNE (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl e 0.1 mM EDTA diluídos em água destilada, pH 7,4), expostas por 30 segundos ao detergente ácido (HCl 0.08M, NaCl 0.15M, Triton X-100 0.1% diluídos em água destilada, pH 1.2) e coradas imediatamente com LA (ácido cítrico 0.1M, Na₂HPO₄ 0.2M, EDTA 0.001M, NaCl 0.15M e 6 µg/mL de LA). Depois de 5 minutos as amostras foram submetidas à citometria de fluxo e 20.000 eventos foram adquiridos. Para a análise, foi aplicada a fórmula de α TYlog, onde a fluorescência amarela foi dividida pela fluorescência total. As células foram consideradas positivas a partir do ponto de corte determinado em uma amostra com fragmentação induzida por uma exposição prévia a um tampão com HCl (pH 0.1) por cinco minutos, conforme descrito por Castro e colaboradores (2016).

4.2.3.2.3.3 Status Oxidativo

CellROX® *green* (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) é uma sonda fluorescente penetrante que quando oxidada pelos radicais livres intracelulares, liga-se ao DNA e emite

fluorescência verde mais intensa. Para este ensaio, 187,500 células foram incubadas com CellROX® *green* na concentração final de 5µM, durante 30 minutos, à 37°C. Nos últimos 10 minutos, foi adicionado PI afim de atingir uma concentração final de 6 µM. A leitura foi realizada com excitação de 488nm e detectadas a 630–650nm (PI) e 515–530nm (CellROX® *green*). Para análise dos resultados, foram selecionadas quatro populações: células negativas para CellROX (Menor produção de EROs) e membrana menos permeável (CNMI); células negativas para CellROX e membrana mais permeável (CNMP), células positivas para CellROX (Maior produção de EROs) e membrana menor permeável (CPMI) e células positivas para CellROX e membrana mais permeável (CPMP).

4.2.3.2.3.4 Potencial da membrana mitocondrial

Para a avaliar o potencial de membrana mitocondrial foi utilizada a sonda fluorescente JC-1 (iodeto de 5,5',6,6' – tetracoloro - 1,1,3,3' – tetraetilbenzimidazolilcarbocianina, 5mg/mL, Invitrogen), seguindo a metodologia descrita por Hamilton e colaboradores (2016). Para tal, foram diluídos 187.500 espermatozoides em 12,5µL de meio TALP, e adicionados 0,5µL da sonda fluorescente JC-1 (76,5 µM), mantidos incubando a 37°C por 5 minutos. Nesta técnica, as membranas mitocondriais com alto potencial emitem fluorescência amarela em alta intensidade (Hamilton et al., 2016). As amostras foram classificadas em porcentagens de espermatozoides com alto, intermediário e baixo potencial de membrana mitocondrial. Para a leitura, foram excitadas a 488nm e detectadas a 590nm.

4.2.3.2.4 Atividade mitocondrial

A avaliação da atividade mitocondrial foi realizada empregando a técnica citoquímica que utiliza o reagente 3'3 Diaminobenzidina (Ensaio DAB), o qual é oxidado pela enzima Citocromo C-Oxidase, presente em mitocôndrias ativas, formando um complexo de coloração marrom na região da peça intermediária (HRUDKA, 1987). Para tal, uma alíquota de 20µL da amostra foi incubada com 20µL de 3'3 Diaminobenzidina em um tubo de microcentrífuga âmbar durante 1 hora em banho-seco a 37°C. Após a incubação, a mistura foi depositada em lâmina de microscopia e mantida em local protegido da luz. As lâminas foram fixadas em formaldeído 10% por 10 minutos e secas no ar ao abrigo da luz. A leitura das lâminas foi realizada em microscopia com contraste de fase em magnificação de 1000x sob óleo de imersão, onde foram contadas 100 células. A atividade mitocondrial foi classificada em 4

classes de acordo com a porcentagem de mitocôndrias coradas em marrom, ou seja, ativas: alta atividade mitocondrial (Classe I – 100% da peça intermediária corada média (Classe II – até 50% da peça intermediária corada), baixa (Classe III – menos de 50% da peça intermediária corada) e ausência de atividade mitocondrial (Classe IV – Peça intermediária sem coloração).

4.2.3.2.5 Níveis de ATP

As amostras foram submetidas à quantificação de ATP utilizando o kit comercial ATP Determination kit A22066 (Molecular Probes®, Invitrogen - (Carlsbad, CA, 132 USA). O Ensaio para quantificação de ATP consiste na clivagem da luciferina (substrato) pela luciferase (enzima recombinante), na presença de ATP e oxigênio, emitindo luz. Foram recuperadas 15 milhões de células de cada amostra, e adicionado ácido tricloroacético 1% (TCA) na proporção 2:1. As amostras foram centrifugadas a 20800 $\times$ g durante 15 minutos a 5°C para precipitação das proteínas e preservação do ATP. O sobrenadante foi recuperado e seu pH foi corrigido para 7,8. Foi realizada uma curva padrão da concentração de ATP, de 0 a 160nM de ATP. A determinação da concentração de ATP foi realizada por meio da quantificação de luz por luminômetro (Biotek Sinergy HT), em comprimento de onda de 560nm, após 7 minutos de incubação à 28°C. Os resultados foram expressos em nM (nano molar).

4.2.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo programa SAS System for Windows 9.3 (SAS, 2000). Os dados foram testados para normalidade dos resíduos (Distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias utilizando o aplicativo *Guided Data Analysis*. Transformações foram feitas quando necessárias. Os diferentes segmentos epididimários (Cabeça, corpo e cauda) foram comparados por meio da análise One Way ANOVA utilizando o teste LSD (*Least Significant Difference for multiple comparisons*). Foram feitas análises de correlação em cada segmento. Para variáveis paramétricas, foi utilizado o teste de Person, e para variáveis não paramétricas, foi utilizado o teste de Spearman. Foi considerado um valor de probabilidade de $P < 0.05$ para determinar resultados estatisticamente relevantes. Os resultados foram descritos por médias $\pm$ erro padrão não transformados.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Cinética espermática

Os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo apresentaram maior porcentagem de células móveis e progressivas em comparação às amostras da cabeça e da cauda do epidídimo (Tabela 1). Além disso, as amostras epididimárias apresentaram diferença entre os grupos em relação à Velocidade média de percurso (VAP), Velocidade retilínea (VSL) e Velocidade curvilínea (VCL) (Tabela 5).

Adicionalmente, as amostras do corpo e da cauda do epidídimo apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros de amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF) e retilinearidade (STR). Não houveram diferenças entre os resultados de linearidade (LIN) das amostras epididimárias (Tabela 5).

Em relação às velocidades espermáticas, foi possível observar maior porcentagem de células com velocidades rápida e média nas amostras da cauda, em comparação aos demais segmentos. Além disso, os espermatozoides provenientes do corpo, apresentaram maior número de células com movimentos lentos em relação à cauda do epidídimo (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros da cinética espermática de amostras da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. (A-C) Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

	Cabeça	Corpo	Cauda
Motilidade (%)	$1 \pm 0,68^B$	$9,8 \pm 2,32^B$	$61,2 \pm 5,07^A$
VAP ($\mu\text{m/s}$)	$23,62 \pm 11^C$	$76,64 \pm 6,33^B$	$107,52 \pm 4,37^A$
VSL ($\mu\text{m/s}$)	$20,72 \pm 10,18^C$	$48,96 \pm 3,46^B$	$75,92 \pm 3,72^A$
VCL ($\mu\text{m/s}$)	$31,01 \pm 14,20^C$	$152,98 \pm 15,74^B$	$199,29 \pm 10,55^A$
ALH (μm)	$0,68 \pm 0,46^B$	$6,51 \pm 1,31^A$	$8,12 \pm 0,52^A$
BCF (Hz)	$10,37 \pm 4,47^B$	$30,4 \pm 1,32^A$	$33,59 \pm 0,95^A$
STR (%)	$34,8 \pm 14,5^B$	$65 \pm 3,23^A$	$69,2 \pm 1,23^A$
LIN (%)	$29,8 \pm 12,93$	$39,1 \pm 5,03$	$40,5 \pm 2,51$
Movimento progressivo (%)	$0,3 \pm 0,21^B$	$2,7 \pm 0,78^B$	$28,4 \pm 2,10^A$
Rápidos (%)	$0,5 \pm 0,4^B$	$6,9 \pm 1,99^B$	$52,5 \pm 3,79^A$
Médios (%)	$0,5 \pm 0,3^B$	$2,9 \pm 0,99^B$	$8,5 \pm 2,2^A$
Lentos (%)	$5,8 \pm 2,94^B$	$25,3 \pm 6,2^A$	$17,1 \pm 1,33^{AB}$
Células estáticas (%)	$93,3 \pm 3,45^A$	$64,6 \pm 6,6^B$	$21,6 \pm 5,17^C$

4.3.2 Gotas citoplasmáticas proximais e distais

Nas amostras recuperadas da cabeça do epidídimo, observamos maior porcentagem de células com gota citoplasmática proximal quando comparada aos demais segmentos (Tabela 6). Além disso, as amostras oriundas da cauda do epidídimo apresentaram maior porcentagem de gotas citoplasmáticas distais (Tabela 6).

Tabela 6 – Porcentagem de gota citoplasmática proximal e distal em amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. (A-C) Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

	Cabeça	Corpo	Cauda
Gota proximal (%)	$80 \pm 3,09^A$	$6,6 \pm 3,74^B$	$4,9 \pm 2,24^B$
Gota distal (%)	$6,5 \pm 1,13^C$	$70,6 \pm 4,42^B$	$82,9 \pm 4,151^A$

4.3.3 Integridade das membranas acrossomal e plasmática

Não foi possível observar diferenças significativas entre os segmentos do epidídimo na porcentagem de células com integridade das membranas acrossomal e plasmática (AIMI), assim como na porcentagem de células com acrossoma íntegro e membrana plasmática lesada (AIML, Tabela 7). Entretanto, amostras espermáticas do corpo apresentaram maior número de células com acrossomo lesionado e membrana íntegra (ALMI), bem como maior porcentagem de células com as membranas acrossomal e plasmática lesadas (ALML) em comparação aos espermatozoides provenientes da cabeça do epidídimo (Tabela 7).

Tabela 7 - Integridade das membranas acrossomal e plasmática de amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. (A, B) Diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

	Cabeça	Corpo	Cauda
ALMI (%)	$1,58 \pm 0,2^B$	$4,03 \pm 0,79^A$	$1,11 \pm 0,16^B$
ALML (%)	$5,65 \pm 0,81^B$	$11,3 \pm 2,27^A$	$8,02 \pm 1,92^B$
AIML (%)	$29,79 \pm 5,26$	$36,6 \pm 5,1$	$36,52 \pm 5,95$
AIMI (%)	$62,99 \pm 5,9$	$48,05 \pm 7,12$	$54,34 \pm 7,52$

4.3.4 Susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida

A porcentagem de células com fragmentação de DNA em espermatozoides recuperados da cabeça, corpo e cauda do epidídimo não diferiram estatisticamente ($4,05 \pm 1,52\%$; $3,07 \pm 1,27\%$; $4,03 \pm 1,06\%$, respectivamente).

4.3.5 Avaliação do *status* oxidativo

Não foram observadas diferenças significativas nas amostras provenientes dos distintos segmentos epididimários em relação à porcentagem de células com menor produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) associada à menor permeabilidade de membrana ($25,87 \pm 6,91\%$; $31,71 \pm 5,84\%$ e $21 \pm 5,38\%$; CNML, Figura 6).

Além disso, observamos maior permeabilidade de membrana associada à menor produção de EROs (CNML) nos espermatozoides provenientes do corpo e cauda do epidídimo em relação às células recuperadas da cabeça do epidídimo ($28,60 \pm 5,85\%$; $53,3 \pm 3,79\%$ e $63,3 \pm 4,55\%$; Figura 6). Por outro lado, observamos maior produção de EROs e menor permeabilidade de membrana (CPMI) nos espermatozoides oriundos da cabeça do epidídimo ($42,2 \pm 6,82\%$; $7,63 \pm 0,75\%$ e $9,87 \pm 2,07\%$; Figura 6).

Por fim, espermatozoides do corpo do epidídimo apresentaram células com maior produção de EROs associada à maior permeabilidade de membrana (CPML) em comparação às células provenientes dos demais segmentos ($3,31 \pm 0,49\%$; $22,67 \pm 14,03\%$ e $5,77 \pm 1,93\%$; Figura 6).

Figura 6: *Status* oxidativo em amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. CNMI: Células negativas para CellROX® e membrana impermeável; CNMP: Células negativas para CellROX® e membrana permeável; CPMI: Células positivas para CellROX® e membrana impermeável; CPMP: Células positivas para CellROX® e membrana permeável. (A, B) Diferentes letras sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

4.3.6 Potencial de membrana mitocondrial

Não houveram diferenças estatísticas nas amostras provenientes dos diferentes segmentos epididimários em relação à alto PMM ($40,57 \pm 8,57\%$; $21,98 \pm 8,34\%$ e $30,4 \pm 6,89\%$; Figura 7) e intermediário PMM ($29,15 \pm 9,16\%$; $26,14 \pm 7,77\%$ e $22,54 \pm 4,24\%$; Figura 7).

As amostras epididimárias do corpo apresentaram maior porcentagem de células com baixo PMM em comparação aos demais segmentos. As amostras da cauda não diferiram estatisticamente em relação às amostras da cabeça e do corpo ($30,25 \pm 5,15\%$; $51,86 \pm 7,65\%$ e $47 \pm 8,49\%$; Figura 7).

Figura 7: Potencial de Membrana Mitocondrial de amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. População de espermatozoides com alto, intermediário e baixo Potencial de Membrana Mitocondrial. (A, B) Diferentes letras sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

4.3.7 Atividade Mitocondrial

Observamos maior porcentagem de células com alta atividade mitocondrial (DAB - Classe I) em amostras espermáticas da cabeça ($55,1 \pm 3,24\%$) em relação as amostras do corpo ($36,4 \pm 4,7\%$), porém, não diferiu em relação à cauda ($49,5 \pm 6,26\%$). Além disto, não observamos diferença entre as amostras epididimárias ($36 \pm 1,95\%$, $41,9 \pm 4,37\%$, $33,1 \pm 4,27\%$) com atividade mitocondrial intermediária (DAB – Classe II) (Figura 8).

As amostras do corpo apresentaram maior porcentagem de células com baixa atividade mitocondrial (DAB – Classe III) em comparação aos espermatozoides coletados da cabeça do epidídimo. Por outro lado, as amostras da cauda não diferiram significativamente em relação aos demais segmentos ($8,4 \pm 1,88\%$; $18,7 \pm 1,3\%$ e $13 \pm 3,11\%$) (Figura 8).

As amostras da cauda apresentaram maior porcentagem de células ($5,8 \pm 2,4\%$) com ausência de atividade mitocondrial (DAB – Classe IV), sendo que as amostras do corpo ($3 \pm 0,82\%$) apresentaram resultados semelhantes às amostras da cabeça e da cauda ($0,5 \pm 0,26\%$) (Figura 8).

Figura 8: Atividade mitocondrial de amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. Dab I: Alta atividade mitocondrial; Dab II: Atividade mitocondrial intermediária; Dab III: Baixa atividade mitocondrial; Dab IV: ausência de atividade mitocondrial. (A, B) Diferentes índices indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

4.3.9 Níveis de ATP

Observou-se maiores níveis de ATP em amostras espermáticas da cauda ($2695,3 \pm 697,86$ nM) do epidídimo, quando comparados às amostras da cabeça ($528 \pm 93,78$ nM) e do corpo ($426,4 \pm 85,43$ nM) (Figura 9).

Figura 9: Níveis de ATP em amostras espermáticas da cabeça, do corpo e da cauda do epidídimo. (A, B) Diferentes índices indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em Média $\pm$ EPM.

Considerando a análise de correlação, foi possível observar nas amostras provenientes da cabeça do epidídimo correlação positiva entre a concentração de ATP e células com maior produção de EROs e membrana íntegra ($r = 0,71$ e $p = 0,05$), bem como entre a porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial e células com maior produção de EROs e membrana lesionada ($r = 0,86$ e $p = 0,005$).

No corpo do epidídimo, observamos correlação positiva entre gota distal e concentração de ATP ($r = 0,75$ e $p = 0,01$), por outro lado, observamos correlação negativa entre a concentração de ATP e gota proximal ($r = -0,86$ e $p = 0,001$). Além disso, foi possível observar correlação positiva também entre células estáticas e ausência de atividade mitocondrial (DAB – Classe IV) ($r = 0,65$ e $p = 0,05$).

Na cauda do epidídimo, observamos correlação positiva entre gota distal e as variáveis: alta atividade mitocondrial (DAB – Classe I) ($r = 0,77$ e $p = 0,01$), motilidade ($r = 0,77$ e $p = 0,01$), acrossomo e membrana íntegros ($r = 0,73$ e $p = 0,05$) e alto potencial de membrana mitocondrial ($r = 0,65$ e $p = 0,05$).

4.4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos o possível papel da gota citoplasmática no *status* metabólico e as modificações funcionais de espermatozoides bovinos durante a maturação epididimária. Neste contexto, observamos alto potencial de membrana mitocondrial (PMM) em amostras espermáticas recuperadas dos três segmentos epididimários. Foi possível observar correlação positiva entre a porcentagem de células com alto PMM e células com maior produção de EROs, em amostras da cabeça do epidídimo, nos sugerindo que a cadeia transportadora de elétrons está ativa desde o início da maturação espermática. Hipotetizamos que mitocôndrias de células imaturas estejam ativas afim de suprir a demanda energética para processos fisiológicos e modificações celulares durante a maturação espermática, como remodelamento de membranas plasmática e acrossomal, e também para eventos pós-ejaculatórios, como capacitação espermática e hiperativação (Cooper, 2011; Mukai & Okuno, 2004).

Apesar de encontrarmos alto PMM em todas as amostras analisadas, os espermatozoides não apresentavam motilidade antes da passagem ao longo do epidídimo. Houve um aumento do número de células com motilidade total e progressiva em amostras da cauda do epidídimo comparado aos demais segmentos. Além disso, foi possível observar maior número de células do corpo com movimentos lentos em relação ao segmento da cauda. Tais resultados nos mostram que houve ativação progressiva da motilidade em espermatozoides epididimários. Entretanto, sugerimos que a mitocôndria possa ter o papel de manter a homeostase celular durante o início da maturação espermática, fornecendo energia para remodelamentos de membrana, e não para a motilidade.

Observamos que a migração da gota citoplasmática para regiões distais em espermatozoides bovinos ocorreu no corpo do epidídimo. Maior porcentagem de gotas citoplasmáticas proximais foram encontradas em amostras do segmento da cabeça em relação aos demais segmentos, diferindo da maior porcentagem de gotas citoplasmáticas distais encontradas em amostras do corpo e cauda do epidídimo. Provavelmente a migração da gota da região proximal (Cabeça) para regiões distais (Corpo e cauda) do espermatozoide pode ter iniciado o movimento flagelar em amostras do corpo do epidídimo que apresentaram movimentos lentos, evidenciando o início da motilidade no segmento. Xu et al. (2013) demonstraram a importância da gota citoplasmática para aquisição da motilidade em espermatozoides de ratos e primatas. Amostras espermáticas que tiveram as gotas retiradas tinham maior porcentagem de células imóveis em comparação ao grupo que teve a gota mantida na célula.

Uma vez que a migração da gota citoplasmática possa influenciar o início da motilidade, era esperado observarmos aumento dos níveis de ATP e produção de EROs. De fato, houve maior concentração de ATP em amostras da cauda do epidídimo em comparação aos demais segmentos. Sugerimos que exista relação entre a migração da gota citoplasmática, aquisição da motilidade e níveis de ATP durante o processo de maturação espermática (Au et al., 2015; Yuan et al., 2013). Em amostras provenientes do corpo do epidídimo, foi possível observar correlação positiva entre gota distal e concentração de ATP. Entretanto, uma correlação negativa entre a concentração de ATP e gota proximal também foi estabelecida. Já em amostras provenientes da cauda do epidídimo, foi possível observar correlação positiva entre gota citoplasmática distal e alta atividade mitocondrial (DAB – Classe I); motilidade; acrossomo e membrana íntegros e alto PMM.

A correlação positiva entre gota distal e concentração de ATP em amostras do corpo do epidídimo nos sugere a importante relação da migração da gota na ativação o metabolismo energético do espermatozoide. A molécula de ATP, principal produto da fosforilação oxidativa e da glicólise, é fundamental para a motilidade espermática, e consequentemente, aquisição da capacidade fecundante (Losano et al., 2017; Mukai & Okuno, 2004). Este resultado também reforça que o início da motilidade aconteça no segmento do corpo do epidídimo (D. S. R. Angrimani et al., 2017). Contudo, a correlação negativa entre gota proximal e concentração de ATP nos sugere que a gota na região proximal do espermatozoide pode desempenhar um papel inibitório na motilidade espermática (Nichi et al., 2007), justificando a ausência de células móveis em amostras espermáticas provenientes da cabeça do epidídimo.

Em amostras espermáticas provenientes da cauda do epidídimo, a correlação positiva entre gota distal e alta atividade mitocondrial, e gota distal e alto PMM, sugere que a gota participe da ativação mitocondrial afim de produzir energia para a motilidade, parâmetro que também apresentou correlação positiva com gota distal. As amostras espermáticas recuperadas da cauda do epidídimo apresentam motilidade, apoiando a correlação positiva apresentada.

Com os níveis de PMM elevados, era esperado haver aumento na produção fisiológica de EROs pelos espermatozoides epididimários. Células espermáticas provenientes do segmento da cabeça do epidídimo apresentaram maior produção de EROs e menor permeabilidade de membrana. Entretanto, espermatozoides oriundos do segmento do corpo apresentaram maior produção de EROs e maior permeabilidade de membrana. Desta forma, reforçamos que a cadeia transportadora de elétrons esteja ativa ao longo do processo de maturação epididimária. A produção de EROs pelas células presentes no corpo do epidídimo foi menor comparada aos demais segmentos. Isso pode ter acontecido devido ao possível papel antioxidante que a gota

citoplasmática distal possa desempenhar, debelando parte das EROs produzidas (Nichi et al., 2007).

Neste trabalho, sugerimos que a gota atue na ativação metabólica de espermatozoides imaturos. Em estudo realizado por Yuan et al. (2013), observaram a presença de enzimas glicolíticas na gota citoplasmática. Além disso, outros trabalhos verificaram a presença de hidrolases lisossomais e enzimas metabólicas, como a lactato desidrogenase, envolvidas no metabolismo energético (Garbers, Wakabayashi, & Reed, 1970; Oko et al., 1993). A presença de tais enzimas na gota citoplasmática pode desempenhar o papel de um sistema de regulação do início da motilidade por meio da geração de ATP pela glicólise, indicando a participação dessa via na produção de energia para motilidade em espermatozoides bovinos imaturos. Estudos mais aprofundados sobre a glicólise devem ser realizados para elucidar a importância de tal via metabólica durante a maturação espermática em bovinos e em eventos pós-ejaculatórios (Mukai & Okuno, 2004; Turner, 2006).

Durante a maturação espermática, alterações morfológicas são específicas à este processo, assim como os remodelamentos de membrana acrossomal e plasmática. Amostras do corpo do epidídimo apresentaram maior porcentagem de células com lesão de acrossoma e membrana plasmática em relação as amostras dos demais segmentos. Estudos mais aprofundados sobre a dinâmica das membranas plasmática e acrossomal durante a maturação descrevem a expressão de diferentes genes ao longo do lúmen do epidídimo, evidenciando a secreção e adesão de diferentes proteínas de membrana plasmática (Fernandez-Fuertes et al., 2016; Narciandi et al., 2011) e acrossomal (Ma et al., 2013). Outras modificações também são observadas, como mudança do perfil lipídico da membrana plasmática (R. Jones, 1998a; R. C. Jones, 1998b; Rejraji et al., 2006) e modificações em glicoproteínas de superfície (Tulsiani, 2006). Desta forma, acreditamos que possa ser errôneo classificar tais parâmetros como lesões de membrana, uma vez que estamos observando alterações fisiológicas em espermatozoides epididimários. Assim, sugerimos que se tratam de alterações de membranas, eventos celulares inerentes ao processo de maturação espermática em diversas espécies e são essenciais para motilidade espermática (D. S. R. Angrimani et al., 2017; Fetic, Yeung, Sonntag, Nieschlag, & Cooper, 2006; Schlegel et al., 1986; Sullivan & Mieusset, 2016). Resultados reforçam que o remodelamento das membranas aconteça no segmento do corpo do epidídimo.

Houve correlação positiva entre gota citoplasmática distal e integridade das membranas acrossomal e plasmática em amostras da cauda. Este resultado nos permite sugerir que a migração da gota citoplasmática pode estar envolvida também nos processos fisiológicos e modificações celulares finais, pertencentes ao processo de maturação espermática.

4.5 CONCLUSÃO

Concluimos que a gota citoplasmática seja essencial para o processo de maturação espermática em bovinos, pois desempenha inúmeras funções importantes ao longo do trânsito epididimário. A migração da gota citoplasmática da região proximal para regiões distais do espermatozoide pode estar relacionada a aquisição da motilidade, aumento da atividade mitocondrial e modificações morfológicas sofridas pelo espermatozoide durante a maturação espermática. Além disso, nossos resultados sugerem que há relação positiva entre os níveis de ATP e gota citoplasmática distal, evidenciando a participação da gota no metabolismo energético de espermatozoides bovinos.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aitken, R. J., Clarkson, J. S., Hargreave, T. B., Irvine, D. S., & Wu, F. C. (1989). Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl*, 10(3), 214-220.

Aitken, R. J., Jones, K. T., & Robertson, S. A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health. *J Androl*, 33(6), 1096-1106. doi: 10.2164/jandrol.112.016535

Alvarez, J. G., Touchstone, J. C., Blasco, L., & Storey, B. T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl*, 8(5), 338-348.

Angrimani, D. S., Losano, J. D., Lucio, C. F., Veiga, G. A., Pereda, M. C., Nichi, M., & Vannucchi, C. I. (2014). Role of residual cytoplasm on oxidative status during sperm maturation in dogs. *Anim Reprod Sci*, 151(3-4), 256-261. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.10.023

Angrimani, D. S. R., Losano, J. D. A., Lucio, C. F., Veiga, G. A. L., Landim, F. C., Nichi, M., & Vannucchi, C. I. (2017). Cytoplasmic droplet acting as a mitochondrial modulator during sperm maturation in dogs. *Anim Reprod Sci*, 181, 50-56. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.03.014

Au, C. E., Hermo, L., Byrne, E., Smirle, J., Fazel, A., Kearney, R. E., . . . Bergeron, J. J. (2015). Compartmentalization of membrane trafficking, glucose transport, glycolysis, actin, tubulin and the proteasome in the cytoplasmic droplet/Hermes body of epididymal sperm. *Open Biol*, 5(8). doi: 10.1098/rsob.150080

Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2010). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*, 2010. doi: 10.4061/2011/686137

BARTH, A. D., OKO, R. J. (1989). Abnormal morphology of bovine spermatozoa. . *Ames: University Press*, 285.

Beutler, E. (1975). Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. *New York: Grune & Stratton*, 112 - 114.

Capucho, C., Sette, R., de Souza Predes, F., de Castro Monteiro, J., Pigoso, A. A., Barbieri, R., . . . Severi-Aguiar, G. D. (2012). Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. *Food Chem Toxicol*, 50(11), 3956-3962. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.027

Castro, L. S., P. M. de Assis, A. F. Siqueira, T. R. Hamilton, C. M. Mendes, J. D. Losano, M. Nichi, J. A. Visintin and M. E. Assumpcao (2016). "Sperm Oxidative Stress Is Detrimental to Embryo Development: A Dose-Dependent Study Model and a New and More Sensitive Oxidative Status Evaluation." *Oxid Med Cell Longev* **2016**: 8213071.

Cooper, T. G. (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod*, 20(1), 9-11. doi: 10.1093/humrep/deh555

Cooper, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl*, 13(1), 130-138. doi: 10.1038/aja.2010.97

Cooper, T. G., & Yeung, C. H. (2003). Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech*, 61(1), 28-38. doi: 10.1002/jemt.10314

de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., & Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*, 2(1), 48-54.

Du Plessis, S. S., Agarwal, A., Halabi, J., & Tvrda, E. (2015). Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J Assist Reprod Genet*, 32(4), 509-520. doi: 10.1007/s10815-014-0425-7

Fernandez-Fuertes, B., Narciandi, F., O'Farrelly, C., Kelly, A. K., Fair, S., Meade, K. G., & Lonergan, P. (2016). Cauda Epididymis-Specific Beta-Defensin 126 Promotes Sperm Motility

- but Not Fertilizing Ability in Cattle. *Biol Reprod*, 95(6), 122. doi: 10.1095/biolreprod.116.138792
- Fetic, S., Yeung, C. H., Sonntag, B., Nieschlag, E., & Cooper, T. G. (2006). Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *J Androl*, 27(2), 294-301. doi: 10.2164/jandrol.05122
- Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*, 1469(3), 197-235.
- Garbers, D. L., Wakabayashi, T., & Reed, P. W. (1970). Enzyme profile of the cytoplasmic droplet from bovine epididymal spermatozoa. *Biol Reprod*, 3(3), 327-337.
- Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2016). The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. *Biomed Res Int*, 2016, 9380609. doi: 10.1155/2016/9380609
- Goncalves, F. S., Barretto, L. S., Arruda, R. P., Perri, S. H., & Mingoti, G. Z. (2010). Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod Domest Anim*, 45(1), 129-135. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01272.x
- Hamilton, T. R., de Castro, L. S., Delgado Jde, C., de Assis, P. M., Siqueira, A. F., Mendes, C. M., . . . D'Avila Assumpcao, M. E. (2016). Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. *Reproduction*, 151(4), 379-390. doi: 10.1530/REP-15-0403
- Hermo, L., Dworkin, J., & Oko, R. (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(2), 107-124. doi: 10.1002/aja.1001830202
- HRUDKA, F. (1987). Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *International Journal of Andrology*, 10(6), 809 - 828.
- Irvine, D. S., Twigg, J. P., Gordon, E. L., Fulton, N., Milne, P. A., & Aitken, R. J. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*, 21(1), 33-44.

- Jones, R. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl*, 53, 73-84.
- Jones, R. C. (1998). Evolution of the vertebrate epididymis. *J Reprod Fertil Suppl*, 53, 163-181.
- Kim, J. G., & Parthasarathy, S. (1998). Oxidation and the spermatozoa. *Semin Reprod Endocrinol*, 16(4), 235-239. doi: 10.1055/s-2007-1016283
- Kobayashi, T., Miyazaki, T., Natori, M., & Nozawa, S. (1991). Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod*, 6(7), 987-991.
- Losano, J., Angrimani, D., Dalmazzo, A., Rui, B. R., Brito, M. M., Mendes, C. M., . . . Nichi, M. (2017). Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. *Reprod Domest Anim*, 52(2), 289-297. doi: 10.1111/rda.12901
- Ma, L., Yu, H., Ni, Z., Hu, S., Ma, W., Chu, C., . . . Zhang, Y. (2013). Spink13, an epididymis-specific gene of the Kazal-type serine protease inhibitor (SPINK) family, is essential for the acrosomal integrity and male fertility. *J Biol Chem*, 288(14), 10154-10165. doi: 10.1074/jbc.M112.445866
- Mukai, C., & Okuno, M. (2004). Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod*, 71(2), 540-547. doi: 10.1095/biolreprod.103.026054
- Narciandi, F., Lloyd, A. T., Chapwanya, A., C, O. F., & Meade, K. G. (2011). Reproductive tissue-specific expression profiling and genetic variation across a 19 gene bovine beta-defensin cluster. *Immunogenetics*, 63(10), 641-651. doi: 10.1007/s00251-011-0551-7
- Nichi, M., Bols, P. E., Zuge, R. M., Barnabe, V. H., Goovaerts, I. G., Barnabe, R. C., & Cortada, C. N. (2006). Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, 66(4), 822-828. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.01.056

Nichi, M., Goovaerts, I. G., Cortada, C. N., Barnabe, V. H., De Clercq, J. B., & Bols, P. E. (2007). Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. *Theriogenology*, 67(2), 334-340. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.08.002

O'Rand, M. G., Hamil, K. G., Adevai, T., & Zelinski, M. (2018). Inhibition of sperm motility in male macaques with EP055, a potential non-hormonal male contraceptive. *PLoS One*, 13(4), e0195953. doi: 10.1371/journal.pone.0195953

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. et al. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351 - 358.

Okabe, M., Ikawa, M., & Ashkenas, J. (1998). Male infertility and the genetics of spermatogenesis. *Am J Hum Genet*, 62(6), 1274-1281. doi: 10.1086/301895

Oko, R., Hermo, L., Chan, P. T., Fazel, A., & Bergeron, J. J. (1993). The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. *J Cell Biol*, 123(4), 809-821.

POPE, C. E., ZHANG, Y. Z., DRESSER, B. L. (1991). A Simple Staining Method for Evaluating Acrosomal Status of Cat Spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 22(1), 87 - 95.

Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J. M., . . . Drevet, J. R. (2006). Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod*, 74(6), 1104-1113. doi: 10.1095/biolreprod.105.049304

Retzius, G. (1909). Die Spermien der Nagetiere. *Biol Untersuch*, XIV, 153 - 156.

Robaire, B., & Viger, R. S. (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod*, 52(2), 226-236.

Schlegel, R. A., Hammerstedt, R., Cofer, G. P., Kozarsky, K., Freidus, D., & Williamson, P. (1986). Changes in the organization of the lipid bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation. *Biol Reprod*, 34(2), 379-391.

Simões, R., Feitosa, W. B., Siqueira, A. F., Nichi, M., Paula-Lopes, F. F., Marques, M. G., . . . Assumpcao, M. E. (2013). Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. *Reproduction*, 146(5), 433-441. doi: 10.1530/REP-13-0123

Sullivan, R., & Mieusset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update*, 22(5), 574-587. doi: 10.1093/humupd/dmw015

Tulsiani, D. R. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Mol Cell Endocrinol*, 250(1-2), 58-65. doi: 10.1016/j.mce.2005.12.025

Turner, R. M. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev*, 18(1-2), 25-38.

Vieira, N. M. G., Losano, J. D. A., Angrimani, D. S. R., Kawai, G. K. V., Bicudo, L. C., Rui, B. R., . . . Nichi, M. (2018). Induced sperm oxidative stress in dogs: Susceptibility against different reactive oxygen species and protective role of seminal plasma. *Theriogenology*, 108, 39-45. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.020

Xu, H., Yuan, S. Q., Zheng, Z. H., & Yan, W. (2013). The cytoplasmic droplet may be indicative of sperm motility and normal spermiogenesis. *Asian J Androl*, 15(6), 799-805. doi: 10.1038/aja.2013.69

Yuan, S., Zheng, H., Zheng, Z., & Yan, W. (2013). Proteomic analyses reveal a role of cytoplasmic droplets as an energy source during epididymal sperm maturation. *PLoS One*, 8(10), e77466. doi: 10.1371/journal.pone.0077466

Zhang, X., & Lin, M. (2002). Tracing sperm acrosome differentiation in the testis and maturation in the epididymis of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) with a 45-kDa acrosome-membrane-associated protein. *Reprod Fertil Dev*, 14(1-2), 69-77.

5 CONCLUSÕES

Concluimos que a gota citoplasmática seja fundamental para o processo de maturação espermática em bovinos, pois está intimamente relacionada com as modificações celulares inerentes ao processo, como aquisição da motilidade e remodelamentos de membrana. Observamos também a participação da gota no *status* oxidativo e metabólico de espermatozoides imaturos, desempenhando proteção antioxidante e atuando como regulador do início da motilidade para células espermáticas do epidídimo. Os resultados obtidos indicam que as enzimas antioxidantes SOD e GPx sejam constantemente requisitadas ao longo do trato epididimário. A junção desses parâmetros nos permitiram caracterizar inicialmente o processo de maturação espermática em bovinos. Mais estudos devem ser realizados para dar continuidade ao presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- Aitken, R. J., Jones, K. T., & Robertson, S. A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health. *J Androl*, 33(6), 1096-1106. doi: 10.2164/jandrol.112.016535
- Aitken, R. J., Nixon, B., Lin, M., Koppers, A. J., Lee, Y. H., & Baker, M. A. (2007). Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl*, 9(4), 554-564. doi: 10.1111/j.1745-7262.2007.00280.x
- Alvarez, J. G., Touchstone, J. C., Blasco, L., & Storey, B. T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl*, 8(5), 338-348.
- Angrimani, D. S., Losano, J. D., Lucio, C. F., Veiga, G. A., Pereda, M. C., Nichi, M., & Vannucchi, C. I. (2014). Role of residual cytoplasm on oxidative status during sperm maturation in dogs. *Anim Reprod Sci*, 151(3-4), 256-261. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.10.023
- Angrimani, D. S. R., Losano, J. D. A., Lucio, C. F., Veiga, G. A. L., Landim, F. C., Nichi, M., & Vannucchi, C. I. (2017). Cytoplasmic droplet acting as a mitochondrial modulator during sperm maturation in dogs. *Animal Reproduction Science*, 181, 50-56. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.03.014
- Au, C. E., Hermo, L., Byrne, E., Smirle, J., Fazel, A., Kearney, R. E., . . . Bergeron, J. J. (2015). Compartmentalization of membrane trafficking, glucose transport, glycolysis, actin, tubulin and the proteasome in the cytoplasmic droplet/Hermes body of epididymal sperm. *Open Biol*, 5(8). doi: 10.1098/rsob.150080
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2010). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*, 2010. doi: 10.4061/2011/686137
- Belleannee, C., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Gatti, J. L., Dacheux, J. L., & Dacheux, F. (2011). Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *J Proteomics*, 74(1), 59-78. doi: 10.1016/j.jprot.2010.07.013
- Capucho, C., Sette, R., de Souza Predes, F., de Castro Monteiro, J., Pigoso, A. A., Barbieri, R., . . . Severi-Aguiar, G. D. (2012). Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. *Food Chem Toxicol*, 50(11), 3956-3962. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.027
- Chaveiro, A., Cerqueira, C., Silva, J., Franco, J., & Moreira da Silva, F. (2015). Evaluation of frozen thawed cauda epididymal sperms and in vitro fertilizing potential of bovine sperm collected from the cauda epididymal. *Iran J Vet Res*, 16(2), 188-193.
- Cooper, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl*, 13(1), 130-138. doi: 10.1038/aja.2010.97

- Cooper, T. G., & Yeung, C. H. (2003). Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech*, 61(1), 28-38. doi: 10.1002/jemt.10314
- Cosentino, M. J., Takihara, H., Burhop, J. W., & Cockett, A. T. (1984). Regulation of rat caput epididymidis contractility by prostaglandins. *J Androl*, 5(3), 216-222.
- de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., & Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*, 2(1), 48-54.
- Du Plessis, S. S., Agarwal, A., Halabi, J., & Tvrda, E. (2015). Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J Assist Reprod Genet*, 32(4), 509-520. doi: 10.1007/s10815-014-0425-7
- Fernandez-Fuertes, B., Narciandi, F., O'Farrelly, C., Kelly, A. K., Fair, S., Meade, K. G., & Lonergan, P. (2016). Cauda Epididymis-Specific Beta-Defensin 126 Promotes Sperm Motility but Not Fertilizing Ability in Cattle. *Biol Reprod*, 95(6), 122. doi: 10.1095/biolreprod.116.138792
- Garbers, D. L., Wakabayashi, T., & Reed, P. W. (1970). Enzyme profile of the cytoplasmic droplet from bovine epididymal spermatozoa. *Biol Reprod*, 3(3), 327-337.
- Girouard, J., Frenette, G., & Sullivan, R. (2011). Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. *Int J Androl*, 34(5 Pt 2), e475-486. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01203.x
- Goncalves, F. S., Barretto, L. S., Arruda, R. P., Perri, S. H., & Mingoti, G. Z. (2010). Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod Domest Anim*, 45(1), 129-135. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01272.x
- Hermo, L., Dworkin, J., & Oko, R. (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(2), 107-124. doi: 10.1002/aja.1001830202
- Hinton, B. T., Lan, Z. J., Rudolph, D. B., Labus, J. C., & Lye, R. J. (1998). Testicular regulation of epididymal gene expression. *J Reprod Fertil Suppl*, 53, 47-57.
- Jow, W. W., Steckel, J., Schlegel, P. N., Magid, M. S., & Goldstein, M. (1993). Motile sperm in human testis biopsy specimens. *J Androl*, 14(3), 194-198.
- Kobayashi, T., Miyazaki, T., Natori, M., & Nozawa, S. (1991). Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod*, 6(7), 987-991.
- Losano, J., Angrimani, D., Dalmazzo, A., Rui, B. R., Brito, M. M., Mendes, C. M., . . . Nichi, M. (2017). Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(2), 289-297. doi: 10.1111/rda.12901

- Nichi, M., Goovaerts, I. G., Cortada, C. N., Barnabe, V. H., De Clercq, J. B., & Bols, P. E. (2007). Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. *Theriogenology*, 67(2), 334-340. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.08.002
- O'Rand, M. G., Hamil, K. G., Adevai, T., & Zelinski, M. (2018). Inhibition of sperm motility in male macaques with EP055, a potential non-hormonal male contraceptive. *PLoS One*, 13(4), e0195953. doi: 10.1371/journal.pone.0195953
- Oko, R., Hermo, L., Chan, P. T., Fazel, A., & Bergeron, J. J. (1993). The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. *J Cell Biol*, 123(4), 809-821.
- Rahman, M. B., Vandaele, L., Rijsselaere, T., Maes, D., Hoogewijs, M., Frijters, A., . . . Van Soom, A. (2011). Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. *Theriogenology*, 76(7), 1246-1257. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.05.031
- Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J. M., . . . Drevet, J. R. (2006). Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod*, 74(6), 1104-1113. doi: 10.1095/biolreprod.105.049304
- Retzius, G. (1909). Die Spermien der Nagetiere. *Biol Untersuch*, XIV, 153 - 156.
- Robaire, B., & Viger, R. S. (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod*, 52(2), 226-236.
- Schlegel, R. A., Hammerstedt, R., Cofer, G. P., Kozarsky, K., Freidus, D., & Williamson, P. (1986). Changes in the organization of the lipid bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation. *Biol Reprod*, 34(2), 379-391.
- Sullivan, R., Frenette, G., & Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl*, 9(4), 483-491. doi: 10.1111/j.1745-7262.2007.00281.x
- Sullivan, R., & Mieusset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update*, 22(5), 574-587. doi: 10.1093/humupd/dmw015
- Tulsiani, D. R. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Mol Cell Endocrinol*, 250(1-2), 58-65. doi: 10.1016/j.mce.2005.12.025
- Vieira, N. M. G., Losano, J. D. A., Angrimani, D. S. R., Kawai, G. K. V., Bicudo, L. C., Rui, B. R., . . . Nichi, M. (2018). Induced sperm oxidative stress in dogs: Susceptibility against different reactive oxygen species and protective role of seminal plasma. *Theriogenology*, 108, 39-45. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.020
- Xu, H., Yuan, S. Q., Zheng, Z. H., & Yan, W. (2013). The cytoplasmic droplet may be indicative of sperm motility and normal spermiogenesis. *Asian J Androl*, 15(6), 799-805. doi: 10.1038/aja.2013.69

Yuan, S., Zheng, H., Zheng, Z., & Yan, W. (2013). Proteomic analyses reveal a role of cytoplasmic droplets as an energy source during epididymal sperm maturation. *PLoS One*, 8(10), e77466. doi: 10.1371/journal.pone.0077466