DANIEL DE SOUZA RAMOS ANGRIMANI

Estudo da maturação epididimária em cães

São Paulo

2013

DANIEL DE SOUZA RAMOS ANGRIMANI

Estudo da maturação epididimária em cães

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

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2013

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.2884
FMVZ

Angrimani, Daniel de Souza Ramos

Estudo da maturação epididimária em cães. / Daniel de Souza Ramos Angrimani. -- 2013.
148 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi.

1. Maturação espermática. 2. Epidídimos. 3. Proteômica. 4. Ácidos graxos. 5. Cães. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da maturação epididimária de espermatozoides em cães", protocolado sob o nº 2277/2011, utilizando 5 (cinco) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Camila Infantosi Vannucchi, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Study of epididymal sperm maturation in dogs", protocol number 2277/2011, utilizing 5 (five) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Camila Infantosi Vannucchi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 30 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ANGRIMANI, Daniel de Souza Ramos

Título: Estudo da maturação epididimária em cães

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

DATA ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Ao meu amor,
À minha família,
Aos meus grandes amigos,
E aos meus mestres,*

*"Memories make me want to go back there,
All the memories make me want to go back there,
All the memories, how can we make it back there,
I want to be there again"*

(Weezer – Memories)

AGRADECIMENTOS

Uuufa! Etapa concluída! Foram muitas gotas de suor, noites mal dormidas, viagens, km rodados, risadas, momentos de estresse, MUITOS momentos divertidos e cheios de aprendizado tanto para o âmbito profissional quanto para o pessoal! Todavia, esse trabalho ainda seria uma espermatozônia se não fosse pela ajuda de VOCÊS! Assim, queria agradecer a todas essas pessoas especiais pela amizade, dedicação, esforço e por terem acreditado em mim. Pois hoje eu sou uma pessoa muito mais MADURA! E podem ter certeza que valeu a pena!

Primeiramente agradeço a **Famiglia Angriman!** Mãe e pai, muito obrigado por me fazerem do jeito que eu sou! **Mãe**, você me deu a criatividade, a paixão e a emoção! **Pai**, você me ensinou a pensar, a me dedicar e a imaginar! E vocês dois me ensinaram a sonhar e a atingir meus *goals*! **Dami**, minha irmã fedorenta! Você sabe que eu te amo (*since 1987*)! Valeu pelo seu apoio incondicional! Muito obrigado a todos vocês!

She was the one – for me; she open my eyes - to see. **Cami**, eu fui obrigado a citar os *Stereophonics* pra dizer que graças a você eu consigo enxergar além... Além da mesmice, da rotina e da chuva. Porque você é aquela que me inspira, motiva e enobrece. Obrigado por existir e ter a paciência que você tem comigo, porque eu sei que não é fácil! L.U.B. (simples assim).

A **Batz, Pepe** e a **Tia Berê**, pelas lambidas, abanadas de rabo e amassadas de pãozinho.

Ao **Brunão**, porque o Brunão é simplesmente o Brunão! Aquele que a AMIZADE transcendeu para IRMANDADE, que está do meu lado quando vaza gasolina do Celta Bandido, quando rufio ovelha, quando tenho que marcar 300 spots e estava lá mesmo quando tínhamos dezenove anos e escutávamos *rock n' roll* em uma cidade do interior do Paraná. *Never change who you are, M.F.*

A Professora, Prô, Orientadora ou simplesmente Mestre! **Professora Camila**, obrigado por ter confiado em mim este trabalho e pela oportunidade de fazer parte do seu grupo! Prô, eu já era seu fã muito antes de vir para USP, depois que virei seu aluno me tornei fã de carteirinha, não só pela exímia profissional que você é, mas por você sempre lutar, comprar nossas brigas, buscar o melhor para todos nós e principalmente por me ensinar a NUNCA desistir. Obrigado mesmo!

Ao Mestre de Ofício, PROFESSOR **Marcílio**! Se o *Will* tinha o *Halt*, pode ter certeza que eu tenho você! Agradeço pelos ensinamentos técnicos e pelas memórias! Pela noite em claro dosando os lipídios e CLARO que pelas noites jogando pôquer. Pelas inúmeras estatísticas, delineamentos, risadas, introduções, objetivos, hipóteses, resultados e conclusões! Pelos livros emprestados, correções e colocações. E obviamente pela orientação e amizade! Se o VRA é uma família, você é a enzima catalisadora dessa reação!

Às **Garotas LIAPP**! **Cris**, você ensinou praticamente tudo o que eu sei de sêmen! Você sabia que se não fosse você nada disso teria acontecido? Obrigado do fundo do coração por acreditar em mim, me ajudar na citometria e fazer parte do meu dia a dia! *Girl, you rock!* **Li**, como não me lembrar de você usando touca de banho, blusa roubada (hehe) e macacão “ovino” enquanto ressuscitava um neonato?! Obrigado por todos os ensinamentos e conselhos! **Fer**, você me ensinou a interpretar citologia vaginal! Graças a você que hoje eu sei o que é um ESTRO! Muito obrigado pelas aulas, risadas, companhia em viagens e no laboratório! Inverte o gráfico, aumenta o SD, diminui a escala, RI igual a 0,7... FREEZAAA! **Gi**, esse doppler é pra você! Foram noites sem dormir, ovelhas geniosas, campanhas de castração em comunidades isoladas e dezenas de cirurgias juntos, mas o mais importante foram os conselhos, as risadas e as aventuras, obrigado por ter me ajudado a deixar de ser mais um estagiário! **Clau**, obrigado pelo suporte, piadas, trilhões de dosagem de antioxidantes e obviamente pelas sessões de terapia! **Dona Teresa** por sempre deixar o laboratório brilhando! E as meninas **Häagen**, **Dazs** e **Winnie**, pela zooterapia diária!

Aos **ICs**, os nossos braços anexos! **Ricardinho**, você foi comigo de Guaianazes à Salvador! Obrigado pela ajuda nas campanhas, pelas inúmeras concentrações espermáticas, por confiar o Bianco a este projeto e principalmente pela AMIZADE, continue assim! **Maíra**, laminas de eosina/nigrosia e pope não se fazem sozinhas, né? Obrigado pela ajuda no projeto, companhia, amizade e por sempre me fazer rir.

Ao **Diego** pela ajuda neste projeto (e nos outros três mil), por ser meu *brother* de viagens, projetos mirabolantes, bandejão e pôquer (onde você precisa melhorar). E ao **Gi...Vago**, meu amigo de pós/vida, CA, bandejão, pôquer e de bilhões de gargalhadas.

À ELITE! **Tis** e **Queijinho** vocês sabem que eu gosto tanto de vocês que chego a odiar, né? Obrigado por enriquecerem a minha vida e deixarem ela ainda mais sensacional! E aos meus amigos da vida! **Cicinho, Capponi, Ju, Alemão, Allan, Aruã e Cocorita!** Por sempre me receberem de braços abertos, me ouvindo rir, chorar ou gritar... E por no fim sempre acabarmos com uma latinha na mão cantando: *Memories...*

As Famílias **Assada** (Marlene, Lino e Renato), **Bastos** (Dona Teresa e Seo Manoel) e **Capponi** (Márcia, Marco e Marina), por aqueles finais de semana em que não pude estar perto da minha Família, vocês estavam comigo!

A todos os envolvidos nas **campanhas de castração** em que busquei minhas amostras, obrigado por abrirem as portas! Agradeço em especial o João, Raquel, Maria José, Rafa, Arthur, Nani, Dona Helguinha e o Everton!

A **FZEA-USP**, principalmente a Professora Lara e ao Rui (Libidão) pelas sorologias e principalmente pela amizade e eficácia!

A **UNIFESP-Campus Diadema**, em especial a Profa. Monica e Profa. Suzete e aos alunos Renan, Carla, Pedro, Myrceia e Jane por me ajudarem no perfil proteico das minhas amostras! E a **Profa. Fabíola** por ter sido a porta de entrada na faculdade e por ter “fornecido” o n=22 desse experimento! Muito obrigado!

A **FMRP-USP**, especialmente ao Prof. Dr. Hélio, Monica, Giba, Márcia, Carina e Gabriela por me ajudarem no perfil lipídico das minhas amostras!

A **UNESP – Campus Botucatu**, principalmente aos funcionários da Central de Microscopia Eletrônica, e em especial a Claudete e também a Profa. Fernanda, pelos ensinamentos e paciência!

A **Família Vannucchi**, ao Dr. Hélio, Dra. Maria Terezinha, ao Paulo e a pequena Helena! Muito obrigado pela hospitalidade e por me propiciarem uma semana tão necessária ao meu experimento!

A todos os **professores do VRA**, em especial ao Prof. Ricardo, Profa. Eneiva Carla, Profa. Mayra, Prof. Marcelo, e obviamente, a querida Profa. Claudia! Agradeço pelos preciosos ensinamentos! E também agradeço a todos da **Família VRA** pela amizade, parcerias em experimentos e churrascos, em especial a Hamilton, Fura, Febem, Mari, Gaúcho, Leticia, Patricia, Kitty, Brunão, Karboxy, Andressa, Carol e Brau. E também aos amigos de Pira! Klebão, Sax, Miltão, Arroz, Gaúcho, Everton (Lenda), Roberta (Boberta), Feer, Batissaco, Doci, Shirley e Gi. E em especial ao **Zequinha**, que se não fosse por você eu não teria vivido nada disso!

Aos proprietários e aos **22 cães** que participaram desse experimento, especialmente **Bianco, Zeus, Kevin, Toddy, Otto, Lino, Oscar, Pingo** (*em memória*) e **Juca!** Suas amostras foram muito bem aproveitadas! Obrigado!

A **Dra. Fabiana Ferreira de Souza** e ao **Dr. Ricardo Pimenta Bertolla** por fazerem parte da banca examinadora deste trabalho.

Aos **funcionários do VRA** Harumi, Miguel, Camilla, Thais, Roberta, Luiz, Ira, Belau, Dona Sandra e Joci.

A todos os **funcionários da biblioteca** da FMVZ e da **comissão de pós-graduação** pela ajuda nas horas de apuro.

A **Universidade de São Paulo** e a **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** que possibilitou este mestrado.

E a **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro.

EPÍGRAFE

*I've got another confession to make. I'm your fool;
Everyone's got their chains to break. Holdin' you;
Were you born to resist or be abused?
Is someone getting the best, the best, the best, the best of you?*

*Are you gone and onto someone new?
I need somewhere to hang my head
Without your noose
You gave me something that I didn't have
But had no use
I was too weak to give in. Too strong to lose;
My heart is under arrest again. But I break loose;
My head is giving me life or death. But I can't choose;
I swear I'll never give in. I refuse;*

*Is someone getting the best, the best, the best, the best of you?
Has someone taken your faith?
It's real, the pain you feel
You trust, you must. Confess;
Is someone getting the best, the best, the best, the best of you?*

*Has someone taken your faith?
It's real, the pain you feel. The life, the love;
You die to heal. The hope that starts;
The broken hearts. You trust, you must. Confess;
Is someone getting the best, the best, the best, the best of you?*

*I've got another confession, my friend. I'm no fool;
I'm getting tired of starting again. Somewhere new;
Were you born to resist or be abused?
I swear I'll never give in. I refuse;*

*Is someone getting the best, the best, the best, the best of you?
Has someone taken your faith?
It's real, the pain you feel. You trust, you must. Confess;
Is someone getting the best, the best, the best, the best of you?*

(Foo Fighters – Best of You)

RESUMO

ANGRIMANI, D. S. R. **Estudo da maturação epididimária em cães.** [Epididymal maturation in dogs]. 2013. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A hipótese desta pesquisa foi que a maturação epididimária dos espermatozoides caninos envolve modificações nas proteínas e ácidos graxos do fluido sintetizado pelos distintos segmentos epididimários, além de alterações no perfil de ácidos graxos da membrana plasmática, organização celular e morfológica dos espermatozoides. Para tanto, este projeto foi realizado com 20 cães em idade reprodutiva e negativos para *Brucella canis*. Após a orquiectomia bilateral, os testículos e epidídimos foram acondicionados a 5°C por no máximo 24 horas, em seguida, as amostras foram colhidas por incisões na cauda, corpo e cabeça do epidídimo. As amostras foram imediatamente processadas por avaliação subjetiva e automática da motilidade e vigor espermático, concentração, morfologia espermática, integridade da membrana plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial. Foi possível observar determinar maior número de espermatozoides dentro da normalidade na cauda do epidídimo, especialmente, referindo-se à motilidade, integridade de membrana e atividade mitocondrial. A avaliação das modificações ultraestruturais dos espermatozoides permitiu observar a migração da gota citoplasmática e alterações acrossomais. No perfil de ácidos graxos observaram-se variações na quantidade e presença dos ácidos durante o trajeto epididimário, destacando o acréscimo do DHA na região da cauda epididimária. Ainda, no perfil protéico do plasma epididimário canino, foi possível identificar um padrão regional de secreção de proteínas, maior nas regiões da cabeça e corpo em relação à cauda do epidídimo. Apesar das importantes informações geradas a partir do presente trabalho, mais estudos são necessários para a compreensão da fisiologia reprodutiva, especialmente da maturação espermática epididimária na espécie canina.

Palavras-chave: Maturação espermática. Epidídimos. Proteômica. Ácidos Graxos. Cães.

ABSTRACT

ANGRIMANI, D. S. R. **Epididymal maturation in dogs**. [Estudo da maturação epididimária em cães]. 2013. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The hypothesis of this research is that the canine maturation of epididymal spermatozoa involves progressive changes in the protein and fatty acid content of the fluid synthesized by the different epididymal segments, as well as changes in the fatty acid profile of the sperm plasma membrane, cell organization and morphology of the canine sperm. Therefore, this experiment was conducted with 20 dogs in reproductive age and free of *Brucella canis*. After bilateral orchiectomy, testes and epididymis were stored at 5°C for up to 24 hours and then the samples were harvested through incisions of the tail, corpus and caput of the epididymis. The samples were immediately processed for subjective and automatic motility and sperm vigor, sperm count, morphology, plasma membrane integrity, acrosomal and mitochondrial activity. It was possible to observe a greater number of mature sperm in the epididymal tail compared to the corpus and caput, especially referring to motility, membrane integrity and mitochondrial activity. The evaluation of ultrastructural changes of the spermatozoa allowed to observed the migration of the cytoplasmic droplets and acrosomal changes. In the fatty acid profile was observed variations in the amount and presence of acids during epididymal maturation, highlighting the addition of DHA in the epididymal tail region. Moreover, in the protein profile of the canine epididymal plasma, it was possible to identify a regional pattern of protein secretion, higher in the caput and corpus in relation to the tail epididymis. In spite of the important data generated from this study, further studies are needed for understand the reproductive physiology, especially the epididymal sperm maturation in dogs.

Keywords: Sperm maturation. Epididymis. Proteomic. Fatty Acids. Dogs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental inicial	47
Figura 2 – Delineamento experimental do Capítulo 1 (Análises Espermáticas)	56
Figura 3 – Avaliação da permeabilidade de membrana plasmática (%) (eosina/nigrosina), integridade acrossomal (<i>fast green</i> /rosa bengala - %) e motilidade espermática subjetiva (%) dos espermatozoides epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013	59
Figura 4 – Espermatozoide proveniente do corpo do epidídimo em corte longitudinal apresentando descolamento de acrossomo (Seta A).....	60
Figura 5 – Espermatozoides provenientes do corpo do epidídimo em corte longitudinal apresentando gota proximal (Seta A) e acrossomo dilatado (Seta B)	60
Figura 6 – Espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo em corte longitudinal apresentando gota distal (Seta A) e reação acrossomal (Seta B)	61
Figura 7 – Avaliação do potencial mitocondrial (sonda JC-1) por citometria de fluxo, nos espermatozoides epididimários provenientes das distintas regiões epididimárias (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013	64
Figura 8 – Fenômeno da migração da gota citoplasmática da região proximal a distal da peça intermediária do espermatozoide entre os diferentes segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013	65
Figura 9 – Espermatozoides provenientes do corpo do epidídimo em corte longitudinal apresentando gota distal (Seta A), descolamento de acrossomo (Seta B) e acrossomo dilatado (Seta C)	67
Figura 10 – Espermatozoide proveniente do corpo do epidídimo em corte longitudinal apresentando gota distal (Seta A) e acrossomo dilatado (Seta B)	68
Figura 11 – Espermatozoide proveniente da cauda do epidídimo em corte longitudinal apresentando integridade morfológica.	68
Figura 12 – Delineamento Experimental do Capítulo 2	79
Figura 13 - Pico cromatográfico expressivo (Seta A) de ácidos graxos presentes em membrana plasmática de espermatozoides de ratos no Grupo 1,5M, em análise por cromatografia gasosa	81
Figura 14 – Concentração de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e do docosa-	

hexaenoico (DHA) nos espermatozoides e fluido epididimário de cães, nos diferentes segmentos do epidídimo (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013	85
Figura 15 – Posicionamento da fita IPG (Seta A), com amostras diluídas em solução de reidratação em aparelho Protean IEF Cell (Bio-Rad)	100
Figura 16 – Fita IPG (Seta A) e eletrodo <i>wicks</i> corado com padrão molecular (Seta B) no topo do gel de poliacrilamida	104
Figura 17 – Fita de IPG e eletrodo <i>wicks</i> corado com padrão molecular sobre gel de poliacrilamida selado com a solução de agarose 0,5% (Seta A)	104
Figura 18 – Corrida de géis, apresentando a faixa de agarose 0,5% (corada com azul de bromofenol) na região medial do gel (Seta A), com aproximadamente três horas de corrida.....	105
Figura 19 – Detecção de spots marcados (Seta A), indicando que a corrida e coloração ocorreram dentro do esperado	106
Figura 20 – Identificação de spot de proteína, na região da cabeça do epidídimo, utilizando o recurso do <i>3D Viewer</i> do <i>Pd Quest Basic</i> . São Paulo, 2013	107
Figura 21 – Distribuição dos spots de proteínas nos segmentos do corpo e cauda do epidídimo. São Paulo, 2013	110
Figura 22 – Distribuição dos spots de proteínas nos segmentos da cabeça e cauda do epidídimo. São Paulo, 2013.....	111
Figura 23 – Distribuição dos spots detectados nos segmentos da cabeça e cauda do epidídimo. São Paulo, 2013.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Poder de Teste e respectivas unidades experimentais (n) necessárias, por grupo, nas comparações entre os grupos experimentais (Cabeça, corpo e cauda do epidídimo) de maior e menor diferença, respectivamente. São Paulo, 2013.....	43
Tabela 2 – Idade, peso e raça dos cães selecionados para os grupos experimentais (n=22). São Paulo, 2013	44
Tabela 3 – Animais reagrupados de acordo com o método de randomização para a formação do novo grupo amostral (n=10). São Paulo, 2013	57
Tabela 4 – Valores médios e desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras ou lesadas na avaliação por citometria de fluxo das sondas FITC/PI em espermatozoides oriundos dos três segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013.....	62
Tabela 5 – Valores médios e desvios padrão da concentração e vigor espermático em distintas regiões epididimárias (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013	63
Tabela 6 – Valores médios e desvios padrão da atividade mitocondrial (DAB - %) nos espermatozoides oriundos dos três segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013.....	63
Tabela 7 – Valores médios e desvios padrão dos defeitos morfológicos (Eosina / Nigrosina - %) dos espermatozoides provenientes dos distintos segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013.....	65
Tabela 8 – Valores médios e desvios padrão das variáveis obtidas por análise computadorizada do sêmen (CASA) em espermatozoides oriundos dos três segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013.....	69
Tabela 9 – Animais reagrupados de acordo com a concentração espermática, para a formação dos pools (n=5). São Paulo, 2013.....	82
Tabela 10 – Perfil de ácidos graxos (mg/dL) no fluido epididimário oriundo dos distintos segmentos do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) de cães. São Paulo, 2013.....	87
Tabela 11 – Perfil de ácidos graxos (mg/dL) nos espermatozoides oriundos dos distintos segmentos do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) de cães. São Paulo, 2013.....	89

Tabela 12 – Perfil de ácidos graxos (mg/dL) nos espermatozoides e fluido oriundos da cabeça do epidídimo de cães. São Paulo, 2013.....	90
Tabela 13 – Perfil de ácidos graxos (mg/dL) nos espermatozoides e fluido oriundos do corpo do epidídimo de cães. São Paulo, 2013.....	91
Tabela 14 – Perfil de ácidos graxos (mg/dL) nos espermatozoides e fluido oriundos da cauda do epidídimo de cães. São Paulo, 2013.....	92
Tabela 15 – Amostras dos grupos CAUDA e CORPO, reagrupadas de acordo com a concentração de proteína total, para a formação dos <i>pools</i> (n=5). São Paulo, 2013.....	98
Tabela 16 – Amostras do Grupo CABEÇA reagrupadas de acordo com a concentração de proteína total, para a formação dos <i>pools</i> (n=4). São Paulo, 2013	99
Tabela 17 – Preparo do gel de Poliacrilamida 12,5%. São Paulo, 2013.....	102
Tabela 18 – Concentração de proteína total (ng/mL), número total de spots de proteínas, spots de proteínas <i>matched</i> e porcentagem (%) de spots de proteínas <i>matched</i> avaliados pelo <i>Pd Quest 8.0.1</i> nos distintos segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013.....	109

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	<i>MATURAÇÃO EPIDIDIMÁRIA</i>	<i>27</i>
2.1.1	Anatomia dos epidídimos.....	27
2.1.2	O fluído epididimário	28
2.1.2.1	Secreção e Absorção Epididimal.....	28
2.1.2.2	Ação dos Espermatozoides.....	29
2.1.2.3	Composição Lipídica.....	29
2.1.2.4	Composição Proteica	30
2.1.3	Espermatozoides epididimários	31
2.1.3.1	Motilidade Espermática	31
2.1.3.2	Migração da Gota Citoplasmática	32
2.1.3.3	Acrossomo	33
2.1.3.4	Defeitos Morfológicos dos Espermatozoides Epididimários.....	34
2.1.3.5	Mitocôndrias Espermáticas	35
2.1.3.6	Membrana Plasmática	36
2.1.4	Perspectivas decorrentes do estudo da maturação epididimária ..	37
3	HIPÓTESE	40
4	MATERIAL E MÉTODOS INICIAL	42
4.1	<i>PROJETO PILOTO</i>	<i>42</i>
4.1.1	Análise do Poder de Teste	42
4.2	<i>ANIMAIS</i>	<i>44</i>
4.3	<i>SOROLOGIA PARA BRUCELOSE</i>	<i>45</i>
4.4	<i>COLHEITA DAS AMOSTRAS E COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....</i>	<i>45</i>
4.5	<i>PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....</i>	<i>46</i>
4.6	<i>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL INICIAL</i>	<i>47</i>
5	ANÁLISES ESPERMÁTICAS	49
5.1	<i>MATERIAL E MÉTODOS.....</i>	<i>49</i>
5.1.1	Análises Espermáticas Convencionais	49

5.1.1.1	Avaliação Subjetiva da Motilidade e Vigor Espermáticos	49
5.1.1.2	Concentração Espermática	50
5.1.1.3	Análise Computadorizada do Sêmen (CASA)	50
5.1.1.4	Morfologia Espermática.....	51
5.1.2	Testes Espermáticos Funcionais.....	51
5.1.2.1	Integridade Acrossomal.....	51
5.1.2.2	Atividade Mitocondrial	52
5.1.2.3	Citometria de Fluxo	53
5.1.2.3.1	<i>Integridade Acrossomal e de Membrana Plasmática dos Espermatozoides</i>	<i>53</i>
5.1.2.3.2	<i>Potencial Mitocondrial dos Espermatozoides</i>	<i>54</i>
5.1.3	Análise Estatística	54
5.1.4	Delineamento Experimental – Análises Espermáticas (Capítulo 1).....	56
5.1.5	Análise Ultraestrutural.....	57
5.1.5.1	Animais e Grupos Experimentais	57
5.1.5.2	Preparo da Amostra	58
5.2	RESULTADOS.....	58
5.3	DISCUSSÃO	71
6	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	78
6.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	78
6.1.1	Delineamento Experimental (Capítulo 2).....	79
6.1.2	Padronização 1 - Cães	80
6.1.3	Padronização 2 - Ratos.....	80
6.1.4	Grupos Experimentais	81
6.1.5	Transesterificação	82
6.1.6	Padrão de Ácidos Graxos.....	83
6.1.7	Análise Estatística	83
6.2	RESULTADOS.....	84
6.3	DISCUSSÃO	92
7	PROTEÔMICA.....	97
7.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	97

7.1.1	Etapa 1 - Preparo das Amostras	97
7.1.1.1	Dosagem de Proteína Total	98
7.1.1.2	Precipitação de Proteínas	99
7.1.2	Etapa 2 – Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)	99
7.1.2.1	Reidratação das Fitas	100
7.1.2.2	Focalização Isoelétrica.....	101
7.1.2.3	Armazenamento das Fitas	101
7.1.3	Etapa 3 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (Segunda Dimensão)	101
7.1.3.1	Preparação do Gel de Poliacrilamida	102
7.1.3.2	Reequilíbrio das Fitas	102
7.1.3.3	Eletroforese.....	103
7.1.3.4	Fixação dos Géis	105
7.1.4	Etapa 4 – Detecção de Proteínas	105
7.1.4.1	Coloração dos Géis.....	105
7.1.4.2	Descoloração dos Géis	106
7.1.5	Análise das Imagens.....	107
7.1.5.1	Análise Estatística.....	107
7.2	RESULTADOS.....	108
7.3	DISCUSSÃO.....	112
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
9	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS	124

Introdução

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2012, o Brasil ocupou o segundo lugar na escala de faturamento do mercado *pet* mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. O crescimento, em comparação a 2011, foi de 11,42%, o qual corresponde a um faturamento superior a 14 bilhões de reais (ABINPET, 2013). Verifica-se, notoriamente, o interesse cada vez maior da população pelo bem estar e saúde animal, principalmente nos animais de companhia, segmento que se integram os cães. Porém, acompanhando o interesse por saúde, alimentação e higiene, atualmente o perfil do mercado almeja maiores conhecimentos, como por exemplo, a reprodução canina. Portanto, tornou-se desafio desenvolver novas biotecnologias aplicadas para aperfeiçoar a reprodução de animais de alto valor zootécnico (THOMASSEN; FARSTAD, 2009).

Para o desenvolvimento de biotécnicas aplicadas à reprodução canina, estudos da fisiologia são de suma importância, para que tornem base científica de referência nos canídeos (FARSTAD, 2000). Ainda, ressalta-se que os cães são modelo biológico de caninos selvagens e, particularmente, no estudo da reprodução humana, substituindo estas espécies em metodologias experimentais (KIRCHHOFF, 2002). Os cães são considerados como metodologia experimental ideal à espécie humana, pois estão sujeitos a afecções semelhantes ao homem, como por exemplo, alterações genéticas (KIRCHHOFF, 2002). Na teriogenologia humana, os cães podem servir às pesquisas envolvendo enfermidades testiculares, tais como a varicocele e, para os epidídimos, comprovou-se que o cão é a espécie mamífera com maior semelhança ao homem no tocante à expressão gênica (IVELL et al., 1998; KIRCHHOFF, 2002).

Os cães, são empregados como modelo experimental de canídeos selvagens. No Brasil, há diversos animais em risco de extinção, tais como o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) (BRASIL, 2003). Logo, na eventual morte de representantes destas espécies, a recuperação e criopreservação do material genético são de extrema importância para sua preservação (BAINBRIDGE; JABBOUR, 1998). Por este motivo, os estudos científicos objetivam a recuperação e análise dos espermatozoides colhidos diretamente do epidídimo, permitindo o uso deste material genético *post-mortem* ou

após orquiectomia. Tal material biológico poderá ser empregado na reprodução de espécies ameaçadas, em animais de alto valor zootécnico e até mesmo para o homem (THOMASSEN; FARSTAD, 2009). Além disto, o estudo das modificações ocorridas durante o transito dos espermatozoides pelo epidídimo permitirá o desenvolvimento de contraceptivos masculinos (alternativa para a orquiectomia e vasectomia) e a melhoria e incremento de biotécnicas reprodutivas, tais como, a injeção intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI) (MA et al., 2013).

Assim, urgem maiores elucidações sobre o ambiente epididimário dos caninos, visto que as informações científicas ainda são escassas e muitas vezes abrangem o epidídimo de forma pouco específica. Sabe-se que durante o percurso epididimário, os espermatozoides passam por diversas alterações morfofuncionais, tais como: ganho da motilidade progressiva, modificações na membrana plasmática e acrosomal e habilidade de reconhecimento e ligação ao oócito (JERVIS; ROBAIRE, 2001).

Nos mamíferos em geral, os lipídios da membrana plasmática do espermatozoide estão relacionados a propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, funcionais dos espermatozoides. O conteúdo lipídico da membrana plasmática tem origem nas espermatogônias e é modificado durante os processos de espermatogênese e maturação espermática (JONES, 1998). Tal conjunto de modificações permite que o espermatozoide ultrapasse o estado imóvel e infértil para uma célula vigorosamente ativa e apta a se ligar de modo específico ao oócito (JONES, 1998; JERVIS; ROBAIRE, 2001). Deste modo, na maturação espermática, a membrana plasmática modela-se de acordo com as alterações morfo-funcionais pelas quais o espermatozoide atravessa. É apenas no último estágio da maturação epididimária que a membrana plasmática assume sua forma final e sua composição terminal (JONES, 1998).

Simultaneamente a tais alterações da membrana lipídica dos espermatozoides durante a maturação epididimária, os atributos de motilidade modificam-se gradativamente, desde a imotilidade ou vibração a movimentos progressivos (JERVIS; ROBAIRE, 2001). Em relação ao acrossomo, estudos sugerem que as secreções epididimárias o estabilizam, de tal forma que ao completar a maturação espermática, a membrana acrossomal estará mais estável (LAKOSKI et al., 1988; VARESI et al., 2013). De fato, na cabeça do epidídimo, em primatas e marsupiais, encontra-se o acrossomo ainda imaturo, diferentemente do

observado na cauda do epidídimo (SIVASHANMUGAM; RAJALAKSHMI, 1997; LIN, M.; RODGER, 1999).

Os referidos processos de biotransformação correspondem à maturação espermática mediada por secreções do epitélio seminífero que irão compor o fluído epididimário (SCHIMMING; VICENTINI, 2001). Contudo, a composição exata do plasma epididimário dos cães, assim como as modificações específicas que ocorrem nos espermatozoides ainda não foram integralmente estabelecidos e elucidados, sendo necessários estudos específicos para a melhoria da fertilidade e das biotecnologias reprodutivas na espécie (DE SOUZA; BARRETO; LOPES, 2007).

Em face do exposto, o objetivo geral do presente estudo é:

1 – Estudar a maturação espermática de forma temporal nos segmentos epididimários, com respeito à composição química e modificações morfológicas dos espermatozoides caninos;

E os objetivos específicos são:

- 1 - Determinar o perfil de ácidos graxos da membrana plasmática dos espermatozoides e do fluído epididimário de forma temporal nos distintos segmentos do epidídimo;
- 2 - Determinar a atividade mitocondrial e acrossomal dos espermatozoides, bem como a motilidade espermática durante a maturação no epidídimo.
- 3 - Correlacionar os achados físico-químicos com a morfologia espermática nos distintos segmentos epididimários;
- 4 - Identificar as proteínas do plasma epididimário canino, contribuindo para maior compreensão dos aspectos fisiológicos da maturação espermática.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Embora a presente pesquisa esteja debruçada especificamente nos cães, a abrangente revisão de literatura da maturação espermática se faz necessária, visando a apresentar as particularidades do evento fisiológico.

2.1 MATURAÇÃO EPIDIDIMÁRIA

Nos mamíferos, a maturação espermática ocorre durante o trajeto pelo epidídimo, com a interação entre o espermatozoide e os componentes presentes no fluído epididimário (JERVIS; ROBAIRE, 2001).

2.1.1 Anatomia dos epidídimos

O epidídimo de mamíferos é dividido anatomicamente em: cabeça, corpo e cauda (ZHANG et al., 2003). A cabeça do epidídimo encontra-se firmemente anexada ao testículo, local de confluência dos ductos eferentes ao ducto do epidídimo. Este último prossegue pelo corpo epididimário em posição medial-longitudinal ao testículo. A cauda do epidídimo é o local de estocagem das células até o momento da ejaculação, pois o ducto epididimal irá se unir ao ducto deferente (CHANDLER; SINOWATZ; PIERREPOINT, 1981).

O comprimento do ducto do epidídimo pode variar de acordo com a espécie, sendo, nos cães, de aproximadamente 5 a 8 metros (SCHIMMING; VICENTINI, 2001). Além de ser responsável pelo transporte dos espermatozoides, o ducto epididimal é imprescindível para a maturação espermática, pois as secreções de suas células estruturais irão compor o fluído epididimário (BELLEANNEE; THIMON; SULLIVAN, 2012).

2.1.2 O fluído epididimário

O microambiente epididimal é isolado do sangue pela barreira hemato-epididimária, desta forma, sua regulação funcional ocorre localmente (FOUCHECOURT et al., 2000). O controle das secreções do epitélio epididimal é mediado por hormônios esteroides, principalmente a dihidrotestosterona (LEGARE et al., 1999a). De maneira geral, o plasma epididimário é constituído por lipídeos e proteínas secretados e absorvidos pelos epidídimos, além da ação direta do espermatozoide sob as secreções do epitélio epididimal (GUYONNET et al., 2011).

2.1.2.1 Secreção e Absorção Epididimal

A atividade secretória dos epidídimos apresenta-se regionalizada em sítios anatômicos específicos (cabeça, corpo e cauda), caracterizados por atividade secretória exclusiva, conforme descrito no homem (BELLEANNEE et al., 2012), rato (CARVELLI et al., 2013), camundongo (VERNON et al., 1982), carneiro (TAJIK; MIRSHOKRAEE; KHOSRAVI, 2007), bovino (BELLEANNEE et al., 2011b), suíno (SUKURA et al., 2002) e felino (AXNER, 2006). Para os cães, tal característica ainda não está completamente definida. Embora se acredite que a composição do fluido epididimário é semelhante entre as espécies, há diferenças espécie-específicas nas funções, tais como a glicosilação, proteólise e composição de proteínas (BELLEANNEE et al., 2011b). Portanto, estudos aprofundados sobre a maturação epididimária em cada espécie animal ainda são necessários.

Sabe-se que a concentração dos fluidos do epidídimo diminui gradativamente de acordo com o transito epididimário, havendo maior perda de líquidos na região da cabeça (BELLEANNEE et al., 2011b). Em relação à reabsorção iônica dos íons Na^+ e Cl^- , há menor concentração na região da cauda do epidídimo. Por outro lado, a concentração de K^+ aumenta no referido segmento (CRABO, 1965; LEVINE; MARSH, 1971). A redução dos níveis de Na^+ e Cl^- propicia maior estabilidade ao

espermatozoide, já que tais íons, quando em níveis elevados, estimulariam a capacitação espermática e reação do acrossomo (FRASER; UMAR; SAYED, 1993)

De forma semelhante ao controle osmótico do lúmen epididimário, a concentração de proteínas depende de atividades opostas, tais como síntese e secreção de proteínas; e reabsorção e degradação proteica. Na região da cabeça do epidídimo, destaca-se a reabsorção e degradação, já que as proteínas provenientes do testículo (p.e.: albumina, transferrina e clusterina) são removidas do fluido epididimário (DACHEUX; GATTI; DACHEUX, 2003; DACHEUX et al., 2009). Não obstante, a cabeça do epidídimo também é considerada a região responsável pela maior secreção de proteínas (BROOKS, 1987; BELLEANNEE et al., 2011b). Segundo Daucheux et al. (2006), a reabsorção proteica pode variar segundo a espécie de estudo, pois em humanos, por exemplo, a albumina e transferrina estão presentes por todo o ducto epididimário.

2.1.2.2 Ação dos Espermatozoides

Em estudo com epidídimos de ratos, Garret, Garret e Douglass (1990) explanam que, além da ação direta das secreções do epidídimo no espermatozoide, a célula espermática regula diretamente as secreções provenientes do epitélio epididimal. O mesmo fenômeno foi encontrado por Reys-Moreno et al. (2008) em estudo *in vitro* com espermatozoides bovinos. Os autores observaram que os espermatozoides são capazes de estimular a secreção proteica das células do epitélio epididimário, indicando que o próprio espermatozoide exerce papel fundamental na composição do fluído epididimário.

2.1.2.3 Composição Lipídica

A composição lipídica do fluído epididimário é essencial para a maturação dos espermatozoides. Sabe-se que os lipídeos presentes no plasma epididimário

contribuem para as modificações na membrana plasmática das células espermáticas durante a maturação, garantindo sua proteção durante as modificações estruturais (POULOS; WHITE, 1973) e habilitando o espermatozoide à fecundação (GULAYA et al., 2001). Todavia, os mecanismos envolvidos nas mudanças dos fosfolipídeos de membrana dos espermatozoides continuam parcialmente elucidados. Acredita-se, porém, na transferência de fosfolipídeos e proteínas do fluido epididimário para as células espermáticas (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985). Saez et al. (2007), em estudo com ratos *knockout* para receptores para oxisteróis (derivados do colesterol), observaram alterações no perfil lipídico da região da cabeça do epidídimo e diminuição na expressão de genes ligados ao metabolismo de ácidos graxos, demonstrando o papel fundamental dos lipídeos na regulação da função epididimal.

2.1.2.4 Composição Proteica

Como o espermatozoide sofre condensação do DNA por ação das protaminas, porém é incapaz de sintetizar proteínas pela sua maquinaria celular, sua maturação é mediada por proteínas secretadas pelo epitélio epididimal (BELLEANNE et al., 2011b). Assim, durante o trânsito pelos epidídimos, os espermatozoides entram em contato com os distintos ambientes bioquímicos específicos, os quais alteram a funcionalidade e a morfologia das células espermáticas (LEGARE et al., 1999a). Dentre os diferentes componentes bioquímicos, destacam-se as proteínas pertencentes ao fluido epididimal, as quais se associam à superfície dos espermatozoides alterando sua funcionalidade ou morfologia (FOUCHECOURT et al., 2000). As alterações nas proteínas estruturais da membrana dos espermatozoides atuam como complexos de sinalização para as proteínas sintetizadas pelas células epiteliais dos epidídimos, que por sua vez, irão modificar o perfil proteico dos espermatozoides (CORNWALL, 2009).

Foram observadas diversas proteínas no plasma epididimário de roedores como, por exemplo, a clusterina (SYLVESTER et al., 1991), SPAG 11 (YENUGU et al., 2006), P26h (LEGARE et al., 1999a) e SED 1, esta última relacionada com a ligação ao oócito, já que age diretamente no acrossomo (ENSSLIN; SHUR, 2003).

Em humanos, foram descritas proteínas (HEL 75) do fluído epididimal relativas à defesa antimicrobiana (LIN et al., 2008). Em cães, por outro lado, não há estudos específicos da ação de proteínas na maturação epididimária.

A concentração e local de síntese variam de acordo com cada proteína (FOUCHECOURT et al., 2000). Todavia, as secreções proteicas obedecem a um parâmetro de importância fisiológica. Portanto, as proteínas secretadas na cabeça e corpo do epidídimo são relacionadas à aquisição de motilidade espermática e potencial de ligação ao oócito, já na cauda do epidídimo, as proteínas sintetizadas atuam na manutenção dos espermatozoides, pois estes devem permanecer aptos à fecundação mesmo após diversos dias de armazenamento (LEGARE et al., 1999b; BELLEANNEE et al., 2011b). Desta maneira, é imperativo o estudo diferencial das modificações do ambiente epididimário conforme sua região anatômica e sua possível influência funcional e morfológica nos espermatozoides.

2.1.3 Espermatozoides epididimários

Durante o transito pelas regiões da cabeça, corpo e cauda dos epidídimos, os espermatozoides sofrem importantes modificações morfofuncionais (FOUCHECOURT et al., 2000), as quais permitem adquirir motilidade progressiva, por alterações mitocondriais, migrar a gota citoplasmática da região proximal para distal da peça intermediária e estabilizar a membrana plasmática e acrossomal (AMANN; HAMMERSTEDT; VEERAMACHANENI, 1993; JERVIS; ROBAIRE, 2001).

2.1.3.1 Motilidade Espermática

Para habilitar a célula espermática à fecundação, o ganho de motilidade deve acontecer durante sua passagem pelo epidídimo (BELLEANNEE et al., 2011b). Logo, é observada imotilidade em espermatozoides provenientes do testículo e

aquisição de motilidade progressiva, velocidade e linearidade de acordo com o transito epididimário (DEVI; SHIVAJI, 1994; MARTINEZ-PASTOR et al., 2005).

De fato, Yeung, Oberlander e Cooper (1992), em estudo com espermatozoides epididimários de ratos, observaram, com o auxílio da análise computadorizada de espermatozoides (CASA), que as células espermáticas provenientes da cabeça do epidídimo possuíam imotilidade, baixos índices de velocidade linear Progressiva (VSL), velocidade média da trajetória (VAP) e retilinearidade (STR). Por outro lado, os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo apresentaram superioridade de tais índices. Ainda, os referidos autores relatam que o ganho de motilidade espermática ocorreu no corpo do epidídimo, gradualmente até a cauda epididimária. Os mesmos resultados foram observados em estudo com espermatozoides epididimários de hamsters, ademais ao aumento gradual entre cabeça, corpo e cauda da linearidade (LIN), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) e motilidade progressiva (DEVI; SHIVAJI, 1994).

As bases químicas envolvidas nos processos de aquisição da motilidade espermática continuam pouco compreendidas. Acredita-se que as alterações em membrana plasmática e transporte iônico estejam relacionados a tal processo (ACOTT; KATZ; HOSKINS, 1983). Serres e Kann (1984), em estudo com espermatozoides da cabeça do epidídimo de hamsters, mostraram a função da proteína FMF (*forward motility protein*) na promoção da motilidade espermática. Semelhante resultado foi observado em células espermáticas bovinas por Acott, Katz e Hoskins (1983).

2.1.3.2 Migração da Gota Citoplasmática

Durante o processo de espermatogênese, a maior parte do citoplasma é fagocitado pelas células de Sertoli, e apenas um pequeno resíduo permanece no espermatozoide, denominado gota citoplasmática. Durante o trânsito pelos epidídimos, a gota citoplasmática migra ao longo dos espermatozoides (COOPER, 2011). Todavia, o segmento epididimário específico no qual a migração ocorre pode

variar segundo a espécie animal (COOPER; YEUNG, 2003). Em felinos, a migração da gota citoplasmática ocorre na região distal do corpo epididimário (AXNER; LINDE-FORSBERG; EINARSSON, 1999). Já em carneiros, suínos, coelhos e touros, a migração ocorre na região média do corpo do epidídimo (AMANN; HAY; HAMMERSTEDT, 1982; BRIZ et al., 1995; PEREZSANCHEZ; TABLADO; SOLER, 1997; TAJIK; ARMAN; TAKTAZ, 2007). Segundo Varesi et al. (2013), em cães, a maior porcentagem de gotas proximais localiza-se no segmento da cabeça do epidídimo e a migração para a região distal ocorre no corpo epididimário. Portanto, é frequente a incidência de gotas citoplasmáticas distais em espermatozoides oriundos da cauda do epidídimo. Porém, vale ressaltar que, na maioria das espécies, a gota é perdida após a ejaculação (AXNER; HOLST; LINDE-FORSBERG, 1998).

O mecanismo exato para a migração da gota citoplasmática permanece incerto. Entretanto, acredita-se que a migração ocorra por pressão exercida de forças mecânicas envolvidas no lúmen epididimário durante os movimentos peristálticos, aliados à alta concentração espermática do local (COOPER; YEUNG, 2003).

2.1.3.3 Acrossomo

Dentre todas as modificações morfofuncionais que o espermatozoide atravessa durante o percurso pelo epidídimo, aquela que irá influenciar diretamente a fecundação oocitária é a alteração acrossomal (LAKOSKI et al., 1988). O acrossomo é uma organela situada na cabeça do espermatozoide, originalmente formado de vesículas produzidas no aparelho de Golgi. Sua estrutura formada por enzimas digestivas facilitam a penetração da célula espermática no oócito (ZHANG, X.; LIN, 2002).

Durante o trânsito epididimário, observa-se a remodelação da estrutura acrossomal, ocorrendo redução de seu tamanho (HEWITT et al., 2001). Varesi et al. (2013), em estudo com espermatozoides epididimários caninos, observaram redução no número de alterações na membrana acrossomal entre a cabeça, corpo e a cauda do epidídimo, justificada pela remodelação dimensional do acrossomo. Tal processo

foi observado inicialmente em estudo clássico de Bedford (1963), o qual avaliou espermatozoides epididimários de coelhos. Por outro lado, Axner, Linde-Forsberg e Einarsson (1999) sugerem que a diminuição no número de acrossomos anormais na cauda do epidídimo em felinos ocorre por mecanismo de fagocitose de células anormais nesta região. Portanto, as modificações acrossomais no âmbito epididimário ainda precisam ser melhor estudadas para o estabelecimento da dinâmica fisiológica envolvida.

2.1.3.4 Defeitos Morfológicos dos Espermatozoides Epididimários

As alterações morfológicas dos espermatozoides ejaculados classificadas como defeitos menores estão relacionados ao transporte e armazenamento dos espermatozoides no epidídimo. Durante o trajeto entre cabeça e cauda do epidídimo, fisiologicamente, ocorre decréscimo do número de espermatozoides anormais. Porém, a explicação fisiológica para este fenômeno é desconhecida, pois pode decorrer da própria maturação celular ou da remoção de células anormais (VARESI et al., 2013). Rao, Bande e Gustafsson (1980) apontam que a cauda do epidídimo é o local onde ocorre a reabsorção seletiva (por fagocitose) ou a dissolução de células com defeitos, sendo os espermatozoides mais suscetíveis à fagocitose aqueles que possuem os defeitos morfológicos de cabeça piriforme, estreitamento na base e cabeça subdesenvolvida.

Em estudo sobre maturação epididimária de espermatozoides felinos, Axner (2006) relata o decréscimo do número de defeitos espermáticos ao longo do epidídimo e destaca que o fenômeno pode ser explicado pela reabsorção seletiva. O mesmo autor, ainda, observou que espermatozoides imaturos possuem altos teores de creatinina fosfoquinase (CPK), a qual pode servir como sinalizador para as células fagocíticas. Por outro lado, espermatozoides maduros possuem membrana plasmática rígida que evita sua eliminação no epidídimo (AXNER et al., 2002). Assim, a habilidade dos epidídimos em modificar a morfologia espermática é uma função interessante que deve ser levada em consideração para avaliar o potencial reprodutivo do macho (RAO; BANE; GUSTAFSSON, 1980).

2.1.3.5 Mitocôndrias Espermáticas

Durante a espermatogênese e na maturação espermática ocorrem processos peculiares de diferenciação celular e reestruturações dos componentes celulares à medida que a célula imóvel é transformada em espermátide e, em seguida, em espermatozoide com motilidade (YAFFE, 1997). Dentre tais modificações, a mitocôndria tem papel fundamental.

As mitocôndrias são responsáveis por, aproximadamente, 90% da produção de energia celular, a qual ocorre por processo de fosforilação oxidativa. Além disto, esta organela é responsável pela maior parte da produção endógena de espécies reativas ao oxigênio (ROS), sendo assim, considerada a reguladora de apoptose celular (COPELAND, 2002). As mitocôndrias geram adenosina trifosfato (ATP) pela fosforilação oxidativa, por metabolismo anaeróbico ou aeróbico. Na célula espermática, as mitocôndrias localizam-se apenas na peça intermediária, formando a bainha mitocondrial e produzindo ATP pela respiração aeróbica (CUMMINS; JEQUIER; KAN, 1994).

Para o espermatozoide iniciar a motilidade flagelar, é preciso grande quantidade de ATP, distribuído por todo o flagelo em curto espaço de tempo. Assim, pesquisas recentes na espécie ovina, suína, equina e canina teorizam que ocorra um mecanismo compensatório de geração de ATP, tais como a presença de estoques de glicogênio e a efetivação da gliconeogênese pela célula espermática (PALOMO et al., 2003; TURNER, R. M., 2003). As mitocôndrias também agem no processo de seleção espermática ao longo do trajeto pelos epidídimos, determinando a apoptose celular de espermatozoides indesejáveis ou danificados que serão reabsorvidos (SAKKAS et al., 1995). A apoptose celular inicia-se com a redução do potencial de membrana mitocondrial decorrente da fragmentação do DNA nuclear, aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio e, por fim, ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática (KROEMER; ZAMZAMI; SUSIN, 1997).

Segundo Amann, Hammerstedt e Veeramachaneni (1993), as mitocôndrias, em conjunto com a membrana plasmática, passam por diversas modificações durante a maturação espermática de suma importância para a transdução eficiente de ATP e aquisição de motilidade espermática. Dentre tais modificações, destaca-se a fosforilação da tirosina, inicialmente na peça intermediária e, em seguida, na cauda do espermatozoide. Este seria o evento inicial para a fosforilação de diversas proteínas mitocondriais, gerando, assim, o potencial mitocondrial (PENA et al., 2009). Na região do corpo epididimário ocorrem as principais alterações de membrana plasmática, concomitantemente ao início do ganho de motilidade e também à maior produção de ATP pelas mitocôndrias espermáticas. As mitocôndrias permanecem em estágio silencioso na cabeça do epidídimo e em alta atividade na cauda, indicando o ganho de potencial mitocondrial no corpo epididimário (AITKEN et al., 2007). Gallon et al. (2006), em estudo utilizando a citometria de fluxo em espermatozoides humanos, sugerem que o alto potencial mitocondrial está intimamente relacionado à capacidade de fertilização espermática.

2.1.3.6 Membrana Plasmática

As modificações na membrana plasmática são importantes transformações em nível epididimário, decorrentes da maturação da célula espermática (LAKOSKI et al., 1988). As remodelações da membrana plasmática ocorrem nas regiões da cabeça, corpo e cauda do epidídimo, mudanças extremamente necessárias para a integridade celular e fecundação (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985; PETRUSZAK; NEHME; BARTLES, 1991).

Em função das alterações na membrana plasmática, os espermatozoides são capazes de adquirir a motilidade espermática (ACOTT; KATZ; HOSKINS, 1983) e o potencial mitocondrial (AMANN; HAMMERSTEDT; VEERAMACHANENI, 1993). Além disto, as mudanças na composição lipídica da membrana plasmática no epidídimo promovem estabilização da membrana para a estocagem e transporte dos espermatozoides no trato reprodutivo, além da reorganização molecular necessária para capacitação no trato reprodutivo feminino (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985).

Corroborando tais afirmações, Ammann, Hammerstedt e Veeramachaneni (1993) relataram que, nas primeiras regiões epididimárias, a membrana plasmática é flexível, com o intuito de facilitar a remodelação necessária. Desta forma, o espermatozoide permanece estável e é capaz de suportar as injúrias do armazenamento na cauda do epidídimo ao final do processo de maturação espermática, além de estar apto à fecundação.

A composição da membrana lipídica ao final da maturação espermática pode variar de acordo com a espécie, mas, comumente, é constituída por 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros (como o colesterol) e 5% de glicolipídios (FLESCH; GADELLA, 2000). Contudo, o mecanismo exato de estruturação da membrana plasmática deve ser investigado, pois acredita-se que ocorram mudanças na composição dos ácidos graxos estruturais dos espermatozoides, devido às transferências de fosfolipídeos e proteínas presentes no fluído epididimário para a célula espermática (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985; FOUCHECOURT et al., 2000).

2.1.4 Perspectivas decorrentes do estudo da maturação epididimária

Diante das distintas informações científicas arroladas nesta revisão de literatura, cabem algumas considerações com o intuito de reforçar o potencial científico para o estudo da maturação espermática nos epidídimos.

Os espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo, em condições controladas de reprodução assistida, podem gerar resultados semelhantes as células do ejaculado. Desta maneira, são interessantes alternativas para as biotecnologias da reprodução em cães (YU; LEIBO, 2002), tais como a inseminação artificial a fresco (KLINC et al., 2005) ou a criopreservação (HORI et al., 2004). O emprego deste material em tais biotecnologias apresenta grande importância na disseminação do material genético dos canídeos, pois a criopreservação possibilita o armazenamento do material genético *post-mortem*, utilizando-se a técnica de colheita de espermatozoides epididimários (THOMASSEN; FARSTAD, 2009).

Por tais motivos, as pesquisas que objetivam elucidar a fisiologia espermática e dos epidídimos em cães podem gerar protocolos e técnicas específicas para a

recuperação, transporte e armazenamento de amostras epididimárias. Assim, são importantes para a criação de bancos de germoplasma de canídeos selvagens, contribuindo para a preservação destas espécies (TITTARELLI et al., 2006). Ademais, os estudos em espermatozoides epididimários podem colaborar para o desenvolvimento de biotecnologias tais como o estabelecimento de protocolos de maturação e fecundação *in vitro* e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (TRAVIS; KIM; MEYERS-WALLEN, 2009).

Hipótese

3 HIPÓTESE

A maturação epididimária dos espermatozoides caninos envolve modificações progressivas nas proteínas e ácidos graxos do fluido presente nos distintos segmentos epididimários, além de alterações no perfil de ácidos graxos da membrana plasmática, na organização celular e morfológica dos espermatozoides.

Material e Métodos Inicial

4 MATERIAL E MÉTODOS INICIAL

O presente experimento foi realizado segundo as normas de bem estar animal, sendo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) (protocolo nº2277/2011).

4.1 PROJETO PILOTO

Inicialmente, foi realizado um projeto piloto com o intuito de obter o número amostral adequado para o presente experimento. Foram utilizadas amostras de 12 cães e os resultados obtidos foram analisados estatisticamente para a obtenção do poder de teste.

4.1.1 Análise do Poder de Teste

A análise do poder de teste foi feita pelo aplicativo Analyst do SAS System for Windows (SAS, 2000), utilizando valores de médias e desvios padrão provenientes de resultados do projeto piloto. A partir de amostras espermáticas oriundas da cabeça, corpo e cauda do epidídimo, foram selecionadas as variáveis correspondentes à porcentagem de espermatozoides em alta atividade mitocondrial (DAB - Classe I), porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e porcentagem de espermatozoides com acrossomo lesado. A descrição metodológica das referidas técnicas, bem como os resultados e a respectiva discussão estão detalhadamente elucidados no capítulo 1 da presente dissertação.

Para tanto, foram utilizadas duas comparações para cada variável; aquela em que houve a maior diferença entre os grupos (cabeça, corpo e cauda do epidídimo) e aquela em que houve a menor diferença entre os grupos (Tabela 1). Foi possível

observar que, a despeito das variáveis de menor diferença entre os grupos (DAB I: cabeça vs. corpo; membrana íntegra: corpo vs. cauda; acrossomo lesado: corpo vs. cauda), o número de animais preconizado por grupo estava abaixo do utilizado no projeto piloto ($n=12$), pois para um poder de teste de 0,80, seriam necessários no máximo 5 animais por grupo. Em contrapartida, para um poder de teste de 0,99, o número amostral necessário seria de, no máximo, 9 animais por grupo. Neste caso, o número de animais nas variáveis: DAB – Classe I, membrana íntegra e acrossomo lesado, já ultrapassava o valor necessário. Contudo, como o presente experimento contava com outras variáveis-resposta, optou-se por aumentar o número de animais com o objetivo de assegurar o valor científico, sendo o número amostral definido em 21 cães.

Tabela 1 - Poder de Teste e respectivas unidades experimentais (n) necessárias, por grupo, nas comparações entre os grupos experimentais (Cabeça, corpo e cauda do epidídimo) de maior e menor diferença, respectivamente. São Paulo, 2013

	DAB – Classe I		Membrana Íntegra		Dano Acrossomal	
Poder do Teste	Cabeça vs. Cauda	Cabeça vs. Corpo	Cabeça vs. Cauda	Corpo vs. Cauda	Cabeça vs. Cauda	Corpo vs. Cauda
0.80	3	5	3	5	3	4
0.90	3	6	4	5	3	4
0.91	3	6	4	5	3	4
0.92	3	6	4	5	3	4
0.93	3	7	4	5	4	4
0.94	3	7	4	6	4	4
0.95	3	7	4	6	4	5
0.96	3	7	4	6	4	5
0.97	3	8	4	6	4	5
0.98	4	8	4	6	4	5
0.99	4	9	4	7	4	5

4.2 ANIMAIS

Após ser estabelecido o número mínimo de animais, foram selecionados 22 cães, de acordo com a idade reprodutiva, ou seja, faixa etária de 1 a 6 anos, de distintas raças e portes (Tabela 2).

Tabela 2 - Idade, peso e raça dos cães selecionados para os grupos experimentais (n=22). São Paulo, 2013

Identificação	Raça	Peso	Idade
Cão 1	SRD	19,6kg	1 ano
Cão 2	Labrador	26,6kg	3 anos
Cão 3	SRD	6,4kg	1 ano
Cão 4	SRD	7,8kg	5 anos
Cão 5	Poodle	12,8kg	5 anos
Cão 6	SRD	18kg	3 anos
Cão 7	SRD	12,6kg	2 anos
Cão 8	SRD	7,8kg	1 ano
Cão 9	SRD	12,8kg	2 anos
Cão 10	SRD	14,6kg	2 anos
Cão 11	SRD	10,5kg	2 anos
Cão 12	SRD	5,5kg	1 ano
Cão 13	SRD	17,9kg	2 anos
Cão 14	Labrador	48kg	6 anos
Cão 15	SRD	19,9kg	3 anos
Cão 16	Pastor Branco	40kg	2 anos
Cão 17	SRD	11,9kg	2 anos
Cão 18	Pastor de Shetland	14,8kg	6 anos
Cão 19	Schnauzer	7,6kg	6 anos
Cão 20	SRD	7,5kg	1 ano
Cão 21	Cane Corso	45kg	3 anos
Cão 22	SRD	13,7kg	1 ano

4.3 SOROLOGIA PARA BRUCELOSE

Com o escopo de manipular amostras apenas de cães livres de Brucelose, todos os animais selecionados tiveram 3 mL de sangue coletados em tubo com gel separador. O sangue foi centrifugado a 6000 x g por 15 minutos em temperatura ambiente sendo o soro armazenado a -20°C para posterior análise.

As análises foram realizadas na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), utilizando-se o teste *Antigen Rapid Canine Brucella Ab Test* (Bioeasy, Minas Gerais-Brasil), que apresenta alta especificidade, identificando os anticorpos IgG anti-*Brucella canis*. Como resultado, observou-se que apenas o cão 9 foi positivo para o agente, sendo, portanto, retirado do experimento, totalizando o número final de 21 animais (Figura 1).

4.4 COLHEITA DAS AMOSTRAS E COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os testículos e epidídimos dos 21 cães selecionados foram colhidos em campanhas de castração em diversos municípios da grande São Paulo, ou em orquiectomias eletivas realizadas no Laboratório de Inseminação Artificial, Perinatologia e Patologia da Reprodução (LIAPP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), no período de maio de 2012 a fevereiro de 2013.

Após a orquiectomia bilateral, os epidídimos foram conservados a 5°C por no mínimo 18 horas e no máximo 24 horas, até o processamento no laboratório. De acordo com Hori et al. (2009), não há efeito deletério quando os epidídimos são armazenados a 4°C por até 24 horas.

Os espermatozoides e o fluido epididimário foram colhidos por meio de pequenas incisões (<1 mm) na cauda, corpo e cabeça do epidídimo, com auxílio de uma lâmina de bisturi. As amostras extraídas foram aspiradas com pipeta automática e, então, depositadas em 300 µl de PBS (solução salina em tampão fosfato),

conforme procedimento previamente descrito (KAABI et al., 2003). Os tubos contendo apenas PBS foram pesados antes (tubo + PBS) e após a adição das amostras (tubo + PBS + fluído e espermatozoides do epidídimo), com o objetivo de calcular posteriormente o fator de diluição das amostras. Em função do reduzido volume recuperado do epidídimo, as amostras experimentais correspondem à junção do material obtido dos epidídimos esquerdo e direito do mesmo animal.

As amostras de espermatozoides e fluído epididimário foram divididas em três grupos experimentais, de acordo com o segmento do epidídimo de origem:

- Grupo CABEÇA: amostras da cabeça do epidídimo;
- Grupo CORPO: amostras do corpo do epidídimo;
- Grupo CAUDA: amostras da cauda do epidídimo;

4.5 PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

A descrição detalhada do processamento das amostras será realizada conforme o capítulo correspondente à metodologia específica. Todavia, de maneira geral, após a realização dos exames imediatos (Capítulo 1), 50 µl do volume total de cada amostra foi transferido para um tubo plástico e armazenado a -20°C para posterior análise do perfil de ácidos graxos do fluído e dos espermatozoides epididimários (Capítulo 2). O volume restante das amostras foi centrifugado a 800 x g por 30 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante (referente ao fluído epididimário) foi separado e conservado a -20°C, para posterior análise do perfil proteico (Capítulo 3); enquanto o *pellet* (referente aos espermatozoides) foi fixado em gluteraldeído 2,5% e conservado a 5°C, para posterior análise ultraestrutural dos espermatozoides (Capítulo 1). Os procedimentos do delineamento experimental estão detalhados na figura 1.

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL INICIAL

Figura 1 – Delineamento experimental inicial

Capítulo 1

5 ANÁLISES ESPERMÁTICAS

No presente capítulo serão abordadas as análises espermáticas imediatas e ultraestruturais dos distintos grupos experimentais, bem como a descrição dos resultados e sua respectiva discussão.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação dos espermatozoides epididimários foi realizada por meio de análises convencionais e funcionais, ilustradas na Figura 2.

5.1.1 Análises Espermáticas Convencionais

Para as análises convencionais das amostras espermáticas, foram empregadas a avaliação subjetiva e computadorizada (CASA) da motilidade espermática, concentração espermática e avaliação das anormalidades morfológicas dos espermatozoides.

5.1.1.1 Avaliação Subjetiva da Motilidade e Vigor Espermáticos

Imediatamente após a colheita das amostras, foi realizada a avaliação subjetiva da motilidade e vigor espermáticos. Foi utilizado 5 μ L de cada amostra, depositado entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C, e avaliado em microscópio de luz (Nikon, Eclipse-E200) em aumento de 40X. A classificação de motilidade espermática respeitou a capacidade do espermatozoide de movimentar-se em linha reta, sendo pontuada entre 0 a 100%. Já o vigor espermático correspondeu à velocidade de progressão dos espermatozoides, sendo classificado

em um escore de 0-5 (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS, 1998; FRESHMAN, 2002).

5.1.1.2 Concentração Espermática

A concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer, sob microscópio de luz (Nikon, Eclipse-E200) em aumento de 400X. Os espermatozoides foram diluídos em solução de formol salina e azul de metileno, de acordo com a região epididimária de origem: 1:200 para a cauda, 1:100 para o corpo e 1:10 para as amostras oriundas da cabeça do epidídimo.

5.1.1.3 Análise Computadorizada do Sêmen (CASA)

Adicionalmente, foi realizada a análise computadorizada do sêmen (Computer Assisted Sperm Analysis - CASA; Hamilton-Thorne Ivos 12.3). Para a leitura, utilizou-se 7 μL da amostra entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C. Em seguida, selecionou-se 8 campos aleatórios, obtendo, assim, diferentes padrões de motilidade dos espermatozoides, como: porcentagem de espermatozoides móveis e progressivos, velocidade média de trajetória (VAP - $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL - $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH - $\mu\text{m/s}$), frequência de batimento cruzado (BCF - Hz), retilinearidade (STR - %), linearidade (LIN - %) e porcentagem de espermatozoides rápidos, em velocidade média, baixa e estáticos (GOOVAERTS et al., 2006).

5.1.1.4 Morfologia Espermática

Para a avaliação da morfologia espermática, utilizou-se a técnica de coloração em eosina/nigrosina. Ainda, a referida técnica possibilitou a diferenciação das células com lesões ou com alterações de permeabilidade da membrana plasmática daquelas íntegras. Em lâmina pré-aquecida a 37°C, depositou-se 5 µL da amostra espermática e 5 µL do corante eosina/nigrosina para a confecção de um esfregaço. A lâmina foi analisada em microscópio óptico (Nikon, Eclipse-E200), sob objetiva de imersão (100x), mediante a contagem de 200 espermatozoides, sendo estes classificados em normais e com defeitos menores ou maiores, expressos em porcentagem (%) (FRESHMAN, 2002). Para a análise da integridade da membrana plasmática, considerou-se que os espermatozoides com danos de membrana possuem coloração rósea, enquanto os espermatozoides íntegros são mantidos sem coloração (BARTH; OKO, 1989). Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de membrana lesionada e íntegra.

5.1.2 Testes Espermáticos Funcionais

No presente experimento, foram utilizados testes funcionais com o intuito de avaliar isoladamente as diferentes estruturas espermáticas, a saber: acrossomo e mitocôndria.

5.1.2.1 Integridade Acrossomal

A coloração proposta por Pope; Zhang; Dresser (1991) ou Fast-Green/Rosa-Bengala foi a técnica escolhida para avaliar a integridade acrossomal dos espermatozoides. O esfregaço espermático foi realizado com 5 µL da amostra e 5 µL do corante Fast-Green/Rosa-Bengala em lâmina aquecida a 37°C e analisado em

microscópio óptico (Nikon, Eclipse-E200), sob objetiva de imersão (100x). Os espermatozoides foram classificados como, íntegros, quando apresentavam coloração roxa, ficando mais escura que a região pós-acrossomal e lesionados, quando permaneceu não corado ou de coloração mais clara que a região pós-acrossomal (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991). Após contagem de 200 espermatozoides, os resultados foram expressos em porcentagem (%) de acrossomo lesionado e íntegro.

5.1.2.2 Atividade Mitocondrial

Com o objetivo de avaliar a atividade mitocondrial, recorreu-se a técnica citoquímica da 3,3'-diaminobenzidina (DAB), a qual avalia a intensidade de oxidação da enzima citocromo-c (localizada nas mitocôndrias) em contato com a DAB, gerando um complexo de coloração marrom que se deposita em mitocôndrias ativas. Para tanto, uma alíquota da amostra foi incubada com a DAB na proporção de 1:2 (20 µL de amostra : 40 µL de DAB) para as amostras provenientes do corpo e cauda; e 1:1 (20 µL de amostra : 20 µL de DAB) para as amostras da cabeça do epidídimo. A incubação ocorreu em tubo plástico (0.5mL) âmbar na temperatura de 37°C durante 1 hora. Após este período, foram confeccionados esfregaços das amostras em lâminas de vidro com posterior fixação em formol 10% por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram secas em temperatura ambiente. A leitura transcorreu em microscópio de luz (Nikon, Eclipse-E200), sob objetiva de imersão (100x), com contagem de 200 espermatozoides classificados, segundo Hrudka, 1987, em quatro classes expressas por porcentagem (%) de:

DAB – Classe I: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada, indicando alta atividade mitocondrial;

DAB – Classe II: células espermáticas com mais de 50% dos segmentos corados (ativos), indicando atividade mitocondrial média a alta;

DAB – Classe III: células espermáticas com menos de 50% dos segmentos corados (ativos), indicando baixa atividade mitocondrial;

DAB – Classe IV: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada, indicando ausência de atividade mitocondrial.

5.1.2.3 Citometria de Fluxo

Ademais aos testes funcionais, empregou-se a avaliação da membrana plasmática, acrossomo e mitocôndria dos espermatozoides epididimários por citometria de fluxo, com as respectivas sondas fluorescentes para cada região espermática.

5.1.2.3.1 Integridade Acrossomal e de Membrana Plasmática dos Espermatozoides

Para avaliar a integridade de membrana plasmática, foi utilizada a sonda fluorescente iodeto de propídeo (PI), o qual penetra em células com alterações na permeabilidade de membrana ou lesionadas, corando-as em vermelho. Para a avaliação da integridade acrossomal, utilizou-se a sonda fluorescente aglutinina de *Psium sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), corando os acrossomos lesados em verde (PETERSON; SILVERSTEIN; FREUND, 1974).

Para tanto, foram adicionados 50 µL de FITC-PSA e 2 µL de PI a 300 mil espermatozoides diluídos em 53 µL de PBS. As amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos e, então, 850 µL de PBS foram adicionados para, em seguida, a amostra ser processada no citometro de fluxo. Posteriormente, a população de espermatozoides foi selecionada para a sonda FITC-PSA e avaliada no gráfico de dispersão.

5.1.2.3.2 *Potencial Mitocondrial dos Espermatozoides*

O JC-1 foi a sonda fluorescente de escolha para a avaliação do potencial mitocondrial dos espermatozoides, classificando-os em elevado potencial de membrana mitocondrial (fluorescência vermelha) e baixo potencial (fluorescência verde) (GRAVANCE et al., 2000). Para tal análise, foi adicionado 2 μ L da sonda JC-1 em 300 mil espermatozoides diluídos em 53 μ L de PBS. As amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos e, então, 850 μ L de PBS foram adicionados para, em seguida, a amostra ser processada em citometro de fluxo. Os espermatozoides foram separados em duas populações, a que continha médio-elevado potencial mitocondrial e baixo potencial mitocondrial.

5.1.3 **Análise Estatística**

Os dados obtidos nas análises espermáticas imediatas foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS, 2000). Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a tais premissas, foram transformados (logaritmo na base 10 - Log10X; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X²) e se a normalidade não fosse obtida, empregava-se, então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica (Teste Wilcoxon para comparações dois a dois). Para as análises paramétricas, foi utilizado o teste Tukey para a comparação entre as regiões do epidídimo (Cabeça, Corpo e Cauda). Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias, seus respectivos desvios padrões e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados pela análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvesse transformações possíveis. As variáveis respostas foram submetidas aos testes de correlação de Pearson e Spearman para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente. O nível de significância

utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se diferenças estatísticas entre as diferentes regiões do epidídimo (Cabeça, Corpo e Cauda).

5.1.4 Delineamento Experimental – Análises Espermáticas (Capítulo 1)

Figura 2 – Delineamento experimental do Capítulo 1 (Análises Espermáticas)

5.1.5 Análise Ultraestrutural

A análise ultraestrutural dos espermatozoides epididimários foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – Campus Botucatu. A morfologia espermática foi avaliada utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (MET).

5.1.5.1 Animais e Grupos Experimentais

Para a microscopia eletrônica de transmissão, foram selecionados dez animais aleatoriamente, por meio da randomização *PROC PLAN* (*seed:3859012*) do programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). As características dos dez cães selecionados estão ilustradas na Tabela 3, e estes foram alocados nos três grupos experimentais iniciais, de acordo com o segmento do epidídimo de origem (Cabeça; Corpo; Cauda).

Tabela 3 – Animais reagrupados de acordo com o método de randomização para a formação do novo grupo amostral (n=10). São Paulo, 2013

Identificação	Raça	Peso	Idade
Cão 2	Labrador	26,6kg	3 anos
Cão 3	SRD	6,4kg	1 ano
Cão 6	SRD	18kg	3 anos
Cão 7	SRD	12,6kg	2 anos
Cão 11	SRD	10,5kg	2 anos
Cão 12	SRD	5,5kg	1 ano
Cão 16	Pastor Branco	40kg	2 anos
Cão 18	Pastor de Shetland	14,8kg	6 anos
Cão 19	Schnauzer	7,6kg	6 anos
Cão 20	SRD	7,5kg	1 ano

5.1.5.2 Preparo da Amostra

O processamento das amostras seguiu o protocolo de Long et al. (1996), no qual o *pellet* de espermatozoides é fixado inicialmente com gluteraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e, em seguida, em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão. A desidratação das amostras ocorreu em séries crescentes de acetona para, então, os espermatozoides desidratados serem incluídos em resina plástica (*Embed 812, Electron Microscopy Sciences*). Os cortes ultrafinos sucederam-se com navalha de diamante (70-90 nm de espessura), foram montados em grades de cobre e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (Philips EM 301), sendo escolhidas aleatoriamente quinze imagens dos espermatozoides provenientes de cada grupo experimental (cabeça, corpo e cauda) e descritas, segundo a avaliação morfológica estipulada por Barth e Oko (1989).

5.2 RESULTADOS

Os resultados do presente capítulo ilustram as modificações morfológicas dos espermatozoides caninos durante a maturação (cabeça, corpo e cauda), assim como as características de atividade mitocondrial e acrossomal e ganho de motilidade espermática. Ainda, a análise ultraestrutural dos espermatozoides está apresentada na forma de fotodocumentos.

A figura 3 refere-se à motilidade espermática ao longo do transito epididimário, sendo possível observar imotilidade nos espermatozoides da cabeça do epidídimo, ganho da motilidade no corpo ($27,7 \pm 3,0\%$) e significativo aumento na cauda ($69,7 \pm 4,0\%$). Paralelamente, observou-se maior porcentagem de membranas plasmáticas íntegras (eosina/nigrosina) nos espermatozoides do grupo CAUDA ($92,6 \pm 1,1\%$), em comparação ao CORPO ($74,5 \pm 2,3\%$) e CABEÇA ($40,1 \pm 4,7\%$).

Resultado semelhante ocorreu para o dano acrossomal, pois as amostras do grupo CAUDA ($93,5 \pm 1,8\%$) apresentaram maior integridade em comparação ao grupo CORPO ($85,6 \pm 1,1\%$) e CABEÇA ($59,8 \pm 3,7\%$).

Na avaliação ultraestrutural dos espermatozoides, observou-se modificações na estrutura do acrossomo nos três grupos experimentais. Os espermatozoides oriundos da cabeça e corpo epididimário apresentaram menor frequência de descolamento acrossomal (Figura 4) e maior incidência de dilatação do acrossomo (Figura 5). Já na cauda do epidídimo, foram encontrados acrossomos íntegros e algumas células apresentando reação acrossomal (Figura 6).

Figura 3 – Avaliação da permeabilidade de membrana plasmática (%) (eosina/nigrosina), integridade acrossomal (*fast green*/rosa bengala - %) e motilidade espermática subjetiva (%) dos espermatozoides epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013

A-C
diferença estatística entre os segmentos epididimários ($p < 0,05$)

Figura 4 – Espermatozoide canino proveniente do corpo do epidídimo em corte longitudinal apresentando descolamento de acrossomo (Seta A)

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2013)

Figura 5 – Espermatozoides caninos provenientes do corpo do epidídimo em corte longitudinal apresentando gota proximal (Seta A) e acrossomo dilatado (Seta B)

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2013)

Figura 6 – Espermatozoides caninos provenientes da cauda do epidídimo em corte longitudinal apresentando gota distal (Seta A) e possível reação acrossomal (Seta B)

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2013)

Na avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal, utilizando as sondas fluorescentes FITC/PI (Tabela 4), observou-se maior lesão de ambas as membranas (FITC/PI ML) nas amostras da cauda epididimária. Já os resultados para o corpo não diferiram da cabeça do epidídimo para tal variável (Tabela 4). Por outro lado, não houve diferença entre os grupos para os resultados de porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra (FITC/PI MI). Na análise apenas da membrana acrossomal (FITC/MI), a cabeça do epidídimo apresentou resultados mais elevados que o corpo, este último, por sua vez, estatisticamente superior à cauda epididimária (Tabela 4). Em relação à porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, a cabeça do epidídimo apresentou valores estatisticamente inferiores à cauda (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores médios e desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras ou lesadas na avaliação por citometria de fluxo das sondas FITC/PI em espermatozoides oriundos dos três segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013

	Cabeça	Corpo	Cauda
FITC/PI MI (%)	32,3 ± 3,5	44,3 ± 5,5	38,0 ± 3,3
FITC/PI ML (%)	24,6 ± 2,4 ^A	20,6 ± 2,6 ^A	38,5 ± 3,4 ^B
FITC/MI (%)	37,4 ± 3,8 ^A	22,1 ± 4,0 ^B	8,1 ± 1,6 ^C
PI/MI (%)	5,4 ± 2,1 ^A	12,8 ± 2,3 ^{AB}	15,1 ± 2,2 ^B

A-C na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$). FITC/PI MI: Membrana acrossomal e plasmática íntegras. FITC/PI ML: Membrana acrossomal e plasmática lesionadas. FITC/MI: Membrana acrossomal íntegra. PI/MI: Membrana plasmática íntegra.

Em relação à concentração espermática, houve significativa elevação na cauda do epidídimo, seguido do corpo e cabeça (Tabela 5). O mesmo ocorreu com o vigor espermático, pois os resultados da cabeça do epidídimo foram estatisticamente inferiores ao corpo e cauda (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores médios e desvios padrão da concentração e vigor espermático em distintas regiões epididimárias (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013

	Concentração (Espermatozoides $\times 10^6/\text{mL}$)	Vigor (0-5)
Cabeça	8 ± 1^B	$0,0 \pm 0,0^C$
Corpo	98 ± 17^B	$2,0 \pm 0,1^B$
Cauda	850 ± 124^A	$2,6 \pm 0,1^A$

A-C
na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Na avaliação da atividade mitocondrial, observou-se aumento gradativo dos espermatozoides em DAB – Classe I (alta atividade) entre a cabeça, corpo e cauda do epidídimo (Tabela 6). Paralelamente, um decréscimo em DAB – Classe II, DAB – Classe III e DAB – Classe IV (ausência de atividade mitocondrial) foi verificado quando comparado os resultados da cabeça, corpo e cauda epididimária (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores médios e desvios padrão da atividade mitocondrial (DAB - %) nos espermatozoides oriundos dos três segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013

	Cabeça	Corpo	Cauda
DAB – Classe I	$26,0 \pm 2,4^A$	$46,8 \pm 2,5^B$	$75,9 \pm 3,4^C$
DAB – Classe II	$21,6 \pm 1,9^A$	$17,4 \pm 1,7^A$	$9,0 \pm 1,1^B$
DAB – Classe III	$13,2 \pm 1,6^A$	$9,3 \pm 1,2^A$	$2,9 \pm 0,6^B$
DAB – Classe IV	$39,5 \pm 3,6^A$	$26,2 \pm 3,0^B$	$12,5 \pm 3,0^C$

A-C
na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$). DAB – Classe I: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada indicando alta atividade mitocondrial (DAB I) / DAB – Classe II: células espermáticas com mais de 50% dos segmentos corados (ativos) indicando atividade mitocondrial média a alta (DAB II) / DAB – Classe III: células espermáticas com menos da 50% dos segmentos corados (ativos) indicando baixa atividade mitocondrial (DAB III) / DAB – Classe IV: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV).

Na avaliação com as sondas fluorescentes pela citometria de fluxo, observou-se aumento gradativo do potencial mitocondrial (Figura 7) dos espermatozoides ao

longo do transito epididimário, não havendo diferenças estatísticas entre a cabeça ($43,6\pm4,1\%$) e corpo do epidídimo ($38,3\pm3,6\%$). Entretanto, os espermatozoides com significativo aumento do potencial mitocondrial foram oriundos da cauda do epidídimo ($65,0\pm4,2\%$).

Figura 7 – Avaliação do potencial mitocondrial (sonda JC-1) por citometria de fluxo, nos espermatozoides epididimários provenientes das distintas regiões epididimárias (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013

A-B indicam diferença estatística ($p<0.05$).

Em relação aos defeitos morfológicos dos espermatozoides avaliados por eosina / nigrosina, o grupo CABEÇA apresentou maior porcentagem de defeitos maiores e totais em relação aos grupos CORPO e CAUDA (Tabela 7). Atribui-se tal resultado, principalmente, à presença de gota proximal (Figura 8) nas amostras provenientes da cabeça do epidídimo ($71\pm2,3\%$), diferindo significativamente do corpo ($20,1\pm5\%$) e cauda ($10,3\pm5\%$). O mesmo padrão de resultados foi observado quanto às alterações de peça intermediária, pois o grupo CABEÇA apresentou resultado superior ao CORPO e CAUDA (Tabela 7). Já em relação aos defeitos espermáticos menores, houve diferença significativa entre as amostras do corpo do epidídimo e da cabeça (Tabela 7). É possível atribuir tal resultado à maior

porcentagem de gota distal (Figura 8) na cauda ($6,6 \pm 1,3\%$) e corpo do epidídimo ($6,4 \pm 1,0\%$), em relação à cabeça ($0,7 \pm 0,4\%$).

Tabela 7 – Valores médios e desvios padrão dos defeitos morfológicos (eosina / nigrosina - %) dos espermatozoides provenientes dos distintos segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013

	Cabeça	Corpo	Cauda
Defeitos Menores (%)	$3,2 \pm 0,8^A$	$13,6 \pm 2,5^B$	$8,5 \pm 1,5^{AB}$
Defeitos Maiores (%)	$84,7 \pm 1,7^A$	$27,8 \pm 4,7^B$	$22,5 \pm 5,7^B$
Defeitos Totais (%)	$88,0 \pm 1,6^A$	$41,5 \pm 4,5^B$	$31,0 \pm 5,4^B$
Alterações em Peça Intermediária (%)	$10,0 \pm 1,5^A$	$0,61 \pm 0,2^B$	$0,1 \pm 0,0^B$

A-B na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 8 – Fenômeno da migração da gota citoplasmática da região proximal a distal da peça intermediária do espermatozoide entre os diferentes segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013

A-B indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Semelhante ao encontrado na avaliação de defeitos morfológicos pela eosina / nigrosina), na análise ultraestrutural dos espermatozoides, observou-se maior incidência de gotas proximais nas amostras da cabeça do epidídimo, em relação aos grupos corpo e cauda. Em contrapartida, a prevalência de gotas distais foi maior na cauda e corpo (Figuras 9 e 10), em comparação à cabeça do epidídimo (Figura 11).

Figura 9 – Espermatozoides caninos provenientes do corpo do epidídimo em corte longitudinal apresentando gota distal (Seta A), descolamento de acrosso (Seta B) e acrosso dilatado (Seta C)

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2013)

Figura 10 – Espermatozoide canino proveniente do corpo do epidídimo em corte longitudinal apresentando gota distal (Seta A) e acrossoomo dilatado (Seta B)

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2013)

Figura 11 – Espermatozoide canino proveniente da cauda do epidídimo em corte longitudinal apresentando integridade morfológica.

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2013)

No tocante à análise computadorizada do sêmen (CASA), foi possível constatar aumento progressivo e significativo nas taxas de motilidade, motilidade progressiva, velocidade rápida e média, velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN), de acordo com a passagem dos espermatozoides pelo

epidídimo (comparação cabeça X corpo X cauda) (Tabela 8). As variáveis referentes aos espermatozoides em velocidade média, amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) e frequência de batimento cruzado (BCF) não diferiram estatisticamente entre os grupos corpo e cauda, porém a cabeça do epidídimo apresentou significativamente os menores resultados (Tabela 8). O índice de espermatozoides com motilidade progressiva não se alterou entre cabeça e corpo, mas foi superior à cauda do epidídimo. Já a porcentagem de espermatozoides estáticos na cabeça do epidídimo foi estatisticamente superior aos resultados do corpo e cauda epididimários (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores médios e desvios padrão das variáveis obtidas por análise computadorizada do sêmen (CASA) em espermatozoides oriundos dos três segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013

	Cabeça	Corpo	Cauda
Motilidade (%)	0,0 ± 0,0 ^C	34,5 ± 3,5 ^B	71,0 ± 4,4 ^A
Motilidade Progressiva (%)	0,0 ± 0,0 ^B	5,5 ± 0,9 ^B	27,8 ± 2,9 ^A
Velocidade Rápida (%)	0,0 ± 0,0 ^C	18,2 ± 2,4 ^B	54,2 ± 4,5 ^A
Velocidade Média (%)	0,0 ± 0,0 ^B	16,3 ± 1,7 ^A	16,8 ± 2,6 ^A
Velocidade Lenta (%)	6,0 ± 2,5	6,0 ± 2,4	10,5 ± 1,4
Espermatozoides Estáticos (%)	94,0 ± 2,5 ^A	54,8 ± 4,4 ^B	23,1 ± 3,6 ^C
VAP (µm/s)	0,0 ± 0,0 ^C	66,3 ± 5,5 ^B	94,9 ± 5,6 ^A
VSL (µm/s)	0,0 ± 0,0 ^C	37,8 ± 3,7 ^B	67,2 ± 4,6 ^A
VCL (µm/s)	0,0 ± 0,0 ^C	142,5 ± 10,3 ^B	178,5 ± 10,0 ^A
ALH (µm/s)	0,0 ± 0,0 ^B	7,3 ± 0,6 ^A	7,8 ± 0,3 ^A
BCF (Hz)	0,0 ± 0,0 ^B	32,0 ± 3,1 ^A	28,3 ± 2,2 ^A
Retilinearidade (%)	0,0 ± 0,0 ^C	48,9 ± 3,5 ^B	67,4 ± 1,4 ^A
Linearidade (%)	0,0 ± 0,0 ^C	26,3 ± 2,4 ^B	38,9 ± 1,5 ^A

A-C
na mesma linha indicam diferença estatística (p≤0,05).

No segmento da cabeça do epidídimo, observou-se correlação positiva ($r=0,53$; $p=0,01$) entre a porcentagem de espermatozoides com ausência de atividade mitocondrial (DAB – Classe IV) e estáticos (avaliados pelo CASA), bem como entre esta última variável e a porcentagem de espermatozoides com lesão de membrana plasmática e acrossomal (FITC/PI) ($r=0,92$; $p=0,0004$). Por outro lado, houve correlação negativa ($r=-0,61$; $p=0,05$) entre a porcentagem de espermatozoides com ausência de atividade mitocondrial (DAB – Classe IV) e de células com membrana plasmática e acrossomal íntegras (FITC/PI).

A principal correlação positiva encontrada nas amostras provenientes do corpo epididimário ocorreu entre a porcentagem de retilinearidade (CASA) e a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (eosina/nigrosina) ($r=0,49$; $p=0,03$). Já as correlações negativas foram observadas entre a porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB – Classe I) e de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesionadas (FITC/PI) ($r=-0,48$; $p=0,03$), além da correlação negativa ($r=-0,47$; $p=0,03$) entre a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (eosina/nigrosina) e estáticos (CASA).

Na região da cauda do epidídimo, foram verificadas correlações positivas entre: a porcentagem de espermatozoides em alta atividade mitocondrial (DAB – Classe I) e a motilidade subjetiva ($r=0,60$; $p=0,004$), a motilidade analisada pelo CASA ($r=0,45$; $p=0,05$), a porcentagem de espermatozoides rápidos ($r=0,51$; $p=0,02$), a motilidade progressiva ($r=0,44$; $p=0,05$) e com a porcentagem de membrana plasmática íntegra (eosina/nigrosina) ($r=0,69$; $p=0,0006$). Paralelamente, a porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra (eosina/nigrosina) apresentou correlações positivas com a motilidade subjetiva ($r=0,80$; $p<0,0001$), motilidade avaliada pelo CASA ($r=0,63$; $p=0,003$) e motilidade progressiva ($r=0,46$; $p=0,04$). Ainda, foi observada correlação positiva ($r=0,54$; $p=0,01$) entre a porcentagem de espermatozoides com ausência de atividade mitocondrial (DAB – Classe IV) e espermatozoides estáticos avaliados pelo CASA. As correlações negativas destacaram-se, principalmente, entre a porcentagem de espermatozoides com ausência de atividade mitocondrial (DAB – Classe IV) e a porcentagem de retilinearidade ($r=-0,70$; $p=0,0006$), a motilidade subjetiva ($r=-0,64$, $p=0,002$), a motilidade avaliada pelo CASA ($r=-0,51$; $p=0,02$), a motilidade progressiva ($r=-0,58$;

$p=0,007$), porcentagem de linearidade ($r=-0,55$; $p=0,01$) e porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (Eosina/Nigrosina) ($r=-0,55$; $p=0,009$). Ademais, a porcentagem de espermatozoides com a membrana íntegra correlacionou-se negativamente ($r=-0,54$; $p=0,01$) com a porcentagem de espermatozoides estáticos, os quais apresentaram correlação negativa ($r=-0,45$; $p=0,05$) com a porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB – Classe I).

5.3 *DISCUSSÃO*

Durante o transito epididimário, a célula espermática passa por distintas modificações morfológicas e funcionais, tais como a aquisição de motilidade, migração da gota citoplasmática para a região distal da peça intermediária e aquisição da habilidade de reconhecimento e ligação ao oócito (JERVIS; ROBAIRE, 2001). Com base nos resultados obtidos e compilados no presente capítulo, foi possível observar tais modificações fisiológicas ao longo do trato epididimário canino.

Dentre as variáveis propostas no presente estudo, os resultados da motilidade espermática permitiram evidenciar, as modificações entre a cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Notou-se um padrão de aquisição de motilidade entre os distintos segmentos epididimários, devido a ausência de batimento flagelar nos espermatozoides da cabeça, início da motilidade no corpo epididimário e maior porcentagem de espermatozoides com batimento flagelar progressivo na cauda do epidídimo. Tais resultados foram obtidos tanto na análise subjetiva (motilidade e vigor), quanto na análise computadorizada do sêmen (motilidade, motilidade progressiva, VAP, VSL, VCL e BCF). Portanto, torna-se evidente a aquisição de motilidade progressiva e vigorosa durante a passagem dos espermatozoides no epidídimo. De fato, diferentes autores já haviam observado tais características em ratos (YEUNG; OBERLANDER; COOPER, 1992) e hamsters (DEVI; SHIVAJI, 1994). Em cães, Angrimani et al. (2013) relataram resultados semelhantes quando comparados os segmentos epididimários, tanto nas variáveis subjetivas de

motilidade e vigor, quanto na análise computadorizada do sêmen. Já Varesi et al. (2013) descreveram total ausência de batimento flagelar em espermatozoides caninos da cabeça do epidídimo. Em contrapartida, os referidos autores observaram certo movimento vibratório por toda a extensão do espermatozoide, o que gerou, por sua vez, uma movimentação lenta dos mesmos, semelhante ao observado no presente estudo. Vale ressaltar que os resultados de ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça) não diferiram entre a cauda e o corpo, porém foram superiores dos espermatozoides da cabeça do epidídimo. Acredita-se que tal variável esteja relacionada à capacidade de penetração do espermatozoide à zona pelúcida do oócito, portanto, indiretamente relacionada à habilidade de fecundação espermática (LIU et al., 2008; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Com base em tais achados, pode-se inferir que os espermatozoides caninos oriundos tanto do corpo como da cauda do epidídimo já apresentam capacidade fecundante.

Ainda, os atributos de motilidade foram uma das variáveis com maior número de correlações, especialmente relacionadas à atividade mitocondrial analisada pelo DAB. Na cabeça do epidídimo, por exemplo, a porcentagem de espermatozoides em DAB - Classe IV (ausência de atividade mitocondrial) correlacionou positivamente com espermatozoides estáticos. Na cauda do epidídimo, observou-se correlações negativas entre o DAB - Classe IV com a retilinearidade, motilidade (subjativa e CASA), motilidade progressiva e linear. Por outro lado, correlações positivas entre a porcentagem de DAB – Classe I (alta atividade mitocondrial) com a porcentagem de espermatozoides rápidos com motilidade progressiva (subjativa e CASA), além de correção negativa com a porcentagem de espermatozoides estáticos, foram verificadas na cauda do epidídimo. Tais dados mostram que a atividade mitocondrial está intimamente relacionada à aquisição da motilidade espermática, por haver requerimento elevado de adenosina trifosfato (ATP) para promover o batimento flagelar (STOREY; KAYNE, 1980; TURNER, 2003; SCHULZE et al., 2013). Além disto, com os resultados apresentados no presente trabalho, é possível compreender a dinâmica envolvida na atividade mitocondrial durante a maturação espermática, a qual foi diretamente ligada ao ganho de motilidade espermática. De fato, o acréscimo gradual da porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB I) e potencial mitocondrial avaliado pela sonda fluorescente JC-1 entre os segmentos de cabeça, corpo e cauda do epidídimo corroboram tal

assertiva. Desta maneira, é possível compreender que, nos espermatozoides caninos, as mitocôndrias estão inativas na cabeça do epidídimo, em média atividade no corpo e em máxima atividade na cauda epididimária. Tais resultados estão em consonância com os obtidos por Aitken et al. (2007), os quais relatam estágio latente das mitocôndrias na célula espermática contida na cabeça e máxima atividade nas variáveis da cauda do epidídimo, indicando o ganho de potencial mitocondrial no segmento do corpo epididimário. Gallon et al. (2006) afirmam que o número elevado de espermatozoides com alto potencial mitocondrial está intimamente relacionado à fertilidade espermática. Tal observação explica o alto potencial mitocondrial observado no segmento da cauda do epidídimo no presente estudo, já que os espermatozoides oriundos deste segmento epididimário devem estar totalmente aptos à fecundação (YU; LEIBO, 2002).

Na análise dos resultados da cabeça do epidídimo, foi possível observar correlação negativa entre a porcentagem de DAB IV (ausência de potencial mitocondrial) e espermatozoides com membranas íntegras, analisados por FITC/PI. Por outro lado, no corpo epididimário, a porcentagem de DAB I (alta atividade mitocondrial) correlacionou-se negativamente com lesão de membranas plasmática e acrossomal (FITC/PI) e, na cauda do epidídimo, houve correlação positiva entre DAB I e a integridade de membrana plasmática (eosina/nigrosina - E/N). Portanto, podemos inferir que, para que haja a atividade mitocondrial elevada do espermatozoide, as membranas plasmática e acrossomal devem estar íntegras. Tais resultados podem ser corroborados por Amann, Hammerstedt e Veeramachaneni (1993), Amann (1987) e Amaral et al. (2013b), os quais relacionam a necessidade de alterações estruturais da membrana plasmática do espermatozoide para a transdução eficiente de ATP proveniente das mitocôndrias, culminando com o batimento flagelar e motilidade espermática. Por este motivo, espera-se evidenciar modificações da integridade de membrana plasmática e acrossomal durante o transito epididimário para, ao final da maturação epididimária, haver transferência dos requisitos necessários para tornar o espermatozoide fecundante (TITTARELLI et al., 2006). De fato, os resultados do presente estudo denotam acréscimo de integridade da membrana plasmática e acrossomal ao longo dos segmentos epididimários.

Ao observarmos os resultados gerados pelas colorações de Fast-Green/Rosa Bengala (coloração de Pope) no presente estudo, foi encontrado padrão crescente de integridade das membranas acrossomais a medida que o espermatozoide ultrapassa o processo da maturação espermática no epidídimo. De acordo com Hewitt et al. (2001) e Varesi et al. (2013), há necessidade de remodelação acrossomal nos epidídimos para que o espermatozoide canino esteja apto a ligar-se ao oócito no momento da fecundação. Tal assertiva pode ser comprovada pelos resultados da análise ultraestrutural dos espermatozoides epididimários, pois foi possível notar a incidência de acrossomos alterados (dilatados e descolados) nas regiões da cabeça e corpo do epidídimo, enquanto na região da cauda tais defeitos estavam ausentes. Portanto, os resultados do nosso estudo podem ser atribuídos ao referido processo fisiológico de remodelação espermática.

Por outro lado, na análise FITC-PSA, foi observado um resultado contrário do observado na coloração de Pope. A aglutinina de *Psium sativum* é uma lectina que se liga a um sítio das moléculas de manose e galactose da matriz acrossomal, levando a fluorescência a esta região (CROSS; MEIZEL, 1989). Visto que a PSA não consegue penetrar no acrossoma intacto serão marcados apenas acrossomos reagidos ou danificados. No entanto, uma série de reações inespecíficas pode ocorrer (DALIMATA; GRAHAM, 1997), o que poderia explicar os resultados controversos encontrados utilizando o PSA em contraste com a coloração de Fast-Green/Rosa Bengala. Desta forma, a aglutina de *Arachis hypogea* (PNA) apesar de atuar de forma semelhante ao PSA, exibe menores índices de ligações inespecíficas a outras áreas do espermatozoide, pois emite fluorescência de maneira mais intensa (GRAHAM, 2001). Ainda, segundo Graham (1996) existem diferenças espécie-específicas em resposta as diferentes lectinas para avaliação do status acrossomal. Assim, seriam necessários maiores estudos com espermatozoides epididimário caninos utilizando outras lectinas.

Com base nos resultados da coloração de eosina / nigrosina e da sonda fluorescente PI, notou-se igualmente um padrão de remodelamento da membrana plasmática dos espermatozoides ao longo dos segmentos epididimários. A maior porcentagem de espermatozoides com integridade da membrana plasmática na cauda do epidídimo pode ser atribuída às diversas modificações na estrutura primária da membrana lipídica, com o intuito de facilitar a adesão de proteínas e

ácidos graxos presentes no lúmen epididimário (FOUCHECOURT et al., 2000). Além disto, a alta permeabilidade da membrana plasmática na região da cabeça e corpo dos epidídimos pode estar relacionada ao ganho de motilidade espermática, já que o espermatozoide em fase de maturação está propenso a alterações em sua estrutura lipídica primária, necessárias para o início do batimento flagelar, ganho do potencial mitocondrial e essencial para a aquisição de motilidade espermática. Já a baixa permeabilidade de membrana nos espermatozoides da cauda do epidídimo deve-se à maior resistência à estocagem e às posteriores injúrias durante a ejaculação (ACOTT; KATZ; HOSKINS, 1983; PARKS; HAMMERSTEDT, 1985). Todavia, quando se observa os resultados das sondas fluorescentes em conjunto (FITC/PI), nota-se que não houve diferenças entre os grupos na porcentagem de espermatozoides com as membranas plasmática e acrossomal íntegras. Já a porcentagem de lesão (FITC/PI ML) foi maior na região de cauda de epidídimo. Desta forma, acredita-se que os espermatozoides oriundos do corpo e da cabeça do epidídimo apresentam baixa permeabilidade de membrana plasmática e acrossomal de modo isolado, porém não se enquadrando em lesão e integridade das duas membranas simultaneamente.

Para o espermatozoide ser capaz de adquirir motilidade, é necessária integridade da membrana plasmática (ACOTT; KATZ; HOSKINS, 1983). De fato, no corpo epididimário, observamos correlação positiva entre a retilinearidade e a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (eosina / nigrosina); e correlação negativa entre espermatozoides estáticos e aqueles com integridade de membrana plasmática. Na cauda do epidídimo, tal observação foi mais evidente, pois há correlações positivas entre a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e as análises de motilidade progressiva (subjetiva e CASA); e correlação negativa entre integridade de membrana e espermatozoides estáticos.

No presente experimento, os corantes eosina / nigrosina, além de terem sido utilizados para o teste funcional de permeabilidade da membrana plasmática, foram escolhidos para avaliação dos defeitos morfológicos. Assim, observou-se maior porcentagem de defeitos maiores e totais nas amostras oriundas da cabeça do epidídimo, enquanto os defeitos menores foram superiores nos espermatozoides provenientes do corpo epididimário. Tais resultados são explicados, principalmente,

pela presença elevada de gotas proximais nas amostras da cabeça; e de gotas distais nos espermatozoides do corpo do epidídimo. De fato, na análise ultraestrutural dos espermatozoides, o mesmo padrão de resultados foi encontrado. Desta maneira, foi possível observar, na espécie canina, o fenômeno fisiológico da migração da gota citoplasmática durante a maturação espermática nos epidídimos, extremamente necessário para a capacidade fértil da célula espermática (PENA et al., 2007). Por este motivo, o presente estudo poderá contribuir para esclarecer sobre o segmento epididimário exato no qual ocorre a migração da gota citoplasmática na espécie canina, já que há variações entre as espécies (COOPER; YEUNG, 2003). Segundo Varesi et al. (2013), em cães, a maior porcentagem de gotas proximais localiza-se na cabeça do epidídimo e a migração para a região distal ocorre no corpo epididimário. No presente estudo, observou-se a diminuição no número de gotas proximais no trajeto entre cabeça e o corpo do epidídimo, na análise morfológica pela eosina / nigrosina, corroborando os resultados dos referidos autores. Ainda, sugerimos que as alterações na peça intermediária dos espermatozoides epididimários são indiretamente provocadas pela presença da gota proximal, uma vez que esta última gera dobras ou ondulações, causando alterações na estrutura primária da peça intermediária (CHENOWETH, 2005).

É importante ressaltar, ainda, que na análise da concentração espermática, encontrou-se resultados significativamente mais elevados nas amostras provenientes da cauda do epidídimo. Trata-se de um resultado esperado, já que o volume de líquidos no lúmen diminui gradativamente de acordo com o transito epididimário (BELLEANNEE et al., 2011b). Portanto, eleva-se a concentração espermática no corpo do epidídimo para posterior estocagem dos espermatozoides na cauda, com o intuito de liberar o maior número de células no momento da ejaculação (MURADÁS et al., 2006).

Os resultados compilados no presente capítulo denotam os eventos da maturação epididimária na espécie canina de forma temporal (cabeça, corpo e cauda). Representou-se as modificações morfológicas dos espermatozoides epididimários, bem como as mudanças na funcionalidade celular, contribuindo para a compreensão da fisiologia reprodutiva dos cães.

Capítulo 2

6 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Conforme observado nos resultados do capítulo 1 deste trabalho, durante o processo da maturação epididimária, os espermatozoides passam por diversas modificações na estrutura de sua membrana plasmática. Todavia, a natureza de tais mudanças não está totalmente esclarecida na espécie canina. Portanto, o presente capítulo objetivou determinar o perfil de ácidos graxos presentes na membrana plasmática dos espermatozoides e no fluído epididimário de amostras oriundas dos distintos segmentos do epidídimo.

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

A análise de ácidos graxos (Figura 12) foi realizada na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP). Como não havia a padronização prévia do perfil de ácidos graxos em amostras espermáticas oriundas de epidídimos caninos, optou-se pela realização de uma padronização com o objetivo de assegurar a confiabilidade dos dados.

6.1.1 Delineamento Experimental (Capítulo 2)

Figura 12 – Delineamento Experimental do Capítulo 2

6.1.2 Padronização 1 - Cães

Foi realizado o método de extração denominado transesterificação (descrito no item 6.1.4) com o *pool* de amostras de dois cães (cão 9 e 17), referentes aos três segmentos de interesse: cabeça, corpo e cauda de epidídimo. A escolha da metodologia com o *pool* das amostras ocorreu pela exigência da técnica de transesterificação, a qual utiliza volume amostral elevado. Por este motivo, a individualização das amostras seria inviável, uma vez que apenas 50 µL havia sido previamente destinado para a análise do perfil de ácidos graxos (descrito no item 4.5).

Após a realização da transesterificação das amostras espermáticas e posterior análise no cromatógrafo gasoso (*Shimadzu, Gas Chromatograph Model GC-17A*), notou-se um número limitado e pouco expressivo de picos cromatográficos. Portanto, a baixa concentração espermática das amostras caninas exigiu a realização de uma nova padronização, com o intuito de identificar a concentração espermática ideal para a determinação do perfil de ácidos graxos com a referida metodologia técnica.

6.1.3 Padronização 2 - Ratos

Para a presente etapa, utilizou-se amostras de espermatozoides epididimários de dois ratos *Wistar* adultos e em idade reprodutiva (peso >700g), provenientes do Biotério do campus de Ribeirão Preto. Em função do volume reduzido recuperado dos epidídimos, as amostras experimentais corresponderam à junção do material obtido dos epidídimos esquerdo e direito.

Posteriormente à coleta, foi realizada a contagem da concentração espermática com auxílio da câmara de Neubauer, sob microscópio óptico (Nikon, Eclipse-E200) em aumento de 400X. Os espermatozoides foram diluídos previamente em solução salina, na diluição de 1:200 e, após a obtenção da concentração espermática, as amostras foram separadas em distintas alíquotas de acordo com a concentração espermática:

- Grupo 75m: 75 mil espermatozoides.
- Grupo 1,5M: Um milhão e quinhentos mil espermatozoides.
- Grupo 10M: 10 milhões de espermatozoides
- Grupo 50M: 50 milhões de espermatozoides.

Após o método de transesterificação (descrito no item 6.1.4) e análise pelo cromatógrafo gasoso, a menor concentração na qual foram observados picos cromatográficos expressivos e em grande número (Figura 13), foi a equivalente ao Grupo 1,5M (um milhão e quinhentos mil espermatozoides). Portanto, tal concentração espermática foi adotada para a análise das amostras caninas do presente experimento.

Figura 13 - Pico cromatográfico expressivo (Seta A) de ácidos graxos presentes em membrana plasmática de espermatozoides de ratos no Grupo 1,5M, em análise por cromatografia gasosa

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2013)

6.1.4 Grupos Experimentais

Após a realização dos projetos pilotos, fez-se necessário o reagrupamento das amostras do presente estudo, com o escopo de formar *pools* nos quais a concentração espermática mínima fosse de um milhão e quinhentos mil

espermatozoides. Para tanto, foram agrupados quatro cães em cada *pool*, totalizando cinco pools em cada grupo experimental (Tabela 9), de acordo com o segmento do epidídimo de origem (Grupo CABEÇA, CORPO e CAUDA).

Tabela 9 – Animais reagrupados de acordo com a concentração espermática, para a formação dos pools (n=5). São Paulo, 2013

<i>Pool 1</i>	<i>Pool 2</i>	<i>Pool 3</i>	<i>Pool 4</i>	<i>Pool 5</i>
Cão 1	Cão 4	Cão 10	Cão 7	Cão 2
Cão 3	Cão 13	Cão 16	Cão 12	Cão 5
Cão 11	Cão 14	Cão 21	Cão 18	Cão 6
Cão 15	Cão 20	Cão 22	Cão 19	Cão 8

6.1.5 Transesterificação

Para a determinação da concentração de ácidos graxos da membrana dos espermatozoides e do fluido epididimário (figura 12), utilizou-se o método de transesterificação descrito por Lepage e Roy (1984). Para tanto, o volume de cada amostra equivalente à concentração de um milhão e quinhentos mil espermatozoides foi centrifugado (640 x g por 5 minutos). O sobrenadante foi destinado à dosagem de ácidos graxos no plasma epididimário, enquanto o *pellet* espermático, utilizado para a análise do perfil de lipídeos na membrana plasmática dos espermatozoides.

As amostras a serem analisadas foram transferidas para cubetas de vidro, nas quais adicionou-se 10 µL de padrão interno (10 mg/mL). Posteriormente, acrescentou-se 1 mL da solução de metanol:acetil cloreto, na proporção de 100:5 (3 mL:150 µL) e, então, a cubeta foi mantida em banho-maria a 100°C por 60 minutos para que ocorresse a transesterificação, etapa necessária para a análise de ácidos graxos, segundo Liu (1994).

Após o período de incubação, as cubetas foram mantidas a temperatura ambiente para, em seguida, adicionar-se 1 mL de hexano. Para a solubilização dos ácidos graxos. As amostras foram levadas ao vórtex por 60 segundos e depois novamente centrifugadas (640 x g / 5 minutos). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um frasco de vidro e submetido à secagem por vapor de nitrogênio.

Já o restante da amostra foi novamente homogeneizado em vórtex por 60 segundos e centrifugado ($640 \times g$ / 5 minutos). Posteriormente, o sobrenadante foi recuperado e submetido novamente à secagem em vapor de nitrogênio. Sequencialmente, a amostra foi ressuspensa em 50 μL de hexano, levada ao vórtex por 60 segundos e 1 μL desta solução foi injetada no cromatógrafo gasoso (*Shimadzu, Gas Chromatograph Model GC-17A*).

6.1.6 Padrão de Ácidos Graxos

Para a detecção dos ácidos graxos por cromatografia gasosa nas amostras de fluido epididimário e espermatozoides, o seguinte padrão foi utilizado:

- Ácidos graxos saturados: butírico (C4:0), capríco (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), undecanóico (C11:0), láurico (C12:0), tridecanóico (C13:0), mirístico (C14:0), pentadecanoico (C15:0), palmítico (C16:0), heptadecanoico (C17:0), esteárico (C18:0), araquídico (C20:0), henicossanoico (C21:0), behênico (C22:0),tricosanoico (C23:0) e lignocerico (C24:0).
- Ácidos graxos monoinsaturados: miristoleico (C14:1), heptadecenoico (C15:1), palmitoleico (C16:1), elaídico (C18:1n9t), oleico (C18:1n9c), eicosenoico (C20:1n9), erúcico (C22:1n9) e nervônico (C24:1n9)
- Ácidos graxos poliinsaturados: linolelaídico (C18:2n6t), linoleico (C18:2n6c), gama-linolênico (C18:3n6), alfa-linolênico (C18:3n3), eicosadienoico (C20:2), eicosatrienoico (C20:2n6), araquidônico (C20:4n6), eicosatrienoico (C20:3n3), eicosapentaenoico (C20:5n3), docosadienoico (C22:2) e docosa-hexaenoico (C22:6n3).

6.1.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa do SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). Os efeitos das diferentes regiões do epidídimo

(Cabeça vs. Corpo vs. Cauda) e da matriz utilizada (fluido epididimário vs. espermatozoide) sobre os ácidos graxos foram determinados por métodos paramétricos (teste t de Student para dois tratamentos ou teste LSD para mais de dois tratamentos) e não paramétricos (Wilcoxon), de acordo com a normalidade dos resíduos (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias. Os diferentes ácidos graxos avaliados foram também divididos, agrupados e analisados de acordo com o número de insaturações, a saber: saturados (nenhuma ligação dupla), monoinsaturados (uma ligação dupla) e poliinsaturados (duas ou mais ligações duplas).

O valor de probabilidade de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os resultados foram descritos por meio das *médias não transformadas $\pm$ erros padrões das médias* (EPM).

6.2 RESULTADOS

Os resultados compilados no presente capítulo demonstram a concentração de ácidos graxos no fluido e espermatozoides epididimários caninos oriundos da cabeça, corpo e cauda do epidídimo.

Na análise isolada dos ácidos graxos saturados totais (Figura 14), observou-se que as amostras de fluido provenientes da cauda do epidídimo ($4363,1 \pm 1933,7$ mg/dL) possuem concentrações superiores de ácidos graxos, em comparação à cabeça ($632,7 \pm 171,5$ mg/dL), porém sem diferença significativa com corpo epididimário ($1434,9 \pm 303,4$ mg/dL). Contudo, nas amostras espermáticas, encontrou-se maior concentração de ácidos graxos saturados nos espermatozoides da cauda do epidídimo ($47838,2 \pm 23253,6$ mg/dL), em comparação ao corpo ($5611,7 \pm 1849,7$ mg/dL) e cabeça ($3887,1 \pm 2337,4$ mg/dL). Ainda, na comparação da concentração de ácidos graxos saturados entre o fluido e espermatozoides epididimários, foi encontrada diferença estatística nos segmentos da cauda ($p=0,0005$) e corpo do epidídimo ($p=0,004$).

Figura 14 – Concentração de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e do docosa-hexaenoico (DHA) nos espermatozoides e fluido epididimário de cães, nos diferentes segmentos do epidídimo (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013

a-b letras minúsculas indicam diferença estatística entre as regiões do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) nos espermatozoides epididimários. A-B letras maiúsculas indicam diferença estatística entre as regiões do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) no fluido epididimário. * indica diferença estatística entre fluido e espermatozoides epididimários em cada região do epidídimo.

À análise da concentração de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (Figura 14), não foi possível notar diferenças significativas nas amostras de fluido epididimário entre os segmentos da cabeça (mono: $13,1 \pm 1,8$ mg/dL, poli: $7,0 \pm 0,6$ mg/dL), corpo (mono: $39,3 \pm 23,0$ mg/dL, poli: $20,5 \pm 8,9$ mg/dL) e cauda do epidídimo (mono: $168,0 \pm 89,4$ mg/dL, poli: $25,0 \pm 4,8$ mg/dL). Contudo, os espermatozoides da cauda epididimária apresentaram concentrações superiores dos referidos ácidos graxos (mono: $942,8 \pm 412,5$ mg/dL, poli: $514,5 \pm 263,5$ mg/dL), em relação ao corpo (mono: $150,1 \pm 85,1$ mg/dL, poli: $72,6 \pm 14,4$ mg/dL) e cabeça do epidídimo (mono: $81,7 \pm 30,3$ mg/dL, poli: $77,8 \pm 48,8$ mg/dL). Ademais, quando comparadas as variáveis fluido e espermatozoides epididimários, notou-se diferenças nos segmentos da cabeça ($p = 0.05$) e cauda ($p = 0.05$) para os ácidos graxos

monoinsaturados; e nas regiões do corpo ($p= 0.01$) e cauda do epidídimo ($p= 0.04$) para os ácidos graxos poliinsaturados.

Para a concentração do ácido graxo docosa-hexaenoico (DHA – Figura 14), nota-se diferença estatística entre o fluido e os espermatozoides epididimários apenas na cauda do epidídimo ($p=0.005$). Contudo, quando se observa isoladamente o fluido epididimário, o corpo ($33,8 \pm 22,1$ mg/dL) denota quantidade superior de DHA em relação à cabeça ($7,9 \pm 2,3$ mg/dL), porém sem diferença com a cauda do epidídimo ($26,9 \pm 2,5$ mg/dL). Em relação ao nível de DHA nos espermatozoides epididimários, a cauda ($1860,8 \pm 1374,6$ mg/dL) possuiu valores superiores ao corpo ($126,0 \pm 30,8$ mg/dL) e cabeça do epidídimo ($101,7 \pm 61,6$ mg/dL).

A tabela 10 ilustra o perfil individualizado de ácidos graxos no fluido epididimário, amostra no qual identificou-se, igualmente em todas os segmentos do epidídimo, os ácidos graxos: capróico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), undecanóico (C11:0), láurico (C12:0), heptadecenóico (C15:1), heptadecanóico (C17:0), oleico (C18:1n9c), linolelaídico (C18:2n6t) e nervônico (C24:1n9). Por outro lado, o ácido graxo tridecanóico (C13:0) apresentou nível superior no corpo do epidídimo em comparação à cabeça e cauda. Já a concentração do ácido graxo esteárico (C18:0) foi superior na cauda epididimária em relação ao corpo e cabeça, enquanto o ácido graxo linoleico (C18:2n6c) apresentou maior quantidade na cabeça do epidídimo em comparação ao corpo e cauda. Quanto ao ácido graxo docosa-hexaenoico (DHA – C22:6n3), o corpo do epidídimo apresentou as maiores concentrações, porém sem diferença com a cauda epididimária.

Os ácidos graxos mirístico, pentadecanóico e palmítico foram identificados apenas no corpo do epidídimo; enquanto o lignocérico, erúcico, behênico, eicosatrienóico, eicosenóico e alfa-linolênico, apenas na cauda epididimária. Já os ácidos graxos elaídico, araquídico, eicosadienóico, araquidônico, tricosanóico e docosadienóico foram localizados somente na cabeça e cauda do epidídimo; o miristoléico e eicosapentaenoico apenas na cauda e corpo epididimário e os ácidos graxos butírico e gama-linolênico foram evidenciados somente na cabeça e corpo do epidídimo (Tabela 10).

Tabela 10 – Perfil de ácidos graxos (mg/dL) no fluido epididimário oriundo dos distintos segmentos do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) de cães. São Paulo, 2013

	Cabeça	Corpo	Cauda
Butírico	80,51	15,88	*
Capróico	3,87 ± 0,83	21,89	44,44 ± 22,17
Caprílico	3135,84 ± 1640,87	3467,34 ± 917,79	25493,90 ± 20432,01
Cáprico	26,15 ± 19,05	11,25 ± 1,25	25,36 ± 9,78
Undecanóico	16,74	88,13	13,61
Láurico	3,68	4,85	8,28
Tridecanóico	6,86 ^B	24,07 ^A	10,81 ± 0,37 ^B
Mirístico	*	10,16	*
Pentadecanóico	*	10,26	*
Palmítico	*	15,91	*
Esteárico	33,10 ± 5,64 ^A	68,85 ± 11,35 ^A	171,19 ± 26,22 ^B
Araquídico	4,21	*	23,08 ± 12,89
Behênico	-	*	16,10
Tricosanóico	7,88 ± 0,75	*	47,48 ± 23,24
Lignocérico	*	*	8633,09 ± 7868,12
Mirosteleico	*	473,62	1332,14 ± 453,92
Heptadecenóico	17,06 ± 4,33 ^A	24,18 ± 3,45 ^A	129,21 ± 20,21 ^B
Heptadecanóico	8,36 ± 1,36	9,47 ± 0,63	23,15 ± 10,78
Elaídico	7,08	*	21,64 ± 9,17
Oleico	8,92 ± 1,27	9,74	25,92 ± 4,94
Ecosenoico	*	*	38,55
Erúcico	*	*	9,16
Nervônico	15,11 ± 3,31	16,72 ± 1,49	41,52 ± 10,56
Linolelaídico	6,49	14,93 ± 3,70	17,26 ± 5,13
Linoleico	4,68 ± 0,75 ^A	10,49 ± 2,50 ^B	11,03 ± 1,17 ^B
Eicosadienóico	13,01	*	13,28
Docosadienóico	10,59 ± 4,76	*	25,96 ± 8,47
Gama-Linoleico	5,82	10,81	*
Alfa-Linoleico	*	*	17,40
Eicosatrienóico	*	*	12,12 ± 1,00
Araquidônico	7,28 ± 0,91	*	32,10 ± 9,57
Ecosapentaenóico	*	17,52	46,65 ± 30,51
DHA	7,95 ± 2,31 ^A	33,90 ± 22,17 ^B	26,93 ± 2,58 ^{AB}

A-B na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05). * Não identificado.

Na análise do perfil dos ácidos graxos nos espermatozoides epididimários (Tabela 11), foi possível observar quantidades semelhantes dos ácidos graxos capróico (C6:0) e cáprico (C10:0) em todos os segmentos epididimários. Já os ácidos graxos undecanóico (C11:0), oleico (C18:1n9c) e nervônico (C24:1n9) foram

detectados somente nos segmentos da cabeça e corpo do epidídimo, enquanto o tridecanóico (C13:0) e palmítico (C16:0) foram identificados apenas nos segmentos de corpo e cauda de epidídimo. Os ácidos graxos butírico (C4:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), miristoleico (C14:1) e palmitoleico (C16:1) foram encontrados apenas no corpo do epidídimo; o linoleaídico (C18:2n6t) e araquidônico (C20:4n6) exclusivamente na cabeça; e o gama-linolênico (C18:3n6) somente nas amostras da cauda do epidídimo.

As concentrações dos ácidos graxos caprílico (C8:0), heptadecenóico (C15:1), heptadecanóico (C17:0), esteárico (C18:0) e DHA (C22:6n3) na cabeça e corpo do epidídimo foram estatisticamente inferiores à cauda. Todavia, analisando a concentração do ácido graxo linoleico (C18:2n6c) nos espermatozoides, nota-se superioridade na cauda, porém, sem diferença com a cabeça do epidídimo. Ainda, ressalta-se um incremento dos níveis do ácido graxo behênico (C22:2) na cabeça epididimária em relação à cauda que, por sua vez, foi superior ao corpo do epidídimo.

Tabela 11 – Perfil de ácidos graxos (mg/dL) nos espermatozoides oriundos dos distintos segmentos do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) de cães. São Paulo, 2013

	Cabeça	Corpo	Cauda
Butírico	*	294,75	*
Capróico	21,49 ± 13,06	133,54 ± 83,10	1486,92 ± 1040,43
Caprílico	13915,63 ± 9278,72 ^A	15273,23 ± 5796,17 ^A	166899,87 ± 92944,15 ^B
Cáprico	10,34 ± 1,11	109,02 ± 68,63	261,38 ± 94,15
Undecanóico	17,54	1013,10	*
Láurico	*	65,63	*
Tridecanóico	*	100,06 ± 63,22	498,25
Mirístico	*	131,42 ± 39,94	*
Palmítico	*	41,42	394,49
Esteárico	137,76 ± 43,45 ^A	159,02 ± 12,25 ^A	1385,99 ± 517,63 ^B
Miristoleico	*	2048,77	*
Heptadecenóico	92,66 ± 18,70 ^A	75,73 ± 11,47 ^A	939,84 ± 415,22 ^B
Palmitoleico	*	108,73	*
Heptadecanóico	48,92 ± 33,35 ^A	44,23 ± 16,89 ^A	218,02 ^B
Oleico	163,79 ± 142,33	67,78 ± 32,61	*
Nervônico	23,70	138,46 ± 79,08	*
Linolelaídico	30,99 ± 11,85	*	*
Linoleico	72,34 ± 61,94 ^{AB}	40,06 ± 5,71 ^A	222,23 ± 77,36 ^B
Docosadienóico	339,67 ^A	55,64 ± 2,45 ^B	313,10 ^C
Gama-Linoleico	*	*	294,52
Araquidônico	68,73	*	*
DHA	101,71 ± 61,65 ^A	126,07 ± 30,88 ^A	1860,80 ± 1374,62 ^B

A-C na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05), * Não identificado.

Na comparação entre os ácidos graxos presentes entre o fluido e nos espermatozoides epididimários, observou-se, na região da cabeça do epidídimo (Tabela 12), a presença dos ácidos graxos: butírico (C4:0), láurico (C12:0), tridecanóico (C13:0), elaídico (C18:1n9t), gama-linolênico (C18:3n6), araquídico (C20:0), eicosadienóico (C20:2) e tricosanóico (C23:0) apenas no fluido epididimário. Ainda, as concentrações dos ácidos graxos heptadecenóico (C15:1 – p=0,0139), esteárico (C18:0 – p=0,0439), araquidônico (C20:4n6 – p=0,0163) e docosadienóico (C22:2 – p=0,0139) foram superiores nas amostras dos espermatozoides em comparação ao fluido da cabeça epididimária.

Tabela 12 – Perfil de ácidos graxos (mg/dL) nos espermatozoides e fluido oriundos da cabeça do epidídimo de cães. São Paulo, 2013

	Fluido	Espermatozoide	P
Butírico	80,51	*	*
Capróico	3,87 ± 0,83	21,49 ± 13,06	0,3096
Caprílico	3135,84 ± 1640,87	13915,63 ± 9278,72	0,3129
Cáprico	26,15 ± 19,05	10,34 ± 1,11	0,4677
Undecanóico	16,74	17,54	*
Láurico	3,68	*	*
Tridecanóico	6,86	*	*
Estearico	33,10 ± 5,64	137,76 ± 43,45	0,0439
Araquídico	4,21	*	*
Tricosanóico	7,88 ± 0,75	*	*
Heptadecenóico	17,06 ± 4,33	92,66 ± 18,70	0,0139
Heptadecanóico	8,36 ± 1,36	48,92 ± 33,35	0,2910
Elaídico	7,08	*	*
Oleico	8,92 ± 1,27	163,79 ± 142,33	0,2405
Nervônico	15,11 ± 3,31	23,70	0,3303
Linolelaídico	6,49	30,99 ± 11,85	0,4438
Linoleico	4,68 ± 0,75	72,34 ± 61,94	0,1854
Eicosadienóico	13,01	*	*
Docosadienóico	10,59 ± 4,76	339,67	0,0159
Gama-Linoleico	5,82	*	*
Araquidônico	7,28 ± 0,91	68,73	0,0163
DHA	7,95 ± 2,31	101,71 ± 61,65	0,1794

* Não identificado.

Na região do corpo do epidídimo, os ácidos graxos presentes apenas no fluido epididimário foram o pentadecanóico (C15:0), linolelaídico (C18:2n6t), gama-linolênico (C18:3n6) e eicosapentenóico (C20:5n3). Já os encontrados exclusivamente nos espermatozoides foram o docosadienóico (C22:2) e palmitoleico (C16:1). Comparando-se a duas matrizes de amostras, os ácidos graxos heptadecenóico (C15:1 – p=0,088), estearico (C18:0 – p=0,0006) e linoleico (C18:2n6c – p=0,0007) apresentaram maior concentração nos espermatozoides em comparação ao fluido epididimário (Tabela 13).

Tabela 13 – Perfil de ácidos graxos (mg/dL) nos espermatozoides e fluido oriundos do corpo do epidídimo de cães. São Paulo, 2013

	Fluido	Espermatozoide	P
Butírico	15,88	294,75	*
Capróico	21,89	133,54 ± 83,10	0,5709
Caprílico	3467,34 ± 917,79	15273,23 ± 5796,17	0,1112
Cáprico	11,25 ± 1,25	109,02 ± 68,63	0,2902
Undecanóico	88,13	1013,10	*
Láurico	4,85	65,63	*
Tridecanóico	24,07	100,06 ± 63,22	0,6138
Mirístico	10,16	131,42 ± 39,94	0,3300
Pentadecanóico	10,26	*	*
Palmítico	15,91	41,42	*
Esteárico	68,85 ± 11,35	159,02 ± 12,25	0,0006
Miristoleico	473,62	2048,77	*
Heptadecenóico	24,18 ± 3,45	75,73 ± 11,47	0,0088
Palmitoleico	*	108,73	*
Heptadecanóico	9,47 ± 0,63	44,23 ± 16,89	0,0854
Oleico	9,74	67,78 ± 32,61	0,4914
Nervônico	16,72 ± 1,49	138,46 ± 79,08	0,3667
Linolelaídico	14,93 ± 3,70	*	*
Linoleico	10,49 ± 2,50	40,06 ± 5,71	0,0087
Docosadienóico	*	55,64 ± 2,45	*
Gama-Linoleico	10,81	*	*
Eicosapentenóico	17,52	*	*
DHA	33,90 ± 22,17	126,07 ± 30,88	0,0938

* Não identificado.

Os ácidos graxos presentes apenas no fluido epididimário da cauda do epidídimo foram: undecanóico (C11:0), láurico (C12:0), miristoleico (C14:1), elaídico (C18:1n9t), oleico (C18:1n9c), linoleaídico (C18:2n6t), alfa-linolênico (C18:3n3), araquídico (C20:0), ecosenóico (C20:1n9), eicosadienóico (C20:2), araquidônico (C20:4n6), eicosatrienóico (C20:3n3), behênico (C22:0), eruérico (C22:1n9), eicosapentenóico (20:5n3), tricosanóico (C23:0), lignocérico (C24:0) e nervônico (C24:1n9). Já os ácidos graxos presentes somente nas células espermáticas foram o palmítico (C16:0) e o gama-linolênico (C18:3n6) (Tabela 14). Os ácidos graxos esteárico (C18:0 – p=0,0186), heptadecanóico (C17:1 – p=0,0120), heptadecenóico (C15:1 – p=0,0374), cáprico (C10:0 – p=0,0469), tridecanóico (C13:0 – p=0,0008) e docosadienóico (C22:2 – p=0,0006) estiveram em maior concentração nos espermatozoides em comparação ao fluido epididimário (Tabela 14).

Tabela 14 – Perfil de ácidos graxos (mg/dL) nos espermatozoides e fluido oriundos da cauda do epidídimo de cães. São Paulo, 2013

	Fluido	Espermatozoide	P
Capróico	44,44 ± 22,17	1486,92 ± 1040,43	0,3977
Caprílico	25493,90 ± 20432,01	166899,87 ± 92944,15	0,2262
Cáprico	25,36 ± 9,78	261,38 ± 94,15	0,0469
Undecanóico	13,61	*	*
Láurico	8,28	*	*
Tridecanóico	10,81 ± 0,37	498,25	0,0008
Palmítico	*	394,49	*
Esteárico	171,19 ± 26,22	1385,99 ± 517,63	0,0186
Araquídico	23,08 ± 12,89	*	*
Behênico	16,10	*	*
Tricosanóico	47,48 ± 23,24	*	*
Lignocérico	8633,09 ± 7868,12	*	*
Miristoleico	1332,14 ± 453,92	*	*
Heptadecenóico	129,21 ± 20,21	939,84 ± 415,22	0,0374
Heptadecanóico	23,15 ± 10,78	218,02	0,0120
Elaídico	21,64 ± 9,17	*	*
Oleico	25,92 ± 4,94	*	*
Ecosenóico	38,55	*	*
Erúico	9,16	*	*
Nervônico	41,52 ± 10,56	*	*
Linolelaídico	17,26 ± 5,13	*	*
Linoleico	11,03 ± 1,17	222,23 ± 77,36	0,0525
Eicosadienóico	13,28	*	*
Docosadienóico	25,96 ± 8,47	313,10	0,0006
Alfa-Linoleico	17,40	*	*
Gama-Linoleico	*	294,52	*
Eicosatrienoico	12,12 ± 1,00	*	*
Araquidônico	32,10 ± 9,57	*	*
Eicosapentenóico	46,65 ± 30,51	*	*
DHA	26,93 ± 2,58	1860,80 ± 1374,62	0,0531

* Não identificado.

6.3 DISCUSSÃO

A membrana plasmática dos espermatozoides é constituída por uma bicamada de fosfolipídios, sendo a unidade funcional, os ácidos graxos. Estes

últimos podem assumir a forma saturada (sem ligações duplas) e insaturada (com ligações duplas) (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985). As mudanças na composição lipídica da membrana plasmática são essenciais para a estocagem e transporte dos espermatozoides pelo trato reprodutivo masculino, além do fornecimento à célula espermática dos elementos necessários para a habilidade fecundante. A reorganização lipídica dos espermatozoides ocorre durante os eventos da maturação epididimária, mediados por constituintes proteicos e lipídicos do fluido epididimário (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985; LENZI et al., 1996; BELLEANNEE et al., 2011a).

No presente estudo, foi possível observar que a concentração de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados nos espermatozoides foi superior na cauda do epidídimo. Tal resultado diverge do estudo em suínos de Nikolopoulou; Soucek; Vary (1985), os quais não observaram alterações nos níveis de ácidos graxos poliinsaturados durante a maturação espermática. O referido resultado nos espermatozoides caninos pode ser atribuído, aos ácidos graxos saturados, principalmente à predominância do caprílico (C8:0) e esteárico (C18:0). Nos monoinsaturados, há superioridade do heptadecenóico (C15:1), enquanto para os poliinsaturados, predomina o docosa-hexaenoico (DHA - C22:6n3).

No perfil dos ácidos graxos totais (saturados, monoinsaturados e insaturados), observou-se oscilações na composição lipídica dos espermatozoides durante a migração pelo epidídimo. Por exemplo, os ácidos graxos undecanóico (C11:0) e nervônico (C24:1n9) fazem parte da membrana plasmática dos espermatozoides da cabeça e corpo do epidídimo, mas estavam ausentes na cauda epididimária. Por outro lado, notamos ausência dos ácidos graxos tridecanóico (C13:0) e palmítico (C16:0) nos espermatozoides da cabeça do epidídimo, mas estavam presentes a partir do segmento do corpo epididimário. O ácido graxo palmítico foi anteriormente detectado em homens normozoospermicos, mas ausente em indivíduos astenozoospermicos e oligoastenozoospermicos, indicando sua participação na composição lipídica de espermatozoides normais (KHOSROWBEYGI; ZARGHAMI, 2007). As modificações no perfil de ácidos graxos dos espermatozoides epididimários ilustram as modulações essenciais da membrana plasmática durante a maturação, permitindo uma visão ampla e ainda pouco explorada dos eventos capitais que resultam em normospermia, motilidade e alta atividade mitocondrial e, portanto, aptidão à fecundação (TITTARELLI et al., 2006). Ainda, Horrobin (1993) relata que as modificações na composição lipídica dos

espermatozoides podem ocorrer por efeito da desnaturação e alongação dos ácidos graxos, conforme anteriormente sugerido no trabalho clássico de Davis; Bridges; Coniglio (1966), ao evidenciar as modulações do ácido araquidônico em testículo de ratos.

Para que as modificações da composição lipídica da membrana plasmática ocorram nos espermatozoides, deve haver interferência das proteínas e lipídeos presentes no fluido epididimário (GUYONNET et al., 2011), processo ainda pouco explorado na espécie canina. Assim, no tocante aos ácidos graxos saturados presentes no fluido epididimário de cães, notou-se aumento gradativo entre a cabeça, corpo e cauda, destacado pela maior concentração dos ácidos graxos caprílico (C8:0) e lignocérico (24:0). Já para os ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados, não ocorreu diferença estatística entre os segmentos epididimários. Igualmente ao perfil de ácidos graxos nos espermatozoides epididimários, houve modulação da composição lipídica do fluido conforme a região do epidídimo. De fato, o ácido graxo lignocérico (24:0) foi identificado somente no fluido da cauda do epidídimo e o miristoleico (C14:1) presente apenas a partir do corpo epididimário. Em relação ao ácido graxo docosa-hexanoico (DHA – C22:6n3), observou-se maior concentração no fluido da região do corpo e cauda do epidídimo. O fluido oriundo da cauda do epidídimo destacou-se por apresentar diversos ácidos graxos que estavam ausentes ou em baixas concentrações no corpo e cabeça, tais como o araquidônico (C20:4n6), oleico (C18:1n9c) e esteárico (C18:0). Tais ácidos graxos também foram identificados por Khosrowbeygi; Zarghami (2007) em homens normozoospermicos. Ademais, Nikolopoulou, Soucek e Vary (1985) também observaram o aumento quantitativo do ácido esteárico durante a maturação espermática em cachorros.

De acordo com Parks; Hammerstedt (1985) os lipídeos presentes no fluido epididimário podem ser transferidos para a composição da célula espermática. Por este motivo, os ácidos graxos encontrados na análise do fluido epididimário podem agir como sinalizadores e reguladores da secreção de lipídeos pelas células do lúmen epididimário, sendo posteriormente incorporados aos espermatozoides. De fato, observou-se maior concentração ou variabilidade de ácidos graxos no fluido da cauda do epidídimo, local onde o espermatozoide atinge o maior grau de maturação. Portanto, no qual a composição lipídica da membrana plasmática já está estabelecida (JERVIS; ROBAIRE, 2001). Ainda, nas análises comparativas entre os ácidos graxos presentes no fluido e nos espermatozoides epididimários,

identificamos maior variabilidade no fluido. Entretanto, alguns ácidos graxos estavam em maior quantidade nas células espermáticas como, por exemplo, o ácido araquidônico, esteárico, linoleico, DHA, cáprico e docosadienóico. Ademais, ao analisarmos a composição lipídica geral, houve diferenças dos ácidos graxos saturados e poliinsaturados entre os segmentos da cauda e corpo do epidídimo. Portanto, podemos inferir que os ácidos graxos presentes no lúmen epididimário tenham sido incorporados às células espermáticas, elevando a concentração lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides. Por outro lado, vale destacar que os ácidos graxos presentes no fluido epididimário apresentam-se diluídos, enquanto os espermatozoides tem sua estrutura de membrana rica em fosfolípidios, o que também pode justificar a diferença nas concentrações dos ácidos graxos do fluido e espermatozoides epididimários (FLESCH; GADELLA, 2000).

Os resultados apresentados neste capítulo descrevem de maneira temporal (cabeça, corpo e cauda) o perfil de ácidos graxos presentes no fluido e espermatozoides epididimários de cães. Tais resultados podem contribuir, desta maneira, para maiores elucidações da fisiologia reprodutiva da espécie e possibilitar novas perspectivas às pesquisas no âmbito da composição bioquímica dos componentes epididimários.

Capítulo 3

7 PROTEÔMICA

Conforme mencionado anteriormente, a maturação espermática é mediada por constituintes presentes no fluido epididimário, dentre estes, as proteínas. Portanto, o presente capítulo propõe abordar a constituição proteica do fluido epididimário.

7.1 MATERIAL E MÉTODOS

A análise proteômica foi realizada na Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) – Campus Diadema. A metodologia empregada no presente trabalho pode ser dividida em seis etapas básicas, descritas a seguir:

- Etapa 1: Preparo das amostras (dosagem de proteína total e precipitação).
- Etapa 2: Focalização isoeletrica (primeira dimensão).
- Etapa 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida (segunda dimensão).
- Etapa 4: Detecção de proteínas.
- Etapa 5: Análise da imagem.

7.1.1 Etapa 1 - Preparo das Amostras

Inicialmente, foi adicionado às amostras de fluido epididimário, na proporção de 1:2, o inibidor de proteases *SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free* diluído em tampão fosfato (10 mM / pH 7,0 - Anexo A), a fim de evitar a degradação proteica. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -80°C.

7.1.1.1 Dosagem de Proteína Total

As dosagens de proteína total do plasma epididimário foram realizadas com o escopo de padronizar a quantidade de amostra necessária para a eletroforese bidimensional. A técnica de dosagem de proteínas total seguiu o método descrito por Bradford (1976) e consistiu na diluição das amostras na proporção de 1:5 (2 µL de amostra para 8 µL de água milli-Q) e preparação da curva padrão utilizando a albumina sérica bovina (mg/mL - diluição: 100%, 75%, 50%, 25% e 0%). Após a realização do método de Bradford (1976), e incubação durante 15-20 minutos em temperatura ambiente, foi realizada a leitura de absorbância de cada amostra em 480 nm sob espectrofotometria de microplacas *Epoch*™.

Após a dosagem de proteína total, estipulou-se o uso de 500 µg de proteínas por amostra, mínimo necessário para a realização da eletroforese bidimensional. Porém, para alcançar a quantidade de 500 µg de proteína, foi necessário reagrupar as amostras do presente experimento em *pools*. Desta forma, optou-se por respeitar os mesmos 5 *pools* utilizados para as análises do capítulo 2, para os grupos experimentais CAUDA e CORPO do epidídimo (Tabela 15). Para a análise das amostras da CABEÇA do epidídimo, foi necessário novo reagrupamento em três *pools* (junção dos *pools* 2, 3 e 5) para alcançar a concentração de 500 µg de proteína por amostra, havendo repetitividade mecânica na confecção e análise dos géis, conforme apresentado na tabela 16.

Tabela 15 – Amostras dos grupos CAUDA e CORPO, reagrupadas de acordo com a concentração de proteína total, para a formação dos *pools* (n=5). São Paulo, 2013

<i>Pool 1</i>	<i>Pool 2</i>	<i>Pool 3</i>	<i>Pool 4</i>	<i>Pool 5</i>
Cão 1	Cão 4	Cão 10	Cão 7	Cão 2
Cão 3	Cão 13	Cão 16	Cão 12	Cão 5
Cão 11	Cão 14	Cão 21	Cão 18	Cão 6
Cão 15	Cão 20	Cão 22	Cão 19	Cão 8

Tabela 16 – Amostras do Grupo CABEÇA reagrupadas de acordo com a concentração de proteína total, para a formação dos pools (n=4). São Paulo, 2013

Pool 1	Pool 2+3+5	Pool 4	Pool 2+3+5
Cão 1	Cão 4	Cão 7	Cão 4
Cão 3	Cão 13	Cão 12	Cão 13
Cão 11	Cão 14	Cão 18	Cão 14
Cão 15	Cão 20	Cão 19	Cão 20
	Cão 10		Cão 10
	Cão 16		Cão 16
	Cão 21		Cão 21
	Cão 22		Cão 22
	Cão 2		Cão 2
	Cão 5		Cão 5
	Cão 6		Cão 6
	Cão 8		Cão 8

7.1.1.2 Precipitação de Proteínas

Para a precipitação das proteínas, 400 µL de cloreto de potássio (KCl 1%) foram adicionados ao volume de amostra equivalente a 500 µg de proteínas, formando um composto sólido. A tal precipitado, foi adicionada solução de metanol/clorofórmio na diluição 1:2 e homogeneizado por vórtex, proporcionando a separação da porção proteica do plasma epididimário (já saturada pelo KCl) do restante (p.e. lipídeos) (BLIGH; DYER, 1959). Após centrifugação (14.000g / 20 minutos / 4°C), a parte líquida foi desprezada e o pellet de proteínas foi mantido *overnight* para a evaporação dos reagentes remanescentes.

7.1.2 Etapa 2 – Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)

Esta etapa designou-se à separação eletroforética das proteínas por diferenças de cargas ou pontos isoelétricos, pois, ao serem submetidas a um campo

elétrico, as proteínas migram pelo gel até a faixa de pH referente ao seu ponto isoelétrico, permanecendo com carga neutra (STINSON, 1975).

7.1.2.1 Reidratação Ativa das Fitas

As fitas de IPG (*immobilized pH gel*) foram adquiridas comercialmente na forma desidratada, no tamanho de 18 cm e de pH 3-10, sendo necessária a reidratação. Para tal, 500 μ L da solução de reidratação (Anexo B) foram adicionados a cada amostra e a solução agitada até a solubilização do *pellet* de proteínas. Após um período de descanso de 40 minutos, a solução reidratada foi aplicada no poço de escolha da bandeja do *Protean IEF Cell* (Bio-Rad). Em seguida, com o auxílio de pinça, a fita de IPG foi adicionada ao poço equivalente, atentando-se para a marcação de polos positivos e negativos e com a superfície do gel virada para baixo (Figura 15). Em seguida, 2,5 mL de óleo mineral foi acrescentado à cada fita para evitar a cristalização da uréia (presente na solução de reidratação). O período de reidratação foi de 12 a 14 horas, a 18°C, com voltagem ativa de 50 V (Anexo C).

Figura 15 – Posicionamento da fita IPG (Seta A), com amostras diluídas em solução de reidratação em aparelho Protean IEF Cell (Bio-Rad)

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2013)

7.1.2.2 Focalização Isoelétrica

Após a reidratação, dois eletrodos *wicks* foram colocados em cada extremidade das fitas de IPG (polo positivo e polo negativo). A utilização dos eletrodos visou manter as cargas das proteínas a serem focalizadas entre os polos cátodo e anodo. Então, a focalização isoeletrica (primeira dimensão) iniciou-se com diferentes fases de voltagem. O processo durou em média 11 horas, com voltagens e tempo variados (Anexo C).

7.1.2.3 Armazenamento das Fitas

Terminada a focalização isoeletrica, as fitas foram estocadas em recipiente adequado e cobertas com 2 mL de óleo mineral. O recipiente era embalado em filme plástico e as fitas, estocadas a -20°C até o dia seguinte.

7.1.3 Etapa 3 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (Segunda Dimensão)

A eletroforese em gel bidimensional reúne dois métodos distintos de separação de proteínas, uma vez que, inicialmente, há separação por cargas (focalização isoeletrica) e, posteriormente, por massas. O resultado de tal separação conjunta é um gel com diversas marcações (spots), correspondente a uma proteína distinta, pois não há sobreposição de proteínas.

7.1.3.1 Preparação do Gel de Poliacrilamida

Para o preparo e montagem dos géis de 12,5% com 1,5 mm de espessura, foi utilizada a cuba *Protean II Multi-gel (Bio-Rad)* e o protocolo de preparo está descrito na tabela 17.

Tabela 17 – Preparo do gel de Poliacrilamida 12,5%. São Paulo, 2013

Componente	Concentração	Quantidade (6 géis)
Solução de Poliacrilamida (Anexo D)	4,1M Acrilamida+0,8% Bis	168 mL
Tampão Separador (Anexo E)	1m5M Tris+0,4% SDS	109,2 mL
TEMED		300 µL
Persulfato de Amônio (APS)	1%	3 mL
H ₂ O Milli-Q	Qsp	140,7 mL

O gel de poliacrilamida é basicamente composto por ligações cruzadas de acrilamida e bis-acrilamida, as quais unidas compõem um polímero com matriz porosa, representado pelo caminho por onde as proteínas passarão. Dentre os constituintes do gel, destaca-se o tampão separador, representado, principalmente, pelo dodecilsulfato de sódio (SDS), o qual tem a função de desnaturar as proteínas. Ao transformá-las em sua estrutura linear, o SDS elimina o efeito da carga proteica que poderá interferir na separação pela segunda dimensão, evitando a sobreposição de proteínas (DAMERVAL et al., 1986).

7.1.3.2 Reequilíbrio das Fitas

Após a efetivação da focalização isoeletrica (primeira dimensão), o reequilíbrio das fitas de IPG se faz necessário. Para a realização desta etapa,

utilizou-se duas vezes a solução de reequilíbrio (Anexo F) por 15 minutos. O primeiro equilíbrio foi realizado com a solução de reequilíbrio e ditioneína (DTT) 1%, o qual elimina a estrutura tridimensional das proteínas, reduzindo-as à estrutura linear. O segundo equilíbrio foi obtido com a solução de reequilíbrio e a iodoacetamida 2,5%, com objetivo de promover a alquilação ou neutralização das cargas geradas pela redução estrutural das proteínas (DAMERVAL et al., 1986). Desta maneira, com a ação do SDS, DTT e iodoacetamida, as proteínas migrarão entre os poros da malha do gel e serão separadas pelo peso molecular e não mais por carga (RABILLOUD; LUCHE; CHEVALLET, 2002).

7.1.3.3 Eletroforese

Posteriormente ao reequilíbrio, as fitas foram posicionadas no topo do gel de poliacrilamida, ao lado da aplicação do eletrodo *wicks* com 8 µL de padrão molecular (*Precision plus protein™ standards – Bio-Rad*) (Figura 16), para, então, serem selados com solução de agarose 0,5% (Anexo G – Figura 17). A corrida foi realizada em uma cuba de eletroforese conectada ao aparelho *Bio Rad PowerPac HC Electrophoresis Power Supply*, (96 mA por 30 minutos e 360 mA por 6 horas) a temperatura de 13°C. A cada trinta minutos, o tampão de corrida (Anexo H) foi adicionado à cuba de eletroforese. A corrida foi finalizada quando a faixa de agarose (corada por azul de bromofenol) atingiu o final do gel, com duração média de 6 horas (Figura 18).

Figura 16 – Fita IPG (Seta A) e eletrodo *wicks* corado com padrão molecular (Seta B) no topo do gel de poliacrilamida

Fonte: Angrimani, D.S.R (2013)

Figura 17 – Fita de IPG e eletrodo *wicks* corado com padrão molecular sobre gel de poliacrilamida selado com a solução de agarose 0,5% (Seta A)

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2013)

Figura 18 – Corrida de géis, apresentando a faixa de agarose 0,5% (corada com azul de bromofenol) na região medial do gel (Seta A), com aproximadamente três horas de corrida.

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2013)

7.1.3.4 Fixação dos Géis

Ao término das corridas, os géis foram retirados da cuba de eletroforese e mantidos no equipamento *Dodeca Stainer (Bio-Rad)*, submersos na solução de coloração (Anexo I), sob agitação por aproximadamente 12 horas.

7.1.4 Etapa 4 – Detecção de Proteínas

Nesta etapa, utilizou-se uma solução de coloração com o objetivo de detectar as proteínas separadas na eletroforese, sendo que a solução de escolha foi a base de Coomassie G250 (Anexo J).

7.1.4.1 Coloração dos Géis

Após o período de incubação por 12 horas na solução de fixação, os géis foram submetidos a 3 lavagens durante 30 minutos em água milli-Q. Em seguida, a solução de coloração (Anexo J) foi adicionada e os géis permaneceram por 48 horas em agitação constante no *Dodeca Stainer* (Bio-Rad).

7.1.4.2 Descoloração dos Géis

Após 48 horas de coloração, os géis foram lavados durante uma hora por 3 vezes em solução de descoloração (Anexo K). Sequencialmente, os géis foram selados em saco plástico com 5 mL de solução de Ácido Acético 5% para identificação dos *spots* referentes às distintas proteínas (Figura 19).

Figura 19 – Detecção de spots marcados (Seta A), indicando que a corrida e coloração ocorreram dentro do esperado

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2013)

7.1.5 Análise das Imagens

Os géis foram digitalizados pelo *Densitometer GS-800 Calibrated (Bio-Rad)*, utilizando o software *Quantity One 4.6.9*. Em seguida, empregou-se o programa *Pd Quest Basic 8.0.1* para a confirmação e marcação dos spots de proteínas (Figura 20).

Figura 20 – Identificação de spot de proteína, na região da cabeça do epidídimo, utilizando o recurso do 3D Viewer do *Pd Quest Basic*. São Paulo, 2013

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2013)

7.1.5.1 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (2000). Através do aplicativo Guided Data Analysis, as variáveis respostas foram testadas quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. O efeito da região do epidídimo (cabeça vs. corpo vs. cauda) foi determinado utilizando testes paramétricos (Modelo Linear Geral procedimento PROC GLM) e não paramétricos (Wilcoxon), de acordo com a normalidade de resíduo (distribuição de Gauss) e de homogeneidade de variância. Caso não obedecessem a estas

premissas foram transformadas (logarítmo na base 10 – Log10 X; Raiz quadrada – RQ X; Quadrado – X²) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se, então, o procedimento NPAR1WAY não paramétrico. Para descrição dos resultados foram empregados os erros padrões das médias e as médias (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais; e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis. As variáveis qualitativas binomiais foram descritas através de seu valor em porcentagem, seguido de seus valores absolutos.

O nível de significância utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (regiões do epidídimo) para uma determinada variável resposta.

7.2 RESULTADOS

Os resultados reunidos neste capítulo demonstram os perfis de proteína presentes no fluido epididimário de cães, durante a maturação espermática nos três segmentos do epidídimo (cabeça, corpo e cauda).

Na análise de proteína total, detectamos maior concentração de proteínas na cauda do epidídimo em relação ao corpo e cabeça, os quais não diferiram entre si (Tabela 18). Por outro lado, o número de *spots* de proteínas identificados durante a análise dos géis foi superior na cabeça e corpo do epidídimo, em comparação à cauda. O mesmo padrão de resultados foi observado entre o número de *spots matched*, ou seja, aqueles de ocorrência comum entre os segmentos epididimários. Porém, não houve diferença estatística entre a porcentagem de *spots matched* nos segmentos epididimários de interesse (Tabela 18).

Tabela 18 – Concentração de proteína total (ng/mL), número total de spots de proteínas, spots de proteínas *matched* e porcentagem (%) de spots de proteínas *matched* avaliados pelo *Pd Quest 8.0.1* nos distintos segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda). São Paulo, 2013

	Cabeça	Corpo	Cauda
Proteína Total	631,20±29,67 ^A	648,22±109,06 ^A	5463,76±1276,76 ^B
Total de Spots	192,50±47,73 ^A	178,00±25,29 ^A	71,60±9,50 ^B
Total Spots <i>Matched</i>	94,75±1,49 ^A	96,80±4,31 ^A	35,20±5,3 ^B
% Spots <i>Matched</i>	53,50±8,38	57,20±5,91	48,20±3,53

A-B na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

A figura 21 ilustra a distribuição dos spots de proteínas por localização, nos segmentos cauda e corpo do epidídimo. É possível observar um número elevado de *spots* de proteínas na região do corpo, em comparação à cauda do epidídimo, com reduzido número de spots de proteínas na cauda e no corpo simultaneamente.

Figura 21 – Distribuição dos spots de proteínas nos segmentos do corpo e cauda do epidídimo. São Paulo, 2013

Os pontos situados ao redor da linha preta representam os spots de proteínas em comum (*matched*), na linha azul compreendem os spots detectados apenas no corpo e os na linha vermelha apenas na cauda. A linha verde compreende a regressão linear indicando correlação positiva entre corpo e cauda do epidídimo.

A distribuição dos spots de proteínas nos segmentos da cauda e cabeça do epidídimo está representada na figura 22. Igualmente à figura anterior, podemos observar maior número de spots de proteínas no segmento da cabeça do epidídimo, em relação à cauda, com número reduzido de proteínas presentes simultaneamente na cauda e cabeça epididimária.

Figura 22 – Distribuição dos spots de proteínas nos segmentos da cabeça e cauda do epidídimo. São Paulo, 2013

Os pontos situados ao redor da linha preta representam os spots de proteínas em comum (*matched*), na linha azul compreendem os spots detectados apenas na cabeça e os na linha vermelha apenas na cauda. A linha verde compreende a regressão linear indicando correlação positiva entre a cabeça e cauda do epidídimo.

A figura 23 apresenta os spots de proteínas detectados nos segmentos do corpo e cabeça do epidídimo, na qual é possível notar um número elevado de spots nos dois grupos, tanto simultaneamente, como individualmente em cada segmento do epidídimo.

Figura 23 – Distribuição dos spots detectados nos segmentos da cabeça e cauda do epidídimo. São Paulo, 2013

Os pontos situados ao redor da linha preta representam os spots de proteínas em comum (*matched*), na linha azul compreendem os spots detectados apenas na cabeça e os na linha vermelha apenas no corpo. A linha verde compreende a regressão linear indicando correlação positiva entre a cabeça e corpo do epidídimo.

7.3 DISCUSSÃO

O conhecimento do conteúdo proteico no lúmen epididimário é essencial para o estudo da fisiologia e função do epidídimo durante a maturação espermática. Sabe-se que a associação das proteínas epididimárias aos espermatozoides altera sua morfologia e funcionalidade, habilitando-os à motilidade, com a membrana plasmática e acrossomal híginas e, portanto, culminando com a aptidão à fertilização (RICKER et al., 1996). Contudo, até o momento, não há estudos sobre o perfil proteico durante a maturação espermática na espécie canina. Por este motivo, os dados obtidos no presente experimento podem ser considerados pioneiros.

Ao observarmos a variabilidade de proteínas existentes no fluido epididimário de cães, destaca-se as regiões da cabeça e corpo do epidídimo, em comparação à

cauda epididimária. Fouhecourt et al. (2000), em estudo com maturação epididimária de garanhões, observaram resultado semelhante ao do presente estudo, bem como Syntin et al. (1996), em trabalho com suínos, Belleannee et al. (2011b) em estudo com bovinos e Turner, Avery e Sawchuk (1994) em roedores. Os dados obtidos no presente trabalho permitem inferir que a secreção epididimária de proteínas na espécie canina ocorre de maneira regionalizada, em maior intensidade nos segmentos da cabeça e corpo do epidídimo. Tal padrão secretório decorre da alta complexidade de funções nos referidos segmentos epididimários, como por exemplo, permitir a aquisição da motilidade espermática e potencial de ligação ao oócito. Por outro lado, a cauda do epidídimo possui função direcionada ao armazenamento e preservação das células espermáticas e, portanto, demonstra um perfil inferior de proteínas epididimárias (LEGARE et al., 1999b; BELLEANNEE et al., 2011b; CABALLERO et al., 2012).

Legare et al. (1999b) afirmam que a região do corpo do epidídimo é o local de aquisição da capacidade fecundante dos espermatozoides humanos e, por este motivo, necessita de alta interação com as proteínas epididimárias. Além disto, Belleannee et al. (2011b) asseguram que as secreções proteicas na cabeça do epidídimo são beneficiadas pela baixa concentração de espermatozoides, facilitando o contato entre as proteínas e as células espermáticas durante a maturação epididimária. De fato, em nosso estudo observamos que os espermatozoides oriundos do corpo do epidídimo adquiriram motilidade e a baixa concentração espermática na cabeça e corpo do epidídimo (vide, capítulo 1) pode auxiliar tal função proteica, corroborando as assertivas dos referidos autores.

Por outro lado, observamos que a cauda do epidídimo apresenta concentração de proteína total mais elevada, em comparação ao corpo e cabeça epididimária. Tal resultado pode ser explicado pela alta concentração de células espermáticas na região da cauda do epidídimo e, desta forma, exige-se maior aporte proteico para a maturação espermática. Ainda, podemos relacionar a concentração de proteínas com o volume de fluido epididimário, já que no segmento da cabeça os espermatozoides estão em um ambiente proteico mais diluído (DACHEUX; GATTI; DACHEUX, 2003; DACHEUX et al., 2009).

Durante o transito epididimário, algumas proteínas são absorvidas, enquanto outras permanecem durante toda a maturação espermática. Por exemplo, em humanos, a albumina e transferina estão presentes por todo o ducto do epidídimo

(DACHEUX et al., 2006). No presente estudo, podemos observar que as proteínas que permaneceram presentes durante o transito epididimário (*matched*) foram superiores na cabeça e corpo, em relação à cauda do epidídimo, já que a função secretora nos segmentos iniciais é mais requerida. Por outro lado, na região mais distal do epidídimo (cauda), o papel das proteínas é diferenciado, alterando, desta forma, o perfil proteico e a repetitividade das proteínas neste segmento (MONCLUS et al., 2010; COHEN et al., 2011). Portanto, as proteínas simultaneamente identificadas nos segmentos epididimários podem ser importantes marcadores proteicos da maturação epididimária, podendo, no futuro, serem empregadas em protocolos de maturação *in vitro* de espermatozoides e no desenvolvimento de contraceptivos masculinos (O'RAND et al., 2011).

Os dados encontrados no presente trabalho podem contribuir para o estudo das proteínas presentes no fluído epididimário. Contudo, experimentos mais aprofundados na esfera reprodutiva canina são necessários, especialmente, a identificação de cada proteína presente nos segmentos epididimários, provendo maior compreensão da maturação espermática.

Considerações Finais

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo possui o escopo de contribuir para os conhecimentos fisiológicos em reprodução na espécie canina, a qual também é considerada modelo experimental para animais silvestres e humanos. Desta sorte, os resultados aqui compilados poderão ser aplicados, futuramente, em pesquisas que abordem contraceptivos masculinos, ou mesmo para auxiliar no tratamento de indivíduos portadores de afecções prejudiciais à maturação espermática nos epidídimos. Ainda, o estudo dos espermatozoides epididimários permitirá o desenvolvimento de novas biotecnologias reprodutivas aplicadas, tais como a aspiração percutânea de espermatozoides epididimários (PESA), aspiração microcirúrgica dos espermatozoides epididimários (MESA) e posterior utilização na injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), ou mesmo na maturação espermática *in vitro*. Entretanto, para o sucesso de tais biotécnicas, além da compreensão do estado morfofuncional dos espermatozoides, faz-se necessário o conhecimento ultraestrutural e bioquímico do processo de maturação espermática. As ferramentas laboratoriais, tais como a microscopia eletrônica, espectrometria de massas e a cromatografia, vêm ao encontro da lacuna de conhecimento nesta área de estudo.

Os espermatozoides são células extremamente especializadas para, em última análise, carrear eficientemente o material genético masculino até o trato genital feminino. Para tanto, devem possuir motilidade, membrana plasmática preservada e capacidade funcional de ligação à zona pelúcida do oócito. Por este motivo, durante a espermiogênese, considerada a última fase pós-meiótica da espermatogênese, a maior parte do citoplasma é eliminado, em conjunto com uma série de proteínas citoplasmáticas, visando diminuir o volume celular e beneficiar a mobilidade da célula. Adicionalmente, para maior proteção do material genético, a cromatina condensa-se pela troca de histonas em protaminas. No entanto, tal processo reduz a capacidade de transcrição gênica da célula espermática, por inacessibilidade da maioria dos genes (OLIVA; DIXON, 1991; OLIVA; CASTILLO, 2011; AMARAL et al., 2013a). Assim, estabelece-se o paradigma da ausência de transcrição nuclear no espermatozoide ejaculado (AMARAL; RAMALHO-SANTOS, 2013). Ademais, considera-se haver síntese protéica reduzida ou ausente a partir da

tradução dos genes nucleares do espermatozoide (BAKER, 2011). Neste contexto, o estudo da interação entre o ambiente extracelular e o espermatozoide torna-se fundamental, principalmente, durante a maturação espermática ao longo do epidídimo, local de aquisição de sua capacidade fecundante. Portanto, em função do silêncio transcricional e translacional do espermatozoide, o perfil proteico do plasma epididimário (extracelular) desempenha papel medular (AMARAL et al., 2013a). Corroborando tal assertiva, foram identificados, no presente estudo, um número e variedade de proteínas significativamente maior nas regiões da cabeça e corpo do epidídimo, em comparação à cauda. Por ser a região de maior maturidade espermática, a cauda do epidídimo não apresenta expressão intensa de proteínas responsáveis pelas alterações funcionais de aquisição da motilidade, aumento da atividade mitocondrial e estabilização das membranas plasmática e acrossomal. No entanto, são necessários estudos futuros para identificação protéica individualizada, no sentido de melhor compreender o papel das proteínas do plasma epididimário na maturação espermática em caninos.

A membrana plasmática do espermatozoide atua de forma ativa em sua habilidade fecundante e na comunicação com o oócito, sendo a fluidez da membrana um pré-requisito para a perfeita funcionalidade celular. Tanto a fluidez, como a flexibilidade da membrana celular, dependem principalmente de sua constituição lipídica (LENZI et al., 1996). No presente estudo, verificamos incremento da motilidade espermática, atividade mitocondrial e integridade da membrana plasmática durante o transito epididimário (cabeça x corpo x cauda), simultaneamente a alterações significativas do perfil lipídico, especialmente, da membrana plasmática. A elevada fluidez da membrana plasmática é proporcionada pela maior proporção de ácidos graxos insaturados em sua disposição estrutural. De fato, o completo rearranjo lipídico (aumento de insaturações) na estrutura da membrana plasmática foi observado em diferentes espécies durante a maturação espermática nos epidídimos (GAUNT; BROWN; JONES, 1983; WOLF et al., 1986). Em controvérsia, no presente estudo, observamos aumento da concentração de ácidos graxos saturados (caprílico e esteárico) na membrana plasmática dos espermatozoides oriundos da cauda epididimária. De acordo com Liu et al. (2008), o ácido graxo caprílico possui função antimicrobiana e protetora da membrana do espermatozoide. Portanto, o aumento das concentrações do ácido graxo caprílico pode ser responsável pela maior integridade da membrana plasmática, observada

nos espermatozoides da cauda epididimária. Por sua vez, o ácido graxo esteárico é o principal produto do sistema ácido graxo-sintase em células animais (MAIER; LEIBUNDGUT; BAN, 2008), exercendo seu efeito por dessaturação para ácido oleico (PAI; YEH, 1997). De fato, estudos indicam que a razão ácido esteárico : ácido oleico proporciona alteração na fluidez da membrana plasmática (APOSTOLOV et al., 1985; HABIB et al., 1987; FERMOR et al., 1992), possivelmente auxiliando na aquisição da motilidade pela célula espermática durante o trajeto epididimário.

Diferentemente de outras células, o espermatozoide maduro apresenta alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) em sua membrana plasmática (LENZI et al., 1994), configuração lipídica relacionada ao melhor padrão morfológico (LENZI et al., 2000) e motilidade espermática (NISSEN; KREYSEL, 1983). Dentre os ácidos graxos poliinsaturados, o DHA representa 50% do conteúdo total do espermatozoide humano (MARTINEZ-SOTO; LANDERAS; GADEA, 2013). De forma similar, no presente estudo, evidenciamos aumento na concentração de ácidos graxos poliinsaturados ao longo da maturação espermática, sendo o DHA o ácido graxo de maior concentração na membrana plasmática dos espermatozoides oriundos da cauda do epidídimo. O DHA é suscetível ao ataque das espécies reativas ao oxigênio, as quais tem como principal alvo o DNA e lipídeos espermáticos. Embora a maior quantidade de PUFAs fragilize a membrana plasmática, torna-a extremamente ativa e sensível a estímulos externos, características fundamentais à fertilização (LENZI et al., 2002). Além disto, a ocorrência de estresse oxidativo na célula espermática, fisiologicamente, propicia a capacitação espermática e, conseqüentemente, a fertilização (LI; SHANG; CHEN, 2004). Portanto, o DHA, além de ser considerado necessário para a fluidez da membrana plasmática, participa da aquisição da motilidade espermática e reação acrossomal (ROOKE; SHAO; SPEAKE, 2001). Por tal motivo, ao observarmos os resultados do presente estudo, podemos afirmar que o aumento das concentrações de DHA na membrana plasmática é essencial para as etapas finais da maturação epididimária, habilitando o espermatozoide à fecundação.

Os dados obtidos no presente estudo indicam que a utilização dos espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo pode ser alternativa viável para as biotécnicas da reprodução em canídeos. Com respeito à contracepção, os resultados do perfil de ácidos graxos direcionam para a utilização de inibidores das

enzimas responsáveis pela biossíntese dos ácidos graxos (e.g., *estearoil CoA dessaturase*), *no sentido de promover a desestruturação lipídica* dos espermatozoides da cauda do epidídimo e do ejaculado. Por outro lado, no tocante à utilização de espermatozoides imaturos para as biotécnicas reprodutivas (e.g., maturação *in vitro*), a adição de tais enzimas e de ácidos graxos importantes (e.g., DHA, esteárico e caprílico) poderá viabilizar o emprego de importantes técnicas de manipulação de gametas.

Conclusões

9 CONCLUSÕES

Em face do exposto, as conclusões do presente trabalho são:

1. A maturação espermática em cães ocorre de forma temporal nos segmentos epididimários, com respeito à composição química e modificações morfológicas dos espermatozoides;
 - 1.1. As principais modificações morfológicas observadas foram: migração da gota citoplasmática da região proximal da peça intermediária para a distal, remodelação acrossomal e diminuição da permeabilidade da membrana plasmática;
 - 1.2. Por outro lado, as alterações na composição química foram principalmente observadas nas mudanças do perfil de ácidos graxos dos espermatozoides;
2. Foi possível determinar o perfil de ácidos graxos na membrana plasmática dos espermatozoides e no fluído epididimário de forma temporal nos distintos segmentos do epidídimo;
 - 2.1. No segmento da cauda do epidídimo, há acréscimo no número total de ácidos graxos, destacando o DHA, ácido graxo essencial para proferir a fluidez necessária à membrana plasmática dos espermatozoides;
3. Foi possível determinar os atributos de motilidade espermática, atividade mitocondrial e integridade acrossomal dos espermatozoides durante a maturação no epidídimo.
 - 3.1. A cauda do epidídimo apresentou os parâmetros seminais mais próximos da normalidade (sêmen ejaculado) para a espécie;
4. Foi possível correlacionar as alterações físico-químicas com a morfologia espermática nos distintos segmentos epididimários;

4.1. Os parâmetros observados, tais como, motilidade, atividade mitocondrial, permeabilidade de membrana plasmática e acrossomal e morfologia espermática correlacionaram entre si, podendo contribuir para a maior elucidação dos fenômenos envolvidos na maturação epididimária.

5. Foi possível determinar que a secreção do perfil proteico no fluído epididimário ocorre de forma temporal nos distintos segmentos do epidídimo.

5.1. Há secreção regionalizada de proteínas equivalente a cada segmento epididimário, sendo a cabeça e corpo os de maior síntese proteica.

Referências

REFERÊNCIAS

ABINPET. Mercado pet deve faturar R\$ 154 bilhões em 2013. São Paulo, ABINPET, 2013. Disponível em: < <http://abinpet.org.br/imprensa/mercado-pet-deve-faturar-r-154-bilhoes-em-2013/>>. Acesso em: 23 ago. 2013.

ACOTT, T. S.; KATZ, D. F.; HOSKINS, D. D. Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: effects of forward motility protein and epididymal maturation. **Biol Reprod**, v. 29, n. 2, p. 389-399, 1983.

AITKEN, R. J.; NIXON, B.; LIN, M.; KOPPERS, A. J.; LEE, Y. H.; BAKER, M. A. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. **Asian J Androl**, v. 9, n. 4, p. 554-564, 2007.

AMANN, R. P. Function of the epididymis in bulls and rams. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 34, n., p. 115-131, 1987.

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; VEERAMACHANENI, D. N. The epididymis and sperm maturation: a perspective. **Reprod Fertil Dev**, v. 5, n. 4, p. 361-381, 1993.

AMANN, R. P.; HAY, S. R.; HAMMERSTEDT, R. H. Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. **Biol Reprod**, v. 27, n. 3, p. 723-733, 1982.

AMARAL, A.; CASTILLO, J.; RAMALHO-SANTOS, J.; OLIVA, R. The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. **Hum Reprod Update**, 2013a.

AMARAL, A.; LOURENCO, B.; MARQUES, M.; RAMALHO-SANTOS, J. Mitochondria functionality and sperm quality. **Reproduction**, v., n., p., 2013b.

AMARAL, A.; RAMALHO-SANTOS, J. The male gamete is not a somatic cell--the possible meaning of varying sperm RNA levels. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 2, p. 179-180, 2013.

ANGRIMANI, D. S.; LUCIO, C. F.; VEIGA, G. A.; SILVA, L. C.; REGAZZI, F. M.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Sperm maturation in dogs: sperm profile and

enzymatic antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa. **Andrologia**, 2013.

APOSTOLOV, K.; BARKER, W.; CATOVSKY, D.; GOLDMAN, J.; MATUTES, E. Reduction in the Stearic to Oleic-Acid Ratio in Leukemic-Cells - a Possible Chemical Marker of Malignancy. **Blut**, v. 50, n. 6, p. 349-354, 1985.

AXNER, E. Sperm maturation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 14-24, 2006.

AXNER, E.; HOLST, B. S.; LINDE-FORSBERG, C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 50, n. 6, p. 973-979, 1998.

AXNER, E.; LINDE-FORSBERG, C.; EINARSSON, S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 767-778, 1999.

AXNER, E.; PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E.; LINDE-FORSBERG, C.; SPINDLER, R. E. Creatine phosphokinase in domestic cat epididymal spermatozoa. **Mol Reprod Dev**, v. 62, n. 2, p. 265-270, 2002.

BAINBRIDGE, D. R.; JABBOUR, H. N. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. **Vet Rec**, v. 143, n. 6, p. 159-168, 1998.

BAKER, M. A. The 'omics revolution and our understanding of sperm cell biology. **Asian J Androl**, v. 13, n. 1, p. 6-10, 2011.

BARTH, A.; OKO, R. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa State: University Press, 1989.

BEDFORD, J. M. Morphological changes in rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. **J Reprod Fertil**, v. 5, p. 169-177, 1963.

BELLEANNÉE, C.; BELGHAZI, M.; LABAS, V.; TEIXEIRA-GOMES, A. P.; GATTI, J. L.; DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. **Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 1952-1964, 2011a.

BELLEANNÉE, C.; CALVO, E.; THIMON, V.; CYR, D. G.; LEGARE, C.; GARNEAU, L.; SULLIVAN, R. Role of microRNAs in controlling gene expression in different segments of the human epididymis. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34996, 2012.

BELLEANNÉE, C.; LABAS, V.; TEIXEIRA-GOMES, A. P.; GATTI, J. L.; DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. **J Proteomics**, v. 74, n. 1, p. 59-78, 2011b.

BELLEANNÉE, C.; THIMON, V.; SULLIVAN, R. Region-specific gene expression in the epididymis. **Cell Tissue Res**, v. 349, n. 3, p. 717-731, 2012.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção. Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n 101, de 28 de maio de 2003. Seção 1, p. 88-97.

BRIZ, M. D.; BONET, S.; PINART, B.; EGOZCUE, J.; CAMPS, R. Comparative-study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. **J Androl**, v. 16, n. 2, p. 175-188, 1995.

BROOKS, D. E. Androgen-regulated epididymal secretory proteins associated with post-testicular sperm development. **Ann N Y Acad Sci**, v. 513, p. 179-194, 1987.

CABALLERO, J.; FRENETTE, G.; D'AMOURS, O.; BELLEANNÉE, C.; LACROIX-PEPIN, N.; ROBERT, C.; SULLIVAN, R. Bovine sperm raft membrane associated Glioma Pathogenesis-Related 1-like protein 1 (GliPr1L1) is modified during the epididymal transit and is potentially involved in sperm binding to the zona pellucida. **J Cell Physiol**, v. 227, n. 12, p. 3876-3886, 2012.

CARVELLI, L.; BANNOUD, N.; AGUILERA, A. C.; SARTOR, T.; MALOSSI, E.; SOSA, M. A. Testosterone influences the expression and distribution of the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor in rat epididymis. Implications in the distribution of enzymes. **Andrologia**, 2013.

CHANDLER, J. A.; SINOWATZ, F.; PIERREPOINT, C. G. The ultrastructure of dog epididymis. **Urol Res**, v. 9, n. 1, p. 33-44, 1981.

CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 457-468, 2005.

COOPER, T. G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian J Androl**, v. 13, n. 1, p. 130-138, 2011.

COHEN, D. J.; MALDERA, J. A.; VASEN, G.; ERNESTO, J. I.; MUÑOZ, M. W.; BATTISTONE, M. A.; CUASNICÚ, P. S. Epididymal Protein CRISP1 Plays Different Roles During the Fertilization Process. **J Androl**, v. 32, n. 6, p. 672-678, 2011.

COOPER, T. G.; YEUNG, C. H. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. **Microsc Res Tech**, v. 61, n. 1, p. 28-38, 2003.

COPELAND, W. C. Mitochondrial DNA. Methods and protocols. Introduction. **Methods Mol Biol**, v. 197, p. v-vi, 2002.

CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Hum Reprod Update**, v. 15, n. 2, p. 213-227, 2009.

CRABO, B. Studies on the composition of epididymal content in nulls and boars. **Acta Vet Scand**, v. 22, p. 1-94, 1965. Suplemento 5.

CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biol Reprod**, v. 41, n. 4, p. 635-641, 1989.

CUMMINS, J. M.; JEQUIER, A. M.; KAN, R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? **Mol Reprod Dev**, v. 37, n. 3, p. 345-362, 1994.

DACHEUX, J. L.; BELGHAZI, M.; LANSON, Y.; DACHEUX, F. Human epididymal secretome and proteome. **Mol Cell Endocrinol**, v. 250, n. 1-2, p. 36-42, 2006.

DACHEUX, J. L.; BELLEANNEE, C.; JONES, R.; LABAS, V.; BELGHAZI, M.; GUYONNET, B.; DRUART, X.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Mammalian epididymal proteome. **Mol Cell Endocrinol**, v. 306, n. 1-2, p. 45-50, 2009.

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microsc Res Tech**, v. 61, n. 1, p. 7-17, 2003.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 831-841, 1997.

DAMERVAL, C.; DEVIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic-variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, n. 1, p. 52-54, 1986.

DAVIS, J. T.; BRIDGES, R. B.; CONIGLIO, J. G. Changes in lipid composition of the maturing rat testis. **Biochem J**, v. 98, n. 1, p. 342-346, 1966.

DE SOUZA, F. F.; BARRETO, C. S.; LOPES, M. D. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. **Theriogenology**, v. 68, n. 1, p. 100-106, 2007.

DEVI, L. G.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of the motility parameters of hamster spermatozoa during maturation. **Mol Reprod Dev**, v. 38, n. 1, p. 94-106, 1994.

ENSSLIN, M. A.; SHUR, B. D. Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. **Cell**, v. 114, n. 4, p. 405-417, 2003.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p. 375-387, 2000.

FERMOR, B. F.; MASTERS, J. R. W.; WOOD, C. B.; MILLER, J.; APOSTOLOV, K.; HABIB, N. A. Fatty-Acid Composition of Normal and Malignant-Cells and Cytotoxicity of Stearic, Oleic and Sterculic Acids Invitro. **European Journal of Cancer**, v. 28A, n. 6-7, p. 1143-1147, 1992.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

FOUCHECOURT, S.; METAYER, S.; LOCATELLI, A.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. **Biol Reprod**, v. 62, n. 6, p. 1790-1803, 2000.

FRASER, L. R.; UMAR, G.; SAYED, S. Na(+)-requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v. 97, n. 2, p. 539-549, 1993.

FRESHMAN, J. L. Semen collection and evaluation. **Clin Tech Small Anim Pract**, v. 17, n. 3, p. 104-107, 2002.

GALLON, F.; MARCHETTI, C.; JOUY, N.; MARCHETTI, P. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. **Fertil Steril**, v. 86, n. 5, p. 1526-1530, 2006.

GARRETT, J. E.; GARRETT, S. H.; DOUGLASS, J. A spermatozoa-associated factor regulates proenkephalin gene expression in the rat epididymis. **Mol Endocrinol**, v. 4, n. 1, p. 108-118, 1990.

GAUNT, S. J.; BROWN, C. R.; JONES, R. Identification of mobile and fixed antigens on the plasma membrane of rat spermatozoa using monoclonal antibodies. **Exp Cell Res**, v. 144, n. 2, p. 275-284, 1983.

GOOVAERTS, I. G. F.; HOFLACK, G. G.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; DE KRUIF, A.; BOLS, P. E. J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 323-330, 2006.

GRAHAM, J. K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 12, n. 1, p. 119-130, 1996.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Anim Reprod Sci**, v. 68, n. 3-4, p. 239-247, 2001.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; BAUMBER, J.; BALL, B. A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1691-1703, 2000.

GUYONNET, B.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L. The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. **J Androl**, v. 32, n. 6, p. 651-664, 2011.

HABIB, N. A.; HERSHMAN, M. J.; SALEM, R.; BARKER, W.; APOSTOLOV, K.; WOOD, C. B. Increased Erythrocyte Stearic-Acid Desaturation in Rats with Chemically-Induced Colorectal Carcinomas. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 2, n. 1, p. 12-14, 1987.

HEWITT, D. A.; LEAHY, R.; SHELDON, I. M.; ENGLAND, G. C. Cryopreservation of epididymal dog sperm. **Anim Reprod Sci**, v. 67, n. 1-2, p. 101-111, 2001.

HORI, T.; ICHIKAWA, M.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Artificial insemination of frozen epididymal sperm in beagle dogs. **J Vet Med Sci**, v. 66, n. 1, p. 37-41, 2004.

HORI, T.; UEHARA, Y.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Influence of the time between removal and cooling of the canine epididymis on post-thaw caudal epididymal sperm quality. **J Vet Med Sci**, v. 71, n. 6, p. 811-815, 2009.

HORROBIN, D. F. Fatty acid metabolism in health and disease: the role of delta-6-desaturase. **Am J Clin Nutr**, v. 57, n. 5 Suppl, p. 732S-736S; discussion 736S-737S, 1993.

HRUDKA, F. 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**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

IVELL, R.; PERA, I.; ELLERBROCK, K.; BEIGLBOCK, A.; GEBHARDT, K.; OSTERHOFF, C.; KIRCHHOFF, C. The dog as a model system to study epididymal gene expression. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 53, p. 33-45, 1998.

JERVIS, K. M.; ROBAIRE, B. Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. **Biol Reprod**, v. 65, n. 3, p. 696-703, 2001.

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

JONES, R. E.; PLYMATE, S. R. Evidence for the regulation of fatty acid utilization in human sperm by docosahexaenoic acid. **Biol Reprod**, v. 39, n. 1, p. 76-80, 1988.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v. 60, n. 7, p. 1249-1259, 2003.

KHOSROWBEYGI, A.; ZARGHAMI, N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 77, n. 2, p. 117-121, 2007.

KIRCHHOFF, C. The dog as a model to study human epididymal function at a molecular level. **Mol Hum Reprod**, v. 8, n. 8, p. 695-701, 2002.

KLINC, P.; MAJDIC, G.; STERBENC, N.; CEBULJ-KADUNC, N.; BUTINAR, J.; KOSEC, M. Establishment of a pregnancy following intravaginal insemination with epididymal semen from a dog castrated due to benign prostatic hyperplasia. **Reprod Domest Anim**, v. 40, n. 6, p. 559-561, 2005.

KROEMER, G.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A. Mitochondrial control of apoptosis. **Immunol Today**, v. 18, n. 1, p. 44-51, 1997.

LAKOSKI, K. A.; CARRON, C. P.; CABOT, C. L.; SALING, P. M. Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. **Biol Reprod**, v. 38, n. 1, p. 221-233, 1988.

LEGARE, C.; BERUBE, B.; BOUE, F.; LEFIEVRE, L.; MORALES, C. R.; EL-ALFY, M.; SULLIVAN, R. Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. **Mol Reprod Dev**, v. 52, n. 2, p. 225-233, 1999a.

LEGARE, C.; GAUDREAU, C.; ST-JACQUES, S.; SULLIVAN, R. P34H sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis. **Endocrinology**, v. 140, n. 7, p. 3318-3327, 1999b.

LENZI, A.; GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; PICARDO, M.; MARESCA, V.; PANFILI, E.; TRAMER, F.; BOITANI, C.; DONDERO, F. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. **Contraception**, v. 65, n. 4, p. 301-304, 2002.

LENZI, A.; GANDINI, L.; MARESCA, V.; RAGO, R.; SGRO, P.; DONDERO, F.; PICARDO, M. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. **Mol Hum Reprod**, v. 6, n. 3, p. 226-231, 2000.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Hum Reprod Update**, v. 2, n. 3, p. 246-256, 1996.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; TERMINALI, O.; PASSI, S.; DONDERO, F. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. **Hum Reprod**, v. 9, n. 11, p. 2044-2050, 1994.

LEPAGE, G.; ROY, C. C. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. **J Lipid Res**, v. 25, n. 12, p. 1391-1396, 1984.

LEVINE, N.; MARSH, D. J. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. **J Physiol**, v. 213, n. 3, p. 557-570, 1971.

LI, K.; SHANG, X.; CHEN, Y. High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male infertility. **Clin Chim Acta**, v. 346, n. 2, p. 199-203, 2004.

LIN, M.; RODGER, J. C. Acrosome formation during sperm transit through the epididymis in two marsupials, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) and the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). **J Anat**, v. 194, Pt 2, p. 223-232, 1999.

LIN, Y. Q.; LI, J. Y.; WANG, H. Y.; LIU, J.; ZHANG, C. L.; WANG, W. T.; LI, N.; JIN, S. H. Cloning and identification of a novel sperm binding protein, HEL-75, with antibacterial activity and expressed in the human epididymis. **Hum Reprod**, v. 23, n. 9, p. 2086-2094, 2008.

LIU, D. Y.; CLARKE, G. N.; BAKER, H. W. G. Relationship Between Sperm Motility Assessed with the Hamilton-Thorn Motility Analyzer and Fertilization Rates In Vitro. **J Androl**, v. 12, n. 4, p. 231-239, 1991.

LIU, K. S. Preparation of Fatty-Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of Lipids in Biological-Materials. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 71, n. 11, p. 1179-1187, 1994.

LONG, J. A.; WILDT, D. E.; WOLFE, B. A.; CRITSER, J. K.; DEROSI, R. V.; HOWARD, J. Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. **Biol Reprod**, v. 54, n. 3, p. 638-646, 1996.

MA, L.; YU, H.; NI, Z.; HU, S.; MA, W.; CHU, C.; LIU, Q.; ZHANG, Y. 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**, v. 288, n. 14, p. 10154-10165, 2013.

MAIER, T.; LEIBUNDGUT, M.; BAN, N. The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. **Science**, v. 321, n. 5894, p. 1315-1322, 2008.

MARTINEZ-PASTOR, F.; DIAZ-CORUJO, A. R.; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 64, n. 4, p. 958-974, 2005.

MARTINEZ-SOTO, J. C.; LANDERAS, J.; GADEA, J. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. **Andrology**, v. 1, n. 3, p. 365-375, 2013.

MONCLUS, M. A.; ANDREINA, C.; CABRILLANA, M. E.; SAEZ LANCELLOTTI, T. E.; RENSETTI, D. E.; CLEMENTI, M. A.; BOARELLI, P. V.; VINCENTI, A. E.; FORNÉS, M. W. Protein fraction isolated from epididymal fluid re-associates sperm in vitro: Possible role of serpins in rat rosettes assembly. **Mol Reprod Dev**, v. 77, n. 5, p. 410-419, 2010.

MURADÁS, P. R.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; GRANEMANN, L. C.; SANTOS, I. W.; PIMPÃO, C. T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, p. 69-74, 2006.

NIKOLOPOULOU, M.; SOUCEK, D. A.; VARY, J. C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. **Biochim Biophys Acta**, v. 815, n. 3, p. 486-498, 1985.

NISSEN, H. P.; KREYSEL, H. W. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. **Andrologia**, v. 15, n. 3, p. 264-269, 1983.

O'RAND, M. G.; WIDGREN, E. E.; HAMIL, K. G.; SILVA, E. J.; RICHARDSON, R. T. Epididymal protein targets: a brief history of the development of epididymal protease inhibitor as a contraceptive. **J Androl**, v. 32, n. 6, p. 698-704, 2011.

OLIVA, R.; CASTILLO, J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. **Asian J Androl**, v. 13, n. 1, p. 24-30, 2011.

OLIVA, R.; DIXON, G. H. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 40, p. 25-94, 1991.

PAI, T. K.; YEH, Y. Y. Desaturation of stearate is insufficient to increase the concentrations of oleate in cultured rat hepatocytes. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 5, p. 753-757, 1997.

PALOMO, M. J.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; PENA, A.; GUINOVART, J. J.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Glucose- and fructose-induced dog-sperm glycogen synthesis shows specific changes in the location of the sperm glycogen deposition. **Mol Reprod Dev**, v. 64, n. 3, p. 349-359, 2003.

PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biol Reprod**, v. 32, n. 3, p. 653-668, 1985.

PENA, A. I.; BARRIO, M.; BECERRA, J. J.; QUINTELA, L. A.; HERRADON, P. G. Infertility in a dog due to proximal cytoplasmic droplets in the ejaculate: investigation of the significance for sperm functionality in vitro. **Reprod Domest Anim**, v. 42, n. 5, p. 471-478, 2007.

PEREZSANCHEZ, F.; TABLADO, L.; SOLER, C. Sperm morphological abnormalities appearing in the male rabbit reproductive tract. **Theriogenology**, v. 47, n. 4, p. 893-901, 1997.

PETERSON, R. N.; SILVERSTEIN, K.; FREUND, M. A RAPID FLUOROMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF DNA IN HUMAN SEMEN. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n. 2, p. 485-488, 1974.

PETRUSZAK, J. A.; NEHME, C. L.; BARTLES, J. R. Endoproteolytic cleavage in the extracellular domain of the integral plasma membrane protein CE9 precedes its redistribution from the posterior to the anterior tail of the rat spermatozoon during epididymal maturation. **J Cell Biol**, v. 114, n. 5, p. 917-927, 1991.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, p. 87-95, 1991.

POULOS, A.; WHITE, I. G. The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma. **J Reprod Fertil**, v. 35, n. 2, p. 265-272, 1973.

RABILLOUD, T.; LUCHE, S.; CHEVALLET, M. Gel electrophoresis techniques in proteomic analysis. **Biofutur**, p. 11-19, 2002.

RAO, A. R.; BANE, A.; GUSTAFSSON, B. K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 1980.

REYES-MORENO, C.; LAFLAMME, J.; FRENETTE, G.; SIRARD, M. A.; SULLIVAN, R. Spermatozoa modulate epididymal cell proliferation and protein secretion in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 75, n. 3, p. 512-520, 2008.

RICKER, D. D.; CHAMNESS, S. L.; HINTON, B. T.; CHANG, T. S. Changes in luminal fluid protein composition in the rat cauda epididymidis following partial sympathetic denervation. **J Androl**, v. 17, n. 2, p. 117-126, 1996.

ROOKE, J. A.; SHAO, C. C.; SPEAKE, B. K. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. **Reproduction**, v. 121, n. 2, p. 315-322, 2001.

SAEZ, F.; CHABORY, E.; CADET, R.; VERNET, P.; BARON, S.; LOBACCARO, J. M.; DREVET, J. R. Liver X receptors and epididymal epithelium physiology. **Asian J Androl**, v. 9, n. 4, p. 574-582, 2007.

SAKKAS, D.; MANICARDI, G.; BIANCHI, P. G.; BIZZARO, D.; BIANCHI, U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 52, n. 5, p. 1149-1155, 1995.

SCHIMMING, B. C.; VICENTINI, C. A. Ultrastructural features in the epididymis of the dog (*Canis familiaris*, L.). **Anat Histol Embryol**, v. 30, n. 6, p. 327-332, 2001.

SCHULZE, M.; RUEDIGER, K.; MUELLER, K.; JUNG, M.; WELL, C.; REISSMANN, M. Development of an in vitro index to characterize fertilizing capacity of boar ejaculates. **Anim Reprod Sci**, v. 140, n. 1-2, p. 70-76, 2013.

SERRES, C.; KANN, M. L. Motility induction in hamster spermatozoa from caput epididymidis: effects of forward motility protein (FMP) and calmodulin inhibitor. **Reprod Nutr Dev**, v. 24, n. 1, p. 81-94, 1984.

SIVASHANMUGAM, P.; RAJALAKSHMI, M. Sperm maturation in rhesus monkey: changes in ultrastructure, chromatin condensation, and organization of lipid bilayer. **Anat Rec**, v. 247, n. 1, p. 25-32, 1997.

STINSON, R. A. Protein staining and pH gradient determination on the same gel in isoelectric focusing. **Anal Biochem**, v. 69, n. 1, p. 278-282, 1975.

STOREY, B. T.; KAYNE, F. J. Properties of pyruvate kinase and flagellar ATPase in rabbit spermatozoa: relation to metabolic strategy of the sperm cell. **J Exp Zool**, v. 211, n. 3, p. 361-367, 1980.

SUKURA, A.; MAKIPAAA, R.; VIERULA, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SUNDBACK, P.; ANDERSSON, M. Hereditary sterilizing short-tail sperm defect in Finnish Yorkshire boars. **J Vet Diagn Invest**, v. 14, n. 5, p. 382-388, 2002.

SYLVESTER, S. R.; MORALES, C.; OKO, R.; GRISWOLD, M. D. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. **Biol Reprod**, v. 45, n. 1, p. 195-207, 1991.

SYNTIN, P.; DACHEUX, F.; DRUART, X.; GATTI, J. L.; OKAMURA, N.; DACHEUX, J. L. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. **Biol Reprod**, v. 55, n. 5, p. 956-974, 1996.

TAJIK, P.; ARMAN, A.; TAKTAZ, T. Bovine epididymal sperm morphology obtained from caput, corpus and cauda epididymides. **Pak J Biol Sci**, v. 10, n. 21, p. 3936-3939, 2007.

TAJIK, P.; MIRSHOKRAEE, P.; KHOSRAVI, A. Effects of different concentrations of aflatoxin B on ram epididymal and ejaculatory sperm viability and motility in vitro. **Pak J Biol Sci**, v. 10, n. 24, p. 4500-4504, 2007.

THOMASSEN, R.; FARSTAD, W. Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 190-199, 2009.

TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C. A.; ARNAUDIN, E.; STORNELLI, M. C.; STORNELLI, M. A.; DE LA SOTA, R. L. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1637-1640, 2006.

TRAVIS, A. J.; KIM, Y.; MEYERS-WALLEN, V. Development of new stem cell-based technologies for carnivore reproduction research. **Reprod Domest Anim**, v. 44, p. 22-28, 2009. Suplemento 2.

TURNER, R. M. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? **J Androl**, v. 24, n. 6, p. 790-803, 2003.

TURNER, T. T.; AVERY, E. A.; SAWCHUK, T. J. Assessment of protein synthesis and secretion by rat seminiferous and epididymal tubules in vivo. **Int J Androl**, v. 17, n. 4, p. 205-213, 1994.

VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. Avaliação seminal em cães. **Clínica Veterinária**, v. 3, n. 15, p. 22-26, 1998.

VARESI, S.; VERNOCCHI, V.; FAUSTINI, M.; LUVONI, G. C. Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. **Acta Vet Scand**, v. 55, n. 1, p. 17, 2013.

VERNON, R. B.; MULLER, C. H.; HERR, J. C.; FEUCHTER, F. A.; EDDY, E. M. Epididymal secretion of a mouse sperm surface component recognized by a monoclonal antibody. **Biol Reprod**, v. 26, n. 3, p. 523-535, 1982.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

WOLF, D. E.; HAGOPIAN, S. S.; LEWIS, R. G.; VOGLMAYR, J. K.; FAIRBANKS, G. Lateral regionalization and diffusion of a maturation-dependent antigen in the ram sperm plasma membrane. **J Cell Biol**, v. 102, n. 5, p. 1826-1831, 1986.

YAFFE, M. P. Mitochondrial morphogenesis: fusion factor for fly fertility. **Curr Biol**, v. 7, n. 12, p. R782-783, 1997.

YENUGU, S.; HAMIL, K. G.; GROSSMAN, G.; PETRUSZ, P.; FRENCH, F. S.; HALL, S. H. Identification, cloning and functional characterization of novel sperm associated antigen 11 (SPAG11) isoforms in the rat. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 4, p. 23, 2006.

YEUNG, C. H.; OBERLANDER, G.; COOPER, T. G. Characterization of the motility of maturing rat spermatozoa by computer-aided objective measurement. **J Reprod Fertil**, v. 96, n. 2, p. 427-441, 1992.

YU, I.; LEIBO, S. P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 degrees C. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1179-1190, 2002.

ZHANG, Q. Y.; QIU, S. D.; MA, X. N.; YU, H. M.; WU, Y. W. Effect of experimental varicocele on structure and function of epididymis in adolescent rats. **Asian J Androl**, v. 5, n. 2, p. 108-112, 2003.

ZHANG, X.; LIN, M. 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**, v. 14, n. 1-2, p. 69-77, 2002.

ANEXO A – Tampão Fosfato

<i>Componente</i>	<i>Concentração</i>	<i>Quantidade</i>
Fosfato de Sódio Monobásico	100mM	0,5999 g
Fosfato de Sódio Dibásico	100mM	0,7098 g
Água Milli-Q	qsp	50 mL
pH em 7,0		

ANEXO B – Solução de Reidratação

<i>Componente</i>	<i>Concentração</i>	<i>Quantidade (para 6 géis)</i>
Uréia	7M	2,1021 g
Tiouréia	2M	0,7613 g
CHAPS	4%	0,2 g
Triton X-100	0,5%	25 µL
Azul de Bromofenol	-	Traços
DTT	1%	0,0540 g
IPG Buffer 3-10	0,2%	7,0 µL

ANEXO C – Focalização Isoelétrica

<i>Fase</i>	<i>Voltagem</i>	<i>Velocidade</i>	<i>Tempo</i>
Reidratação	50V	-	12-14 horas
Passo 1	250V	Rápido	30 minutos
Passo 2	500V	Rápido	1 hora
Passo 3	1.000V	Rápido	1 hora
Passo 4	2.000V	Rápido	1 hora
Passo 5	4.000V	Rápido	1 hora
Passo 6	8.000V	Linear	1 hora
Passo 7	8.000V	Linear	6 horas
O passo 7 visava alcançar 48.000V (total)			

ANEXO D – Solução de Poliacrilamida

<i>Componente</i>	<i>Concentração</i>	<i>Quantidade (para 6 géis)</i>
Acrilamida 4,1 M	4,1M	29,1387 g
Bis-Acrilamida 0,8%	0,8%	0,8 g
Água Milli-Q	qsp	100 mL

ANEXO E – Tampão Separador

<i>Componente</i>	<i>Concentração</i>	<i>Quantidade (para 6 géis)</i>
Tris	1,5M	18,171 g
SDS	0,4%	0,4 g
Água Milli-Q	qsp	100 mL
pH em 8,8		

ANEXO F – Solução de Reequilíbrio

<i>Componente</i>	<i>Concentração</i>	<i>Quantidade (para 6 géis)</i>
Tris	1,5M	18,171 g
SDS	0,4%	0,4 g
Água Milli-Q	qsp	100 mL
pH em 8,8		

ANEXO G – Solução de Agarose

<i>Componente</i>	<i>Quantidade (para 6 géis)</i>
Tampão de Corrida (Diluído – Anexo H)	100 mL
Agarose 0,5%	0,5 g
Azul de Bromofenol	Traços

ANEXO H – Tampão de Corrida (10X)

<i>Componente</i>	<i>Concentração</i>	<i>Quantidade (para 6 géis)</i>
Tris	3%	30 g
Glicina	14,4%	144 g
SDS	1%	10 g
Água Milli-Q	qsp	1000 mL
pH em 8,3		

ANEXO I – Solução de Fixação

<i>Componente</i>	<i>Concentração</i>	<i>Quantidade (para 6 géis)</i>
Ácido Acético	10%	200 mL
Metanol	40%	800 mL
Água Milli-Q	qsp	1000 mL

ANEXO J – Solução de Coloração

<i>Componente</i>	<i>Concentração</i>	<i>Quantidade (para 6 géis)</i>
Sulfato de Amônio	10%	75 g
Ácido Fosfórico	85%	83,4 mL
Comassie G250	-	0,90 g
Água Milli-Q	Qsp	600 mL
Metanol	20%	150 mL

ANEXO K – Solução de Descoloração

<i>Componente</i>	<i>Concentração</i>	<i>Quantidade (para 6 géis)</i>
Ácido Acético 5%	5%	135 mL
Metanol 20%	20%	540 mL
Água Milli-Q	qsp	2700 mL