

MARIA ANGÉLICA PERES

Influência da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD)
na viabilidade espermática e nas características morfológicas
do aparelho reprodutivo masculino

São Paulo

2009

MARIA ANGÉLICA PERES

Influência da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD) na
viabilidade espermática e nas características morfológicas do
aparelho reprodutivo masculino

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Departamento

Cirurgia

Área de concentração

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador

Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

São Paulo

2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2109
FMVZ

Peres, Maria Angélica

Influência da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD) na viabilidade espermática e nas características morfológicas do aparelho reprodutivo masculino / Maria Angélica Peres. – São Paulo : M. A. Peres, 2009.

81 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção.

1. Distrofia muscular. 2. GRMD. 3. DMD. 4. Avaliação andrológica. 5. Testículo. I. Título.

ERRATA

PERES, M. A. Influência da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD) na viabilidade espermática e nas características morfológicas do aparelho reprodutivo masculino 2009, xxf. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
11	1	5	xx f.	81 f.
13	1	5	xx f.	81 f.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

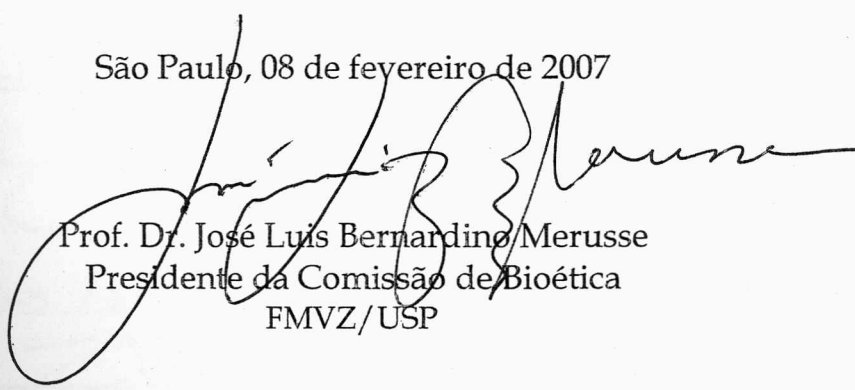
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência da Distrofia Muscular do Golden Retriever (DMGR) na viabilidade espermática e nas características morfológicas do aparelho reprodutor masculino", protocolado sob o nº1011/2006, utilizando 14 (catorze) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia 07/02/07".

(We certify that the Research "Influence of Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) in sperm viability and morphologic characteristics of the male reproductive tract", protocol number 1011/2006, utilizing 14 (fourteen) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 02/07/2007).

São Paulo, 08 de feyereiro de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PERES, Maria Angélica

Título: **Influência da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD) na viabilidade espermática e nas características morfológicas do aparelho reprodutivo masculino**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Doméstico e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/2009.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Ao meu marido Edu, por sua
paciência e amor e principalmente
por acreditar em mim.

Ao nosso filho Andre que
tornou nossas vidas muito
mais brilhantes!

Ao meu pai José Benedito
que me ensinou a perseguir
meus sonhos

À minha mãe Anézia que me
ensinou minha tarefa
mais difícil:
Ser mãe

Aos pais e mães que a cada dia
transformam sua dor em força e
esperança para continuar lutando pela
cura da distrofia muscular

Agradecimentos

À minha orientadora *Mayra* pelos ensinamentos, amizade, carinho, disponibilidade, disposição e participação. Por valorizar minhas conquistas, ajudar a superar as incertezas e a “domesticar” minhas rebeldias.

À *Profa. Angélica*, por me receber e abrir as portas do departamento pra que eu pudesse alcançar esta conquista.

Ao *Prof. Visintin* por me receber em seu laboratório e me fazer sentir em casa.

Ao *Cajú*, por estar ao nosso lado compartilhando as alegrias e desventuras vividas no canil.

À *Profa. Camila* por me disponibilizar seu laboratório e pela generosidade ao dividir seus conhecimentos.

Ao Prof. Francisco Javier Hernandez Blazquez do Laboratório de Anatomia Macroscópica e Imuno-Histoquímica e ao Diogo pelo grande auxílio prestado nas colorações histológicas.

Ao professor Luiz Carlos de Sá Rocha pelo uso do citômetro no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da FMVZ – USP.

À *Profa. Maria Angelica Miglino* pelo uso irrestrito do Laboratório de Anatomia Microscópica e do Desenvolvimento e pela ajuda do Ronaldo nas emblocagens, colorações, etc.

À *Profa. Valquiria Hyppolito Barnabe* pelo uso do Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – USP para dosagens de TBARS.

Ao Edu, meu marido, que não mediu esforços pra me ajudar a realizar este trabalho, envolvendo-se pessoalmente em diversas etapas, além do apoio moral, e da difícil tarefa de me manter com os pés no chão nos momentos difíceis.

Ao André (*Cachaço*) pelo auxílio impagável com o citômetro e pelas dicas de congressos, publicações e afins.

À Sandra pelas batalhas no citômetro e pelos esclarecimentos posteriores.

À Camilla pela coordenação do laboratório nos dias de coleta, sempre no meio de tanta correria, cheiros e barrigão (a Laura).

Ao Paulo que assumiu com coragem o citômetro assim que chegou ao laboratório!

À Marcella e Fabíola que me auxiliaram no laboratório de citometria e em outras situações como “paper”, resumos, traduções e tantas outras dúvidas.

À Mariana Matera que me salvou nos últimos momentos.

Aos amigos da reprodução: Ale, Alezinha, Aníbal, Febem, Flávia, Fernanda, Marcílio (TBARS, as várias estatísticas...), Mariana (compartilhamos tantas “peruisses”!), Renata (sempre divertida e desbocada), Weber (ranzinza mas que adora dar uma explicaçãozinha) e Zeca (sempre renovando nosso bom humor).

Às camiletes: Cris, Gisele, Jaqueline, Liege, Fernanda, sempre tão prestativas.

Aos amigos do canil com quem compartilhei tantas emoções: Ana Luíza, Angélica, Cris, Flávio, Juliana Passos, Karla, Leandro, Marina, Marininha, Matheus, Renata e um agradecimento muito especial à Thaís que mesmo na correria da qualificação conseguiu parar pra me ensinar “imuno”.

Ao Augusto por manter o canil sempre “brilhando” e tratar os cães com tanto respeito. Ao João e Eduardo, recém chegados, mas também tão dedicados.

Ao Miguel sempre com tudo à mão.

Aos funcionários dos dois departamentos e da pós-graduação que sempre me ajudaram a solucionar os problemas e dúvidas: Maicon, Jaqueline, Harumi, Thaís, Alice, Cláudia, Dayse e Joana.

E especialmente aos cães que sempre me receberam com muito “interesse” e alvoroço.

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que a minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não".

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta...

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo."

Texto supostamente atribuído a Fernando Pessoa.

RESUMO

PERES, M. A. **Influência da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD) na viabilidade espermática e nas características morfológicas do aparelho reprodutivo masculino.** [Influence of Golden Retriever muscular dystrophy (GRMD) on sperm viability and on morphologic characteristics of the male reproductive tract]. 2009. XX f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

As distrofias musculares constituem um grupo de doenças caracterizadas por degeneração progressiva e irreversível da musculatura. A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia letal causada pela deficiência da distrofina, proteína integrante do citoesqueleto muscular, cujo gene possui característica recessiva e localiza-se na porção p21 do cromossomo X. Avanços nos cuidados terapêuticos dos pacientes afetados pela DMD têm aumentado a expectativa e qualidade de vida dos mesmos. Por este motivo, questões de ordem fisiológica e/ou ética, antes não pensadas, dentre elas possibilidades reprodutivas destes pacientes, começaram a ser discutidas. Os modelos animais são muito úteis para se traçar paralelos entre achados morfológicos, fisiológicos, prognósticos e tratamentos de determinadas doenças que acometem o homem. A Distrofia Muscular do Golden Retriever (GRMD) é uma doença que naturalmente acomete esta raça, podendo ser um ótimo modelo animal para estudos da DMD, pois apresenta fisiopatologia semelhante. O objetivo deste estudo foi investigar a existência de possíveis alterações morfológicas do trato reprodutivo masculino e relacioná-las com o quadro espermático destes cães. Para tanto foram utilizados 5 cães com GRMD e 4 cães saudáveis, tendo sido realizadas ao todo 37 colheitas de sêmen, a intervalos aproximados de 30 dias entre elas. Após espermograma de rotina, o sêmen foi avaliado quanto à integridade da membrana acrossomal (FITC-PSA), à atividade mitocondrial (JC-1) e à estrutura da cromatina (SCSA) utilizando-se a técnica da citometria de fluxo e quanto à resistência ao estresse oxidativo pela dosagem de TBARS. Fragmentos de testículo, epidídimo e próstata de cinco animais com GRMD e de 1 animal sadio foram coletados para avaliação histológica. As avaliações seminais não demonstraram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos afetado e controle, embora as avaliações histológicas tenham mostrado alterações

significativas em todos os tecidos analisados. Isto sugere que ejaculados de homens com DMD podem ser obtidos com estimulação apropriada e, utilizando técnicas de fecundação in vitro, combinada com diagnóstico genético pré-implantacional de desordem genética para um único gene, podem satisfazer o desejo de paternidade de pacientes portadores de DMD, com o nascimento de crianças não afetadas.

Palavras-chave: Distrofia muscular. GRMD. DMD. Avaliação andrológica. Testículo.

ABSTRACT

PERES, M. A. **Influence of Golden Retriever muscular dystrophy (GRMD) on sperm viability and on morphologic characteristics of the male reproductive tract.** [Influência da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD) na viabilidade espermática e nas características morfológicas do aparelho reprodutivo masculino]. 2009. XX f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Muscular dystrophies constitute a group of diseases characterized by progressive and irreversible muscle degeneration. Duchenne's Muscular Dystrophy (DMD) is a lethal myopathy caused by dystrophin deficiency, a muscular cell cytoskeleton protein. The dystrophin gene have recessive characteristic and is located in the p21 portion of the X chromosome. Advancements in the therapeutic cares of the affected by the DMD have been increasing their life expectancy and quality. For this motive, physiologic and/or ethics questions, like reproductive means of these patients, began to be discussed. Animal models are very useful in drawing parallels between morphologic and physiologic findings, predictions and treatments of diseases that affect man. The Golden Retriever's Muscular Dystrophy (GRMD) is a natural disease of this race, being the best animal model for DMD studies, since it presents similar physiopathology. The aim of this study was to investigate the existence of possible morphological alterations of the male reproductive tract and their connection with the sperm qualities of these dogs. For so, thirty seven ejaculates from 5 GRMD affected dogs and 4 non-affected Golden Retrievers were collected monthly and evaluated in five different replicates. After routine spermogram, the acrosome integrity (FITC-PSA), the mitochondrial activity (JC-1) and the DNA structure (SCSA) were evaluated by flow cytometry technique. The resistance to the oxidative stress was measured by the TBARS dosage. Fragments of testicle and epididymis of five GRMD affected animals and 1 healthy animal were collected for histological evaluation. No significant difference were found in seminal evaluations ($p > 0,05$) between affected and control groups, though significant alterations have been seen in the histological evaluations of all the analyzed cloths. This animal model suggests that ejaculates of DMD men can be obtained by the proper stimulation, and that the conventional *in vitro*

fertilization techniques combined with pre-implantation genetic diagnosis for single gene disorders may be efficient to satisfy the desire of paternity of DMD patients with the birth of non-affected children.

Key word: Muscular dystrophy. GRMD. DMD. Andrologic evaluation. Testicle.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Identificação, idade à primeira colheita, número de colheitas de sêmen realizadas, número de cruzamentos/filhotes de cada animal, data do óbito. São Paulo – 2008.....	38
Quadro 2 -	Protocolo para análise do sêmen pela técnica de citometria de fluxo para as diferentes sondas fluorescentes. São Paulo – 2008	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Média e erro padrão (das variáveis seminais para os grupos afetado (AF) e controle (GC) nas 37 colheitas de sêmen. São Paulo - 2008.....	50
Tabela 2 -	Média e erro padrão da integridade da membrana acrossomal, do potencial de mitocôndria e da integridade de DNA avaliados pelas sondas fluorescentes FITC-PSA, JC1 e LA respectivamente nos grupos afetados e controle. São Paulo – 2008.....	51
Tabela 3 -	Média e desvio padrão da quantidade de TBARS encontrada no plasma seminal e após o estresse oxidativo induzido nos grupos controle e afetado. São Paulo – 2008.....	51
Tabela 4 -	Correlação entre as variáveis seminais avaliadas no grupo afetado. Os valores em negrito indicam correlação e os grifados sugerem tendência a correlação. São Paulo – 2008.....	52
Tabela 5 -	Correlação entre as variáveis seminais avaliadas no grupo controle. Os valores em negrito indicam correlação e os grifados sugerem tendência a correlação. São Paulo – 2008.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Gráfico de pontos resultante da passagem dos espermatozóides pelo citômetro de fluxo sem sonda fluorescente. O círculo representa a população de espermatozóides. São Paulo – 2008..... 41
- Gráfico 2 - Gráfico de pontos resultante da calibração dos instrumentos do citômetro de fluxo para os ensaios com as sondas fluorescentes..... 42
- Gráfico 3 - Gráficos de pontos resultantes da passagem dos espermatozóides pelo citômetro de fluxo com sonda fluorescente FITC-PSA. Os eventos registrados no quadrante superior direito são os espermatozóides com acrossomo lesado, enquanto que no quadrante inferior direito encontram-se os espermatozóides com acrossomo íntegro. São Paulo – 2008..... 43
- Gráfico 4 - Gráfico de pontos resultante da passagem dos espermatozóides pelo citômetro de fluxo com sonda fluorescente JC-1. Os eventos registrados no quadrante superior direito são os espermatozóides com alto e médio potencial de membrana enquanto que no quadrante inferior direito encontram-se os espermatozóides com baixo potencial de membrana. São Paulo – 2008..... 44
- Gráfico 5 - Exemplos de gráfico gerados pelo teste SCSA. As figuras A e C são gráficos de pontos da fluorescência verde (eixo y - fita dupla de DNA) pela vermelha (eixo X - fita simples de DNA), nos quais são marcadas (círculo) as células que saem da população principal – COMP α T. As figuras B e D são os histogramas correspondentes de α T. Espermatozóides com cromatina normal produzem curva de α T estreita (D), enquanto que aqueles com cromatina com estrutura anormal exibirão maior índice de fluorescência vermelha, apresentando uma curva mais larga no eixo X (B). São Paulo – 2008 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	AF-6 – Galak – Cortes histológicos de testículo e epidídimo – coloração HE. São Paulo – 2008	55
Figura 2 -	AF-7 – Oddie – Cortes histológicos de testículo e epidídimo – coloração HE. São Paulo – 2008	56
Figura 3 -	AF-8 – Thor – Cortes histológicos de testículo e epidídimo – coloração HE. São Paulo – 2008	57
Figura 4 -	AF-9 – Cajú – Cortes histológicos de testículo e epidídimo – coloração HE. São Paulo – 2008	59
Figura 5 -	AF-10 – Hércules – Cortes histológicos de testículo e epidídimo – coloração HE. São Paulo – 2008	60

LISTA DE ABRAVIATURAS E SIGLAS

AF	Grupo de animais afetados pela GRMD
ATP	Adenina trifosfato
CASA	Análise espermática computadorizada
CK	Creatinina quinase
COMP	Células fora da população principal
DAPC	Complexo de proteínas associadas à distrofina
DEFMAEN	Defeitos maiores na eosina-nigrosina
DEFMAFS	Defeitos maiores no formol salino
DEFMEEN	Defeitos menores na eosina-nigrosina
DEFMEFS	Defeitos menores no formol salino
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FITC-PSA	Isotiocianato de fluoresceína associado à aglutinina da ervilha
GC	Grupo de animais controle
GRMD	Distrofia muscular do Golden Retriever
JC-1	iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina
kDA	Kilo Dalton
LA	Laranja de acridina
LH	Hormônio luteinizante
MDA	Malondialdeído
PBS	Tampão fosfato
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SCSA	Teste de estrutura da cromatina espermática
Sptz	Espermatozóide
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 AS DISTROFIAS MUSCULARES E A REPRODUÇÃO	27
2.2 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO APARELHO REPRODUTIVO MASCULINO ...	28
2.3 ANÁLISE SEMINAL	30
3 HIPÓTESE	35
4 OBJETIVOS	36
5 MATERIAL E MÉTODO	37
5.1 OS GRUPOS: CONSTITUIÇÃO E HISTÓRICO	37
5.2 AVALIAÇÃO SEMINAL	39
5.2.1 Espermiograma	40
5.2.2 Citometria de Fluxo	41
5.2.3 Estresse oxidativo	46
5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	46
5.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	47
6 RESULTADOS	49
6.1 AVALIAÇÃO SEMINAL	49
6.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	54
7 DISCUSSÃO	61
8 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	77
APÊNDICE	80

1 INTRODUÇÃO

As distrofias musculares constituem um grupo de doenças caracterizadas por degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. Estas doenças incluem um amplo espectro de alterações que variam desde o aumento assintomático da creatinina quinase (CK), enzima liberada pelo músculo lesado, até formas mais graves como as distrofias musculares de Duchenne/Becker que levam à morte por comprometimento geral de toda musculatura, inclusive a cardíaca (KORF, 2000).

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma desordem muscular herdada e que afeta 1 em 3500 meninos nascidos. Embora o gene e a proteína responsáveis pela doença, a distrofina, tenham sido caracterizados há 20 anos e apesar dos grandes avanços dos últimos anos no conhecimento da doença e nos testes clínicos que vêm sendo realizados, o conhecimento do mecanismo molecular, bioquímico e celular que acarreta a degeneração muscular causado pela ausência da distrofina ainda é vago e um tratamento efetivo permanece indefinido (DECONINCK; DAN, 2007).

Os estágios de vida da infância à adolescência dos meninos afetados pela DMD são bem documentados, sob diversos aspectos. Com os avanços tecnológicos, a expectativa de vida destes adolescentes vem crescendo havendo necessidade de abordar questões éticas e fisiológicas antes desconhecidas, como por exemplo, os aspectos reprodutivos. Em estudo realizado na Dinamarca com homens portadores de DMD foi relatado que a falta de vida familiar é a experiência mais difícil de ser superada pelos pacientes (RAHBEEK et al., 2005).

Em função disto, um estudo mais detalhado do funcionamento do aparelho reprodutivo masculino em indivíduos afetados e possíveis implicações na qualidade do sêmen ganham importância.

Uma grande variedade de espécies animais é utilizada como modelo para o estudo da DMD como camundongos, cães, felinos, primatas, além de peixes e invertebrados. Por questão de praticidade, o modelo animal usualmente utilizado no estudo da DMD é o camundongo, entretanto estes animais apresentam diferenças significativas na fisiopatologia da distrofia. Os cães, apesar do manejo mais oneroso e difícil, por envolver um número muito grande de pessoas e dos valores éticos e

emocionais que envolvem sua utilização como modelo animal são de grande valia nestes estudos, podendo muitas vezes esclarecer questões difíceis de serem avaliadas nos humanos, além de apresentarem desenvolvimento da doença semelhante ao encontrado em humanos (COLLINS; MORGAN, 2003).

A identificação de uma nova linhagem da raça Golden Retriever com deficiência de distrofina (Golden Retriever Muscular Dystrophy - GRMD) trouxe novas perspectivas aos estudos da DMD, por serem estes animais mais adequados como modelo de estudo para a distrofia muscular humana (COLLINS; MORGAN, 2003; VAINZOF et al., 2005).

Assim sendo, este trabalho serviu-se desse modelo de estudo, a GRMD, para analisar as características seminais e histopatológicas do trato reprodutivo de cães. Este estudo poderá ser posteriormente utilizado como ponto de partida na avaliação da qualidade do sêmen humano, relacionando possíveis alterações espermáticas com alterações do trato reprodutivo masculino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Em 1851 Edward Meryon, um médico inglês, descreveu detalhadamente a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) em humanos. A sintomatologia clínica tem início muito precoce, com perda muscular progressiva e fraqueza generalizada, culminando com a morte no final da adolescência. Este autor sugeriu a hereditariedade da doença e o acometimento apenas de meninos. Verificou também que a doença era muscular e não secundária à degeneração neurológica e que o sarcolema encontrava-se degenerado. Tais achados foram negligenciados por muitos anos sendo novamente descritos por Duchenne, em 1868 (EMERY, 2002).

O gene da DMD foi identificado em 1986 por Kunkel et al. em pacientes com deleção no cromossomo Xp21. A proteína de 427 kDA, codificada por esse gene foi denominada distrofina, uma vez que sua ausência causa a distrofia muscular. Dos pacientes com mutação no gene da distrofina, 60% têm deleção total e não produzem distrofina, este grupo compreende a maioria dos pacientes com DMD. Os demais apresentam mutações pontuais ou pequenos rearranjos que resultam em redução na produção desta proteína, podendo levar a diferentes graus de manifestações clínicas. Esta forma é apresentada na minoria dos pacientes com DMD e em pacientes com uma forma mais branda de distrofia denominada de Becker (DAVIS, 1997; HOFFMAN; DRESSMAN, 2001).

A distrofina é expressa em tecidos musculares e não musculares. O Complexo distrofina-glicoproteína, composto pela distrofina e por outras proteínas associadas a ela, conecta a actina à matriz extracelular e integra a estrutura contrátil muscular. Isoformas da distrofina de menor peso molecular, ou seja, proteínas menores codificadas pelo mesmo gene são expressas em tecido neuronal e outros tecidos não musculares como olhos, intestino, rim, fígado, pulmão, baço, estômago, timo, testículo e até na membrana de espermatozoides (TOKARZ et al., 1998; COLLINS; MORGAN, 2003; HERNÁNDEZ-GONZALEZ et al., 2005). A função molecular e celular destas isoformas não foi elucidada, porém acredita-se que estejam envolvidas na estabilização e na função do complexo não muscular “distrofina-like” (BLAKE et al., 2002).

Apesar da distrofina, das sarcoglicanas e de outras glicoproteínas associadas à distrofina serem expressas em outros tecidos além das fibras

musculares esqueléticas há uma tendência de serem ignorados ou esquecidos. Durante os tratamentos com célula tronco ou em terapia gênica, podem ser induzidas alterações em outras estruturas do organismo, devido a esta expressão multitecidual, porém com frequência as pesquisas avaliam apenas um ou poucos músculos de um animal (BRETAG, 2007). É necessário que se tenha uma visão global da doença e que todos os aspectos que possam estar alterados ou que possam vir a sofrer modificação pela terapia empregada sejam avaliados. Respostas para questões ainda não respondidas sobre a doença podem surgir de pontos inesperados.

O gene da distrofina tem caráter recessivo e por estar localizado no cromossomo X, tanto no cão como em humanos, é transmitido pela mãe, que raramente manifesta a doença por ser heterozigota para este gene, podendo apresentar sinais clínicos muito discretos como fraqueza dos membros pélvicos e mudanças musculares detectadas por eletromiografia ou por biópsia. Porém seu descendente do sexo masculino, que receberá um cromossomo Y do pai e um único cromossomo X da mãe, poderá herdar o gene recessivo da doença. Mutações isoladas também podem levar à doença (SHELTON et al., 2001; NGUYEN et al., 2002).

As lesões musculares na DMD são caracterizadas por hialinização, hipertrofia, calcificação e necrose, seguida por regeneração, podendo-se encontrar diferentes associações e distribuições das lesões conforme o músculo estudado e a idade do indivíduo. Após algum tempo, a capacidade regenerativa do músculo entra em exaustão, sendo as fibras musculares substituídas gradativamente por tecido conjuntivo e adiposo. Observa-se ainda infiltrados de células inflamatórias, predominantemente macrófagos e linfócitos CD4+, no endomísio e perimísio (tecido conjuntivo que envolve e dá sustentação à fibra muscular e ao feixe de fibras, respectivamente)(BLAKE et al., 2000; DECONINCK; DAN, 2007).

Os sinais clínicos da DMD começam a se manifestar muito cedo. Por volta de 3 a 5 anos de idade o menino começa a ter dificuldades para correr e subir escadas. A progressão leva a fraqueza dos joelhos e dos quadris, levando à característica manobra de Gower, na qual a criança, para se levantar, utiliza as mãos como se estivesse escalando as próprias pernas. Algum grau de retardo mental pode ser encontrado, aproximadamente 20% a 30% dos garotos afetados. A

fraqueza é progressiva e o paciente poderá, por volta dos 12 anos de idade, necessitar de cadeira de rodas. A causa da morte é geralmente por pneumonia resultante de alterações cardíacas. A expectativa de vida é em torno de 20 anos, sendo que com os avanços dos cuidados respiratórios, esta pode ser estendida para próximo dos 30 anos ou um pouco mais (DAVIES, 1997; EMERY, 2002).

Inúmeros modelos animais apresentam doenças genéticas específicas, naturais ou geradas por engenharia genética. O modelo de laboratório mais comumente usado para o estudo da DMD é o camundongo C57Bl/10ScSn mdx, porém apesar da semelhança genotípica e bioquímica, a sintomatologia é significativamente mais branda do que a observada em humanos com DMD. Outros modelos como cães, felinos, primatas, além de peixes e invertebrados também são usados para o estudo desta doença (COLLINS; MORGAN, 2003; VAINZOF et al. 2008).

As diferenças fenotípicas observadas entre as espécies são informativas a respeito das diferentes funções da distrofina. A deleção da distrofina é menos crítica para a função do músculo do camundongo do que é para o humano ou para os cães. Os estudos de modelos animais para doenças genéticas, apesar das diferenças fenotípicas, genéticas ou no defeito molecular primário, continuarão a ser ferramentas importantes para a elucidação de mecanismos da doença e para tratamentos experimentais (COLLINS; MORGAN, 2003; VAINZOF, 2008).

A distrofia muscular já foi identificada em diversas raças de cães, podendo ser natural ou induzida por acasalamento, porém na raça *Golden Retriever* foi melhor estudada e caracterizada. Apesar das dificuldades apresentadas na manutenção de uma colônia de cães, como custos altos e emotividade dos animais em relação aos seus tratadores, o que dificulta o manejo e desprendimento dos envolvidos no tratamento dos animais, estes cães apresentam similaridades fisiológicas com os humanos portadores de DMD, dentre elas elevada atividade da creatinina quinase sérica e atrofia muscular generalizada com contraturas (COLLINS; MORGAN, 2003).

Histologicamente há marcada necrose muscular, degeneração com mineralização e simultânea regeneração, fibrose do endomísio e perimísio e cardiomiopatia (HOWELL et al., 1997; COLLINS; MORGAN, 2003). Segundo estudo de Valentine et al. (1990), com exceção da musculatura extra-ocular, lesões moderadas a severas são encontradas em todos os músculos de cães distróficos, de

todas as idades. Os autores não encontraram lesões no cérebro, medula espinhal, raízes nervosas ou nervos periféricos de animal com 6 anos de idade. Nos jovens, os autores relatam ondas de necrose e regeneração muscular. Inicialmente, a regeneração das fibras musculares compensa degeneração das mesmas, porém começam a aparecer áreas de fibrose ao redor dos focos de necrose que evoluem para marcada fibrose do endomísio e perimísio e diminuição da degeneração/regeneração.

Os filhotes afetados apresentam menor poder de sucção e são mais fracos do que os cães normais. Tendem a ganhar menos peso e os sinais mais específicos costumam aparecer entre 6 a 8 semanas de vida. Estes sinais são enrijecimento progressivo dos membros, sendo os posteriores mais afetados que os anteriores, fazendo com que ao andar ou correr o animal movimente os membros posteriores simultaneamente, como um coelho saltando. Ocorre superextensão do carpo, superflexão do tarso e abdução dos membros. A hipertrofia da língua e atrofia dos músculos do temporal estão associados com dificuldade na deglutição (HOWELL et al., 1997).

A forma mais agressiva da doença pode levar o animal à morte com alguns dias de vida. Os animais que atingem a idade adulta geralmente morrem em decorrência de degeneração dos músculos cardíacos (HOWELL et al., 1997).

2.1 AS DISTROFIAS MUSCULARES E A REPRODUÇÃO

Em estudo realizado em humanos portadores de diferentes miopatias, inclusive DMD, no qual se mensurou os níveis de testosterona sérica livre e total, constatou-se que o hipogonadismo é comum em homens portadores de miopatias, não havendo prevalência entre os diferentes tipos da doença (AL-HARBI, 2008).

Luppi (2006) constatou em estudo realizado no canil GRMD Brasil, importantes alterações como criptorquidismo, hérnia inguinoescrotal, exposição constante da glândula peniana na ausência de ereção e aspermia. Os cães distróficos apresentaram maior taxa de anormalidade espermática, degeneração testicular com fibrose, hialinização e retração das fibras do músculo cremáster. A autora concluiu

que a GRMD pode comprometer a aptidão reprodutiva dos cães afetados pela distrofia muscular, porém sem alterar de forma significativa o potencial fecundante.

Hernández-González et al. (2005) avaliaram as conseqüências da ausência da proteína Dp71, uma isoforma da distrofina de menor peso molecular, na membrana de espermatozóides de camundongos mdx^{3cv} . Estes camundongos são distróficos mutantes e não expressam nenhum dos produtos do gene da distrofina e apresentam fertilidade reduzida. Os autores relatam ausência da Dp71, que é largamente distribuída em tecidos não musculares, inclusive no espermatozóide, em animais normais. Neste estudo foi avaliada a morfologia do espermatozóide, a localização e a expressão de proteínas pertencentes ao complexo de proteínas associadas à distrofina (DAPC – sigla em inglês). Verificaram que a ausência da Dp71 causou alteração morfológica no flagelo levando à diminuição da motilidade progressiva do espermatozóide, devido aos movimentos vibratórios. Observaram ainda diminuição ou ausência da β -dystroglican e superexpressão e realocização da α -sintrofina, proteínas que fazem parte do complexo das proteínas associadas à distrofina, além de alterações na bomba de Na^+ e K^+ . Todas estas alterações reduziram significativamente a capacidade fecundante dos espermatozóides e foi a primeira descrição de alteração morfológica numa célula não-muscular em camundongo distrófico.

2.2 ANATOMIA E FISILOGIA DO APARELHO REPRODUTIVO MASCULINO

O sistema reprodutivo masculino consiste dos testículos, circundados pela túnica vaginal, escroto, epidídimo, ducto deferente, glândulas acessórias (próstata no cão), uretra e pênis circundado pelo prepúcio (SENGER, 2003).

No interior dos túbulos seminíferos (localizados nos testículos), ocorre a espermatogênese, ou seja, a transformação da espermatogônia (2N) em espermátide (N) e a espermiogênese, com a transformação dessa espermátide em espermátide madura ou espermatozóide testicular. Uma série de transformações ocorre no citoplasma e no núcleo celular. Basicamente, as histonas nucleares são substituídas por protaminas, a cromatina condensa e o núcleo reduzido assume posição excêntrica próximo à membrana celular. Pontes dissulfeto tornam a cromatina resistente à DNase. O acrossomo e o flagelo são formados e o citoplasma

é reduzido, permanecendo uma gota citoplasmática junto à porção proximal da peça intermediária. A migração desta gota para a porção distal da cauda e conseqüente eliminação, ocorre durante a maturação do espermatozóide no epidídimo (MORTIMER, 1994).

Fisiologicamente, durante este trajeto, o espermatozóide desenvolve motilidade e torna-se capaz de fecundar. Mudanças morfológicas envolvem a perda de gota citoplasmática e mudanças na estrutura da membrana espermática. O acrossomo assume a forma final e ocorre a condensação total da cromatina. Metabolicamente, o espermatozóide torna-se mais ativo e a capacidade de movimentação aumenta conforme progressão pelo epidídimo (MORTIMER, 1994).

O epidídimo, local no qual os espermatozoides, produzidos no testículo, sofrem maturação e adquirem capacidade fecundante é formado por um único túbulo circundado por fibras musculares lisas, dispostas circularmente, que auxilia na movimentação das células germinativas. O comprimento do túbulo do epidídimo e a velocidade com a qual o espermatozóide passa por ele são importantes para que o processo de maturação espermática se complete (EVANS, 1993). No epidídimo ocorrerá a reabsorção do fluido testicular, maturação pós-testicular do espermatozóide e estocagem até o momento da ejaculação. O epidídimo também irá secretar parte do fluido no qual o espermatozóide será transportado quando ocorrer a ejaculação, além do produzido pelas glândulas acessórias (MORTIMER, 1994).

O ducto deferente também apresenta musculatura em sua estrutura, podendo-se distinguir três camadas de músculo liso, a interna, a externa (longitudinais) e a média (circular). Na cápsula prostática encontram-se fibras musculares lisas circundando o órgão (EVANS, 1993).

Todas as estruturas mencionadas são fundamentais para a produção e maturação espermática. Os testículos, além de produzirem os espermatozoides possuem função endócrina, produzindo testosterona sob o estímulo do LH. A testosterona, hormônio fundamental para o funcionamento da espermatogênese é produzida nas células de Leydig no espaço peritubular. Este hormônio é necessário para a manutenção das atividades secretórias e absorptivas dos ductos eferentes, epidídimos e ductos deferentes, crescimento e manutenção da glândula prostática e para a manutenção da libido. Também estimula a síntese protéica e contribui para o desenvolvimento muscular dos machos (FELDMAN; NELSON, 2004).

A próstata, única glândula acessória ativa no cão é responsável por 95% do volume do ejaculado, consistindo na primeira e terceira frações do ejaculado. Este fluido é responsável pelo aumento da motilidade espermática (MORTIMER, 1994; SILVA, 2002).

O processo de ejaculação envolve uma série de músculos como a musculatura da cápsula do testículo, a musculatura lisa prostática e a do ducto deferente, os músculos pélvicos, os músculos bulbocavernoso e isquiocavernoso (SHAFIK et al., 2006), que de forma rítmica e sincronizada promovem a expulsão do gameta das ampolas do ducto deferente até o trato reprodutivo feminino.

As células mióides, classificadas como células peritubulares musculares lisas e encontradas em todos os túbulos do trato reprodutor masculino são responsáveis pela contratilidade tubular, gerando impulso para a progressão do espermatozóide pela rede testis, função fundamental para a fertilidade do macho (ROMANO et al., 2005).

A termorregulação testicular, muito importante para a manutenção da temperatura testicular entre 2 a 6 graus abaixo da temperatura corpórea, tem grande dependência do músculo cremáster, no funículo espermático e da túnica dartos, camada muscular do escroto, ambos músculos esqueléticos (SENGER, 2002).

2.3 ANÁLISE SEMINAL

O sêmen do cão é facilmente coletado, na maioria dos animais, por manipulação digital do pênis, sendo necessário apenas algum treino para que o animal se adapte ao procedimento. Devido à ejaculação fracionada em três partes é possível coletar apenas a fração rica em espermatozóides (2ª fração), proveniente do epidídimo, descartando-se a 1ª e 3ª frações, compostas por líquido prostático (CHRISTIANSEN, 1988).

Normalmente, o ejaculado de cão é avaliado basicamente por microscopia de luz. As principais limitações deste método são a subjetividade e a variabilidade entre técnicos. O acesso visual à motilidade espermática é difícil e influenciado pela temperatura e pela habilidade do avaliador, o que acarreta grande variabilidade de resultados entre laboratórios e entre observadores. O acesso à morfologia

espermática depende das técnicas de fixação e coloração empregadas, da qualidade do microscópio e da experiência do avaliador. Outro fator que pode causar variação nos resultados laboratoriais é a limitação do número de células analisados pelas técnicas convencionais. Além disso, estas variáveis têm baixa relação com a fertilidade, tornando a interpretação dos resultados muito difícil (RIJSSELAERE et al., 2005).

Na última década, a avaliação da qualidade do sêmen de cães tem progredido consideravelmente. Muitas técnicas inovadoras vêm sendo utilizadas, como o sistema CASA (computer-assisted sperm analysis) e a citometria de fluxo com sondas fluorescentes, que permite avaliar de maneira rápida e detalhada funções específicas dos espermatozóides, funções estas não visualizadas pelos métodos subjetivos da microscopia de luz (RIJSSELAERE et al., 2005).

A citometria de fluxo vem se mostrando muito útil no acesso à morfologia e à função dos espermatozóides. Esta técnica permite avaliar diferentes funções em milhares de células espermáticas, simultaneamente, num curto período de tempo. É uma técnica rápida, e de alta repetibilidade para o acesso de células em suspensão, inclusive amostras de espermatozóides (PEÑA et al., 1999; NAGY et al., 2003).

Diversas sondas fluorescentes vêm sendo desenvolvidas e testadas para a citometria de fluxo em diferentes espécies para quantificar proporções de células vivas e mortas, avaliar a função mitocondrial, a integridade de acrossomo e de DNA, separar espermatozóides contendo cromossomo X ou Y, estudar a morfologia celular e a fase do ciclo celular, entre outras. Tal técnica já foi empregada com sucesso na avaliação do sêmen de diversas espécies como canina, bovina, humana, suína, eqüina e murina (EVENSON et al., 1982; GARNER et al., 1986; GRAHAM et al., 1990; JAYAT; RATINAUD, 1993; PEÑA et al., 1999; ANZAR et al., 2002; NAGY et al., 2003).

A integridade do acrossomo é fundamental para a fixação e a penetração do espermatozóide no oócito. A sonda fluorescente mais comumente utilizada para detectar alterações no acrossomo é o isotiocianato de fluoresceína (FITC) associado à aglutinina da ervilha (*Pisum sativum* – PSA). Esta aglutinina cora em verde o acrossomo lesado, ficando sem coloração a célula com acrossomo íntegro (GRUDZINSKAS; YOVICH, 1995; NAGY et al., 2003).

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção de energia para o batimento flagelar do espermatozóide em algumas espécies ou para manter o

gradiente de Na/K, químico e elétrico da membrana plasmática em outras. Sua localização em forma de bainha ao redor da peça intermediária facilita a liberação rápida do ATP para a manutenção do gradiente da membrana plasmática e movimentação flagelar. Um marcador muito utilizado para avaliar a atividade mitocondrial é o iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1). O JC-1 é um monômero que emite fluorescência verde, porém dependendo do potencial de membrana da mitocôndria, este monômero irá formar agregados que emitirão fluorescência vermelho-alaranjado. Quando a mitocôndria apresenta alto potencial de membrana, emite fluorescência vermelha, enquanto que quando com baixo a médio potencial de membrana, emite fluorescência verde (CURRY; WATSON, 1995; GARNER et al., 1997; THOMAS et al., 1998).

A cromatina do espermatozóide, diferentemente das células somáticas, passa por um processo denominado de compactação. Durante a espermiogênese, as nucleoproteínas das células somáticas (histonas) são substituídas em parte ou totalmente por protaminas, nucleoproteínas específicas de espermatozóides. A troca de histonas por protaminas ocorre em etapas e é conhecida como protaminação. Nos estágios iniciais da espermiogênese, o DNA sofre remodelação favorecendo a retirada das histonas e substituição por protaminas que se ligam à curvatura menor do DNA (KNOBIL et al., 1994; WOUTERS-TYROU et al., 1998; ERENPREISS et al., 2006). Segundo Rocha et al. (2002), após a ligação desta proteína, a cromatina espermática apresenta-se extremamente condensada e inerte devido à neutralização do esqueleto fosfodiéster do DNA pela interação dos resíduos amina da protamina com grupos fosfatos das fitas de DNA. Durante a maturação espermática que ocorre no epidídimo, as ligações 'tiol' (-SH) da cisteína na molécula de protamina são substituídas por pontes dissulfeto (S-S), tornando o espermatozóide mais estável do que o espermatozóide testicular, seu DNA é mantido em fita dupla mesmo após a exposição a ácidos ou ao calor. A sonda fluorescente laranja de acridina (LA) possibilita a análise da estrutura da cromatina nuclear do espermatozóide por microscópio de epifluorescência ou mesmo por citometria de fluxo. Este teste é chamado de SCSA (sperm chromatin structure assay) e permite avaliar a maturidade espermática. Segundo Evenson et al. (1980), autores que validaram a técnica, a mesma possibilita prever o potencial fecundante do espermatozóide. Quando o DNA está maduro (com muitas pontes S-S) as moléculas de laranja de acridina irão se intercalar à fita dupla do DNA emitindo

coloração verde fluorescente. Caso o DNA nuclear apresente poucas pontes S-S, DNA imaturo, este será denaturado pela ação do ácido (uma das etapas do protocolo) e ocorrerá agregação das moléculas de laranja de acridina no núcleo, emitindo fluorescência vermelha (KATAYOSE et al., 2003).

Todas as células aeróbicas geram ROS (reactive oxygen species) como consequência de atividades redutoras como a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. A membrana da célula espermática dos mamíferos apresenta composição lipídica altamente específica, com altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados. Os componentes lipídicos da membrana estão envolvidos na regulação da maturação espermática, espermatogênese, capacitação, reação acrossomal e na fusão com o oócito. No entanto, os lipídios são o principal substrato para a peroxidação que pode provocar desordens funcionais severas nos espermatozoides, comprometendo toda função espermática, podendo chegar a inibir completamente a espermatogênese ou a fecundação (AITKEN e BAKER, 2004; SANOCKA; KURPISZ, 2004; AGARWAL, 2005). A célula espermática, além da suscetibilidade à peroxidação lipídica devido à composição da membrana, não possui ação antioxidante, principalmente os antioxidantes enzimáticos, devido ao reduzido tamanho do citoplasma (VERNET et al., 2004).

Em condições normais há um balanço apropriado entre os pro - oxidantes e os antioxidantes. Em espermatozoides, a produção de malondialdeído, produto final da peroxidação lipídica induzida por íons ferrosos e ascorbato de sódio, pode ser mensurada pelo TBARS test (thiobarbituric acid reactive species), método simples e útil, que envolve reação de aldeídos com TBA (thiobarbituric acid), em condições ácidas, produzindo coloração rosa, mensurada em espectrofotômetro (SIKKA et al., 1995; SANOCKA; KURPISZ, 2004).

Animais portadores da GRMD, assim como humanos portadores da DMD, apresentam atividade da enzima creatinina quinase (CK) sérica elevada. Esta enzima está envolvida na síntese e utilização de energia pelo espermatozoide (EMERY, 2002; NGUYEN et al., 2002). Altos níveis espermáticos de CK estão inversamente correlacionados com o potencial fecundante do espermatozoide e indica grau de imaturidade. Foi encontrada uma relação positiva entre a atividade da CK e o índice de peroxidação lipídica, pela mensuração do malondialdeído (MDA) (SIDHU et al., 1998; AGARWAL, 2005). Portanto, a mensuração da peroxidação

lipídica é uma forma indireta de se mensurar CK e com isso obter o potencial fecundante do animal estudado e o grau de imaturidade de forma indireta.

3 HIPÓTESE

A distrofia muscular em cães da raça Golden Retriever (GRMD) não causa alterações histológicas do trato reprodutivo masculino e, portanto não afeta a viabilidade e a qualidade seminal em indivíduos afetados.

4 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a atividade mitocondrial, a integridade de acrossomo e a compactação do DNA em espermatozoides de cães afetados pela GRMD.
- Avaliar a capacidade espermática de resistência ao estresse oxidativo em cães afetados e nos não afetados.
- Avaliar as características histológicas do trato reprodutivo dos animais afetados pela GRMD.
- Traçar um paralelo entre as características histológicas encontradas e a qualidade espermática.

5 MATERIAL E MÉTODO

Para melhor compreensão do trabalho, o material e método foi descrito em itens.

5.1 OS GRUPOS: CONSTITUIÇÃO E HISTÓRICO

O grupo “afetados” (AF) foi formado por 5 animais provenientes do Canil GRMD Brasil do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres do Departamento e Cirurgia da FMVZ – USP. Estes animais foram diagnosticados como afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever pela equipe do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (IB – USP), por genotipagem do DNA genômico sanguíneo extraído com GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ – USA/Canadá).

O grupo controle (GC) foi formado por 4 animais sem GRMD, da mesma raça, que vivem em casas de particulares, sendo 1 deles nascido no mesmo canil do grupo AF.

O quadro 1 especifica a idade, a identificação do animal, o número de colheitas de sêmen realizadas em cada animal e data de óbito dos animais utilizados para avaliação histológica.

Animal	Identificação nome/tatuagem data nasc.	Idade na primeira colheita	Nº de colheitas	Óbito
Afetado 1 AF1	Peter/M5 12/07/03	4 anos e 3 meses	5	–
Afetado 2 AF2	Ringo/M4 12/07/03	4 anos e 3 meses	5	–
Afetado 3 AF3	Bis*/2L2 11/04/06	1 ano e 6 meses	3	–
Afetado 4 AF4	Choquito/2L3 11/04/06	1 ano e 6 meses	5	–
Afetado 5 AF5	Suflair**/3H10 15/04/06	1 ano e 6 meses	4	–
Afetado 6 AF6	Galak/1CL3 17/04/06	–	–	08/02/2007
Afetado 7 AF7	Oddie/3H5 24/02/05	–	–	12/02/2007
Afetado 8 AF8	Thor/3R2*** 23/07/04	–	–	10/04/2007
Afetado 9 AF9	Caju/3L6 25/03/07	–	–	12/05/2008
Afetado 10 AF10	Hércules/3R7 23/07/04	–	–	11/08/2008
Controle 1	Ice CO 1	3 anos e 10 meses	5	–
Controle 2	Bob CO 2	2006	4	–
Controle 3	Horus CO 3****	2006	2	–
Controle 4	Boomer CO 4	1ano e 3 meses	4	–
Controle 5	Bisteka CO5*****	1ano e 15 dias	–	–

* Falta de libido/ereção em 2 colheitas

** Aspermia em uma das colheitas

*** Coleta de material realizada após 4 meses de congelamento

**** Sofreu ferimento escrotal, o que inviabilizou outras colheitas

***** Animal orquiectomizado, material coletado para histologia

Quadro 1 – Identificação, idade à primeira colheita, número de colheitas de sêmen realizadas, número de cruzamentos/filhotes de cada animal, data do óbito - São Paulo – 2008

Os animais AF foram monitorados diariamente pela equipe do Canil GRMD Brasil. Foram realizados exames clínicos com pesagens semanais de cada animal, vermifugação 3 vezes ao ano e vacinação anual. Em caso de alteração comportamental ou de qualquer parâmetro clínico, os animais foram submetidos a

exames complementares que se julgaram necessários para o diagnóstico e tratamento da ocorrência.

Alguns dos animais participaram de outros estudos realizados paralelamente à avaliação reprodutiva, foram eles: Choquito (2L3) – recebeu injeção intra-arterial de células de polpa dentária (KERKIS, 2008); Bis (2I2) – animal controle do experimento de células de polpa dentária, não recebeu célula, após o término das colheitas de sêmen deste trabalho participou de outro estudo no qual recebe losartana potássica diariamente (50mg); Peter (M5) – não participa de experimento, porém recebe cloridrato de benazepril (10mg, 1 vez ao dia) e digoxina (0,125mg, 2 vezes ao dia) para controle de alterações cardíacas.

Foram realizados exames de brucelose nos 5 machos afetados envolvidos neste experimento, com cultura de sêmen e sorologia sanguínea, sendo todos negativos.

Dos 5 animais do grupo AF, 2 têm fertilidade comprovada por cruzamentos naturais ou por de inseminação artificial, apresentando tamanho de ninhada compatíveis com a raça.

5.2 AVALIAÇÃO SEMINAL

As colheitas de sêmen foram realizadas por manipulação digital do pênis, com presença de fêmea em cio, em intervalos aproximados de 1 mês, para que se pudesse avaliar espermatozoides produzidos em ciclos espermáticos distintos, que no cão é de aproximadamente 2 meses (SENGER, 1999), podendo assim eliminar eventuais efeitos de algum estresse pontual. Os animais não foram mantidos em repouso reprodutivo, tendo ocorrido outras colheitas no mesmo período, porém que não ultrapassaram uma ou duas por animal, dentro deste intervalo. Foi coletada apenas a segunda fração dos ejaculados, a fração rica, e desprezadas as outras duas frações, provenientes da próstata.

5.2.1 Espermiograma

Imediatamente após a colheita, o volume do ejaculado foi mensurado em tubo graduado, sendo em seguida avaliados motilidade, caracterizada pela porcentagem de espermatozóides com movimento retilíneo progressivo - escala de 0 a 100%, e vigor, que representa a força de propulsão do espermatozóide, classificado de 0 a 5, sendo 0 - sem movimento e 5 - movimento vigoroso, que foram estimados em uma gota de sêmen colocada entre lâmina e lamínula a 37°C e observada em microscópio de luz, em aumento de 200X.

A avaliação da proporção de espermatozóides vivos e mortos e morfologia espermática foram realizadas em lâmina aquecida a 37°C, na qual se diluiu o sêmen in natura, nos corantes eosina-nigrosina (proporção sêmen/eosina/nigrosina 1:2:1) e realizou-se então um esfregaço. Os espermatozóides mortos permitem a entrada do corante, apresentando coloração vermelha, os vivos não se coram. Foram contados 100 espermatozóides/lâmina.

Realizou-se também a técnica de câmara úmida, para a qual uma alíquota de sêmen foi fixada em formol salino para posterior avaliação da morfologia espermática em microscópio de contraste de fase sob imersão (aumento de 1000X).

Os defeitos espermáticos foram classificados em maiores, quando relacionados à espermatogênese (contorno anormal de cabeça; gota citoplasmática proximal; defeitos de acrossomo; cauda fortemente enrolada/dobrada) e menores, quando relacionados ao transporte e armazenamento no epidídimo, alterações nas técnicas de colheita ou processos patológicos como febre, trauma, infecção, etc. (cabeça pequena; alterações de tamanho com contorno normal da cabeça; inserções anormais da cauda; gota citoplasmática distal) (VANNUCCHI et al., 1998).

O sêmen foi então centrifugado a 300g por 5 minutos para retirada do plasma seminal, o qual foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, para posterior dosagem de TBARS no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ - USP (descrita adiante), e o sedimento ressuspendido para 1mL em solução tampão (DMPBS® - Nutricell) a 37°C.

A concentração espermática foi calculada em câmara hematimétrica após diluição do sêmen na proporção de 1:200, sendo utilizada para o cálculo a fórmula: concentração = M.5.diluição.10⁴, onde M é a média do número de espermatozóides

contados dos dois lados da câmara, obtendo-se o número médio de espermatozóides por mL do ejaculado.

5.2.2 Citometria de Fluxo

Foram então preparadas três soluções de 1mL cada, duas contendo 7×10^6 spz/mL em PBS , e outra com 5×10^6 spz/mL em TNE (Anexo A). Estas concentrações foram definidas para que, ao se retirar as alíquotas de sêmen para incubação com as sondas fluorescentes, se obtivesse uma concentração final de 10^6 espermatozóides/mL nas amostras para citometria de fluxo.

Previamente à avaliação seminal pela citometria de fluxo, realizou-se a separação e identificação das populações encontradas, para que se pudesse ter certeza qual era formada por espermatozóides (Gráfico 1). A separação foi realizada em Citômetro de Fluxo FACSVantage SE, (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), localizado no Departamento de Imunologia do ICB, na Universidade de São Paulo.

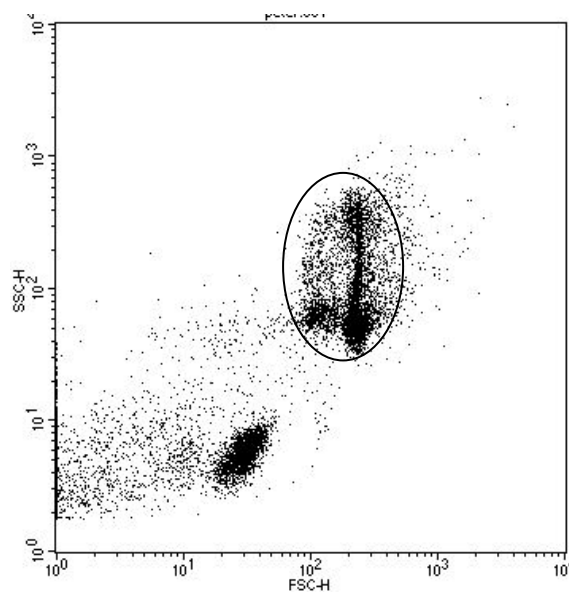


Gráfico 1 – Gráfico de pontos resultante da passagem dos espermatozóides pelo citômetro de fluxo sem sonda fluorescente. O círculo representa a população de espermatozóides - São Paulo – 2008

Procedeu-se então a preparação do sêmen para a leitura no citômetro de Fluxo, conforme sumarizado no quadro 2. As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCalibur, Becton Dickinson, (Franklin Lakes, NJ, USA) do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da FMVZ da Universidade de São Paulo. A diluição de cada sonda fluorescente para o preparo das soluções está descrita no Anexo B. Para todas as avaliações foram contadas 10.000 células.

SONDA	TAMPÃO	VOL. DO SÊMEN	VOL. DA SONDA	TEMPO DE INCUBAÇÃO
FITC-PSA	PBS	150µl	50µl	10 min
JC-1	PBS	150µl	2µl	10 min
SCSA	TNE	200µl	400µl ácido 1,2ml LA	30 seg 3 – 5 min

Quadro 2 – Protocolo para análise do sêmen pela técnica de citometria de fluxo para as diferentes sondas fluorescentes - São Paulo – 2008

As amostras foram adquiridas pelo citômetro de fluxo sem a utilização de sonda fluorescente. As configurações do aparelho foram alteradas de modo a se eliminar a auto-fluorescência da amostra para FL1 (verde) e FL3 (vermelho). Os eventos foram posicionados no quadrante inferior esquerdo (mais de 99% dos eventos contados), correspondente à zona sem fluorescência (Gráfico 2).

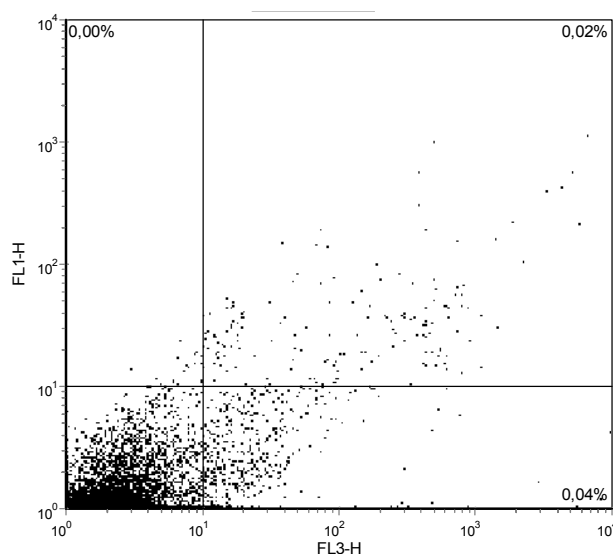


Gráfico 2 – Gráfico de pontos resultante da calibração dos instrumentos do citômetro de fluxo para os ensaios com as sondas fluorescentes

O FITC-PSA (isotiocianato de fluoresceína associado à aglutinina da ervilha *Pisum sativum* – PSA) foi utilizado para avaliação da integridade do acrossomo, que se cora em verde quando lesado. Para a análise utilizou-se 150µl de sêmen da diluição em PBS contendo 7×10^6 sptz/mL, ao qual se adicionou 50µl de FITC-PSA, e incubou-se por 10 minutos, protegido da luz, após os quais o volume da suspensão foi completado para 1mL com PBS a 37°C para leitura no citômetro de fluxo. A avaliação dos resultados obtidos pela citometria de fluxo foi realizada pela porcentagem de espermatozóides que apresentaram fluorescência verde (FL-1) acima de 10^2 (Gráfico 3).

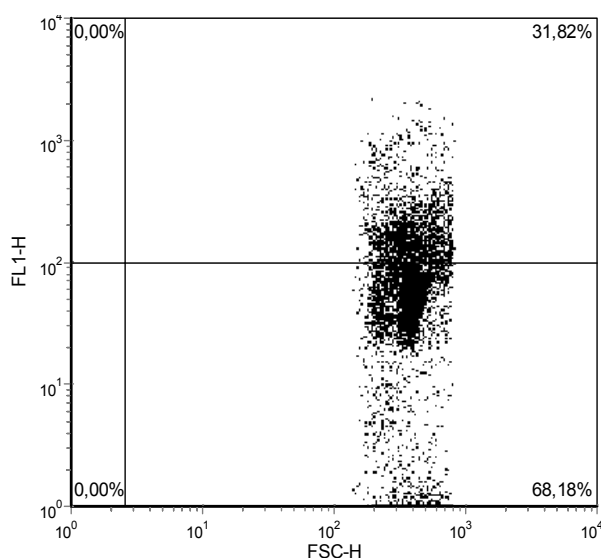


Gráfico 3 – Gráficos de pontos resultantes da passagem dos espermatozóides pelo citômetro de fluxo com sonda fluorescente FITC-PSA. Os eventos registrados no quadrante superior direito são os espermatozóides com acrossomo lesado, enquanto que no quadrante inferior direito encontram-se os espermatozóides com acrossomo íntegro - São Paulo – 2008

O JC-1 foi utilizado para avaliação do potencial de membrana mitocondrial, emitindo fluorescência vermelha quando com alto potencial e verde com baixo potencial. Para tanto, 150µl de sêmen da diluição em PBS contendo 7×10^6 sptz/mL foi incubado por 10 minutos com 2µl de JC-1, protegido da luz, após os quais o volume da suspensão foi completado para 1mL com PBS a 37°C para leitura no citômetro de fluxo. A análise foi realizada em gráfico de pontos, no qual se pôde diferenciar uma sub-população de espermatozóides com alto e médio potencial de membrana mitocondrial, localizada no quadrante superior (acima de 10^1), e outra

sub-população com baixo potencial de membrana mitocondrial localizada no quadrante inferior (Gráfico 4).

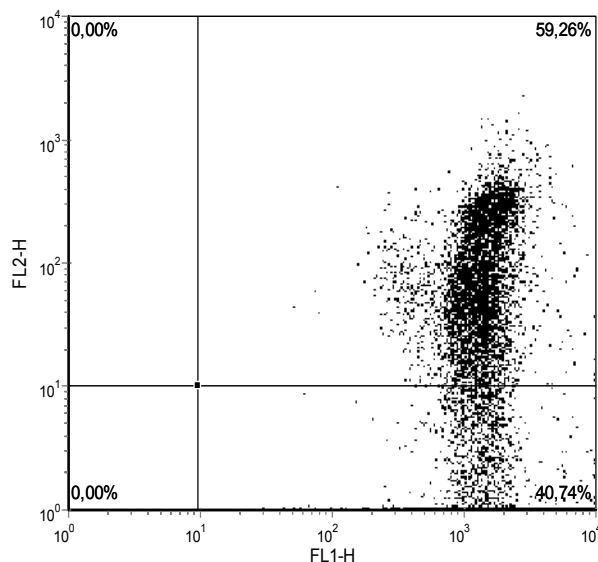


Gráfico 4 – Gráfico de pontos resultante da passagem dos espermatozoides pelo citômetro de fluxo com sonda fluorescente JC-1. Os eventos registrados no quadrante superior direito são os espermatozoides com alto e médio potencial de membrana enquanto que no quadrante inferior direito encontram-se os espermatozoides com baixo potencial de membrana - São Paulo – 2008

As análises do FITC-PSA e do JC-1 foram realizadas com o programa FCS Express V3 Research Edition.

O SCSA (laranja de acridina) foi utilizado para avaliação da compactação do DNA. No DNA compactado, o corante intercala-se com o mesmo, produzindo fluorescência verde. Quando o DNA nuclear estiver descompactado, as moléculas de LA irão se aglutinar emitindo fluorescência vermelha. Este teste mede a susceptibilidade do DNA à denaturação quando submetido a um meio com baixo pH (pH=1,4). As análises foram feitas com o programa FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software – Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA), com o qual se calculou o AlfaT, que quantifica a extensão da denaturação do DNA de cada um dos espermatozoides da amostra. AlfaT é definido como o resultado da divisão da fluorescência vermelha pela fluorescência total [$\alpha T = \text{verm} / (\text{verm} + \text{verde})$]. O COMP α T (sigla em inglês para

“células fora da população principal”) é marcado visualmente à partir do histograma de αT e representa a porcentagem de DNA denaturado na amostra (Gráfico 5).

Adotou-se como valores de referência os mesmos sugeridos por Evenson e Jost (2000), no qual $COMP_{\alpha T}$ entre 0-15% é considerado baixo índice de fragmentação (alta fertilidade), entre 16-29% médio índice de fragmentação e $\geq 30\%$ alta fragmentação.

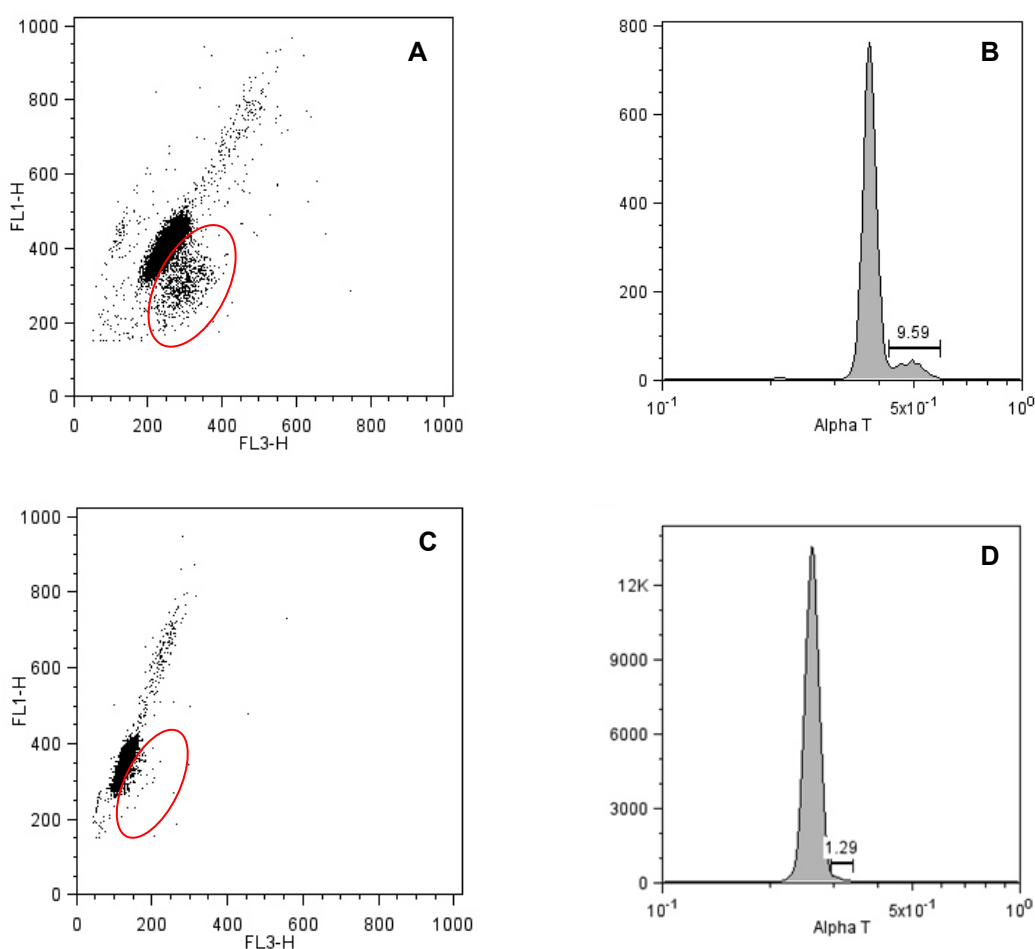


Gráfico 5 - Exemplos de gráfico gerados pelo teste SCSA. As figuras A e C são gráficos de pontos da fluorescência verde (eixo y - fita dupla de DNA) pela vermelha (eixo X - fita simples de DNA), nos quais são marcadas (círculo) as células que saem da população principal – $COMP_{\alpha T}$. As figuras B e D são os histogramas correspondentes de αT . Espermatozoides com cromatina normal produzem curva de αT estreita (D), enquanto que aqueles com cromatina com estrutura anormal exibirão maior índice de fluorescência vermelha, apresentando uma curva mais larga no eixo X (B) - São Paulo – 2008

5.2.3 Estresse oxidativo

Para a dosagem de TBARS foi necessário fixar o número de espermatozoides por mL para todas as amostras, podendo variar entre 5×10^6 spz/mL e 10×10^6 spz/mL, sendo adotado um valor intermediário. Utilizou-se o protocolo descrito por Nichi et al. (2007) no qual 1mL de suspensão contendo 7×10^6 spz/mL em PBS foi incubada com sulfato ferroso (250 μ L, 4mM) e ascorbato de sódio (250 μ L, 20mM) por 1:30hs a 37°C. Após a incubação, adicionou-se 3mL de ácido tricloroacético (TCA 10%) a 4°C e a mistura foi centrifugada (18000 x g, 15min), para promover a precipitação das proteínas. O sobrenadante foi então congelado em nitrogênio líquido para posterior análise. O produto a ser mensurado da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA). A mensuração baseia-se na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de MDA, em alta temperatura e baixo pH, resultando em coloração rosa que é então quantificada por espectrofotometria. A mensuração foi realizada no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ - USP e consistiu na mistura de 500 μ L da amostra congelada (plasma ou solução submetida ao estresse) com 500 μ L de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA, 1% diluído em 0,05 N de hidróxido de sódio) num tubo de vidro. Esta mistura foi deixada em banho-maria a 100°C por 20 minutos e então foi imediatamente resfriada em um banho de gelo (0°C) para interromper a reação química. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram então quantificadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 532nm (espectrofotômetro U-2001, Hitachi High Technologies, America, Inc. San Jose, CA, USA). O índice de peroxidação lipídica está descrito em nanogramas de TBARS/ 10^8 spz.

5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Para a avaliação histológica foi coletado material de testículo e epidídimo de cinco animais (n=5), de diferentes idades, que vieram a óbito em decorrência de

complicações da doença. AF 6 – 10 meses; AF 7 – 2 anos; AF 8 – 2 anos e nove meses; AF 9 – 1 ano e 1 mês; AF 10 – 4 anos.

Fragmentos dos mesmos tecidos foram coletados de um animal da mesma raça submetido à castração de conveniência e destinado ao grupo controle (GC5 – 1 ano e 15 dias).

Os epidídimos foram separados dos testículos e fragmentados em cabeça, corpo e cauda. Cada fragmento do epidídimo e também um fragmento do testículo foi fixado em Metacarn (Anexo C), emblocado (Anexo D), cortado com 5 μ m de espessura em micrótomo Leica RM2125RT e corado com hematoxilina-eosina (Anexo E).

Após a coloração, as lâminas foram fotografadas em microscópio Olympus BX60, câmera Zeiss AxioCam HRc, programa Zeiss KS400, em aumento de 100X, 200X, 400X, 600X e 1000X, para descrição das características histológicas.

5.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os dados referentes à qualidade do sêmen foram analisados pelo programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000).

Pelo aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas eram transformados (logaritmo na base 10 - $\log_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica (teste de Kruskal Wallis para interação e teste de Wilcoxon para efeito do grupo). Os dados que obedeceram às premissas foram analisados pelo teste LSD e pelo teste t de Student para efeito de interação e para efeito do grupo, respectivamente.

Para a descrição dos resultados foram empregados as médias e os respectivos erros padrões (média \pm erro padrão da média) 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 transformação possível).

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 que houve diferença significativa entre as variáveis classificatórias (afetado/controle) para uma determinada variável resposta.

As variáveis respostas foram analisadas pela correlação de Pearson e Spearman, para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente. Os resultados foram expressos pelo coeficiente de correlação (r) e nível de significância (p).

Neste experimento, as variáveis classificatórias utilizadas foram o mês de colheita (1, 2, 3, 4 e 5) e grupo animal (afetado e controle). Neste caso foi avaliada a interação entre tempo e grupo. Caso não houvesse interação foi verificado o efeito do grupo apenas. As variáveis resposta utilizadas foram motilidade, vigor, % de sptz mortos, concentração ($\times 10^6$ sptz/mL), integridade de acrossomo (FITC-PSA), potencial de mitocôndria (JC-1), integridade de DNA (SCSA), dosagem de TBARS no plasma seminal e após indução do estresse oxidativo, defeitos maiores e menores em formol-salino, defeitos maiores e menores em eosina-nigrosina. As variáveis motilidade, vigor, % de sptz mortos, FITC-PSA, JC-1, SCSA e dosagem de TBARS após indução do estresse obedeceram às premissas não sendo necessária qualquer transformação.

A variável concentração obedeceu à premissa após a transformação para raiz quadrada e as premissa defeitos maiores em eosina-nigrosina, dosagem de TBARS no plasma seminal e volume do ejaculado obedeceram às premissas após a transformação para logaritmo na base 10.

As variáveis defeitos maiores e menores em formol salino e defeitos menores eosina-nigrosina não obedeceram às premissas, não sendo possível transformá-los. Estas variáveis foram então analisadas pelo PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Neste caso utilizou-se o nível de significância do teste Wilcoxon para dois tratamentos.

6 RESULTADOS

Durante o período do experimento os animais não apresentaram alterações clínicas, estando todos dentro dos parâmetros considerados normais para a doença.

Neste grupo de animais não houve ocorrência de criptorquidismo ou qualquer alteração topográfica dos testículos. Também não foram observadas lesões do escroto, pênis ou prepúcio.

Os animais apresentaram consistência dos testículos ligeiramente flácida.

6.1 AVALIAÇÃO SEMINAL

Os resultados dos espermogramas de cada animal encontram-se no Anexo G. A tabela 1 mostra a média e erro padrão de cada grupo para cada parâmetro avaliado no espermograma.

Os parâmetros seminais volume, motilidade progressiva, vigor e porcentagem de espermatozóides vivos e mortos mostraram-se muito homogêneos entre os grupos AF e GC. A concentração espermática mostrou diferença significativa ($p > 0,05$), sendo o grupo AF mais concentrado que o GC.

Tabela 1 – Média e erro padrão (das variáveis seminais para os grupos afetado (AF) e controle (GC) nas 37 colheitas de sêmen - São Paulo - 2008

Grupo	Volume (mL)	Motilidade %	Vigor (1-5)	Concentração X10⁶sptz/mL	Vivos (%)	Defeitos Maiores (%) FS	Defeitos menores (%) FS	Defeitos Maiores (%) EN	Defeitos menores (%) EN
AF	1,24±0,11	83,86±1,43	3,63±0,07	661,82±87,70 ^a	95,60±0,82	6,33±1,49	5,71±1,35	12,76±1,49	1,09±0,28
GC	0,97±0,14	85,36±1,77	3,57±0,16	382,70±79,97 ^b	93,14±2,64	3,80±0,85	7,07±1,69	8,50±1,03	1,53±0,38

FS = formol salino; EN = Eosina-nigrosina

Letras sobrescritas entre linhas representam diferença significativa (p≤0,05)

A tabela 2 mostra as médias e erros padrões das análises realizadas pela citometria de fluxo para avaliação da integridade de acrossomo (FITC-PSA), do potencial de mitocôndria (JC-1) e da compactação de DNA (SCSA). As médias e erros padrões de cada animal podem ser observados no Anexo H. O FITC-PSA e o SCSA apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 2 – Média e erro padrão da integridade da membrana acrossomal, do potencial de mitocôndria e da integridade de DNA avaliados pelas sondas fluorescentes FITC-PSA, JC1 e LA respectivamente nos grupos afetados e controle - São Paulo – 2008

GRUPOS	FITC-PSA	JC1	SCSA
	% acrossoma lesado	% alto potencial de mitocôndria	% de spz com DNA fragmentado
AF	25,0±2,2 ^a	68,7±1,2	4.6±0,7 ^a
GC	32,5±3,9 ^b	60,5±4,5	6,5±1,0 ^b

Letras sobrescritas entre linhas representam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

A tabela 3 mostra os resultados da quantificação de TBARS no plasma seminal e após o desafio com os oxidantes. Observou-se diferença significativa entre os grupos na dosagem de TBARS no Plasma.

Tabela 3 – Média e desvio padrão da quantidade de TBARS encontrada no plasma seminal e após o estresse oxidativo induzido nos grupos controle e afetado - São Paulo – 2008

	Plasma	Estresse
AF	188,9±28,1 ^a	600,0±40,2
GC	287,5±39,7 ^b	655,7±93,7

Letras sobrescritas entre linhas representam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

O grupo AF apresentou correlação positiva entre stress oxidativo e SCSA (Tabela 4).

O grupo controle apresentou correlação positiva entre plasma/FITC-PSA e correlação negativa entre FITC-PSA/JC-1 (Tabela 5).

Tabela 4 – Correlação entre as variáveis seminais avaliadas no grupo afetado. Os valores em negrito indicam correlação e os grifados sugerem tendência a correlação - São Paulo – 2008

CORRELAÇÃO AFETADOS														
	Motil	Vigor	Mortos	Conc	FITC-PSA	JC1	Plasma	Stress	DEFMAFS	DEFMEFS	DEFMAEN	DEFMEEN	SCSA	
Vol	0.52743 0.0117	0.42513 0.0486	<u>-0.4033</u> <u>0.0627</u>	0.03229 0.8866	0.13656 0.5772	-0.0052 0.9825	0.81461 0.0001	0.00616 0.9783	-0.29811 0.1893	0.05860 0.8008	-0.39302 0.0780	0.14531 0.5297	-0.2486 0.3199	
Motil		0.62414 0.0019	-0.3599 0.0999	0.0409200 .8565	-0.18632 0.445	0.39608 0.0838	-0.33383 0.2064	-0.17969 0.4236	-0.29808 0.1894	-0.12791 0.5806	-0.33311 0.1401	-0.00399 0.9863	-0.38172 0.118	
Vigor			-0.1316 0.5592	0.12665 0.5744	-0.29159 0.2258	0.28926 0.2161	-0.58472 0.0174	-0.34174 0.1196	-0.26884 0.2386	-0.04854 0.8345	-0.34704 0.1232	0.07239 0.7552	-0.14339 0.5703	
Mortos				0.13897 0.5374	-0.39739 0.092	0.12435 0.6014	0.33151 0.2097	0.11545 0.6089	0.02984 0.8978	-0.09610 0.6786	-0.07042 0.7616	0.21647 -0.3459	0.30637 0.2163	
Conc					<u>-0.43215</u> <u>0.0646</u>	-0.1146 0.6303	-0.39337 0.1317	0.10023 0.6572	0.23469 0.3058	<u>0.40994</u> <u>0.0649</u>	0.25595 0.2628	-0.17980 0.4355	-0.1186 0.6393	
FITC-PSA						-0.2625 0.2775	0.34608 0.2467	0.22851 0.3467	0.05984 0.8135	-0.0731 0.7732	0.0765 0.7629	-0.17325 0.4918	0.34578 0.174	
JC1							0.04193 0.8868	-0.08006 0.7372	0.00676 0.9781	0.14128 0.5640	-0.00792 0.9743	-0.14341 0.5581	-0.0617 0.8078	
Plasma								0.19546 0.4682	0.15195 0.5888	-0.39570 0.1443	0.29006 0.2943	0.02827 0.9203	0.19056 0.553	
Stress										0.26162 0.2520	-0.11028 0.6342	0.13542 0.5584	0.17640 0.4443	0.5137 0.0292
DEFMAFS											0.42958 0.0520	0.37182 0.1065	-0.42175 0.640	0.27876 0.2786
DEFMEFS												0.30743 0.1873	-0.26747 0.2543	-0.03635 0.8899
DEFMAEN													-0.48237 0.0268	0.40437 0.1074

Vol=volume; motil=motilidade; conc=concentração; Plasma=quantidade de TBARS no plasma seminal; stress=quantidade de TBARS após desafio com oxidantes; DEFMAFS=defeitos maiores no formol-salino; DEFMEFS=defeitos menores no formol-salino; DEFMAEN=defeitos maiores na eosina-nigrosina; DEFMEEN=defeitos menores na eosina-nigrosina.

Tabela 5 – Correlação entre as variáveis seminais avaliadas no grupo controle. Os valores em negrito indicam correlação e os grifados sugerem tendência a correlação - São Paulo – 2008

CORRELAÇÃO CONTROLE													
	Motil	Vigor	Mortos	Conc	FITC-PSA	JC1	Plasma	Stress	DEFMAFS	DEFMEFS	DEFMAEN	DEFMEEN	SCSA
Vol	0.07706	-0.0152	0.68018	0.05871	0.20649	-0.6409	0.31992	0.26358	-0.10536	0.25801	0.43738	0.11123	0.1691
	0.7849	0.9571	0.0149	0.8353	0.4788	0.0135	0.3107	0.3625	0.7086	0.3532	0.1030	0.6931	0.5993
Motil		0.55447	0.03688	-0.0020	0.02538	-0.2185	0.26448	0.21971	-0.02913	-0.02979	-0.11114	0.45068	0.00136
		0.0319	0.9094	0.9943	0.9314	0.4529	0.4061	0.4504	0.9179	0.9161	0.6933	0.0918	0.9967
Vigor			-0.0382	-0.0083	-0.17907	-0.2600	-0.25970	0.07003	0.36908	0.04338	-0.22537	0.13493	-0.15032
			0.9061	0.9765	0.5402	0.3693	0.4150	0.8120	0.1758	0.8780	0.4193	0.6316	0.6410
Mortos				0.11937	-0.15818	-0.3229	-0.04980	0.51016	-0.28857	0.45749	0.14463	-0.38192	-0.16753
				0.7118	0.6423	0.3327	0.8913	0.1083	0.3630	0.1348	0.6538	0.2205	0.6225
Conc					0.10581	0.05961	<u>0.55065</u>	-0.01331	-0.33887	-0.17314	<u>-0.49333</u>	-0.39430	-0.41035
					0.7189	0.8396	<u>0.0635</u>	0.9640	0.2166	0.5372	<u>0.0617</u>	0.1459	0.1852
FITC-PSA						-0.58672	0.60605	0.23337	0.03445	-0.01422	-0.06889	0.24831	0.12596
						0.035	0.0481	0.4429	0.9069	0.9615	0.815	0.292	0.7121
JC1							-0.31322	-0.06900	-0.09355	-0.02210	-0.12836	-0.22084	-0.29077
							0.3493	0.8228	0.7504	0.9402	0.6619	0.4480	0.3592
Plasma								0.38842	-0.02184	-0.18864	-0.08426	0.14247	-0.07686
								0.2378	0.9463	0.5571	0.7946	0.6587	0.8442
Stress									0.34205	0.20246	0.14280	0.34711	-0.18623
									0.2313	0.5876	0.6262	0.2240	0.5835
DEFMAFS										0.15364	0.31809	0.10151	0.28461
										0.5846	0.2479	0.7189	0.3699
DEFMEFS											-0.22411	-0.36008	0.7296
											0.4220	0.1874	0.0071
DEFMAEN												0.42723	0.17953
												0.1122	0.5766
DEFMEEN													-0.25484
													0.4241

Vol=volume; motil=motilidade; conc=concentração; Plasma=quantidade de TBARS no plasma seminal; stress=quantidade de TBARS após desafio com oxidantes; DEFMAFS=defeitos maiores no formol-salino; DEFMEFS=defeitos menores no formol-salino; DEFMAEN=defeitos maiores na eosina-nigrosina; DEFMEEN=defeitos menores na eosina-nigrosina.

6.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os cães afetados apresentaram diferentes tipos de alterações testiculares e por isso as características foram descritas individualmente.

O AF 6 – Galak (10 meses) apresentou cápsula testicular com tecido organizado e compacto, sendo mais frouxo na porção interna, próximo aos túbulos seminíferos. No compartimento intertubular observou-se tecido conjuntivo frouxo retraído, vasos sanguíneos, células intersticiais (Leydig) e células mióides bem estruturadas dispostas circularmente ao redor de cada túbulo seminífero. Os túbulos seminíferos apresentavam-se sólidos ou com luz reduzida (início de luminação). No interior dos túbulos as células predominantes eram as de suporte indiferenciadas, distribuídas ao longo da membrana basal. Raras espermatogônias em início de divisão celular podiam ser visualizadas em alguns túbulos, entre as células de suporte ou mais centralmente nos túbulos, com núcleo globoso e cromatina ligeiramente frouxa (Figura 1).

Os três segmentos do epidídimo, cabeça, corpo e cauda, apresentavam arquiteturas semelhantes. O tecido conjuntivo intertubular estava bem organizado, disposto circularmente ao redor dos túbulos e tornando-se mais frouxo à medida que se afasta deles. Os túbulos apresentavam luz ampla, sem conteúdo, epitélio com células baixas, cubóides, e não colunares como deveriam ser. Os estereocílios estavam muito pequenos e pouco evidentes (Figura 1).

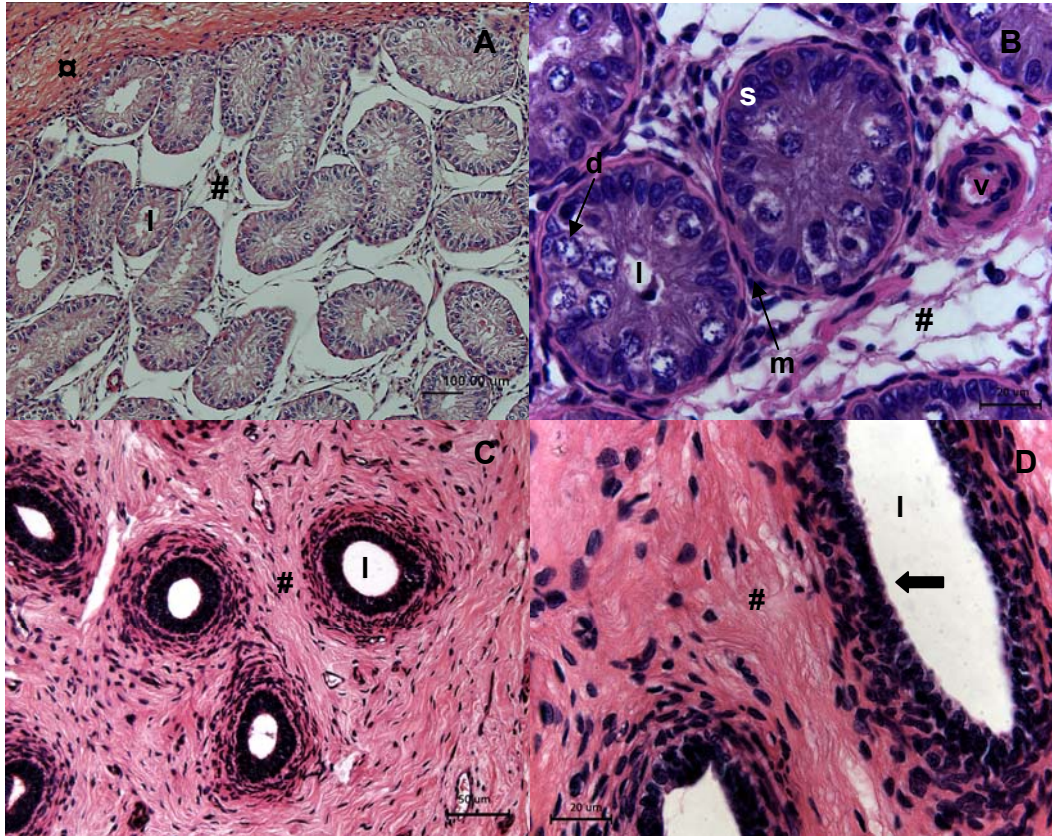


Figura 1 – AF-6 (HE) **A** e **B** testículo – Observa-se cápsula (α) bem organizada; tecido conjuntivo frouxo entre os tubulos (#); túbulos seminíferos sólidos ou com lúmen estreito (I); células de suporte (s); início de divisão de células espermatogênicas (d); células mióides (m); vasos sanguíneos (v). **C** cabeça do epidídimo e **D** cauda do epidídimo – observa-se tecido conjuntivo frouxo bem organizado (#); túbulos com luz ampla (I); células epiteliais baixas (seta) - São Paulo – 2008

O AF 7 – Oddie (2 anos) apresentou cápsula testicular mais delgada, com poucos e espaçados fibroblastos de aparência normal. A camada mais interna da cápsula mostrou-se mais desenvolvida e muito celularizada. No compartimento intertubular observou-se tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, poucas células de Leydig e células mióides ao redor dos túbulos. Os túbulos apresentavam células da linhagem espermatogênica – de espermatogônias a espermatozóides, porém na maioria deles a distribuição estava atípica. Em nenhum dos campos avaliados foi possível visualizar luz tubular. Em um túbulo seminífero células gigantes multinucleadas foram observadas (Figura 2).

A cabeça e o corpo do epidídimo apresentavam tecido conjuntivo intertubular bem organizado e aderido aos túbulos, vasos sanguíneos com estrutura preservada. O tubulo apresentava epitélio pseudo-estratificado com estereocílios, porém com espaços (vacúolos) entre as células. A luz dos túbulos mostrou-se ampla, com

conteúdo de espermatozóides e células descamativas. A cauda do epidídimo apresentou lúmen significativamente aumentado, com epitélio colunar pseudo-estratificado com estereocílios mais bem definido do que as outras duas porções e com grande quantidade de espermatozóides, células descamativas e alguns leucócitos (Figura 2).

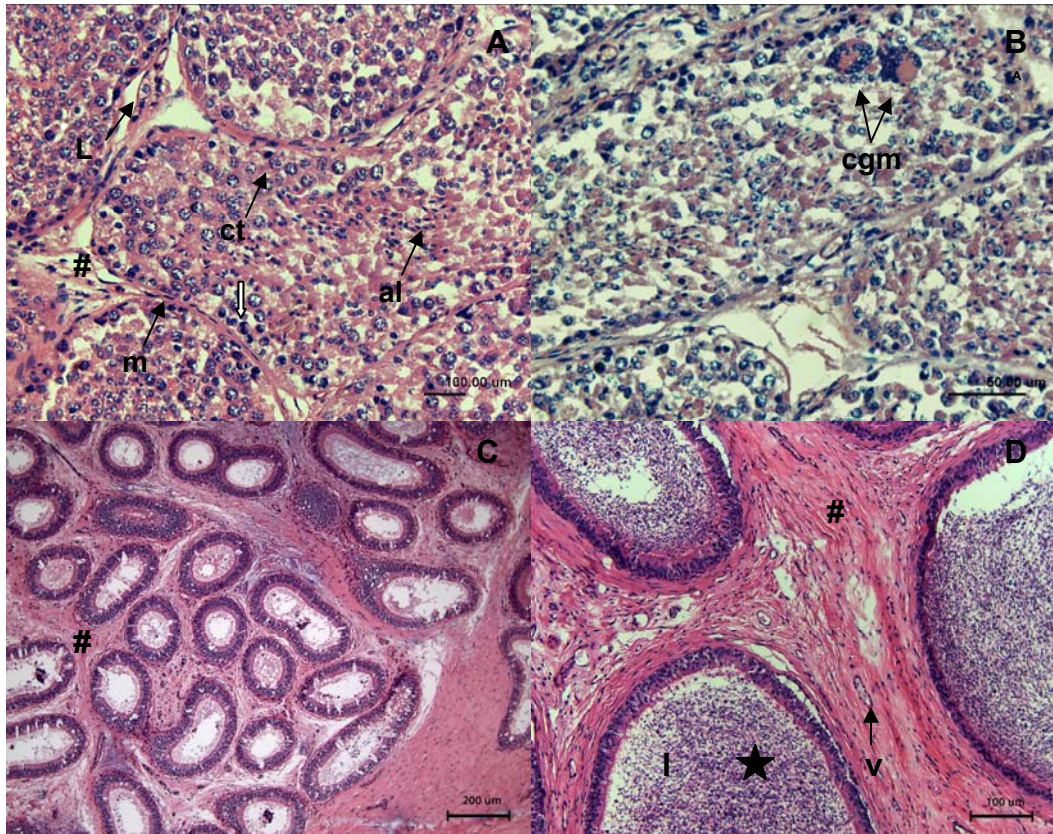


Figura 2 – AF-7 (HE) **A e B** testículo – observa-se tecido conjuntivo frouxo entre os túbulos (#); células mióides (m); célula de Leydig (L); espermatócitos (ct), espermátide alongada (al); célula em divisão (seta branca); célula gigante multinucleada (cgm). **C** corpo do epidídimo e **D** cauda do epidídimo – observa-se tecido conjuntivo frouxo bem organizado (#); túbulos com luz muito ampla (l); grande quantidade de células na luz tubular (★) - São Paulo – 2008

O AF 8 – Thor (2 anos e 9 meses) apresentou cápsula testicular constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, em determinados pontos na região mais interna da cápsula (túnica albugínea) bem como nos septos. Foram observados infiltrados de células inflamatórias. No compartimento intertubular observou-se septos mais espessos. As células mióides mostraram-se bem desenvolvidas e dispostas circularmente à membrana basal dos túbulos seminíferos. Neste animal não foram observadas células de Leydig. Os túbulos seminíferos apresentavam luz

reduzida como se estivessem em início de luminação. Os túbulos seminíferos não apresentavam células da linhagem germinativa, apenas em alguns foram observadas espermatogônias em início de diferenciação, neles predominavam apenas células de suporte (Sertoli) indiferenciadas (Figura 3).

A cabeça e o corpo do epidídimo apresentavam tecido conjuntivo intertubular bem organizado e aderido aos túbulos, disposto circularmente próximo aos túbulos e tornando-se mais frouxo à medida que se afastava deles, os vasos sanguíneos apresentavam estrutura preservada. Os túbulos apresentavam luz ampla, sem conteúdo, epitélio com células baixas, cubóides, e não colunares como deveriam ser. Os estereocílios estavam muito pequenos e pouco evidentes. A cauda do epidídimo apresentava as mesmas características do tecido conjuntivo dos outros segmentos, porém com células colunares altas no epitélio tubular, características deste tecido. O lúmen não apresentou conteúdo (Figura 3).

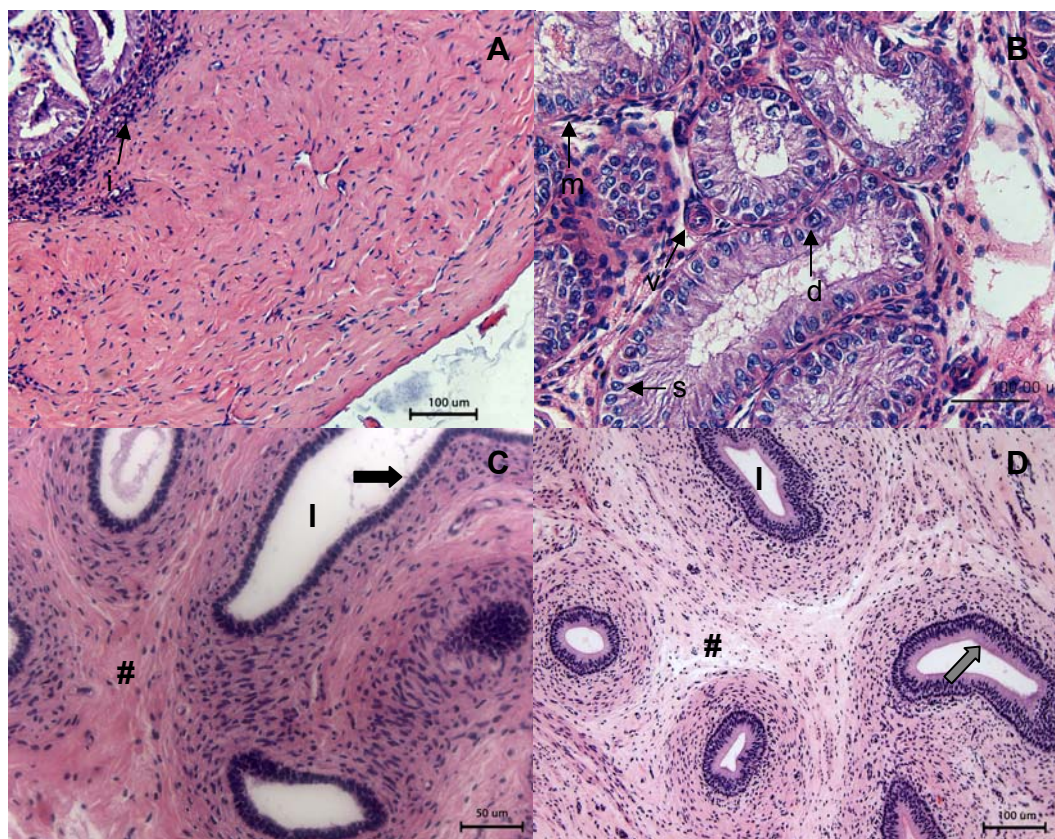


Figura 3 – AF-8 (HE) **A** e **B** testículo – observa-se infiltrado inflamatório adjacente ao septo de tecido conjuntivo (i); células mióides (m); células de suporte (s); início de divisão de células espermatogênicas (d); vaso sanguíneo (v). **C** corpo do epidídimo e **D** cauda do epidídimo – observa-se tecido conjuntivo frouxo bem organizado (#); túbulos com luz ampla (l) sem conteúdo; epitélio tubular com células baixas (seta preta); células colunares (seta cinza) - São Paulo – 2008

O AF 9 – Cajú (1 ano e 1 mês) apresentou cápsula testicular de aparência normal, constituída por tecido conjuntivo denso modelado. O tecido conjuntivo intertubular quando comparado aos demais cães avaliados estava reduzido, com raras células de Leydig. Os túbulos apresentavam contornos irregulares com células mióides espaçadas e sem contato entre eles. Assim como os túbulos, o lúmen apresentava contornos irregulares com epitélio germinativo em início de diferenciação. Muitas figuras de apoptose e de células gigantes multinucleadas também foram observadas na luz dos túbulos (Figura 4).

Os três segmentos do epidídimo, cabeça, corpo e cauda, apresentavam arquiteturas semelhantes. O tecido conjuntivo intertubular estava bem organizado, disposto circularmente ao redor dos túbulos e tornando-se mais frouxo à medida que se afastava deles. Os túbulos apresentavam luz ampla, sem conteúdo, epitélio com células baixas, cubóides, e não colunares como deveriam ser. Apresentavam estereocílios muito pequenos e pouco evidentes. A cauda apresentou epitélio com células mais altas, porém desorganizadas, com núcleos dispostos de maneira confusa, sem a imagem característica de pseudo-estratificado. Os estereocílios apresentavam-se pouco desenvolvidos, formando grumos (Figura 4).

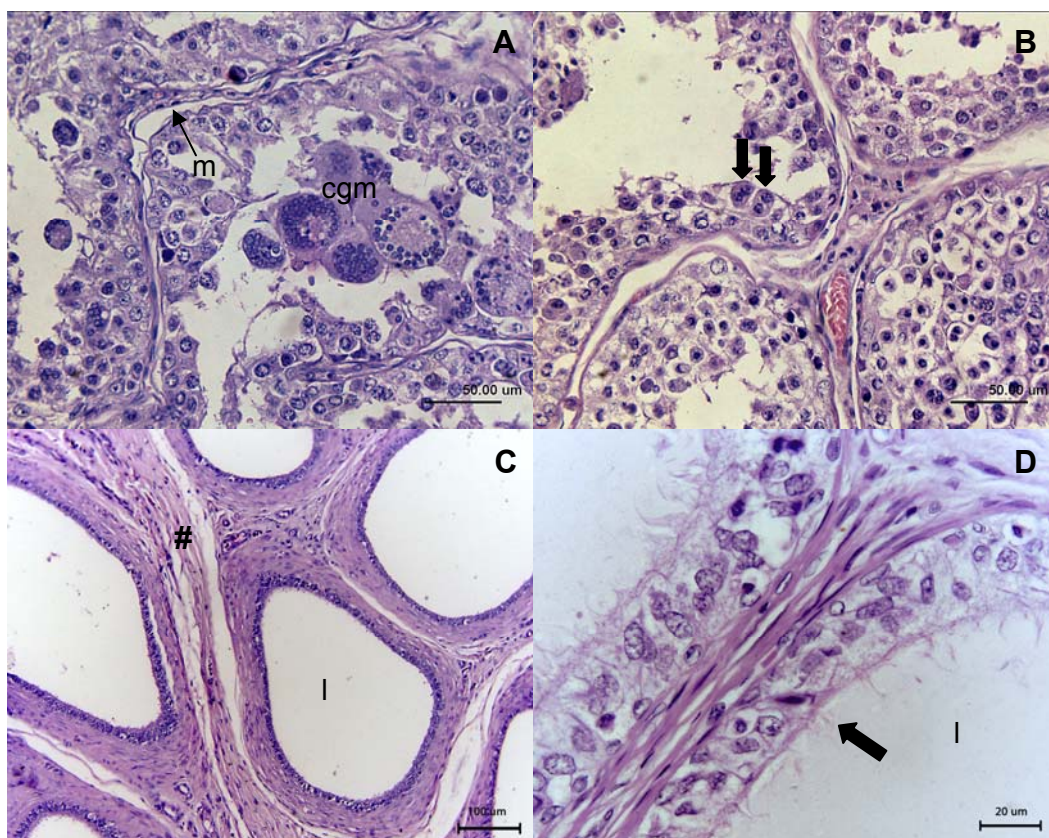


Figura 4 – AF-9 (HE) **A** e **B** testículo – observa-se células mióides (m); células em divisão (seta); célula gigante multinucleada (cgm). **C** corpo do epidídimo e **D** cauda do epidídimo – observa-se tecido conjuntivo frouxo bem organizado (#); epitélio colunar com células desorganizadas e esterecílios pequenos e em grupos (seta); luz tubular muito ampla e sem conteúdo (l) - São Paulo – 2008

O AF 10 – Hércules (4 anos) apresentou cápsula com estrutura frouxa, poucos fibroblastos com núcleos arredondados. O tecido conjuntivo intertubular mostrou-se muito reduzido. Ao redor dos túbulos foram encontradas poucas células mióides e estas fracamente aderidas aos túbulos. Os túbulos mostram-se muito retraídos e com contornos irregulares. Neste animal foi possível diferenciar no epitélio germinativo os diferentes estágios do ciclo germinativo, podendo-se identificar de espermatogônias a espermatozóides (Figura 5).

Os três segmentos do epidídimo, cabeça, corpo e cauda, apresentavam arquiteturas semelhantes. O tecido conjuntivo intertubular estava bem organizado, disposto circularmente ao redor dos túbulos e tornando-se mais frouxo à medida que se afastava deles, os vasos sanguíneos apresentavam estrutura preservada. Os túbulos apresentavam epitélio colunar pseudo-estratificado com estereocílios bem característicos, luz ampla, com conteúdo de espermatozóides e células descamativas (Figura 5).

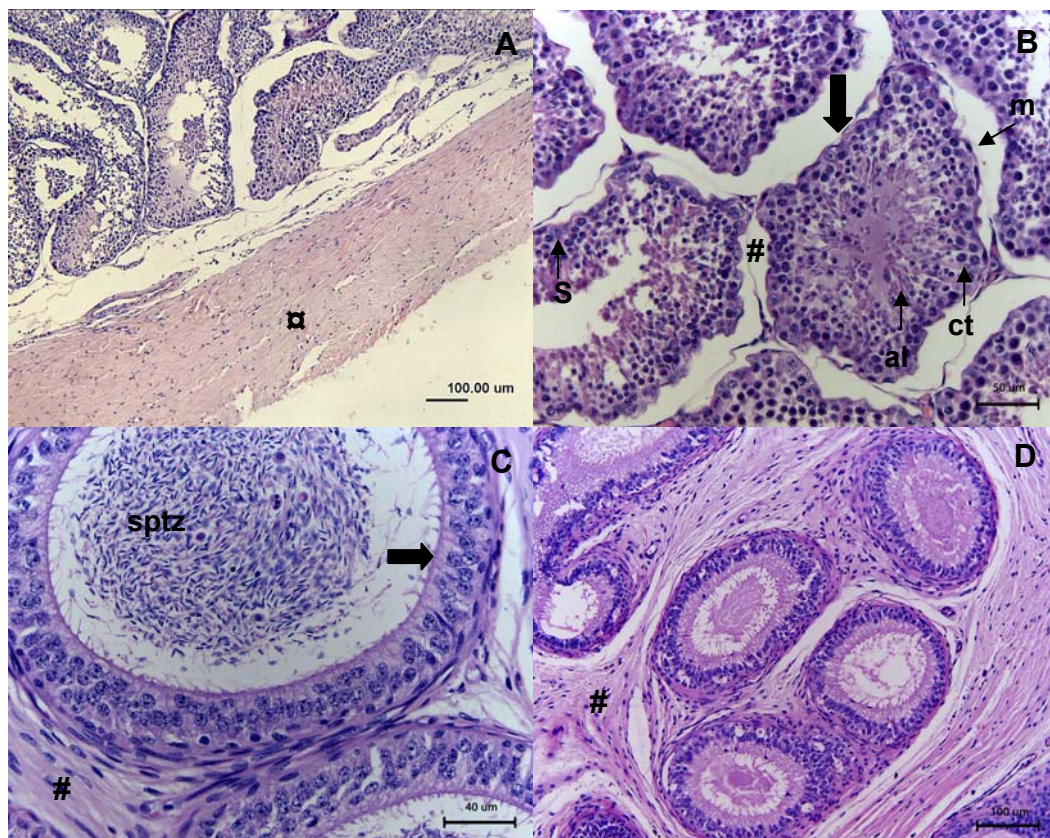


Figura 5 – AF-10 (HE) **A e B** testículo – observa-se cápsula (ca) com poucos fibroblastos; tecido conjuntivo frouxo entre os tubulos com retração (#); túbulos com contornos irregulares (seta); células mióides (m); vasos sanguíneos (v); célula de Sertoli (S); diversos tipos celulares da linhagem germinativa: espermatócito (ct), espermátide alongada (al). **C** corpo do epidídimo e **D** cauda do epidídimo – observa-se tecido conjuntivo frouxo bem organizado (#); epitélio colunar pseudo-estratificado com esterecílio (seta); grande quantidade de espermatozóides na luz do túbulo (sptz) - São Paulo – 2008

7 DISCUSSÃO

A GRMD assim como a DMD apresenta graus diferentes de manifestação clínica. Como já relatado anteriormente por Gaiad (2006), em trabalho realizado no mesmo grupo de animais utilizados neste estudo, cães de uma mesma ninhada, mesmo que mantidos com o mesmo manejo, apresentam fenótipos para a GRMD diferentes entre si e, em cada animal, as características da patologia evoluem em ritmos distintos. O grupo AF é formado por animais com diferentes quadros clínicos.

As características descritas na literatura sobre as alterações posturais com hiper-extensão dos carpos, hiper-flexão dos tarsos e abdução das patas, hipertrofia da língua e atrofia dos músculos do temporal, andar aos saltos como coelho são todas muito bem caracterizadas na população estudada. Outras ocorrências como morte neonatal, morte por insuficiência cardiorrespiratória ou morte súbita por alterações cardíacas também são vivenciadas no Canil GRMD-Brasil.

Os animais apresentam hiperglossia (aumento da musculatura da língua), além de atrofia dos músculos do pescoço e por isso apresentam grande dificuldade na apreensão e deglutição da comida. Para minimizar o esforço durante a alimentação, os mesmos são alimentados um a um, com ração pastosa (ração triturada e umedecida com água morna) desde que começam a apresentar dificuldade de deglutição, fato que ocorre por volta de um ano de idade. Este manejo além de facilitar a apreensão do alimento, permite um acompanhamento muito minucioso de cada animal, qualquer mudança de apetite ou atitude é rapidamente notificada.

Além do acompanhamento clínico há também o manejo reprodutivo destes animais. As fêmeas passam por avaliação citológica periódica para controle da fase do ciclo estral e escolha do momento e do animal adequado para acasalamento. Regularmente realiza-se colheita de sêmen destes animais durante as aulas práticas nas Disciplinas VRA 222 – Fisiologia da Reprodução e da Lactação e VRA 413 – Patologia e Clínica da Reprodução do curso de graduação de Medicina Veterinária da FMVZ-USP.

Pelo fato de estarem acostumados a esta rotina e ao tipo de manipulação, a colheita de sêmen, durante a etapa experimental, não proporcionou estresse a esses animais.

Os animais com GRMD apresentam boa libido e devido a esse treinamento pré-existente e ao condicionamento, muitas vezes chegavam ao laboratório já excitados, com intumescimento do bulbo peniano, sendo necessário que fossem distraídos, para recomeçar todo o procedimento.

No entanto, um desses animais (Bis – AF3), em duas ocasiões, não manteve a ereção até a ejaculação. Este animal, além de ter fenótipo da doença mais acentuado, também apresenta um comportamento mais tímido, fato que pode ter influenciado na resposta ao estímulo.

O Suflair (AF5), em uma única ocasião, apresentou aspermia. Esta situação sugere comprometimento dos músculos ejaculatórios como o músculo bulbocavernoso e o isquiocavernoso, além da musculatura pélvica que também tem importante função na ejaculação. A musculatura da cápsula prostática também tem ação na ejaculação, promovendo a expulsão da primeira e da terceira frações seminais, além de ajudar na eliminação da segunda fração. Estas musculaturas podem ter falhado neste dia, embora nos outros dias a colheita tenha sido realizada de maneira satisfatória, com volume do ejaculado normal.

A monta pode ser difícil para alguns animais, porém não altera a libido, como no caso do Peter (AF1), que já se adaptou à colheita manual. Este animal fica restrito à reprodução por inseminação artificial e já produziu descendentes (1 cruza – IA com 7 filhotes nascidos), apesar de ser teratospérmico (mais de 20% de defeitos totais). Porém, em episódio recente, quando em contato com uma fêmea, realizou salto sobre a mesma, sugerindo que em situação favorável, com fêmea no cio e sem interferência de outros machos, talvez pudesse realizar monta natural.

O volume do ejaculado (2ª fração) não variou entre os animais, que apresentaram valores entre $0,6 \pm 0,012$ mL e $1,68 \pm 0,35$ mL, dentro da faixa da normalidade para a espécie (0,5-4,0 mL). Porém, ao associar os valores de volume com concentração espermática, que expressa o número de espermatozóides por mL de sêmen, pode-se aferir que o animal AF1 – Peter apresentou alta concentração e volume abaixo, quando comparado à média dos demais, de 1,0 mL. Estes valores, quando interpretados juntamente com os outros dados do animal, podem indicar uma possível deficiência contrátil da cápsula prostática, resultando em volume espermático menor e conseqüente maior concentração de espermatozóides no ejaculado.

O grupo AF apresentou concentração espermática significativamente maior que o GC. Talvez este fato possa ter sido influenciado pela pouca experiência dos animais do GC em contraste com o treinamento constante do AF nas aulas da graduação e em outros experimentos.

A motilidade e o vigor seminiais são parâmetros muito importantes da avaliação seminal, não devendo no cão haver menos de 70% dos espermatozoides apresentando movimento retilíneo progressivo. Como mostrado no anexo G, nenhum dos animais apresentou média de motilidade inferior a 80%. O vigor observado também apresentou média satisfatória, sempre acima de 3,25 na escala de 0 a 5 (ROOT; KUSTRITZ, 2007).

A proporção de espermatozoides vivos/mortos também se mostrou numa faixa muito segura, com médias dos grupos acima de 93%.

A morfologia espermática é altamente especializada, cada componente estrutural é desenhado especificamente para o desempenho de sua função, a de transportar em segurança o DNA paterno até o interior do oócito materno (GRUDZINSKAS; YOVICH, 1995). Alterações na conformação do espermatozoide podem dificultar ou mesmo inviabilizar este objetivo. Embora os grupos controle e afetados não tenham apresentado diferenças significativas entre eles é possível observar pelo anexo G que o animal AF1 (Peter) apresenta grande número de defeitos maiores, caracterizados principalmente por alterações de cabeça, sendo considerado um animal teratospérmico, ou seja, que apresenta mais de 20% de defeitos totais (VANNUCCHI et al., 1998) . Segundo Barth e Oko (1989), defeitos de cabeça como cabeça piriforme, muito encontrado neste animal, podem ser resultado de condições anormais que alteram a função testicular. Estas condições podem ser caracterizadas por alterações na termo-regulação ou distúrbios hormonais locais ou sistêmicos. Distúrbios hormonais locais podem ser causados por alterações térmicas e os sistêmicos podem ser consequência de adversidades que causam estresse ao animal, como por exemplo, dor crônica, mudanças ambientais, toxinas, entre outros. Como descrito por Luppi (2006), estes animais apresentam alteração histológica na estrutura do músculo cremáster, responsável pela termo-regulação testicular, podendo ser exacerbada neste animal, justificando as alterações morfológicas encontradas nos espermatozoides. Além disso é sabido que a condição crônica e debilitante da doença proporciona estresse e possivelmente dor permanente aos animais, que estão sempre muito vulneráveis às alterações internas e externas como

dificuldade de deglutição com engasgos, dificuldade respiratória, mudanças climáticas que podem levar a alterações respiratórias, entre outras. Porém, um estudo detalhado sobre o perfil hormonal desses cães ainda não foi realizado, podendo ser uma diretriz a ser seguida.

Como relatado por Evenson et al. (1980), a conformação nuclear, e conseqüentemente da cabeça do espermatozóide, está relacionada, entre outras coisas, com a compactação da cromatina. No entanto, o AF-1 não apresentou índices de fragmentação de DNA (SCSA) maior que os outros animais, mostrando que apesar dos formatos aberrantes observados nas células, as mesmas não apresentaram índice de fragmentação de DNA alterados. Isto pode ser reforçado ainda pelo fato deste animal ter descendentes, produzidos por inseminação artificial, comprovando sua fertilidade.

A quantidade de TBARS no plasma seminal (Plasma) mostrou diferença significativa entre os grupos, sendo que o grupo AF apresentou menor quantidade de ROS do que o grupo GC. Como dito anteriormente, toda célula aeróbica produz ROS como produto de atividade oxidativa, sendo estas fundamentais para a homeostase celular. Os resultados encontrados, neste experimento, podem significar maior atividade espermática dos cães do grupo GC (justificada pela maior produção de ROS), entretanto tal afirmação não pode ser feita, uma vez que não existem parâmetros estabelecidos para esta dosagem, nesta espécie.

A diferença da quantidade de ROS entre os grupos GC e AF não se mantiveram quando da dosagem de TBARS após a indução do estresse oxidativo, indicando que ambos os grupos apresentam resistência semelhante frente a uma situação de estresse.

Os valores de SCSA ("sperm chromatin structure assay") foram maiores no grupo GC do que para o grupo AF, embora todos se encontrem dentro da faixa de valores considerada como baixa fragmentação (0 a 15% - alta fertilidade)(EVENSON e JOST, 2000).

A lesão de DNA, tanto mitocondrial como nuclear está relacionada com a produção de ROS em espermatozóides humanos (AITKEN, 2006) (correlação positiva SCSA/Plasma no grupo AF). Como discutido anteriormente, os animais do grupo GC apresentaram maior produção de ROS do que o grupo AF, podendo ter induzido uma maior fragmentação de DNA, porém ainda dentro dos parâmetro considerados baixos, não comprometendo a fertilidade dos animais.

A integridade de acrossomo, mensurada pelo teste FITC-PSA, também mostrou valores maiores para o grupo GC do que para o grupo AF. É sabido que a manipulação do sêmen, com a centrifugação, a pipetagem e todos os processos realizados para a avaliação seminal estimulam a reação acrossomal. Fisiologicamente, a reação acrossomal ocorre no momento da ligação do espermatozóide com a zona pelúcida (ZP) e consiste na liberação do conteúdo acrossomal, composto de enzimas proteolíticas que irão facilitar a penetração do espermatozóide na ZP, além de promover alterações na superfície espermática, como a exposição de receptores de superfície, que irão possibilitar a fusão do espermatozóide com o oócito (AITKEN, 2006). Assim como para o estresse oxidativo discutido anteriormente, os valores menores de lesão de acrossomo encontrado no grupo AF podem significar uma menor ou mais lenta reatividade acrossomal. Se os valores do grupo controle forem considerados os parâmetros normais para a espécie, o grupo AF pode estar abaixo do ideal esperado, reforçando a idéia de que nestes animais os espermatozoides podem possuir uma alteração na composição ou conformação da membrana plasmática, tornando-a menos fluida ou menos responsiva aos estímulos fisiológicos.

Ao contrário dos animais afetados, os animais do grupo controle não foram treinados previamente, tratavam-se de animais jovens, que nunca procriaram ou copularam e mostraram certa ansiedade diante dos procedimentos e do ambiente. Tal fato pôde ser confirmado por uma mudança de comportamento entre a primeira e a segunda colheita, na qual estavam mais confiantes e adaptados aos procedimentos. Acredita-se que estes fatores podem ter aproximado os resultados do grupo controle aos do grupo afetados, mascarando possíveis diferenças entre as variáveis estudadas.

Outro fator que pode ter sido determinante nos resultados é o número de animais utilizados. Por serem afetados por essa doença tão devastadora, o número de animais adultos e aptos a passar pelos procedimentos de colheita de sêmen é limitado, deixando sempre ressalvas quanto à extrapolação dos resultados para uma população maior ou mesmo para outras espécies, no caso humanos portadores de DMD.

Alterações seminais características a todos os animais não foram observadas, como o descrito por Hernández-González et al. (2004) que observaram, em camundongos, alta incidência de defeitos de cauda do espermatozóide, além de

motilidade espermática anormal, consistindo de movimentos vibratórios. Os autores atribuíram estas alterações à ausência de Dp71 e de proteínas associadas ao complexo da distrofina (DAPC). Porém, o camundongo estudado não apresenta nenhum produto do gene da distrofina, fato que não deve ocorrer na DMD e na GRMD, a não ser em casos individuais. Neste mesmo estudo, os autores citam baixa taxa reprodutiva dos camundongos mdx^{3cv}, o que não se constatou nos cães afetados pela GRMD, uma vez que os mesmos reproduzem-se por inseminação artificial, na maioria das vezes, e apresentam fertilidade e tamanho de ninhada compatíveis com a raça (média de 9,43 filhotes por ninhada).

A histologia do aparelho reprodutor mostrou alterações significativas em todos os animais. Infelizmente não foi possível realizar biópsia de testículo e epidídimo, como pensado inicialmente, para que se pudesse comparar diretamente a histologia com os resultados das análises seminais. Este procedimento poderia causar danos irreversíveis aos animais que são os reprodutores do canil.

Os resultados encontrados na histologia mostram algumas alterações muito severas que não seriam compatíveis com os quadros espermáticos encontrados nos animais afetados que passaram por avaliação seminal. Um exemplo é o animal afetado 8 – Thor, que apresentou testículos de aparência pré-púbere, incompatível com sua idade, caracterizado pela ausência de espermatozóides ou mesmo outras células da linhagem germinativa. Este quadro histológico é compatível com hipoplasia testicular, tendo origem no desenvolvimento embrionário.

Assim como o Thor, o Galak – afetado 6, também apresentou testículos pré-púbere, porém este animal tinha apenas 10 meses quando veio a óbito. Em um cão normal de porte grande, esta seria uma idade limítrofe para o início da puberdade, porém levando-se em conta que a puberdade está relacionada ao tamanho e peso corporal e que estes animais têm taxa de crescimento bem inferior ao esperado, em especial este animal que apresentava enorme dificuldade de ingestão de alimento devido a uma hérnia esofágica pronunciada, pode-se entender este achado. Outro fator que pode levar a este possível retardo da puberdade é o já mencionado estresse permanente causado pela doença e a necessidade detectada pelo organismo de direcionar energias para áreas mais vitais do organismo, deixando a reprodução para segundo plano.

O Cajú – afetado 9, embora ainda bem jovem no momento do óbito, 1 ano e 1 mês, apresentou células germinativas em diferentes fases de diferenciação,

porém essa diferenciação tinha aparência de ter sido interrompida pelo processo degenerativo, sem que as células chegassem a apresentar características definidas de cada fase da espermatogênese. A grande quantidade de células gigantes semelhantes às de corpo estranho caracterizavam severa degeneração de células germinativas, tendo estas células função de limpeza da área (SINGH; ABE, 1987). As células gigantes multinucleadas podem estar muito aumentadas no testículo em casos de toxicidade, estresse ou hipóxia (APSALIAMOV et al., 1993; REHM, 2000). Em estudo de testículos de cães normais, da raça beagle, utilizados como controle em estudos reprodutivos diversos, Rehm (2000) relata alta incidência de células gigantes multinucleadas numa média de 5 túbulos seminíferos afetados por testículo, número muito inferior ao encontrado nos testículos do Cajú – AF9. Singh e Abe (1987) descreveram as células gigantes em testículos de camundongos após ligação do ducto eferente e relatam que o achado é freqüente em animais com diferentes patologias dentre elas criptorquidismo ou animais de estudos experimentais com agentes tóxicos. Os autores descrevem a disposição periférica dos núcleos e alterações morfológicas das pontes intercelulares, além da confluência das membranas plasmáticas de células adjacentes e alterações nas divisões celulares. Estas células são formadas geralmente por espermátides que devido a essa fusão, não desenvolvem o flagelo.

O cão AF9 – Cajú apresentava ainda células mióides pouco aderidas à membrana basal do túbulo seminífero, o qual se apresentava com contornos irregulares e fraca ligação com a matriz extracelular. Esta pouca aderência entre as células pode ser resultante das deficiências de distrofina e proteínas a ela associadas (DAP) que levam à má adesão entre as células musculares e até de tecido conjuntivo (PIZZEY; JONES, 1995).

Os outros dois animais, Oddie e Hércules (AF 7 e 10, respectivamente) mostraram alterações na arquitetura dos túbulos, porém com toda a linhagem germinativa presente, inclusive espermatozóides. Isto leva a crer que este seria um quadro possível para os padrões espermáticos encontrados nos cinco animais avaliados.

Não foi possível determinar um padrão com relação à idade ou às características do quadro clínico dos animais. O AF9 – Cajú era um animal de porte grande em relação aos outros do canil, no entanto veio a óbito muito cedo e com graves alterações degenerativas nos testículos.

O AF7 – Oddie e o AF8 – Thor apresentavam estrutura óssea grande e muito semelhantes. Morreram com idades próximas, porém com características histológicas testiculares completamente diferentes.

O AF10 – Hércules desenvolveu a distrofia de forma severa e rápida, tendo passado toda a vida com grande dificuldade de deglutição e em extrema magreza. Mesmo assim, mostrou espermatogênese completa, apesar das alterações arquiteturais.

Baseado nas diferentes alterações histológicas observadas e traçando-se um paralelo com os resultados das análises seminais, poderíamos supor que o animal AF1 – Peter deve apresentar maiores alterações histológicas, com maior grau de degeneração testicular, que resultariam no quadro de teratospermia apresentado por ele. Os outros animais devem apresentar lesões testiculares menores, que resultam em alterações menos evidentes. Acreditamos que nenhum dos animais das análises seminais apresentem alterações histológicas como as encontradas nos animais AF9 – Caju (intensa degeneração) ou AF8 – Thor (hipoplasia), pois estes não apresentavam espermatozóides nos cortes avaliados e provavelmente não produziram sêmen com as características observadas.

Muitas informações ainda precisam ser melhor detalhadas para que se possa utilizá-las em procedimentos com homens portadores da DMD. Estudos sobre os perfis hormonais devem ser realizados para que se possa prever a maturidade sexual bem como a sua manutenção. Outros fatores não considerados neste estudo podem ser de fundamental importância num estudo com seres humanos, como por exemplo questões psicológicas e emocionais, que podem afetar funções como ereção e ejaculação.

Com a melhora da qualidade de vida dos portadores de distrofias e o conseqüente aumento da expectativa de vida, as manifestações decorrentes do amadurecimento sexual, juntamente com o desejo de se estabelecer um estilo de vida o mais próximo possível do normal, pode levar a questões nunca antes levantadas. Como estas pessoas devem se comportar para que tenham uma vida sexual saudável? Conhecer seu potencial de fertilidade é importante para evitar problemas posteriores. Conseqüências indesejáveis como uma gestação não programada deve ser evitada e se desejada esta deve ser monitorada geneticamente, para que não se produza descendentes com as mesmas alterações

do pai. Um diagnóstico genético pré-implantacional pode selecionar um embrião livre da DMD e garantir uma gestação segura.

Queremos acreditar que este estudo possa abrir algumas portas para questões que venham dar novas esperanças de vida a pessoas com DMD, e seus familiares, trazendo perspectivas de uma vida mais prazerosa e plena.

8 CONCLUSÕES

Este estudo permite concluir que:

- A GRMD não altera a atividade mitocondrial dos espermatozóides, entretanto, a integridade de acrossomo e a compactação de DNA são maiores no grupo AF.
- Os espermatozóides de cães afetados pela GRMD apresentam capacidade de resistência ao estresse oxidativo semelhante à apresentada por cães não afetados pela doença, embora o plasma seminal apresente menor quantidade de ROS.
- O aparelho reprodutor dos cães com GRMD mostram alterações diversas em sua estrutura e composição, o que contraria a hipótese formulada.
- Não é possível, devido à grande variabilidade de sintomas entre indivíduos, traçar um paralelo entre quadro clínico e qualidade espermática.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. **Role of oxidative stress in male infertility and antioxidant supplementation**. Business briefing: US Kidney & Urological Disease, 2005.

AITKEN, R. J. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 69-75, 2006.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 581-588, 2004.

AL-HARBI, T. M.; BAINBRIDGE, L. J.; MCQUEEN, M. J.; TARNOPOLSKY, M. A. Hypogonadism is common in men with myopathies. **Journal of Clinical Neuromuscular Disease**, v. 9, n. 4, p. 397-401. 2008

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M. M.; KROETSCH, T. G.; PAULS, K. P. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 354-360, 2002.

APSALIAMOV, V. Kh.; BAZHANOV, A. N.; SAVENKO, V. A. The multinucleated cells of the spermatogenic layer in rats as a criterion of hypoxic damage to the testis. **Morfologiya**, v. 104, n. 1-2, p. 102-106, 1993. (Resumo).

BADAN, D.; DAVIES, K. E. Microarray analysis of mdx mice expressing high levels of utrophin: Therapeutic implications for dystrophin deficiency. **Neuromuscular Disorders**, v. 18, n. 3, p. 239-247, 2008.

BARTH, A. D; OKO, R. J. Defects of the sperm head. In: **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. 1. ed., Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1989, p. 130-192.

BLAKE, D. J.; WEIR, A.; NEWAY, S. E.; DAVIES, A. E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 291-329, 2002.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; BRETZLAFF, K. N.; ELMORE, R. G. The causes and pathologic changes of testicular degeneration in large animals. **Veterinary Medicine**, v. 6, p. 531-536, 1992.

BRETAG, A. Too much hype, not enough hope: Are balanced reporting and proper controls too much to expect from therapeutic studies in animal models of neuromuscular diseases that presage clinical trials in humans? **Neuromuscular Disorders**, v. 17, p. 203-205, 2007.

CHRISTIANSEN, I. B. J. Andrologia do macho normal. In: **Reprodução no cão e no gato**. Editora Manole Ltda., p. 93-125, 1988.

- COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 165-172, 2003.
- CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Sperm structure and function. In: GRUDZINSKAS, J. G.; YOVICH, J. L. **Gametes - The spermatozoon**. 1. ed., Cambridge, Cambridge University Press, 1995, p. 57-58.
- DAVIS, K. E. Challenges in duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 7, p. 482-486, 1997.
- DECONINCK, N; DAN B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. **Pediatric Neurology**, v. 36, n. 1, p. 1-7, 2007.
- EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **The Lancet**, v. 359, p. 687-695, 2002.
- ERENPREISS, J.; SPANO, M., ENREPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, p. 11-29, 2006.
- ERVASTI, J. M. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 108-117, 2007.
- EVANS, H. E. The urogenital system. In: _____ **Miller's anatomy of the dog**. 3. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1993, p. 463-493.
- EVENSON, DP; DARZYNKIEWICZ, Z; MELAMED, MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.
- EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Simultaneous measurements by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 30, n. 3, p. 279-280, 1982.
- EVENSON, D. P.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**, v. 22, p. 169-189, 2000.
- FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: _____ FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W.; RICHARD, W. **Canine and Feline Endocrinology and reproduction**, 2. ed., St. Louis, W.B. Saunders, p. 673-690, 2004.
- GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A.; PACE, M. M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.
- GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.

- GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.
- GRUDZINSKAS, J. G.; YOVICH, J. L. Sperm structure and function. In: **Gametes – The spermatozoon, Gametes - The spermatozoon**. 1. ed., Cambridge, Cambridge University Press, 1995, p. 45-69.
- HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E. O.; MORNET, D.; RENDON, A.; MARTÍNEZ-ROJAS, D. Absence of Dp71 in mdx^{3cv} mouse spermatozoa alters flagellar morphology and the distribution of ion channels and nNOS. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 137-145, 2004.
- HOFFMAN, E. P.; DRESSMAN, D. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 9, p. 465-470, 2001.
- HOWELL, J. M. C. C.; FLETCHER, S.; KAKULAS, B. A.; O'HARA, M.; LOCHMULLER, H.; KARPATI, G. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. **Neuromuscular Disorders**, v. 7, n. 5, p. 325-328, 1997.
- JAYAT, C.; RATINAUD, M-H. Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. **Bio Cell**, v. 78, p. 15-25, 1993.
- KATAYOSE, H.; YANAGIDA, K.; HASHIMOTO, S.; YAMADA, H.; SATO, A. Use of diamide-acridine orange fluorescence staining to detect aberrant protamination of human-ejaculated sperm nuclei. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 670-676, 2003. Supplement, 1.
- SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. 2ª ed., Nova Iorque: Raven Press, 1994, p. 1363-1434.
- KORF, B. R.; DARRAS, B. T.; URION, D. K. Dystrophinopathies. Gene Reviews, University of Washington, Seattle, 2000. Disponível em: <www.genetests.org> Acesso em: 10/2008.
- LUPPI, M. M. C. P. **Avaliação andrológica de cães da raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular**. 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- MORTIMER, D. Sperm physiology. In: **Practical laboratory andrology**. Oxford University Press, Inc., 1994, p. 13-40.
- NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E. K.; GADELLA, E. M. A triple stain flow-cytometric method to assess plasma- acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of**

Reproduction, v. 68, p. 1828-1835, 2003.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G.; CORTADA, C. N.; BARNABÉ, V. H.; DE CLERCQ, J. B.; BOLS, P. E. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334-40, 2007.

NGUYEN, F.; CHEREL, Y.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever puppies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, n. 2-3, p. 100-108, 2002.

PEÑA, A.; JOHANNINSSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 52, p. 965-980, 1999.

PIZZEY, J. A.; JONE, G. E.. Adhesive interactions between normal and dystrophic human skin fibroblasts. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 69, n. 3, p. 207-221, 1985. (Resumo).

RAHBK, J.; WERGE, B.; MADSEN, A.; MARQUARDT, J.; STEFFENSEN, B. F.; JEPPESEN, J. Adult life with Duchenne muscular dystrophy: Observations among an emerging and unforeseen patient population. **Pediatric Rehabilitation**, v. 8, n. 1, p. 17-28, 2005.

REHM, S. Spontaneous testicular lesions in purpose-bred beagle dogs. **Toxicologic Pathology**, v. 28, n. 6, p. 782-787, 2000.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; DE KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. **Theriogenology**, v. 64, p. 706-719, 2005.

ROCHA, H. L. O. G.; BELETTI, M. E.; MARCOLINI, T. T.; AND AMORIM, D. A. Z. Uso de laranja de acridina e azul de toluidina na avaliação da fertilidade masculina. **Biosci. J.**, v. 18, 65-77, 2002.

ROMANO, F.; TRIPICIANO, A.; MUCIACCIA, B.; DE CESARIS, P.; ZIPARO, E.; PALOMBI, F.; FILIPPINI, A. The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility. **Contraception**, v. 62, p. 294-297, 2005.

ROOT KUSTRITZ, M. V.. The value of canine semen evaluation for practitioners. **Theriogenology**, v. 68, p. 329-337, 2007.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive. **Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 12, 2004. Disponível em: <<http://www.rbej.com/content/2/1/12>> Acesso em: 07/2008.

SENGER, P. L. Endocrinology of the male and spermatogenesis. In: _____ **Pathways to pregnancy and parturition**. Washington: Current Conception, Inc., 2003. p. 214-239.

- SENGER, P. L. Male reproductive system. In: _____ **Pathways to pregnancy and parturition**. Washington: Current Conception, Inc., 2003. p. 44-79.
- SHAFIK, A.; SHAFIK, A. A.; SIBAI, O. E.; SHAFIK, I. A. Contractile activity of the prostate at ejaculation: an electrophysiologic study. **Urology**, v. 67, n. 4, p. 793-796, 2006.
- SHELTON, G. D.; LIU, L. A.; GUO, L. T.; SMITH, G. K.; CHRISTIANSEN, J. S.; THOMAS, W. B.; SMITH, M. O.; KLINE, K. L.; MARCH, P. A.; FLEGEL, T.; ENGVALL, E. Muscular dystrophy in female dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 240-244, 2001.
- SIDHU, R. S.; HALLAK, J.; SHARMA, R. K.; THOMAS, JR. A. J.; AGARWAL, A. Relationship between creatine kinase levels and clinical diagnosis of infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 15, n. 4, p. 188-192, 1998.
- SIKKA, S. C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W. J. G. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 6, p. 464-468, 1995.
- SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. Inseminação Artificial em Cães. In: _____ GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo, Varela Editora e Livraria Ltda., 2002, p. 69-96.
- SINGH, S. K.; ABE, K. Light and electron microscopic observation of giant cells in the mouse testis after afferent duct ligation. **Archives of Histology of Japan**, v. 50, n. 5, p. 579-585, 1987.
- TAKAHASHI, J.; ITOH, Y.; FUJIMORI, K.; IMAMURA, M.; WAKAYAMA, Y.; MIYAGOE-SUZUKI, Y.; TAKEDA, S. The utrophin promoter A drives high expression of the transgenic LacZ gene in liver, testis, colon, submandibular gland, and small intestine. **The Journal of Gene Medicine**, v. 7, p. 237-248, 2005.
- THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 786-793, 1998.
- TORKATZ, S. A.; DUNCAN, N. M.; RASH, S. M.; SADEGHI, A.; DEWAN, A. K.; PILLERS, D. A. M. Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of Duchenne Muscular Dystrophy. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 65, p. 272-281, 1998.
- VAINZOF, M.; YAMAMOTO, L. U.; KOSSUGUE, P. M.; FOGAÇA, L. L. Q.; VELLOSO, F. Z.; AYUB, D.; MUNIZ, V. P.; ZATZ, M.; SILVA, H. C. A.; MASSIRONI, S. M. G.; MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E.; MIYAZATO, L. G.; MORAES, J. R. E.; D'ANGELES, F. H. F.; LACERDA NETO, J. C.; MORTARI, A. C.; BORGES, A. S.; REZENDE, L. A. L.; RAHAL, S.C. Modelos animais ajudando a decifrar doenças neuromusculares humanas. **Revista Neurociências**, v. 13, n. 3, jul/set 2005, supl-versão eletrônica. Disponível em: < <http://www.revistaneurociencias.com.br> > Acesso

em: ago/2008.

VAINZOF, M.; AYUB-GUERRIERI, D.; ONOFRE, P. C. G.; MARTINS, P. C. M.; LOPES, V. F.; ZILBERATAJN, D.; MAIA, L. S.; SELL, K.; YAMAMOTO, L. U. Animal models for genetic neuromuscular diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 34, p. 241-248, 2008.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A. Canine X-linked muscular dystrophy: morphologic lesions. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 97, p. 1-23, 1990.

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

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, p. 31-39, 2004.

WOUTERS-TYROU, D.; MARTINAGE, A.; CHEVAILLIER, P.; SAUTIÈRE, P. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. **Biochimie**, v. 80, p. 117-28, 1998.

ANEXO A – Tampão TNE (pH 7,4)

Reagente	Quantidade
NaCl	0,15M
Tris-HCl	0,01M
EDTA	1mM

ANEXO B – Sondas fluorescentes

a) FITC-PSA (100 µg/ml)

Reagente	Quantidade
FITC-PSA	2 mg
DPBS	20 ml
Ázida sódio 10%	10%

Conservar em freezer e acrescentar ázida no momento do uso

b) JC-1

Reagente	Quantidade
DMSO	1ml
JC-1	0,05mg

Conservar em freezer

c) Laranja de Acridina (LA) – pH 6,0

Reagente	Quantidade
Ác cítrico	0,037M
Na ₂ HPO ₄	0,2M
EDTA	1mM
NaCl	0,15M
LA	6µg/ml

Manter em geladeira

Detergente Ácido – pH 1,4

Reagente	Quantidade
HCl	0,08N
NaCl	0,15M
Triton X 100	0,1%

Manter em geladeira

ANEXO C – Fixador

Metacarn:

Reagente	Quantidade
Metanol	60ml
Clorofórmio	30ml
Ac Acético Glacial	10ml

Manter em geladeira

ANEXO D – Protocolo de Inclusão em Paraplast:

Reagente	Tempo
Álcool 70%	1h ou overnight
Álcool 80%	1h
Álcool 90%	1h
Álcool 100% I	1h
Álcool 100% II	1h
Álcool 100% III	1h
Xilol I	1h
Xilol II	30min
Paraplast I	Overnight (60°C)
Paraplast II	2hs (60°C)
Paraplast III	inclusão

ANEXO E – Coloração

Hematoxilina – Eosina (HE)

Reagente	Tempo
Xilol I	10 min
Xilol II	10 min
Álcool 100%	3 min
Álcool 95%	3 min
Álcool 70%	3 min
Água corrente	3 min
Hematoxilina	4 min
Água corrente	10 min
Álcool – ácido	3 seg
Água corrente	10 min
Eosina	15 seg
Álcool 95%	3 seg
Álcool 100% I	2 min
Álcool 100% II	2 min
Álcool Xilol	2 min
Xilol	2 min

Montagem da lâmina: colar lamínula sobre os cortes histológicos com Permount® (Fisher Scientific – New Jersey).

APÊNDICE A – Média e erro padrão do espermograma nas 37 colheitas de cada animal dos grupos controle e afetado – São Paulo - 2008

Animal	Volume (mL)	Motilidade %	Vigor (1-5)	Concentração X10⁶sptz/mL	Vivos (%)	Defeitos Maiores (%) FS	Defeitos menores (%) FS	Defeitos Maiores (%) EN	Defeitos menores (%) EN
AF1	0,98±0,1	80±3,53	3,25±0,2	1050±241,86	95,2±1,85	19±1,73	8±3,49	22,4±1,6	0,2±0,2
AF2	1,68±0,35	90±0	3,9±0	712±182,38	96,6±0,93	3,2±0,92	5,4±0,81	10,8±2,13	0,8±0,37
AF3	0,93±0,3	80±2,89	3,5±0	380±156,95	96±2,52	3,67±2,73	5,66±1,67	12,5±0,5	0
AF4	1,42±0,2	86±1,87	3,7±0,2	646±79,72	97,2±1,07	4,4±0,75	8±4,73	8,8±2,15	2±0,71
AF5	1±0,2	81,25±4,27	3,62±0,12	345±54,85	92,5±2,96	2±1,22	1±0,7	8,25±2,06	2±0,7
CO1	0,84±0,07	87±3	4,1±0,1	570,8±177,55	95,8±1,93	4,8±1,46	6,2±2,61	7±2,02	0,8±0,37
CO2	0,6±0,12	83,75±4,73	3,5±0,2	191±46,09	99,33±0,33	2,5±0,85	4±0,91	9±0,7	1,75±0,48
CO3	1,55±0,95	87,5±2,5	3,75±0,25	60±50	96±0	4,5±0,5	16,5±6,5	10±7	3±4
CO4	1,62±0,24	85±2,89	3,25±0,24	502,5±77,71	85,25±8,07	2,2±0,75	7,25±2,56	11,25±1,65	1,75±0,85

FS = formol salino; EM = Eosina-nigrosina

APÊNDICE B – Média e erro padrão da cada animal para os testes FITC-PSA, JC-1 e SCSA realizados no citômetro de fluxo – São Paulo – 2008

GRUPOS	FITC-PSA	JC1	SCSA
	% acrossoma lesado	% alto potencial de mitocôndria	% de sptz com DNA fragmentado
AF1	26,5±7,4	67,9±9,7	5,8±0,6
AF2	21,9±6,9	71,3±6,0	3,9±0,8
AF3	22,7±5,1	67,8±8,1	3,6±1,3
AF4	20,9±4,3	71,5±2,6	3,0±0,6
AF5	33,0±9,5	65,1±8,2	6,6±1,3
CO1	31,6±5,2	62±4,1	5,6±1,5
CO2	22,8±4,4	71,7±8,1	4,2±0,3
CO3	41,7±0,96	50,1±11,6	8,9±3,1
CO4	33,9±4,9	58,1±3,1	7,3±2,3