

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Carla Dal Bianco Fernandez

**Alteração do tempo de trânsito epididimário: implicações no perfil
protéico e outros parâmetros espermáticos**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Carla Dal Bianco Fernandez
W. De Grava Kempinas
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

Campinas 2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

F391a

Fernandez, Carla Dal Bianco Fernandez
Alteração do tempo de trânsito epididimário: implicações
no perfil protéico e outros parâmetros espermáticos / Carla
Dal Bianco Fernandez -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Wilma De Grava Kempinas.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Epididimo. 2. Fertilidade. 3. Espermatozóides. 4.
Inseminação artificial. 5. Rato. I. Kempinas, Wilma De
Grava. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Alteration of epididymal transit time: implications on the proteic profile and other sperm parameters.

Palavras-chave em inglês: Epididymis; Fertility; Sperm; Artificial insemination; Mouse.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Wilma De Grava Kempinas, Maria Christina Werneck Avellar, Eliana Milanesi Rúbio.

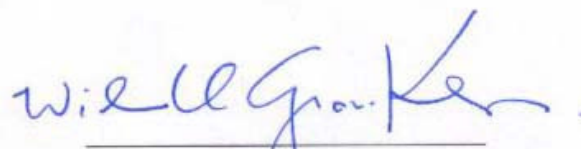
Data da defesa: 15/09/2006.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

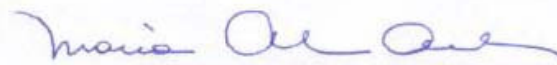
Campinas, 15 de setembro de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Maria Christina Werneck Avellar


Assinatura

Profa. Dra. Eliana Milanesi Rúbio


Assinatura

Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

Assinatura

Profa. Dra. Camila Contin Diniz de Almeida Francia

Assinatura

*“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que melhor fosse
feito...”*

*Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus não somos
mais o que éramos”.*

(Martin Luther King)

À minha mãe...

Ao meu pai...

Ao meu amor...

Agradecimentos

A Deus, por todos os dias da minha vida, e por me dar forças para alcançar o fim dessa jornada, mesmo quando julguei que não conseguiria. E a Yemanjá por toda força e proteção!

À minha mãe, Franca, por ter me trazido à vida, pelo amor, dedicação e apoio na concretização deste projeto. Amo você. Obrigada!

Ao meu padraсто, Djalma, que apesar dos tropeços da vida sei que sempre torceu, e torce pelo meu sucesso.

Ao meu pai, Edson (in memoriam), que onde quer que esteja sei que está, e sempre esteve ao meu lado!

À minha vó, Maria, por toda atenção e carinho.

A toda minha família, tios, tias, primos e primas, que mesmo com toda distância sempre fizeram parte da minha vida.

Ao meu namorado, André, pelo apoio, dedicação, carinho, respeito, companheirismo, paciência, e acima de tudo, por seu amor! Muito obrigada, meu amor!

À minha orientadora Wilma De Grava Kempinas, pela confiança, carinho, amizade e todo o apoio dado na realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo que me ensinou!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP, pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado.

À Liliam A.S. Panagio, secretária da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, IB, UNICAMP, por estar sempre pronta a ajudar no que for preciso, e sua amizade.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular, IB, UNICAMP, pelos ensinamentos e pela contribuição em minha formação científica.

À Profa. Dra. Eunice Oba, por toda a atenção e por ter auxiliado nas dosagens hormonais.

Ao Departamento de Morfologia, IB, UNESP de Botucatu, por ter possibilitado a realização deste trabalho. E aos professores deste departamento por todos os ensinamentos ao longo desses anos.

Ao técnico do Laboratório de Embriologia, José Eduardo, por sempre estar pronto a ajudar, pela paciência e principalmente por sua amizade.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, pela colaboração.

À secretária do Departamento de Morfologia, Luciana, por toda sua colaboração e amizade.

Aos Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, Profa. Dra. Maria Júlia Marques e Profa. Dra. Laurecir Gomes por terem feito parte de minha banca de qualificação, me ajudando a crescer profissionalmente.

Às professoras Maria Christina Werneck Avellar, Eliana Milanesi Rúbio e Maeli Dal Pai Silva pela avaliação prévia deste trabalho, colaborando para o enriquecimento do mesmo. Obrigada!

Aos amigos do laboratório de Biologia da Reprodução e do Desenvolvimento, Ana Paula, Arielle, Azize, Camila, Daniela Fossato, Davi, Elaine, Fabíola, Glaura, Gustavo, Juliana, Marina, Raquel e Thaiane, pela amizade, colaboração e principalmente pelos momentos maravilhosos que passamos juntos. Em especial, agradeço a Arielle, Azize, Fabíola e Glaura pelo apoio incondicional nos momentos em que mais precisei. Valeu muito!

Aos amigos Gisleine, Rafael (Bolaça) e Sabrina pela amizade que compartilhamos ao longo desses anos.

À Jô, uma grande amiga que fiz em Botucatu.

A José Avialdo B. Correa, por toda atenção, dedicação e carinho.

Mesmo que minha memória tenha me traído, e eu tenha esquecido de alguém, agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida e que de alguma forma a transformaram, colaborando para minha formação pessoal ou profissional.

A todos...

... o meu muitíssimo obrigada!!!

"Plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!"

William Shakespeare

Sumário

Resumo.....	01
Abstract.....	03
Introdução.....	05
Justificativa e relevância da temática.....	16
Objetivos.....	16
Capítulo.....	16
Título.....	17
Resumo.....	18
Introdução.....	19
Material e Métodos.....	23
Resultados.....	31
Discussão.....	34
Referências bibliográficas.....	46
Legenda das figuras.....	62
Tabelas.....	63
Figuras.....	66
Conclusões finais.....	70
Referências bibliográficas da introdução.....	71

RESUMO

O epidídimo é um órgão do sistema reprodutor masculino, onde os espermatozóides passam pelo processo de maturação, adquirindo motilidade e capacidade fértil. O tempo de trânsito espermático pelo epidídimo (número de dias necessários para os espermatozóides serem transportados pelo órgão) parece ter um papel importante na maturação dos espermatozóides, e uma alteração desse tempo pode prejudicar o processo. Trabalhos da literatura mostram que a exposição de ratos machos a substâncias estrogênicas, como o dietilestilbestrol (DES), afeta o trato reprodutor masculino e provoca uma aceleração do tempo de trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo, comprometendo a fertilidade nestes animais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da alteração do tempo de trânsito dos espermatozóides no epidídimo sobre parâmetros espermáticos e fertilidade em ratos, bem como o papel da testosterona nestas alterações. Para tanto, dois modelos experimentais foram utilizados: o DES foi administrado para acelerar o tempo de trânsito espermático nos ratos, e a guanetidina, para retardá-lo, através da simpatectomia química na genitália interna masculina. Ratos machos adultos, da variedade Sprague-Dawley, foram divididos em quatro grupos experimentais: 1) tratado com injeções subcutâneas de dietilestilbestrol (DES), diluído em óleo de milho, na dose de 10µg/rato/dia, durante 12 dias; 2) tratado com injeções intraperitoneais de sulfato de guanetidina, dissolvido em solução salina, na dose de 6,25mg/kg/dia, por 12 dias; 3) mesmo tratamento do grupo 1, mais um suplemento androgênico, através de implantes de cápsulas siliconizadas e preenchidas com testosterona; 4) grupo controle, que recebeu as soluções veículo. O tratamento com guanetidina retardou o tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo, aumentando, assim as reservas de espermatozóides nessa região. Por outro lado, a exposição ao DES acelerou o trânsito espermático no epidídimo, diminuindo o número de espermatozóides na cabeça-corpo e na cauda, e reduziu a motilidade dos espermatozóides. Em ambos os casos, a produção espermática não foi alterada. A reposição de testosterona restaurou o tempo de trânsito espermático a valores próximos da normalidade,

uma vez que foram maiores que o do controle. A reposição de testosterona também corrigiu a alteração na motilidade dos espermatozóides. Os animais expostos ao DES apresentaram uma tendência de prejuízo da fertilidade após o procedimento de inseminação artificial *in utero*, utilizando espermatozóides colhidos da região proximal da cauda do epidídimo. Assim, concluiu-se que a aceleração do tempo de trânsito espermático no epidídimo pareceu prejudicar a maturação normal dos espermatozóides nos ratos, diminuindo a qualidade espermática e a capacidade fértil, de maneira andrógeno-dependente.

ABSTRACT

The epididymis is an organ of the male reproductive system where sperm undergoes the maturation process, acquiring motility and fertility capacity. The epididymal sperm transit time (number of days necessary for the sperm to be transported through the organ) seems to have an important role in sperm maturation, and it seems that an alteration of the duration of this transit can harm the process. Data from the literature show that the exposure of male rats to estrogenic substances, such as diethylstilbestrol (DES), affects the male reproductive system and provokes an acceleration of sperm transit in the epididymis, damaging the fertility of the animals. The aim of present work was to evaluate the influence of altered sperm transit time through the epididymis on sperm parameters and fertility of rats, as well as the role of testosterone in the alterations. For this, two experimental models were used: DES was administered to the rats to accelerate the sperm transit time, and guanethidine, to delay it, through a selective chemical sympathectomy of the male internal organs. Sprague-Dawley adult male rats were divided into four experimental groups: 1) treated with sc injections of DES, for 12 days, 10µg/rat/day, dissolved in corn oil; 2) treated with guanethidine sulfate via ip injections, for 12 days, at the dose of 6.25mg/kg/day, dissolved in saline solution; 3) same treatment as group 1, plus androgen supplementation, using testosterone-filled subcutaneous implants; 4) control animals received the vehicles. Guanethidine treatment delayed the sperm transit time through the epididymal cauda, provoking an increase in the sperm reserves in this region. On the other hand, exposure to DES accelerated the sperm transit time in the epididymis, decreasing the sperm density in both epididymal regions, the caput-corpus and cauda, and diminishing sperm motility. In both cases sperm production was not altered. Testosterone supplementation was able to restore the transit time to values close to normality, since they were higher than in the control rats. The same occurred in relation to sperm motility. Rats exposed to DES presented a trend toward lower fertility after *in utero* artificial insemination using

sperm collected from the proximal cauda epididymidis. Thus, it was concluded that the acceleration of sperm transit time seemed to harm the normal sperm maturation in the rat, decreasing sperm quality and fertility capacity, in an androgen-dependent way.

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais da morfologia e fisiologia do sistema reprodutor masculino do rato

Uma visão dos aspectos gerais da morfologia e fisiologia do sistema reprodutor masculino é importante na avaliação de possíveis distúrbios nesse sistema.

O sistema reprodutor masculino do rato, assim como na maioria dos mamíferos, é composto por testículos (gônadas), epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais e órgão copulador.

Os testículos podem ser, funcional e anatomicamente, divididos em duas partes: tecido intersticial e túbulos seminíferos, responsáveis pela esteroidogênese e pela espermatogênese, respectivamente (Rodriguez & Favaretto, 1999). Os túbulos seminíferos são constituídos pelo tecido peritubular e epitélio seminífero com as células de Sertoli e células germinativas (espermátogônias, espermátócitos e espermátides, em animais adultos). A espermatogênese é um processo elaborado pelo qual células-tronco espermatogoniais tornam-se células haplóides altamente diferenciadas, os espermatozóides (Clermont, 1972). O tecido intersticial fica entre os túbulos seminíferos e possui vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e as células intersticiais (células de Leydig), responsáveis pela produção de andrógenos, e fonte para uma variedade de outros esteróides (Russel, 1990).

O epidídimo dos mamíferos é um órgão formado por um ducto único e enovelado que liga os ductos eferentes ao ducto deferente (Cosentino & Cockett, 1986; Hermo & Robaire, 2002), sendo anatomicamente dividido em três regiões principais: cabeça (com o segmento inicial), corpo e cauda (Reid & Cleand, 1957; Cosentino & Cockett, 1986; Gatti et al., 2004; França et al., 2005; Glover, 1982). Nesse órgão, os espermatozóides vindos do testículo passam por um processo de maturação, tornando-se capazes de fertilizar um ovócito (Orgebin-Crist, 1969; Gatti et al., 2004; França et al., 2005).

A vesícula seminal consiste de um ducto único dilatado e enovelado. Este ducto é revestido por um epitélio pseudo-estratificado pregueado, constituído por

células epiteliais secretoras e células basais. A camada muscular lisa que reveste o órgão é constituída por duas lâminas: uma interna, de fibras circulares, e outra, de fibras longitudinais. A luz é ocupada pelo produto de secreção, de aspecto hialino (Hayward et al., 1996^a; 1996^b).

A próstata é formada por um conjunto de glândulas tubuloalveolares ramificadas, cujos ductos desembocam na uretra prostática. O epitélio é colunar simples, formado por células secretoras, basais e neuroendócrinas. Ela é envolta por uma cápsula fibroelástica rica em músculo liso, que envia septos para o interior da glândula. No homem, este órgão é compacto (alobular) apresentando três zonas: central, periférica e de transição. No rato, a próstata é dividida em quatro pares de lóbulos definidos como próstata anterior, dorsal, ventral e lateral (Roy-Burman et al., 2004).

Os produtos de secreção da vesícula seminal e próstata contribuem para a nutrição e suporte dos espermatozóides fora do trato genital masculino. As funções destas glândulas são dependentes de estímulo androgênico como a testosterona, que atua diretamente nos órgãos sexuais acessórios masculinos (Mann, 1974).

Os testículos, epidídimos e as glândulas sexuais acessórias são órgãos andrógeno-dependentes e qualquer tóxico que atue desordenando a interação coordenada do eixo hipotálamo – hipófise – gônada pode levar a anormalidades reprodutivas (Sokol, 1997).

1.2 Epidídimo

1.2.1 Aspectos gerais

O epidídimo faz parte do sistema de ductos extra-gonadais no trato reprodutor masculino de animais com fecundação interna (Cooper, 1998; Jones, 1999). Os ductos extra-gonadais estão envolvidos no transporte dos espermatozóides desde o testículo até o interior do corpo da fêmea, onde ocorre a fecundação (Jones, 1999). O significado biológico da presença de um elaborado sistema de ductos extra-gonadais não é tão óbvio nos machos, como nas fêmeas,

em que o complexo trato genital protege o gameta e o embrião. Nos machos, esse sistema de ductos tem que superar as exigências adicionais impostas aos espermatozóides para atingirem a fecundação interna, que requer que os gametas se locomovam até o local da fecundação, enquanto na fecundação externa, os gametas masculinos são liberados próximos aos femininos (Jones, 1999). Evolutivamente, o epidídimo se desenvolveu por usurpar os ductos do sistema urinário primitivo, com a finalidade de transportar o produto das células germinativas dos testículos para o exterior do organismo (Cooper, 1998).

O epidídimo deriva do ducto mesonéfrico primitivo (ducto de Wolf) do embrião (Brooks, 1983; Cooper, 1998; França et al., 2005). É formado por um ducto único e altamente enovelado (Cosentino & Cockett, 1986; Hermo & Robaire, 2002; França et al., 2005), cuja extensão varia de maneira espécie-específica, atingindo cerca de 2m no rato e 6m no homem, por exemplo (Brooks, 1983).

O epidídimo é geralmente dividido em cabeça, corpo e cauda (Reid & Cleand, 1957; Cosentino & Cockett, 1986; Gatti et al., 2004; França et al., 2005; Sullivan et al., 2005), sendo que a cabeça possui uma região inicial conhecida como segmento inicial, onde os dúctulos eferentes entram e cuja histologia é diferente de outras regiões (Glover, 1982) (Figura 1). Estas porções são subdivididas histologicamente em zonas que são designadas de acordo com a altura do epitélio e a distribuição e quantidade dos tipos celulares (Reid & Cleand, 1957). O epitélio pseudoestratificado ciliado possui seis tipos celulares: basais, principais, estreitas, halo, claras e apicais (Hermo & Robaire, 2002). Há uma camada de músculo liso que envolve esse epitélio epididimário, apresentando-se mais fina na região da cabeça e corpo e mais espessa na cauda. Essa camada muscular recebe a inervação de fibras adrenérgicas do sistema nervoso simpático (Setchell, 2002).

A função secretora e de reabsorção das células principais, juntamente com as junções oclusivas entre elas, garantem a manutenção do micro-ambiente intraluminal onde ocorre a maturação dos espermatozóides. O fluido epididimário contém componentes de baixo peso molecular (como íons inorgânicos, solutos

orgânicos, aminoácidos e pequenas proteínas, entre outros) e macromoléculas (enzimas líticas, glicosiltransferase e glicosidases, por exemplo), sendo que sua composição se altera ao longo do ducto (Cooper, 1998).

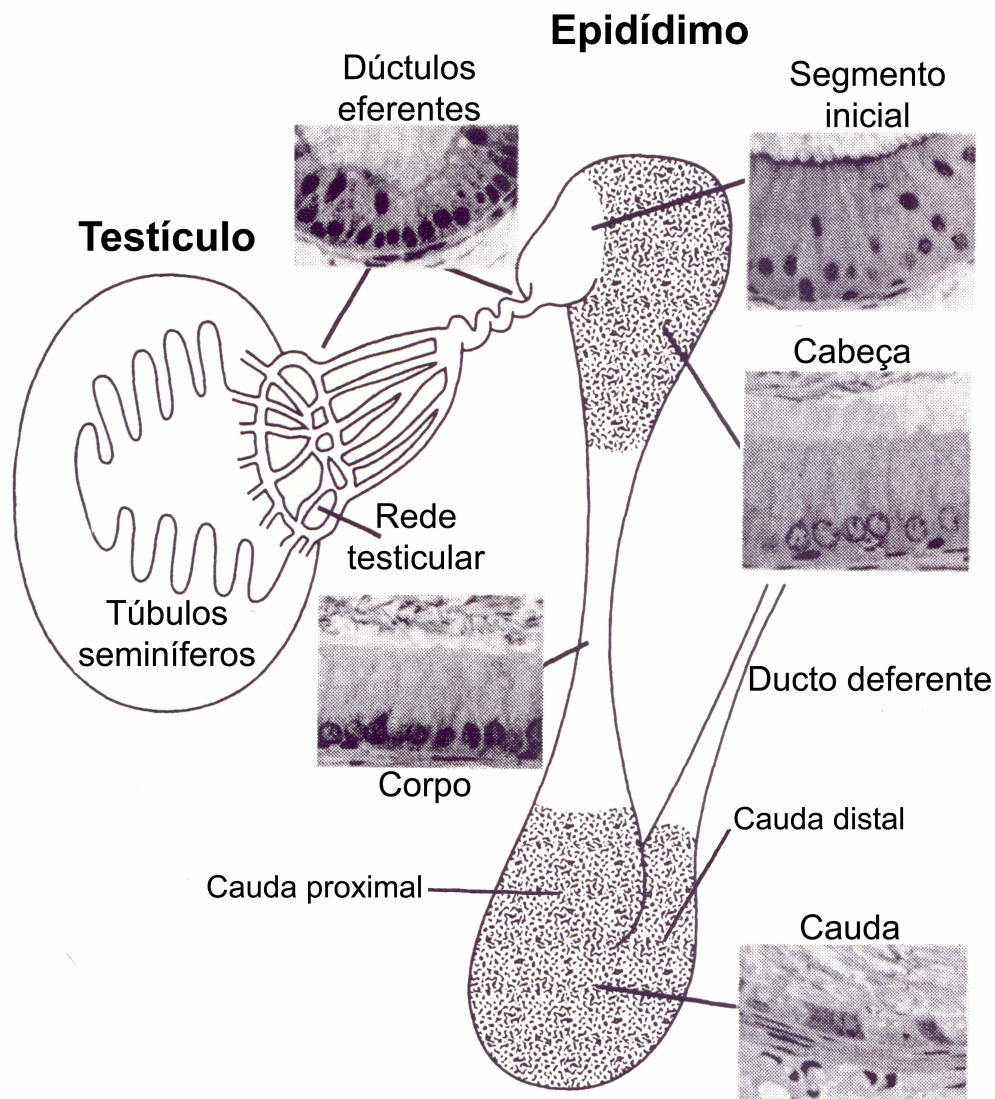


Figura 1: Sistema reprodutor masculino mostrando a rede testicular, os ductos eferentes, o epidídimo e o ducto deferente. [Adaptada de Klinefelter, G. R. & Hess, R. A. (1998) Toxicology of the male excurrent ducts and accessory sex glands. In: *Reproductive and Developmental Toxicology* (ed. K. S. Korach) p. 555, Marcel Dekker, New York].

1.2.2 Funções do epidídimo

A função primária do epidídimo é o transporte dos espermatozóides que chegam do testículo (Orgebin-Crist, 1969; Brooks, 1983). Além do transporte, o epidídimo é responsável pela estocagem, proteção, concentração e maturação dos gametas (Cosentino & Cockett, 1986; Hermo & Robaire, 2002).

➤ Transporte dos espermatozóides

O transporte dos espermatozóides através do epidídimo deve-se provavelmente à atividade contrátil da parede do ducto (Cosentino & Cockett, 1986), a qual é controlada pelo sistema nervoso autônomo, através da inervação adrenérgica, colinérgica e não-adrenérgica e não-colinérgica (Ricker et al., 1997), além da ação de angiotensinas, vasopressinas e ocitocinas presentes no sangue (Cooper, 1998). Nervos do sistema nervoso simpático emanam a partir do gânglio mesentérico inferior para inervar o epidídimo e o ducto deferente dos mamíferos (Ricker et al., 1996; Ricker, 1998; Setchell, 2002). Na cabeça e corpo do epidídimo, a inervação é mais escassa, ao passo que a cauda apresenta-se ricamente inervada por fibras do sistema nervoso simpático, as quais se mantêm presentes no ducto deferente (Kaleczyc et al., 1968; Ricker, 1998).

O tempo da passagem dos gametas pelo ducto epididimário é espécie-específico, atingindo de 3 a 15 dias dependendo da espécie (Cosentino & Cockett, 1986). No rato, o tempo de trânsito tem cerca de 8 dias (Amann et al., 1976; Robb et al., 1978; França et al., 2005). Durante o trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo ocorre a maturação espermática, assim, uma alteração no tempo da passagem dos gametas pelo ducto pode alterar o processo de maturação espermática. Dados da literatura mostram que o atraso no tempo de trânsito pelo epidídimo não altera a capacidade fértil dos gametas (Billups et al., 1991; Kempinas et al., 1998^{a,b}), por outro lado, quando o tempo de trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo é acelerado, pela exposição a agentes tóxicos, a fertilidade fica comprometida (Klinefelter & Suarez, 1997). Esse prejuízo na fertilidade dos gametas ocorre porque o tempo disponível para os processos

requeridos para a aquisição da capacidade fértil fica diminuído (Klinefelter, 2002). Uma alteração no tempo de trânsito espermático também altera a quantidade de gametas disponíveis para a ejaculação (Klinefelter, 2002).

➤ Maturação espermática

Quando os espermatozóides dos mamíferos saem do testículo, eles possuem uma morfologia altamente especializada, mas são imóveis e incapazes de fertilizar um ovócito (Brooks, 1983; Hermo & Robaire, 2002; Gatti et al., 2004). Durante a passagem pelo ducto epididimário os espermatozóides passam por um processo de maturação, em que muitas de suas características morfológicas, fisiológicas e biológicas são modificadas (Orgebin-Crist, 1969), conferindo aos gametas a capacidade de uma vigorosa motilidade e a habilidade para sofrer a reação acrossômica, interagir com a zona pelúcida, reconhecer e fundir-se com a membrana plasmática do ovócito (Jones, 1999; Cuasnicú et al., 2002; Gatti et al., 2004, Sullivan et al., 2005). Assim, o conceito de maturação espermática é definido pela aquisição da habilidade de fertilização pelos espermatozóides (Sullivan et al., 2005). A maturação espermática no epidídimo requer uma interação orquestrada entre a lâmina própria que envolve o epitélio epididimário, o próprio epitélio, o fluido luminal no interior do ducto epididimário e o gameta (Klinefelter, 2002).

Durante o trânsito pelo epidídimo, a principal alteração morfológica que ocorre no espermatozóide é a migração da gota citoplasmática, resquício de citoplasma associado ao espermatozóide (Cosentino & Cockett, 1986; Gatti et al., 2004). Durante a passagem entre a cabeça e o corpo do epidídimo, essa gota desliza, por um mecanismo ainda não conhecido, da base da cabeça até o fim da peça intermediária na cauda do espermatozóide. Dependendo da espécie, a gota citoplasmática se desprende do gameta ou dentro da cauda do epidídimo, ou durante/ após a ejaculação (Gatti et al., 2004). A migração da gota citoplasmática ocorre simultaneamente ao aumento da capacidade móvel dos espermatozóides,

mas nenhuma relação direta entre esses dois eventos ainda é conhecida (Gatti et al., 2004).

A capacidade para a motilidade progressiva é adquirida à medida que o espermatozóide passa pelo epidídimo. No testículo os espermatozóides apresentam apenas uma pequena vibração na cauda, já na cabeça do epidídimo, apresentam um movimento de natação circular e, apenas quando atingem a cauda os espermatozóides possuem um movimento progressivo (Brooks, 1983; Cosentino & Cockett, 1986). Os espermatozóides adquirem a capacidade de se locomoverem durante o trânsito pelo epidídimo, no entanto, dentro do órgão os gametas permanecem em um estado quiescente até o momento da ejaculação (Brooks, 1983), provavelmente devido a um fator de inibição de motilidade produzido pelo epidídimo (Cosentino & Cockett, 1986).

Da mesma forma que a capacidade para a motilidade, a habilidade de fertilização dos espermatozóides aumenta progressivamente à medida que passam pelo epidídimo. Assim, os gametas provenientes de regiões mais proximais do epidídimo possuem uma capacidade de fertilização menor do que aqueles vindos de regiões mais distais (Orgebin-Crist, 1969; Brooks, 1983; Cosentino & Cockett, 1986; Gatti et al., 2004).

A capacidade de reconhecimento e fusão com o ovócito envolve componentes e domínios específicos na superfície dos espermatozóides. Durante o processo espermatogênico, a membrana plasmática dos gametas é organizada em domínios, os quais são remodelados durante a passagem pelo epidídimo, através da degradação e/ou liberação de componentes testiculares e integração de componentes secretados pelo epitélio epididimário, além da ocorrência de eventos de glicosilação e deglicosilação (Gatti et al., 2004). Essas alterações na membrana do espermatozóide permitem a exposição dos receptores de superfície necessários para o reconhecimento espécie-específico entre o espermatozóide e o ovócito, possibilitando a fecundação (Brooks, 1983).

O processo de maturação no epidídimo, incluindo a síntese e secreção de proteínas epididimárias, é andrógeno-dependente (Orgebin-Crist et al., 1975),

mais especificamente, é a 5 α -diidrotestosterona (5 α -DHT) que regula a maturação espermática, através de sua ação no epidídimo (Orgebin-Crist & Jahad, 1978). A 5 α -DHT presente no epidídimo decorre da conversão da testosterona pela enzima 5 α -redutase, presente no epitélio epididimário (Brooks, 1983).

➤ Sustentação e proteção dos espermatozóides

Durante o trânsito pelo epidídimo, os espermatozóides têm acesso a oxigênio e a substratos, permanecendo viáveis dentro do órgão. Além disso, são protegidos do sistema imune pelas junções oclusivas que impedem a passagem de leucócitos e, por mecanismos de imunossupressão. Enzimas epididimárias protegem os gametas de danos causados por espécies reativas do oxigênio, que podem ser geradas nas gotas citoplasmáticas (Cooper, 1998). O epidídimo também promove a proteção dos antígenos da superfície dos espermatozóides do sistema imune da fêmea (Jones, 1999).

➤ Estocagem de espermatozóides

Os espermatozóides são estocados num estado quiescente na cauda do epidídimo, antes da ejaculação (Brooks, 1983; Cooper, 1998), permanecendo vivos por cerca de 15 dias (Sullivan et al., 2005), após os quais sofrem degeneração (Cooper, 1998). Os mecanismos de estocagem incluem a indução da quiescência metabólica e prevenção de ativação prematura dos espermatozóides (Cooper, 1998; Sullivan et al., 2005). O estoque de espermatozóides permite que haja um número suficiente de gametas no momento da ejaculação (Sullivan et al., 2005), além de permitir que a espermatogênese seja contínua (Jones, 1999). A cauda do epidídimo, além de estocar os espermatozóides, mistura gametas de várias idades, o que permite que eles estejam prontos para a fertilização, ou seja, que passem pela capacitação e reação acrossômica em momentos diferentes, após a entrada no trato feminino (Jones, 1999; Sullivan et al., 2005). Essa estratégia é muito importante para

animais de fecundação interna, principalmente naqueles em que a ovulação não é sincronizada com a cópula (Sullivan et al., 2005).

1.3 Ação de andrógenos no epidídimo

O desenvolvimento embrionário da genitália interna masculina, incluindo o epidídimo, é dependente de andrógeno, assim como a estrutura macro e microscópica do epidídimo e o potencial fértil dos espermatozóides em seu interior, no indivíduo adulto (Cooper, 1998). Os hormônios esteróides alcançam o epidídimo através da rede testicular e da corrente sanguínea (Brooks, 1983). A testosterona é o principal andrógeno presente no fluido da rede testicular, sendo carregada pela proteína ligadora de andrógeno (ABP) do testículo ao epidídimo (Brooks, 1983), onde é transformada em 5 α -diidrotestosterona (5 α -DHT) pela enzima 5 α -redutase (tipos 1 e 2) (Henderson & Robaire, 2005). Estudos *in vivo* e *in vitro* confirmaram que o andrógeno atuante no epidídimo, não é a testosterona, mas a diidrotestosterona (Henderson & Robaire, 2005).

Os andrógenos controlam a produção de compostos protéicos e não protéicos no epidídimo, assim, uma privação de testosterona causa alterações protéicas no epidídimo, pela perda do RNAm de algumas proteínas (Cooper, 1998). Os andrógenos também atuam no tempo de trânsito espermático, controlando a viscosidade do fluido luminal e a contratilidade do ducto epididimário para garantir que a taxa de trânsito dos gametas seja ideal (Sujarit & Pholpramool, 1985). Dessa forma, a falta desses hormônios aumenta a permanência dos gametas no epidídimo. Assim, tanto a maturação quanto a estocagem espermática são andrógeno-dependentes (Cooper, 1998).

1.4 Ação de substâncias tóxicas no epidídimo

Sabe-se que a saúde de um indivíduo é determinada pela relação entre dois fatores: o ambiente interno do corpo e o ambiente externo a ele. Assim, ar limpo, água potável e alimentos livres de toxinas são pré-requisitos para uma vida saudável (Bhatt, 2000). A contaminação do ambiente por substâncias químicas

provém principalmente da atividade agrícola e industrial, trazendo conseqüências na qualidade dos alimentos e sérios problemas à saúde humana (Bordjiba et al., 2001).

Há um aumento do interesse público a respeito da possibilidade do declínio na qualidade do sêmen humano devido a exposições a produtos químicos ambientais e a produtos farmacêuticos. Se pesquisas futuras confirmarem que este suposto declínio está de fato acontecendo, e a exposição a compostos químicos está relacionada à qualidade espermática, o epidídimo deve, certamente, ser considerado um possível órgão alvo (Klinefelter, 2002).

Estudos toxicológicos feitos através dos anos classificaram numerosos compostos químicos como agentes tóxicos ao epidídimo, baseados em alterações no número de espermatozóides e/ou alterações qualitativas, tais como motilidade e morfologia dos espermatozóides do epidídimo. Outros estudos também mostram a toxicidade epididimária baseados em alterações na histologia e/ou bioquímica do epidídimo. No entanto, há uma dificuldade em caracterizar o epidídimo como um órgão alvo independente, devido à complexidade de suas funções (Klinefelter, 2002).

1.5 Epidídimo e contracepção

Alguns estudos sobre contracepção masculina indicam a sensibilidade hormonal da função reprodutiva normal como um possível alvo para contraceptivos masculinos. Ewing (1977) mostrou que uma combinação de estradiol e testosterona provocou azoospermia em ratos, indicando uma ação contraceptiva dessa combinação de estrógeno e andrógeno. Saito et al. (2000) mostrou que a privação de testosterona e/ou FSH (hormônio folículo estimulante) prejudicou a espermição, sugerindo o processo de espermição como um possível alvo para a contracepção. Em ambos os casos o contraceptivo atingiria o testículo, impedindo a formação ou liberação dos espermatozóides.

O epidídimo é o órgão em que os espermatozóides adquirem a capacidade de fertilização, assim, se o processo de maturação espermática for alterado, a

capacidade espermática pode ser prejudicada. Nenhuma tentativa de induzir infertilidade através do epidídimo obteve sucesso: a aceleração do transporte dos gametas pelo órgão com o objetivo de reduzir o tempo de contato dos espermatozóides com as secreções epididimárias não induziu fertilidade, a alteração da atividade de enzimas do fluido luminal ou a alteração da concentração de compostos do fluido também não obteve sucesso (Cooper, 1998). A maioria das tentativas de contracepção pós-testicular bem sucedidas foi conseguida com o contraceptivo agindo no espermatozóide dentro do epidídimo, sem uma participação ativa do órgão (Cooper, 1998). Henderson & Robaire (2005) utilizando um inibidor duplo da 5 α -redutase (PNU 157706) mostraram que a falta de diidrotestosterona reduziu significativamente a fertilidade de ratos, sugerindo que o inibidor da 5 α -redutase pode ser um possível componente de um contraceptivo masculino.

Dessa forma, por ser o órgão onde ocorre a maturação espermática, o epidídimo é um alvo em potencial para estudos da contracepção masculina.

1.6 Modelos experimentais para a alteração do tempo de trânsito espermático

O dietilestilbestrol (DES) é um modelo de composto estrogênico (Toppari et al., 1996; Golden et al., 1999), não-esteroidal (Rao et al., 1993), que causa disfunções no sistema reprodutor masculino (Sharpe, 1993; Sultan et al., 1994; Toppari et al., 1996). O DES foi prescrito como suplemento estrogênico para prevenir abortos durante as décadas de 40 a 70, sendo seu uso suspenso após a observação de malformações congênitas e lesões neoplásicas no trato reprodutivo, relacionadas à exposição dos fetos *in utero* (Wilcox et al., 1995). O dietilestilbestrol também é utilizado como aditivo alimentar para promover crescimento em bovinos, mas torna-os inférteis e com disfunções reprodutivas (Rao et al., 1993). Em modelos laboratoriais, este estrógeno sintético provoca diminuição das reservas espermáticas no epidídimo, em ratos, após exposição neonatal (Goyal et al., 2003) ou adulta (Goyal et al., 2001).

A guanetidina é uma droga que destrói seletivamente os neurônios noradrenérgicos pós-ganglionares (Villanueva et al., 2003). Essa droga abole seletivamente a inervação simpática da genitália interna masculina (Lamano-Carvalho et al., 1996; Kempinas et al., 1998^{a,b}), provocando um aumento significativo das reservas de espermatozóides e do trânsito dos gametas no epidídimo (Billups et al., 1991^a; Kempinas et al., 1998^{a,b}).

2. Justificativa e relevância da temática

Apesar da importância do tema, a literatura científica carece de trabalhos específicos e detalhados sobre a influência da alteração do tempo de trânsito no epidídimo sobre o potencial fértil dos espermatozóides. Podem ser encontradas algumas informações fragmentadas sobre o assunto, por isso justifica-se a realização de um trabalho reunindo, num só estudo, dois modelos experimentais, para acelerar e retardar o trânsito espermático no epidídimo. O presente trabalho está inserido no campo da Biologia Epididimária, mas pode ser aplicado em outras áreas, tais como Andrologia, Reprodução Animal e Reprodução Assistida.

3. Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da alteração do tempo de trânsito (aceleração e retardo) dos espermatozóides no epidídimo sobre parâmetros espermáticos e fertilidade, usando o rato como modelo experimental. Pretendeu-se também avaliar o papel da testosterona nas alterações espermáticas encontradas.

4. Capítulo

Este trabalho deu origem ao artigo “O trânsito espermático no epidídimo e seu impacto na fertilidade do rato” que, depois de versado para o inglês, deverá ser submetido para o periódico “International Journal of Andrology”.

O trânsito espermático no epidídimo e seu impacto na fertilidade do rato

Carla Dal Bianco Fernandez¹, Elaine Manoela Porto¹, Arielle Cristina Arena¹ & Wilma De Grava Kempinas²

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Brasil.

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, Brasil.

Título curto: Tempo de trânsito epididimário e fertilidade.

Palavras chave: Epidídimo, tempo de trânsito espermático, fertilidade, dietilestilbestrol, guanetidina, inseminação artificial, rato.

RESUMO

O epidídimo é um órgão do sistema reprodutor masculino, onde os espermatozóides passam pelo processo de maturação, adquirindo motilidade e capacidade fértil. O tempo de trânsito espermático pelo epidídimo parece ter um papel importante na maturação dos espermatozóides. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da alteração do tempo de trânsito dos espermatozóides no epidídimo sobre parâmetros espermáticos e fertilidade em ratos, bem como o papel da testosterona. Ratos machos adultos, da variedade Sprague-Dawley, foram divididos em quatro grupos experimentais: 1) tratado com injeções subcutâneas de dietilestilbestrol (DES), 10µg/rato/dia, por 12 dias; 2) tratado com sulfato de guanetidina intraperitonealmente, na dose de 6,25mg/kg/dia, por 12 dias; 3) mesmo tratamento do grupo 1, mais um suplemento de testosterona; 4) grupo controle, que recebeu as soluções veículo. A guanetidina retardou o tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo, aumentando, assim, as reservas de espermatozóides nessa região. Os animais expostos ao DES apresentaram aceleração do trânsito espermático, com conseqüente redução do número de espermatozóides no epidídimo. Em ambos os casos, a produção espermática não foi alterada. A reposição de testosterona nos animais tratados com DES reverteu a aceleração do trânsito espermático, chegando a retardá-lo em relação ao controle. A exposição ao DES também diminuiu a motilidade dos espermatozóides, e a reposição de testosterona corrigiu essa alteração. Os animais tratados com DES apresentaram uma tendência de prejuízo da fertilidade, após o procedimento de

inseminação artificial *in utero*, apresentando uma redução no potencial de fertilidade e um aumento na taxa de perdas pré-implantação. Assim, concluiu-se que a aceleração do tempo de trânsito espermático no epidídimo pareceu prejudicar a maturação normal dos espermatozóides, diminuindo a qualidade espermática e levando a um prejuízo da capacidade fértil.

INTRODUÇÃO

O epidídimo é um órgão do sistema reprodutor masculino, formado por um ducto altamente enovelado que liga os ductulos eferentes ao ducto deferente (Hermo & Robaire, 2002; Sullivan et al., 2005), e desempenha uma variedade de funções, incluindo transporte, proteção, maturação, concentração e estocagem espermática (Hermo & Robaire, 2002; Rodríguez et al., 2002). Essas funções são favorecidas por um micro ambiente altamente especializado, criado no interior do ducto epididimário (França et al., 2005).

Os espermatozóides de mamíferos, ao deixarem os testículos, são células funcionalmente imaturas que necessitam de um processo de maturação, o qual ocorre durante a passagem através do epidídimo, para adquirirem capacidade de reconhecimento e fertilização de um ovócito (Hermo & Robaire, 2002; Olson et al., 2002; Cuasnicú et al., 2002). Durante o trânsito através do epidídimo, muitas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas dos espermatozóides são modificadas, como parte do processo de maturação (Orgebin-Crist, 1969), através de uma interação orquestrada entre a lâmina própria que circunda o epitélio do

ducto, o epitélio epididimário, os componentes do fluido luminal e os espermatozóides (Klinefelter, 2002; Toshimori, 2003).

As modificações envolvidas no amadurecimento dos gametas incluem a aquisição do potencial de motilidade, a migração distal e eventual perda da gota citoplasmática, e a aquisição da habilidade para sofrer a reação acrossômica, interagir com a zona pelúcida, ligar-se e fundir-se com a membrana plasmática do ovócito (Yanagimachi, 1994; Cuasnicú et al., 2002). Todas essas modificações necessitam de um tempo mínimo para ocorrerem, tempo em que os espermatozóides devem permanecer nas porções iniciais, cabeça e corpo, do epidídimo (França et al., 2005).

O tempo do trânsito espermático pelo epidídimo tem um papel importante na maturação dos espermatozóides. Assim, uma alteração nesse tempo pode acarretar problemas no amadurecimento dos espermatozóides, bem como alterar o número de gametas disponíveis para a ejaculação (Klinefelter, 2002).

Nos últimos anos, muitos químicos ambientais têm sido associados à diminuição do número de espermatozóides estocados na cauda do epidídimo, com pouca ou nenhuma redução da produção espermáticas (Klinefelter e Suarez, 1997; Goyal et al., 2001). Isso sugere que o epidídimo é alvo dessas substâncias tóxicas e que o trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo é acelerado por essa exposição (Klinefelter and Suarez, 1997). Com a aceleração do trânsito espermático, o tempo disponível para os processos necessários à maturação dos espermatozóides fica reduzido, o que pode comprometer o processo (Klinefelter,

2002). Dessa forma, a fertilidade dos espermatozóides, cujo tempo de trânsito através do epidídimo tiver sido alterado, pode estar também alterada. Meistrich et al. (1975) mostraram que a aplicação de estradiol em camundongos revelou uma diminuição no tempo de trânsito espermático, resultando na passagem de espermatozóides imaturos e na total esterilidade.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da alteração do tempo de trânsito dos espermatozóides (aceleração e retardo) no epidídimo, sobre parâmetros espermáticos e fertilidade em ratos. Para isso, dois modelos experimentais, já usados em nosso laboratório, foram escolhidos por mostrarem-se eficazes em alterar o tempo de trânsito espermático, sem, no entanto, alterarem a produção de espermatozóides.

A guanetidina é uma droga que destrói seletivamente os neurônios noradrenérgicos pós-ganglionares, (Villanueva et al., 2003). Essa droga abole seletivamente a inervação simpática da genitália interna masculina (Lamano-Carvalho et al., 1996; Kempinas et al., 1998^{a,b}), provocando um aumento significativo das reservas de espermatozóides e do trânsito dos gametas no epidídimo (Billups et al., 1991; Kempinas et al., 1998^{a,b}).

O dietilestilbestrol (DES) é um modelo de composto estrogênico (Toppari et al., 1996; Golden et al., 1999), que causa disfunções no sistema reprodutor masculino (Sharpe, 1993; Sultan et al., 1994; Toppari et al., 1996). Este estrógeno sintético provoca diminuição das reservas espermáticas no epidídimo, em ratos, após exposição neonatal (Goyal et al., 2003) ou adulta (Goyal et al., 2001). Em

experimentos prévios de nosso laboratório, observamos que o DES também causa aceleração do tempo de trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo (Porto et al., 2003). Além dessas alterações, o DES provoca redução da concentração de testosterona plasmática (Goyal et al., 2001). Assim, no presente trabalho, um grupo de animais expostos ao DES recebeu, concomitantemente, reposição de testosterona, através de cápsulas siliconizadas implantadas subdermicamente (Ewing et al., 1977).

A reposição da testosterona teve por objetivo excluir os problemas causados pela redução dos níveis do hormônio, visto que o epidídimo é um órgão andrógeno-dependente (Dyson & Orgebin-Crist, 1973; Brooks, 1978; Orgebin-Crist & Jahad, 1978; Henderson & Robaire, 2005). No entanto, Meistrich et al. (1975), observou redução no tempo de trânsito espermático pelo epidídimo, em camundongos tratados com estradiol, mesmo quando houve aplicação concomitante de testosterona. Da mesma forma, Rao et al. (1993), observaram que a reposição de testosterona não reverteu todos os problemas causados pela exposição ao DES.

Após alterar o tempo de trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo, foi avaliada a qualidade dos gametas, testando sua fertilidade com o uso da técnica de inseminação artificial *in utero*. Além disso, procedeu-se à análise do perfil protéico das proteínas da membrana espermática, pelo processo de eletroforese bi-dimensional.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Ratos machos adultos (n = 80, 90 dias de idade) e fêmeas (n = 50, 60 dias de idade) da variedade Sprague – Dawley (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - CEMIB, Unicamp) foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Unesp, em gaiolas de polipropileno (40x30x15 cm), com substrato de maravalha, em condições controladas de temperatura (média de 23°C) e luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro,) e acesso livre a água e comida. Os animais foram aclimatados ao ambiente por um período mínimo de uma semana antes do início dos experimentos. Os animais usados neste estudo foram mantidos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

Grupos experimentais

Os ratos machos foram divididos em 4 grupos experimentais, sendo de 12 dias o período de tratamento: 1) os ratos receberam injeções subcutâneas de DES (Sigma Chemical CO., St. Louis, Mo.), diariamente, na dose de 10µg, diluídos em 0,2 mL de óleo de milho; 2) os ratos foram tratados com sulfato de guanetidina (Sigma Chemical CO., St. Louis, Mo.), na dose de 6,25 mg/Kg/dia, intraperitonealmente, na proporção de 1 mL/Kg, diluído em solução fisiológica; 3) os ratos foram tratados segundo o modelo descrito para o grupo 1, e receberam

no espaço subescapular (Ewing et al., 1977), um implante de uma cápsula siliconizada (Silastic capsule), medindo 2,5 cm, preenchida por testosterona (cuja taxa de liberação é de, aproximadamente, 30 µg/cm dia); 4) os ratos receberam, consecutivamente, injeções subcutâneas de óleo de milho e intraperitoneal de solução fisiológica, segundo mesmo protocolo experimental. As doses escolhidas tanto para o DES, quanto para a guanetidina, foram baseadas nos trabalhos de Goyal et al. (2001) e Kempinas et al. (1998^a), respectivamente.

Experimento 1: dosagem hormonal, parâmetros espermáticos, análise histopatológica e análise das proteínas espermáticas

Coleta dos materiais

Ao final do tratamento, 12 animais por grupo foram pesados, anestesiados com éter etílico e mortos por decapitação. O sangue dos animais foi coletado, à partir dos vasos cervicais rompidos pela decapitação. Os testículos e epidídimos direitos de 7 desses animais, foram retirados, pesados e congelados a -20°C para posterior determinação da concentração de células germinativas. Os testículos esquerdos foram coletados, limpos e processados para análise histopatológica. Os testículos e epidídimos dos 5 animais restantes por grupo, foram removidos, limpos e congelados a -80°C pra posterior análise das proteínas espermáticas por eletroforese bi-dimensional.

Dosagens hormonais

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500rpm por 20 minutos a 4°C, para separação do plasma, o qual foi congelado a -20°C até o momento das dosagens hormonais. Os níveis de testosterona plasmática foram determinados pela técnica de radioimunoensaio de duplo-anticorpo, utilizando-se o Kit Coat-A-Count Total Testosterone (DPC, Los Angeles, CA, USA). As variações intra-análise e inter-análise foram de 1,75% e 20%, respectivamente.

Peso corporal e dos órgãos reprodutivos

Os testículos e epidídimos direitos foram retirados e pesados, antes de serem congelados para determinação da concentração de células germinativas. O ducto deferente, a próstata ventral e a vesícula seminal (cheia e sem a glândula coaguladora) foram coletados para determinação do peso e posteriormente descartados.

Contagens espermáticas e determinação do tempo de trânsito epididimário

Espermátides resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermiogênese) no testículo, e espermatozóides das porções cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram contados em câmaras de Neubauer (4 campos por animal), após homogeneização dos órgãos (homogeneizador Ultra-Turrax – Janke & Kunckel IkaWerk) em mistura de 0,9% de NaCl, 0,05% de triton x 100 e 0,01% de Thimerosal (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), segundo método descrito previamente (Robb et al, 1978). Para determinação da produção diária de

espermatozóides (PDE), o número de espermatozóides por testículo foi dividido por 6,1, que é o número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero. Para o cálculo do tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo ou cauda do epidídimo, dividiu-se o número de espermatozóides, em cada porção, pela PDE.

Análise histopatológica

Testículo e epidídimo foram coletados e imersos em mistura fixadora de Alfac (85% álcool, 10% formaldeído e 5% ácido acético). Do testículo foi retirado um disco equatorial; a cabeça e a cauda do epidídimo foram separadas e cortadas longitudinalmente. As peças foram incluídas em parafina e seccionadas a 7µm. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE).

Análise das proteínas de membrana espermáticas

A técnica utilizada para a extração das proteínas de membrana espermáticas foi realizada conforme descrito previamente (Klinefelter et al, 1997; Kempinas et al 1998^a), com adaptações. Resumidamente, as caudas epididimárias foram perfuradas em sua região proximal, em 2mL de tampão fosfato salina (PBS), permitindo a difusão dos espermatozóides para o meio. Esse meio com espermatozóides foi lavado e centrifugado (1000 rpm, 15 min, 4 °C) por duas vezes com tampão fosfato-salina e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila - 1µl/ml). A extração das proteínas ocorreu por 1 hora, em temperatura ambiente, na

presença de 1 mL de n-octyl-β-glucopyranoside (OBG) 80 mM em tris 10mM, pH 7,2 e PMSF (1μl/ml). Após mais uma centrifugação (3000 rpm, 10 mim, 4°C), o sobrenadante foi removido. O extrato foi concentrado por 2 centrifugações (3000 rpm, 30 mim, 4°C) em unidades Amicom Ultra-4, usando-se solução tampão de Tris 1 mM. A determinação da concentração protéica foi feita utilizando-se o reagente corante concentrado BioAgency, baseado no método de Bradford. Um volume equivalente a 50μg de proteínas foi retirado da amostra e liofilizado.

A técnica utilizada no procedimento de eletroforese bi-dimensional está descrita, em detalhes, no manual “2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: principles & methods” fornecido pela Amersham Pharmacia Biotech (1998). Em resumo, a amostra liofilizada foi diluída, em temperatura ambiente por 1 hora, em 125μL da solução de reidratação (3,806g thio-uréia, 10,51 g urea, 1,0 g CHAPS, 50 μL bromophenol blue para 25mL, antes de usar adicionar 5 μl/mL de pharmalyte e 2,8 mg/mL de DTT). Iniciou-se, então o processo de isoeletrofocalização (8000 V, 2:40hr - Ethan IPGphor Isoelectric Focusing System, Amersham Pharmacia) em tiras de gel desidratado (gel de acrilamida, 7 cm; pH 4-7; ImmobilineTM DryStrip – GE Healthcare, ref: 17-6001-10).

Ao final deste processo, foi realizada a separação dos pesos moleculares em mini géis de acrilamida a 12,5% (250 V, 1:30 hr - Hoefer miniVE, Amersham Pharmacia). Os géis foram corados com prata (PlusOne Silver Staining kit, Protein – GE Healthcare). As imagens dos géis foram analisadas pelo sistema Image Master 2-D Elite v.4.1 (Amersham Pharmacia).

Experimento 2: inseminação artificial *in utero*

O procedimento de inseminação artificial foi o mesmo descrito previamente (Klinefelter et al, 1994; Kempinas et al, 1998^b). Resumidamente, foram selecionadas fêmeas (n = 50) em pró-estro natural, as quais foram sexualmente estimuladas, durante uma hora, por machos vasectomizados, obtidos pela ligação e interrupção dos ductos deferentes. O pareamento com ratos vasectomizados promove as condições ideais para o transporte dos espermatozóides no interior do trato genital feminino, a fecundação e, finalmente a implantação e o desenvolvimento do conceito (Klinefelter et al., 1994; Kempinas et al, 1998^b).

Os espermatozóides utilizados para a inseminação, foram obtidos a partir da cauda epididimária esquerda dos animais (8 por grupo). Conforme descrito previamente (Klinefelter et al, 1994; Kempinas et al, 1998^b), a cauda foi perfurada por uma lâmina de bisturi nº 10, em sua região proximal, permitindo a difusão dos espermatozóides no meio (2 mL de PBS estéril - solução fosfato salina, adicionado de BSA - soro de albumina bovina, a 34 °C). A placa com o meio foi levemente agitada e colocada em uma incubadora (B.O.D MA 415) a 34 °C. Após dispersão, uma alíquota do meio com espermatozóides foi diluída (1:10) em formol-salina a 10% procedendo-se então a contagem dos espermatozóides em câmara de Neubauer, para cálculo do volume necessário para se inseminar cada corno uterino com 5×10^6 espermatozóides. Foi inseminada uma fêmea por macho.

No procedimento cirúrgico para a inseminação, as fêmeas foram anestesiadas pela inalação de éter etílico e tiveram a bifurcação dos cornos

uterinos exposta através de uma profunda incisão médio-ventral. Um fórceps curvo foi utilizado para elevar cada corno em que os espermatozóides foram injetados. O local de cada injeção foi cauterizado após a retirada da agulha. Ao final do procedimento, os cornos uterinos foram recolocados na cavidade abdominal, e a incisão foi suturada. As fêmeas foram mortas no 20º dia após a inseminação para avaliação da fertilidade.

Avaliação da fertilidade

As fêmeas, inseminadas artificialmente, foram mortas no 20º dia de gestação para coleta dos ovários e do útero e registro dos números de corpos lúteos e de sítios de implantações. Posteriormente determinou-se o potencial de fertilidade (sítios de implantação/ corpos lúteos x 100); a taxa de gestação (n° de fêmeas prenhes/ n° de fêmeas inseminadas x 100); taxa de perdas pré-implantação (n° de corpos lúteos – n° de implantações/ n° de corpos lúteos x 100); e taxa de perdas pós-implantação (n° . de implantações – n° . de fetos vivos/ n° de implantações x 100).

Motilidade espermática

Os espermatozóides utilizados para avaliação da motilidade foram retirados do meio usado para inseminação artificial *in utero*. Para tal estudo, uma alíquota de 2,5µL do meio contendo espermatozóides da cauda epididimária foi

imediatamente transferida para uma câmara de Neubauer previamente mantida a 34°C. Utilizando microscópio de luz com contraste de fase (aumento final de 200X), contou-se 200 espermatozóides aleatoriamente, classificando-os em móveis e imóveis e, então calculou-se a porcentagem de cada tipo.

Morfologia espermática

Para a avaliação da morfologia foram utilizados os espermatozóides colhidos da cauda proximal do epidídimo durante o procedimento da inseminação artificial. Os espermatozóides foram fixados em formol-salina a 10%. Pequenas quantidades das amostras foram transferidas para lâminas histológicas e analisados em microscópio de luz, com contraste de fase (aumento final de 200 vezes). Foram avaliados 200 espermatozóides por animal e as anormalidades encontradas foram classificadas em duas categorias: a) anormalidades da cabeça (sem curvatura característica, em forma de alfinete ou isolada); e b) anormalidades da cauda (enrolada, quebrada, dobrada ou isolada).

Análise estatística

Para a comparação dos resultados entre os grupos foram utilizados, dependendo da distribuição dos dados, a Análise de Variância, com teste “a posteriori” de Dunnett, ou o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1

Os animais tratados com DES apresentaram redução significativa no peso corporal final, peso absoluto dos testículos e nos pesos absoluto e relativo do epidídimo, próstata, vesícula seminal e ducto deferente, quando comparados aos animais controles. A reposição de testosterona em animais expostos ao DES, não reverteu a redução do peso corporal e do peso dos testículos. Ao contrário, o peso absoluto da vesícula seminal e pesos relativos do epidídimo, próstata e vesícula seminal, aumentaram em relação ao grupo controle. Os animais tratados com sulfato de guanetidina, quando comparados ao grupo controle, mostraram um aumento estatisticamente significativo nos pesos absoluto do epidídimo, vesícula seminal e ducto deferente, assim como nos pesos relativo do epidídimo e da vesícula seminal (tabela 1).

A concentração de testosterona plasmática foi significativamente reduzida nos animais expostos ao DES, quando comparados ao grupo controle. A presença dos implantes subdérmicos de testosterona exógena nos animais tratados com DES, elevou a concentração plasmática do hormônio a níveis próximos aos normais. Da mesma forma, os níveis hormonais dos animais tratados com guanetidina foi semelhante aos do grupo controle (figura1).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao número de espermátides maduras nos testículos e à produção espermática diária. Entretanto, na porção cabeça-corpo do epidídimo, o número

de espermatozóides foi significativamente reduzido no grupo tratado com DES, quando comparado ao grupo controle (tabela 2).

Na cauda do epidídimo, enquanto o DES provocou diminuição das reservas espermáticas, a guanetidina provocou aumento significativo do número de espermatozóides. Nos animais que receberam implante de testosterona, o resultado foi semelhante ao grupo controle (tabela 2). Com relação ao tempo de trânsito espermático, houve uma redução estatisticamente significativa (aceleração), nas regiões da cabeça-corpo e cauda dos animais tratados com DES, quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, nos ratos tratados com guanetidina e naqueles tratados com DES, que receberam implante de testosterona, houve um aumento do número de dias necessários para o transporte dos espermatozóides pela cauda (figura 2).

A análise histológica, em microscopia óptica, revelou alterações importantes, tais como a retenção de espermátides alongadas próximas à lâmina basal de túbulos nos estágios IX ao XII, e a degeneração de espermatócitos primários nos estágios VII e VIII do ciclo do epitélio germinativo, nos ratos tratados com DES e DES + testosterona, as quais não foram encontradas nos testículos dos ratos controles e tratados com guanetidina (figura 3). No interstício, a aparência das células de Leydig foi normal nos quatro grupos experimentais. Não foram observadas alterações morfológicas no epitélio e luz do ducto epididimário, bem como no interstício ductular, que pudessem ser atribuídas à administração de qualquer um dos tratamentos.

A análise quantitativa de proteínas espermáticas, dos espermatozóides provenientes da região proximal da cauda do epidídimo, através de eletroforese bi-dimensional, não revelou diferenças no perfil protéico dos grupos tratados com DES, guanetidina e DES + testosterona quando comparados ao grupo controle (Figura 4).

Experimento 2

Após a inseminação artificial *in utero*, o potencial de fertilidade foi estatisticamente reduzido nos animais tratados com DES, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa, mostrando uma tendência de prejuízo na fertilidade dos animais que tiveram o trânsito espermático pelo epidídimo acelerado. Da mesma forma, o aumento da taxa de perdas pré-implantação neste mesmo grupo experimental, não foi estatisticamente significativo (tabela 3). A fertilidade dos animais dos outros grupos experimentais foi semelhante à do grupo controle.

Os ratos tratados com DES apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa na motilidade espermática quando comparados aos do grupo controle, o que não foi visto nos outros grupos experimentais (tabela 2). Com relação à morfologia dos espermatozóides, a porcentagem de espermatozóides normais foi semelhante entre os grupos experimentais (tabela 2), sendo que entre as poucas anormalidades observadas, houve maior incidência de caudas dobradas e cabeça isolada. No entanto, estas alterações foram encontradas em todos os grupos

experimentais. Em relação à posição da gota citoplasmática foi verificado que em todos os grupos experimentais a gota citoplasmática estava presente na maioria dos espermatozóides, localizada na região mediana da cauda.

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da alteração do tempo de trânsito (aceleração e retardo) dos espermatozóides no epidídimo sobre parâmetros espermáticos e fertilidade. Além disso, pretendeu-se avaliar o papel da testosterona nas possíveis alterações encontradas. Apesar da importância do tema, a literatura científica carece de trabalhos específicos e detalhados sobre o assunto.

A análise do peso corporal fornece uma informação importante sobre a toxicidade geral de um composto e as suas possíveis implicações na saúde do organismo. Os animais tratados com sulfato de guanetidina mantiveram o peso corporal, ao final do tratamento, semelhante ao do grupo controle, indicando que não houve comprometimento sistêmico nesses animais. Da mesma forma, Kempinas et al. (1998^{a,b}) não relataram alterações no peso corpóreo de ratos adultos Sprague-Dawley tratados com 6,25 mg/kg, no entanto, quando as doses foram duas e quatro vezes maiores, o peso corpóreo foi reduzido significativamente (Kempinas et al., 1998^a), provavelmente porque essas doses desencadearam um efeito mais sistêmico do que específico sobre a genitália interna masculina.

A redução no peso corporal dos animais expostos ao DES é, provavelmente, devida ao efeito estrogênico da droga, visto que prejuízos no crescimento, relacionados à diminuição ou ausência de ganho de peso corporal, é considerado um indicador sensível de efeitos estrogênicos e tem sido utilizado como uma medida da potência do estrógeno (Heywood & Wadsworth, 1980; Hart, 1990).

A determinação dos pesos absolutos e relativos de órgãos como testículos, epidídimos, hipófise, vesícula seminal e próstata, são parâmetros úteis na avaliação de riscos de efeitos tóxicos sobre o aparelho reprodutor masculino (Clegg et al., 2001). A redução dos pesos dos órgãos reprodutores nos animais tratados com DES já havia sido demonstrada previamente em trabalho de nosso laboratório, ao tratar ratos Wistar com DES (Porto et al., 2003). O mesmo é relatado em vários trabalhos da literatura que utilizam substâncias estrogênicas (Goyal et al., 2001; Oishi, 2002). A diminuição do peso de órgãos como epidídimos, vesícula seminal e próstata nos animais tratados com DES pode estar relacionada à diminuição dos níveis plasmáticos de testosterona, visto que estes, são órgãos andrógeno-dependentes. Esta redução no peso também pode estar relacionada com a diminuição do número de espermatídes e espermatozóides, nos casos do testículo e epidídimo, respectivamente. A reposição de testosterona nos animais tratados com DES não foi capaz de reverter o efeito sobre o peso do testículo, porém normalizou o peso do epidídimo, próstata e vesícula seminal, mostrando que os implantes subdérmicos de cápsulas siliconizadas contendo testosterona foram eficientes na manutenção dos níveis plasmáticos de testosterona e dos pesos das glândulas sexuais acessórias dos animais, como já

havia sido relatado em coelhos castrados (Moon & Bunguer, 1968).

Nos animais tratados com sulfato de guanetidina, o aumento observado nos pesos do epidídimo, vesícula seminal e ducto deferente, deve ter sido devido a desnervação simpática que ocorreu nesses animais. Esses resultados corroboram dados da literatura que também relatam um aumento significativo nos pesos da vesícula seminal, epidídimo e ducto deferente logo após desnervação simpática, pela retenção de fluido e de espermatozóides, respectivamente (Lamano-Carvalho et al., 1990, 1993^{a,b}; Kempinas et al., 1998^{a,b}). O epidídimo é um órgão ricamente innervado por fibras do sistema nervoso simpático, que aumentam em direção à região da cauda, e continuam presentes no canal deferente (Ricker, 1998), assim, a desnervação do sistema reprodutor masculino causada pela guanetidina, afeta a contratilidade desses órgãos, levando ao acúmulo de espermatozóides. Da mesma forma, essa desnervação gera uma dilatação na vesícula seminal, refletindo distúrbios na contratilidade e conseqüente acúmulo e retenção de fluido em seu interior (Hodson, 1964, 1965; Evans et al., 1972, 1979; Lamano-Carvalho et al., 1990, 1993^b).

A significativa redução na concentração plasmática da testosterona nos animais tratados com DES já havia sido relatada por Goyal et al. (2001). Evidências indicam que esta redução ocorra devido a uma retroalimentação negativa feita pelo DES na hipófise anterior. Compostos com atividade estrogênica podem, através de feedback negativo, regular a secreção de gonadotrofinas, interferindo no balanço normal do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, alterando a secreção normal de testosterona pelos testículos. Entretanto, Goyal et al. (2001)

mostraram que os níveis plasmáticos de LH, nos animais tratados com DES, são próximos aos valores encontrados nos animais controles, apesar da significativa redução dos níveis androgênicos daqueles mesmos animais. Portanto, o DES parece agir diretamente sobre as células de Leydig.

As cápsulas de testosterona implantadas em animais tratados com DES mantiveram níveis plasmáticos do androgênio semelhantes aos do grupo controle, como já havia sido descrito (Moon & Bonge, 1968). Nos animais tratados com guanetidina, as concentrações de testosterona plasmática foram semelhantes ao grupo controle, corroborando dados da literatura tanto em ratos Sprague-Dawley (Kempinas et al. 1998a), quanto em ratos Wistar (Lamano-Carvalho et al., 1996; Cosentino et al., 1984; Billups et al., 1991).

O número de espermátides presentes nos testículos, assim como o total de espermatozóides produzidos diariamente, são importantes indicativos do potencial de fertilidade masculina. Os animais simpatectomizados quimicamente com guanetidina não apresentaram alterações na produção espermática diária (PDE). Estudos prévios já haviam mostrado que a simpatectomia tanto química (Kempinas et al., 1998^a), quanto cirúrgica, através da remoção do gânglio mesentérico inferior (Billups et al., 1991), não alterou a produção de espermatozóides. Os animais expostos ao DES, com ou sem reposição de testosterona, também não apresentaram alterações na PDE no testículo. Da mesma forma, Goyal et al. (2001), tratando ratos adultos Sprague-Dawley com 10µg DES, durante 12 dias, também não encontraram alterações no número de

espermátides e PDE nos testículos dos animais expostos ao estrógeno. Contrariamente, o mesmo tratamento feito em animais logo após o nascimento, resultou em uma redução significativa na PDE destes animais na idade adulta (Sharpe et al., 1998; O'donnel et al., 2001; Goyal et al., 2003).

O aumento do número de espermatozóides e do tempo de trânsito dos gametas observado na cauda epididimária, e a ausência de alterações na porção cabeça-corpo pode ser explicada, pelo menos em parte, devido a diferenças no padrão de inervação simpática, que é mais escassa nas regiões mais proximais do epidídimo (cabeça-corpo), ao passo que a região mais distal (cauda) é ricamente innervada por fibras simpáticas (Kaleczyc et al., 1968). Os resultados relatados por Kempinas et al. (1998^{a,b}), também com ratos Sprague-Dawley, corroboram os resultados do presente trabalho.

A diminuição das reservas espermáticas no epidídimo dos animais expostos ao DES pode estar associada à aceleração do tempo de trânsito dos espermatozóides, em ambas as regiões do órgão. A aceleração do trânsito espermático associada a uma diminuição das reservas epididimárias também foi descrita por Goyal et al. (2001) após expor ratos Wistar adultos ao DES. Da mesma forma, Oishi (2002) tratando animais com propilparabeno, composto utilizado como conservante de alimentos e cosméticos, com conhecida atividade estrogênica, relatou uma redução dose-dependente das reservas espermáticas na cauda epididimária. A rápida passagem dos espermatozóides pela região da cabeça-corpo do epidídimo promove uma mínima exposição dos espermatozóides ao micro ambiente epididimário que está normalmente associado aos processos

de maturação pós-testiculares (Bedford, 1966, 1967).

A reposição de testosterona nos animais expostos ao DES normalizou as reservas espermáticas, tanto na porção cabeça-corpo, quanto na cauda do epidídimo. O mesmo aconteceu com o tempo de trânsito nessa região, por outro lado, a reposição de testosterona retardou o trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo.

A retenção de espermátides alongadas próximas à lâmina basal, e a degeneração dos espermatócitos primários, vistas nos animais expostos ao DES, também foram observadas por Goyal et al. (2001), após tratamento com o mesmo composto. O aspecto do citoplasma e a fragmentação nuclear sugerem a ocorrência de apoptose nos espermatócitos primários, porém somente a utilização de técnicas específicas poderia confirmar. Em nosso laboratório, a utilização da técnica de TUNEL revelou a ocorrência de apoptose dos espermatócitos primários de ratos Wistar tratados com DES (dados não publicados). Estas alterações estágio-específicas também foram relatadas por outros autores em ratos com depleção androgênica (Russell & Clermont, 1977; Bartlett et al., 1986; Kerr et al., 1993).

É interessante salientar que mesmo com os níveis plasmáticos de testosterona normais, os problemas no epitélio germinativos permaneceram. Ewing et al. (1973) relataram um prejuízo na espermatogênese de coelhos castrados que receberam implantes de testosterona, sem que houvesse alteração dos níveis plasmáticos do hormônio ou outras funções andrógeno-dependentes. Em outro trabalho, a azoospermia observada em ratos adultos que receberam

implantes de uma cápsula de testosterona e outra de estradiol, aconteceu com os níveis plasmáticos dos dois hormônios semelhantes aos dos animais controles. No entanto, uma avaliação *in vivo* desses animais revelou que a concentração de testosterona no interior dos túbulos seminíferos, dos animais que receberam os implantes, estava reduzida, provavelmente devido a uma inibição da produção de testosterona pelas células de Leydig (Ewing et al., 1977). Isso mostra que os implantes são capazes de manter os níveis plasmáticos da testosterona próximos ao fisiológico, mas não de manter uma alta concentração do hormônio no interior dos túbulos seminíferos, o que é essencial para o processo espermatogênico.

Saito et al. (2000) observaram um grande número de espermátides retidas nos túbulos seminíferos de animais com supressão androgênica, e esta retenção foi maior quando houve diminuição concomitante dos níveis de testosterona e FSH, do que quando há uma diminuição individual destes hormônios. Assim, esses autores concluíram que a espermição é altamente sensível à supressão hormonal, e que ocorre atuação sinérgica da testosterona e do FSH neste processo.

No epidídimo não foram observadas alterações morfológicas ao microscópio óptico, nem no epitélio do ducto, nem no interstício de nenhum dos grupos experimentais, quando comparados ao controle. Kempinas et al. (1998b), tratando ratos Sprague-Dawley com guanetidina não observaram diferenças histológicas no epidídimo destes animais, quando comparados ao grupo controle. Ao contrário, Nagao et al. (1999) observaram restos celulares na luz do ducto epididimário em ratos machos adultos, após tratamento neonatal com benzoato de estradiol.

As proteínas epididimárias desempenham um importante papel na maturação dos espermatozóides (Mathur et al., 2000), o que é necessário para que os gametas adquiram motilidade (Gatti et al., 2004) e capacidade fértil (França et al., 2005, Gatti et al., 2004). A síntese de algumas dessas proteínas é andrógeno-dependente (Brooks, 1983). O uso de compostos que alteram a produção ou a funcionalidade dessas proteínas pode causar sérios problemas reprodutivos ao indivíduo. Dessa forma, o estudo do perfil protéico dos espermatozóides de indivíduos expostos a químicos ambientais é uma ferramenta importante na toxicologia atual para avaliação dessas alterações reprodutivas. No presente trabalho a análise das proteínas espermáticas dos espermatozóides presentes na região proximal da cauda epididimária, através da técnica de eletroforese bi-dimensional, não revelou alterações nos perfis protéicos entre os grupos experimentais.

Kempinas et al. (1998^a) tratando ratos Sprague-Dawley com guanetidina, também não encontraram alterações na análise das proteínas espermáticas dos espermatozóides presentes na cauda do epidídimo. No entanto, ao analisarem proteínas do homogeneizado da unidade cabeça-corpo do epidídimo, foram encontradas alterações no perfil protéico dos animais tratados com as diferentes doses.

Klinefelter et al. (1997) verificaram alterações no perfil protéico da unidade cabeça-corpo do epidídimo, correlacionadas à redução significativa do tempo de trânsito espermático nessa região. No presente experimento, os animais tratados com DES apresentaram uma aceleração do trânsito espermático na cauda do

epidídimo, mas o perfil das proteínas espermáticas não se mostrou alterado.

A técnica de inseminação artificial *in utero*, foi utilizada para avaliar a fertilidade dos animais, cujos espermatozóides tiveram o tempo de trânsito pelo epidídimo alterado. Essa técnica exclui a influência do comportamento sexual e do número de espermatozóides disponíveis para ejaculação no teste de fertilidade. No presente trabalho, após o emprego desse procedimento, a taxa de gestação (nº fêmeas prenhes/ nº de fêmeas inseminadas) foi semelhante para os diferentes grupos experimentais.

O potencial de fertilidade quantifica a capacidade fértil do macho que está sendo avaliado, através da relação entre o número de implantações no útero e dos corpos lúteos no ovário (que indicam o número de ovulações). É importante salientar que embora não tenha havido significância estatística em nenhum dos parâmetros de fertilidade, o potencial de fertilidade dos animais tratados com DES foi menor do que o do grupo controle, da mesma forma, a taxa de perdas pré-implantação aumentou nesse grupo. Esses resultados, apesar de não se mostrarem estatisticamente significativos, têm um significado biológico, pois eles revelam que a aceleração do trânsito espermático pareceu prejudicar a maturação normal dos espermatozóides no epidídimo, interferindo com a qualidade espermática e, conseqüentemente, diminuindo a fertilidade do animal. Em estudo anterior de nosso laboratório, ratos Wistar expostos ao DES, mostraram uma redução significativa do potencial de fertilidade (Fernandez et al., 2003), confirmando que a alteração do tempo de trânsito espermático no epidídimo, provoca danos à capacidade fértil dos espermatozóides. A reposição de

testosterona recuperou o potencial de fertilidade dos animais expostos ao DES, em outras palavras, recuperou a capacidade fértil dos espermatozóides, reforçando a importância da testosterona no processo de maturação espermática.

O potencial reprodutivo dos animais cujo trânsito espermático foi retardado pela administração de guanetidina não foi alterado. Apesar da literatura mais antiga sobre o assunto sugerir que o “envelhecimento” dos espermatozóides estocados na cauda epididimária diminui a fertilidade dos mesmos (Orgebin-Crist, 1969), o presente trabalho mostrou que os espermatozóides que sofreram um atraso na passagem pelo epidídimo e, portanto, ficaram um tempo maior estocados, não tiveram sua qualidade alterada. Da mesma forma, outros trabalhos mostram que os espermatozóides mantêm a capacidade de fertilização mesmo após a desnervação, seja ela química (Kempinas et al., 1998^b) ou cirúrgica (Ricker et al., 1997).

Durante a passagem pelo epidídimo, os espermatozóides adquirem a capacidade de motilidade, o que depende da interação do micro ambiente intraluminal do ducto com os espermatozóides. A motilidade espermática é um dos parâmetros mais importantes utilizados na avaliação da habilidade fértil dos espermatozóides obtidos de amostras de sêmen *in vitro* (Mahadevan & Trounson, 1984) e *in vivo* (Bostofte et al., 1990; Barrat et al., 1993). Alterações nos parâmetros de motilidade podem levar a uma ineficiência dos espermatozóides na penetração do muco cervical (Aitken et al., 1985; Feneux et al., 1985; Mortimer et al., 1986), impedindo seu acesso ao ovócito, reduzindo sua capacidade fertilizante. A

redução na porcentagem de espermatozóides móveis, observada nos animais expostos ao DES, provavelmente foi um dos fatores que levou à redução no potencial de fertilidade dos mesmos animais. Essa alteração foi corrigida pela reposição de testosterona, reafirmando a importância do hormônio na função epididimária.

Outro parâmetro importante na avaliação da fertilidade de machos, é a análise da morfologia espermática (Plassmann & Urwyler, 2001). No presente estudo a morfologia dos espermatozóides colhidos da cauda epididimária proximal mostrou-se sem alteração significativa, quando comparados ao grupo controle. Resultados da literatura mostram que a exposição à guanetidina (Kempinas et al., 1998^a), e ao DES (Goyal et al., 2001) não refletem em alterações na morfologia espermática. Além dos aspectos gerais da cabeça e da cauda dos espermatozóides, outro parâmetro avaliado, é a presença e a posição da gota citoplasmática, cuja migração ao longo do espermatozóide durante a sua passagem pelo epidídimo é característico do processo de maturação, permanecendo em muitos espermatozóides estocados na cauda epididimária dos mamíferos (Cooper & Yeung, 2003). Os mecanismos precisos que controlam a migração da gota ao longo do flagelo do espermatozóide durante o trânsito pelo epidídimo não são completamente compreendidos.

Estudos recentes sugerem que a gota exerça um papel importante na fertilidade dos espermatozóides (Cooper et al., 2004), sendo importante na resistência osmótica dos mesmos. A gota citoplasmática também estaria envolvida na aromatização do andrógeno a estrógeno, o qual teria um papel importante na

regulação das funções do trato reprodutivo masculino (Hess et al., 1997), função esta demonstrada pela atividade da enzima P450 aromatase, localizada na gota citoplasmática, responsável pela aromatização do andrógeno. A retenção da gota nos espermatozóides ejaculados pode estar associada a causas de infertilidade (Cooper et al., 2004), em várias espécies de animais (Waberski et al., 1994).

No presente estudo a grande maioria dos espermatozóides colhidos da cauda epididimária e analisados sob o microscópio de luz, com contraste de fase, apresentaram a gota citoplasmática na região mediana da cauda, independentemente do grupo experimental. É relatado na literatura que os espermatozóides que são ejaculados com a gota citoplasmática estão relacionados à alteração das funções epididimárias e redução da fertilidade (Cummins & Glover, 1970). Gatti et al. (2004) verificaram que a migração da gota citoplasmática ocorre ao mesmo tempo em que a motilidade dos espermatozóides aumenta, mas a relação direta entre estes dois eventos ainda não foi demonstrada.

Em resumo, o presente trabalho mostrou que quando o tempo de trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo é alterado, pela aceleração ou retardo, parâmetros espermáticos como o número e a motilidade dos gametas também são alterados. No entanto, a qualidade desses espermatozóides foi prejudicada apenas quando o trânsito foi acelerado, resultando em uma redução na fertilidade dos animais. O presente trabalho também reafirmou o importante papel de testosterona na função epididimária de transporte dos gametas, visto que o tempo de trânsito foi normalizado com a reposição do hormônio nos animais com

depressão androgênica, causada pela exposição ao DES. Mais estudos devem ser feitos, com o objetivo de se investigar mais a fundo os mecanismos pelos quais a aceleração da passagem dos espermatozóides pelo ducto epididimário prejudica a qualidade dos gametas.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, na forma de bolsa de mestrado (processo nº 03/12156-3). Os autores gostariam de agradecer à Dra. Eunice Oba, do departamento de Radiologia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Botucatu, pela realização das dosagens hormonais.

Referências Bibliográficas

Aitken, R. J., Sutton, M., Waner, P. & Richardson, D. W. (1985) Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamsters oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, **73(2)**, 441-449.

Bartlett, J. M., Kerr, J. B. & Sharpe, R. M. (1986) The effect of selective destruction and regulation of rat Leydig cells on the intratesticular distribution of

testosterone and morphology of the seminiferous epithelium. *Journal of Andrology*, **7**, 240-253.

Barratt, C. L. R., Tomlinson, M. J. & Cooke, I. D. (1993) Prognostic significance of computerised motility analysis for in vivo fertility. *Fertility and Sterility*, **60**, 520-525.

Bedford, J. M. (1966) Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. *The Journal of experimental zoology*, **163**, 319-330.

Bedford, J. M. (1967) Effect duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of rabbit. *The Journal of experimental zoology*, **166**, 271-282.

Billups, K. L., Tillman, S. L. & Chang, T. S. K. (1991) Ablation of the inferior mesenteric plexus in the rat: alteration of sperm storage in the epididymis and vas deferens. *The Journal of Urology*, **143**, 625-629.

Bostofte, E., Bagger, P., Michael, A. & Stakemann, G. (1990) Fertility prognosis for infertile men from two different population evaluated by the Cox regression model. *Fertility and Sterility*, **54**, 1100-1106.

Brooks, D. E. (1978) Androgenic regulation of metabolic pathways in the rat epididymis. *Biology of reproduction*, **18**, 629-638.

Brooks, D. E. (1983) Epididymal functions and their hormonal regulation. *Australian journal of biological sciences*, **36**, 205-221.

Clegg, E. D., Perreault, D. & Klinefelter, G. R. (2001) Assessment of male reproductive toxicity. In: *Principles and Methods of toxicology*. (ed. A. W. Hayes), pp. 1263-1300. Taylor & Francis, Philadelphia.

Cooper, T. G. & Yeung, C. H. (2003) Developmental changes in signalling transduction factors in maturing sperm during epididymal transit. *Cellular and molecular biology*, **49(3)**, 341-349.

Cooper, T. G., Yeung, C. H., Fetic, S., Sobhani, A. & Nieschlag E. (2004) Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Human reproduction*, **19(10)**, 2283-2288.

Cosentino, M.J., Susan, R., Schoen, A.A.S., Abraham, T.K. & Cockett, M.D. (1984) Effect of sympathetic denervation of rat internal genitalia on daily sperm output. *Fertility and sterility*, **24**, 587-590.

Cuasnicú, P. S., Cohen, D. J., Ellerman, D. A., Busso, D., Da Ros, V. G. & Morgenfeld, M. M. (2002) Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. In: *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (eds. B. Robaire & B. T. Hinton), pp. 389-403. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York.

Cummins, J. M. & Glover, T. D. (1970) Artificial cryptorchidism and fertility in the rabbit. *Journal of reproduction and fertility*, **23**, 423-433.

Dyson, A. L. M. B. & Orgebin-Crist, M. C. (1973) Effect of hypophysectomy, castration and fertilizing ability. *Endocrinology*, **93(2)**, 391-402.

Evans, B., Gannon, B. J., Heath, J. W. & Burnstock, G. (1972) Long-lasting damage to the internal male genital organs and their adrenergic innervation in rats following chronic treatment with the antihypertensive drug guanethidine. *Fertility and sterility*, **23**, 657-67.

Evans, B., Heath, J. W. & Burnstock, G. (1979) Effects of chronic guanethidine on the sympathetic nervous system of mouse and toad. *Comparative biochemistry and physiology*, **63**, 81-92.

Ewing, L. L., Stratton, L. G. & Desjardins, C. (1973) Effect of testosterone polydimethylsiloxane implants upon sperm production, libido and accessory sex

organ function in rabbits. *Journal of reproduction and fertility*, **35**, 245-253.

Ewing, L. L., Desjardins, C., Irby, D. C. & Robaire, B. (1977) Synergistic interaction of testosterone and oestradiol inhibits spermatogenesis in rats. *Nature*, **269**, 409-411.

Feneux, D., Serres, C. & Jouannet, P. (1985) Sliding spermatozoa: a dyskinesia responsible for human infertility? *Fertility and sterility*, **44**, 508-511.

Fernandez, C. D. B., Porto, E. M., Arena, A. C. & Kempinas, W. G. (2003) A exposição de ratos machos ao diethylstilbestrol (DES) altera a fertilidade e a qualidade espermática. *Revista Brasileira de Toxicologia*, **16(1)**, 206.

França, L. R., Avelar, G. F. & Almeida, F. F. L. (2005) Spermatogenesis and transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, **63**, 300-318.

Gatti, J. L., Castella, S., Dacheux, F., Ecruyd, H., Métayer, S., Thimon, V. & Dacheux, J. L. (2004) Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal reproduction science*, **82-83**, 321-339.

Golden, R. J., Noller, K. L. & Titus-Ernstoff, L. (1999) Environmental endocrine modulators and human health: an assessment of the biological

evidence. *Critical reviews in toxicology*, **28**, 109-227.

Goyal, H. O., Braden, T. D., Mansour, M., Willians, C. S., Kamaleldin, A. & Srivastava, K. K. (2001) Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters, but without alterations in sperm production and sperm morphology. *Biology of reproduction*, **64**, 927-934.

Goyal, H. O., Robateau, A., Braden, T. D., Willians, C. S., Srivastava, K. K. & Ali, K. (2003) Neonatal estrogen exposure of male rats alters functions at adulthood. *Biology of reproduction*, **68**, 2081-2091.

Hart, J. E. (1990) Endocrine pathology of estrogens: species differences. *Pharmacology & therapeutics*, **47(2)**, 203-218.

Henderson, N. A. & Robaire, B. (2005) Effects of PNU157706, a dual 5 α -reductase inhibitor, on rat epididymal sperm maturation and fertility. *Biology of Reproduction*, **72**, 436-443.

Hermo, L. & Robaire, B. (2002) Epididymal cell types and their functions. In: *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (eds. B. Robaire & B. T. Hinton), pp. 81-102. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York.

Hess R. A., Bunick D., Lee K. H., Bahr J., Taylor J. A., Korach K. S. & Lubahn D. B. (1997) A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, **30**, 509-512.

Heywood, R. & Wadsworth, P. F. (1980) The experimental toxicology of estrogens. *Pharmacology & therapeutics*, **8**, 125-142.

Hodson, N. (1964) Role of the hypogastric nerves in seminal emission in the rabbit. *Journal of reproduction and fertility*, **7**, 113-22.

Hodson, N. (1965) Sympathetic nerves and reproductive organs in the male rabbit. *Journal of reproduction and fertility*, **10**, 209-20.

Kaleczyc, J., Majewski, M., Calka, J. & Lakomy, M. (1968) Adrenergic innervation of the epididymis, vas deferens, accessory genital glands and urethra in the boar. *Folia histochemica et cytobiologica*, **31**, 117-123.

Kempinas, W. G., Suarez, J. D., Roberts, N. L., Strader, L., Ferrell, J., Goldman, J. M. & Klinefelter, G. R. (1998^a) Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit after guanethidine - induced sympathsectomy. *Biology of reproduction*, **59**, 890-896.

Kempinas, W. G., Suarez, J. D., Roberts, N. L., Strader, L., Ferrell, J., Goldman, J. M., Narotsky, M. G., Perreault, S. D., Evenson, D. P., Ricker, D. D. & Klinefelter, G. R. (1998^b) Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biology of reproduction*, **59**, 897-904.

Kerr, J. B., Millar, M., Maddocks, S. & Sharpe, R. M. (1993) Stage dependent changes in spermatogenesis and Sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. *The Anatomical record*, **235**, 547-559.

Klinefelter, G. R., Laskey, J. W., Kelce, W. R., Ferrell, J., Roberts, N. L., Suarez, J. D. & Slott, V. (1994) Chloroethylmethanesulfonate-induced effects on the epididymis seem unrelated to altered leydig cell function. *Biology of Reproduction*, **51**, 82-91.

Klinefelter, G. R. & Suarez, J. D. (1997) Toxicant-induced acceleration of epididymal sperm transit: androgen-dependent proteins may be involved. *Reproductive toxicology*, **11(4)**, 511-509.

Klinefelter, G. R., Laskey, J. W., Ferrell, J., Suarez, J. D. & Roberts, N. L. (1997) Discriminant analysis indicates a single sperm protein (SP22) is predictive of fertility following exposure to epididymal toxicants. *Journal of Andrology*, **18 (2)**, 139-150.

Klinefelter, G. R. (2002) Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (eds. B. Robaire & B. T. Hinton), pp. 353-369. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York.

Lamano-Carvalho T. L., Petenusci, S. O., Favaretto, A. L. V. & Kempinas, W. G. (1990) Morfometric and biochemical evaluation of rat prostate and seminal vesicle following chemical sympathectomy with guanethidine. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochemie*, **98(5)**, 225-230.

Lamano Carvalho, T. L., Petenusci, S. O., Favaretto, A. L. V. & Kempinas, W. G. (1993^a) Prepubertal development of rat prostate and seminal vesicle following chemical sympathectomy with guanethidine. *Brazilian journal of medical and biological research*, **26**, 639-646.

Lamano Carvalho, T. L., Kempinas, W. G. & Favaretto, A. L. V. (1993^b) Morfometric evaluation of rat testis, epididymis and vas deferens following chemical sympathectomy with guanethidine. *Journal of anatomy*, **175**, 453-457.

Lamano Carvalho, T. L., Guimarães, M. A., Kempinas, W. G., Petenusci, S. O. & Rosa E Silva, A. A. M. (1996) Effects of guanethidine-induced sympathectomy on the spermatogenic and steroidogenic testicular functions of prepubertal to mature rats. *Andrologia*, **28**, 117-122.

Mahadevan, M. M. & Trounson, A. O. (1984) The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, **42**, 400-405.

Mathur, P. P., Marshall, A. & Cheng, C. Y. (2000) Protein profiles in various epididymal segments of normal and castrated rats. *Asian journal of andrology*, **2**, 57-64.

Meistrich, M. L., Hughes, T. H. & Bruce, W. R. (1975) Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. *Nature*, **258**, 145.

Moon, K. H. & Br, R. G. (1968) Silastic testosterone capsules. I. Observations in the castrated male rat. *Investigative urology*, **6(3)**, 329-33.

Mortimer, D., Panday, I. J. & Sawers, R. S. (1986) Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, **78**, 93.

Nagao, T. S., Usumi, K., Kuwagata, M. & Imai, K. (1999) Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate. *Reproductive toxicology*, **13**, 303-311.

O'donnell, L., Robertson, K. M., Jones, M. E. & Simpson, E. R. (2001) Estrogen an Spermatogenesis. *Endocrine reviews*, **23**, 289-318.

Oishi, S. (2002) Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food and chemical toxicology*, **40(12)**, 1807-1813.

Olson, G. E., NagDas, S. K. & Winfrey, V. P. (2002) Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In: *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (eds. B. Robaire & B. T. Hinton), pp. 371-387. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York.

Orgebin-Crist, M. C. (1969) Studies on the function of the epididymis. *Biology of reproduction*, **1**, 155-175.

Orgebin-Crist, M. C. & Jahad, N. (1978) The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: inhibition by antiandrogens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis. *Endocrinology*, **103(1)**, 46-53.

Plassmann, S. & Urwyler, H. (2001) Improved risk assessment by screening sperm parameters. *Toxicology letters*, **119**, 157-171.

Porto, E. M., Fernandez, C. D. B., Arena, A. C. & Kempinas, W. G. (2003) Alterações espermáticas em ratos machos adultos tratados com diethylstilbestrol (DES). *Revista Brasileira de Toxicologia*, **16(1)**, 206.

Rang, H. P., Dale, M. M. & Ritter, J. M. (2001) Transmissão noradrenérgica. In: *Farmacologia*. (eds. H. P. Rang, M. M. Dale & J. M. Ritter), pp. 116-135. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

Rao, M. V., Mehta, A. R., Sharma, A. K., Patil, J. S. & George, R. K. (1993) Effect of testosterone on diethylstilbestrol toxicity and comparison to a recovery study in the rat epididymis and vas deferens. *Reproductive Toxicology*, **7(5)**, 453-461.

Ricker, D. D., Crone, J. K., Chamness, S. L., Klinefelter, G. R. & Chang, T. S. K. (1997) Partial sympathetic denervation of the rat epididymis permits fertilization but inhibits embryo development. *Journal of Andrology*, **18**, 131-138.

Ricker, D. D. (1998) The Autonomic Innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility. *Journal of Andrology*, **19**, 1-4.

Robb, G. W., Amman, R. P. & Killian, G. J. (1978) Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. *Journal of reproduction and fertility*, **54**, 103-7.

Rodríguez, C. M., Kirby, J. L. & Hinton, B. T. (2002) The development of the epididymis. In: *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (eds. B. Robaire & B. T. Hinton), pp. 251-267. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York.

Russel, L. D. & Clermont, Y. (1977) Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *The Anatomical record*, **197**, 347-366.

Saito, K., O'donnell, L., McLachlan, R. I. & Robertson, D. M. (2000) Spermiation failure is a major contributor to early spermatogenic suppression caused by hormone withdrawal in adult rats. *Endocrinology*, **141**, 2779-2785

Sharpe, R. M. (1993) Falling sperm counts in the men – is there are endocrine cause? *The Journal of endocrinology*, **137**, 357-360.

Sharpe, R. M., Atanassova, N. , Mckinnell C., Parte, P., Turner, K. J., Fisher, J. S., Kerr, J. B., Goome, N. P., Macpherson, S., Millar, M. R. & Saunders, P. T. K. (1998) Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats treated neonatally with diethylstilbestrol: a possible role for estrogens in Sertoli cell development. *Biology of reproduction*, **59**, 1084-1094.

Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J. & Frenette, G. (2005) Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Molecules & Diseases*, **35**, 1-10.

Sultan, C., Balaguer, P., Terouanne, B., Georget, V., Paris, F., Jeandel, C., Lumbroso, S. & Nicolas, J. C. (1994) Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Molecular and cellular endocrinology*, **178**, 99-105.

Toshimori, K. (2003) Biology of spermatozoa maturation: an overview with introduction to this issue. *Microscopy research and technique*, **61(1)**, 1-6.

Toppari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L. J., Jégou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J. A., Meyer, O., Müller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R. M., Sumpter, J. S. & Skakkebaek, N. E. (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental health perspectives*, **104 (4)**, 741–803.

Villanueva, I., Piñón, M., Quevedo-Corona, L., Martínez-Olivares, R. & Racotta, R. (2003) Epinefrine and dopamine colocalization with norepinephrine in

various peripheral tissue: Guanethidine effects. *Life Sciences*, **73**, 1645-1653.

Waberski, D., Meding, S., Dirksen, G., Weitze, K. F., Leiding, C. & Hahn R. (1994) Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Animal reproduction science*, **36**, 145-151.

Yanagimachi, R. (1994) Mammalian fertilization. In: *The physiology of reproduction*, vol. 1. (ed. E. Knobil & J.D. Neil), pp. 189-317. Raven Press, New York.

Correspondência para o autor:

Wilma De Grava Kempinas

Departamento de Morfologia

Instituto de Biociências – UNESP

Caixa postal 510

18618-000, Botucatu, SP, Brasil

Tel.: 14 3811 6264; Fax: 14 3811 6264

Endereço eletrônico: kempinas@ibb.unesp.br

Legenda das figuras

Figura 1: Concentração plasmática de testosterona nos ratos adultos após 12 dias de tratamento. Valores expressos em média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle. Teste de Kruskal-Wallis com teste "a posteriori" de Dunn.

Figura 2: Tempo de trânsito dos espermatozóides na cabeça-corpo e cauda do epidídimo de ratos adultos, após 12 dias de tratamento. Valores expressos em média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle. Teste ANOVA com teste "a posteriori" de Dunnett.

Figura 3: Fotomicrografias de cortes transversais de testículos. A e E) controle, B e F) tratado com DES, C e G) tratado com guanetidina, D e H) DES + testosterona. As fotos A, B, C e D mostram túbulos seminíferos no estágio IX-X da espermatogênese. As setas nas fotos B e D mostram espermátides alongadas retidas próximo à base do epitélio (1000x). As fotos E, F, G e H mostram túbulos seminíferos o estágio VII-VIII da espermatogênese. As setas nas fotos F e H apontam espermatócitos primários em degeneração (400x).

Figura 4: Gel bi-dimensional de poliacrilamida corado com prata, mostrando o perfil protéico de proteínas espermáticas de um animal controle. Eixo-y = peso molecular ($\times 10^{-3}$); eixo-x = faixa de ponto Isoelétrico (pI).

Tabela 1: Peso corporal final e pesos absolutos e relativos dos órgãos reprodutivos de ratos machos dos grupos controle, tratado com DES (10µg/dia), tratado com guanetidina, tratado com DES (10µg/dia) e reposição de testosterona, após 12 dias de tratamento. As setas indicam se houve aumento (↑) ou diminuição (↓).

Grupos experimentais				
	Controle	DES	Guanetidina	DES + T
Peso corpóreo final (g)	456,11 ± 13,28 (n = 7)	406,44 ± 10,71*↓ (n = 7)	459,87 ± 15,16 (n = 7)	401,66 ± 12,38*↓ (n = 7)
Testículo (g)	1,65 ± 0,07	1,35 ± 0,04*↓	1,85 ± 0,03	1,30 ± 0,13*↓
Testículo (g/100g)	0,36 ± 0,01 (n = 7)	0,33 ± 0,01 (n = 7)	0,40 ± 0,02 (n = 7)	0,32 ± 0,03 (n = 7)
Epidídimo (mg)	549,77 ± 24,01	349,29 ± 7,51**↓	678,00 ± 13,04**↑	578,20 ± 31,22
Epidídimo (mg/100g)	120,52 ± 4,14 (n = 7)	86,51 ± 3,79**↓ (n = 7)	148,57 ± 6,48**↑ (n = 7)	143,98 ± 6,86*↑ (n = 7)
Próstata ventral (mg)	535,08 ± 30,50	109,9 ± 4,67**↓	563,71 ± 45,67	636,46 ± 31,69
Próstata ventral(mg/100g)	117,54 ± 6,90 (n = 7)	27,23 ± 1,54**↓ (n = 7)	123,11 ± 10,94 (n = 7)	158,34 ± 5,64**↑ (n = 7)
Vesícula seminal (g)	1,20 ± 0,06	0,37 ± 0,05**↓	2,05 ± 0,10**↑	1,66 ± 0,09**↑
Vesícula seminal (g/100g)	0,26 ± 0,01 (n = 7)	0,09 ± 0,01**↓ (n = 7)	0,45 ± 0,02**↑ (n = 7)	0,41 ± 0,02**↑ (n = 7)
Ducto deferente (mg)	121,64 ± 8,64	77,46 ± 4,94**↓	147,55 ± 5,53*↑	121,62 ± 7,79
Ducto deferente (mg/100g)	26,87 ± 1,96 (n = 5)	19,12 ± 1,28*↓ (n = 7)	32,34 ± 2,04 (n = 6)	30,08 ± 2,12 (n = 6)

Valores expressos em média ± EPM. *p<0,05; **p<0,01, comparados ao controle. Teste ANOVA com teste “a posteriori” de Dunnett.

Tabela 2: Parâmetros espermáticos (número, motilidade e morfologia) de ratos adultos dos grupos controle, tratado com DES (10µg/dia), tratado com guanetidina, tratado com DES (10µg/dia) e reposição de testosterona, após 12 dias de tratamento. As setas indicam se houve aumento (↑) ou diminuição (↓).

	Controle (n = 7)	DES (n = 7)	Guanetidina (n = 7)	DES + testosterona (n = 6)
Nº de espermátides (x 10⁶/testículo)	234,99 ± 12,87	214,16 ± 10,67	222,08 ± 11,56	205,74 ± 6,00
Produção espermática (x 10⁶/testículo/dia)	38,52 ± 2,11	35,11 ± 1,75	36,41 ± 1,90	33,73 ± 0,98
Produção espermática relativa (x 10⁶/g de testículo/dia)	24,95 ± 0,88	26,78 ± 0,90	20,75 ± 0,79**↓	25,19 ± 0,91
Nº de espermatozóides na cabeça/corpo do epidídimo (x 10⁶/órgão)	116,58 ± 9,27	63,09 ± 3,47**↓	122,14 ± 7,41	100,88 ± 9,07
Nº de espermatozóides na cauda do epidídimo (x 10⁶/órgão)	218,44 ± 8,07	77,29 ± 5,60**↓	436,34 ± 16,33**↑	260,34 ± 18,50
¹Espermatozóides móveis (%)	84,5 (79,25 – 89,75)	62 (56,5 – 64)	84 (84 – 86,5)	75,5 (75 – 78,5)
¹Espermatozóides normais (%)	90 (90 – 91,5)	90 (86,75 – 94)	93,5 (91,75 – 95)	92,5 (91 – 94)

Valores expressos em média ± EPM. **p<0,01, comparados ao controle. Teste ANOVA com teste “a posteriori” de Dunnett.

¹Valores expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste Kruskal-Wallis com teste “a posteriori” de Dunn

Tabela 3: Fertilidade dos ratos pertencentes aos grupos controle, tratado com DES (10µg/dia), tratado com guanetidina e tratado com DES (10µg/dia) e reposição de testosterona, após inseminação artificial *in utero*.

	Grupos experimentais			
	Controle (n=6)	DES (n = 7)	Guanetidina (n = 5)	DES + testosterona (n=8)
¹ Potencial de fertilidade (%)	52,78 (50 – 58,89)	27,27 (20,31 – 47,32)	60,00 (36,36 – 93,33)	60,20 (35,11 – 77,92)
Peso da rata (g)	324,28 ± 15,14	335,97 ± 17,69	322,78 ± 14,73	346,03 ± 10,25
Peso do útero com fetos (g)	51,99 ± 6,63	29,82 ± 6,42	45,33 ± 9,14	38,42 ± 6,95
Número de corpos lúteos	17 ± 0,82	14,86 ± 1,87	14 ± 2,17	15,37 ± 1,13
Número de implantações	9 ± 1,24	5,3 ± 1,29	8,6 ± 1,89	8,5 ± 1,43
Número de fetos vivos				
Total	8 ± 1	5 ± 1	8 ± 2	8 ± 1
Machos	6 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	4 ± 1
Fêmeas	4 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	4 ± 1
Peso dos fetos (g)	2,92 ± 0,09	3,23 ± 0,10	3,12 ± 0,08	3,09 ± 0,02
¹ Taxa de perdas pré-implantação (%)	47,22 (41,11 – 50)	72,73 (52,68 – 79,70)	40,00 (6,67 – 63,64)	39,81 (22,08 – 64,88)
¹ Taxa de perdas pós-implantação (%)	9,13 (1,78 – 11,11)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)	8,01 (0,0 – 17,05)

Valores expressos em média ± EPM. Teste ANOVA com teste “a posteriori” de Dunnett.

¹Valores expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste Kruskal-Wallis com teste “a posteriori” de Dunn.

Figura 1

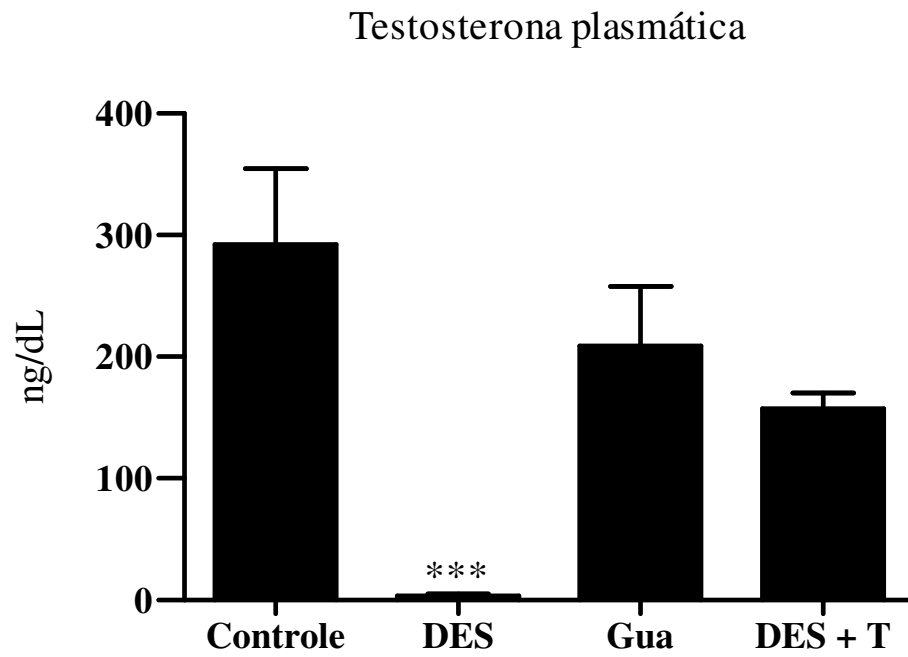


Figura 2

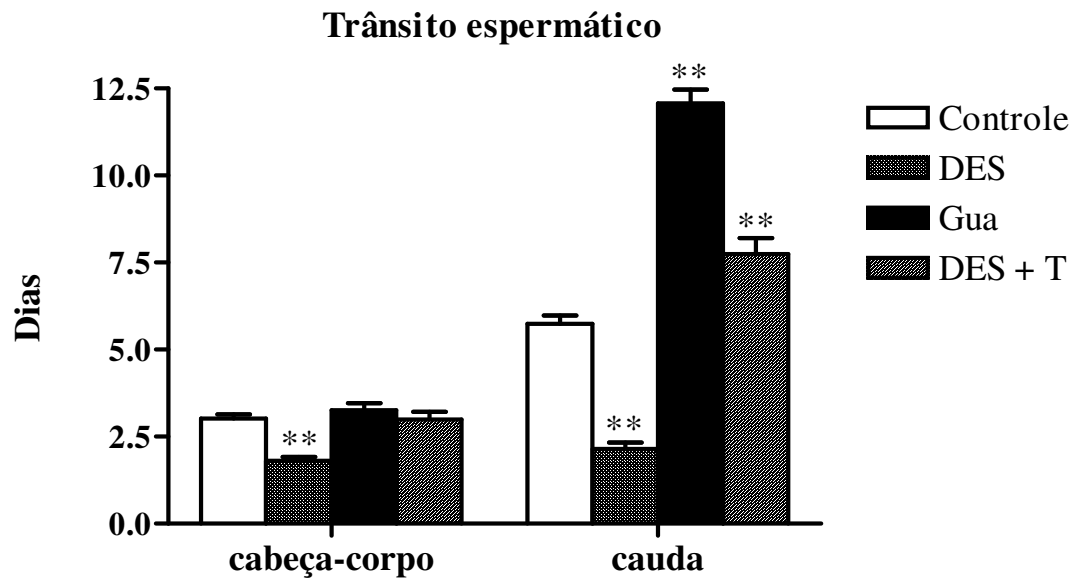


Figura 3

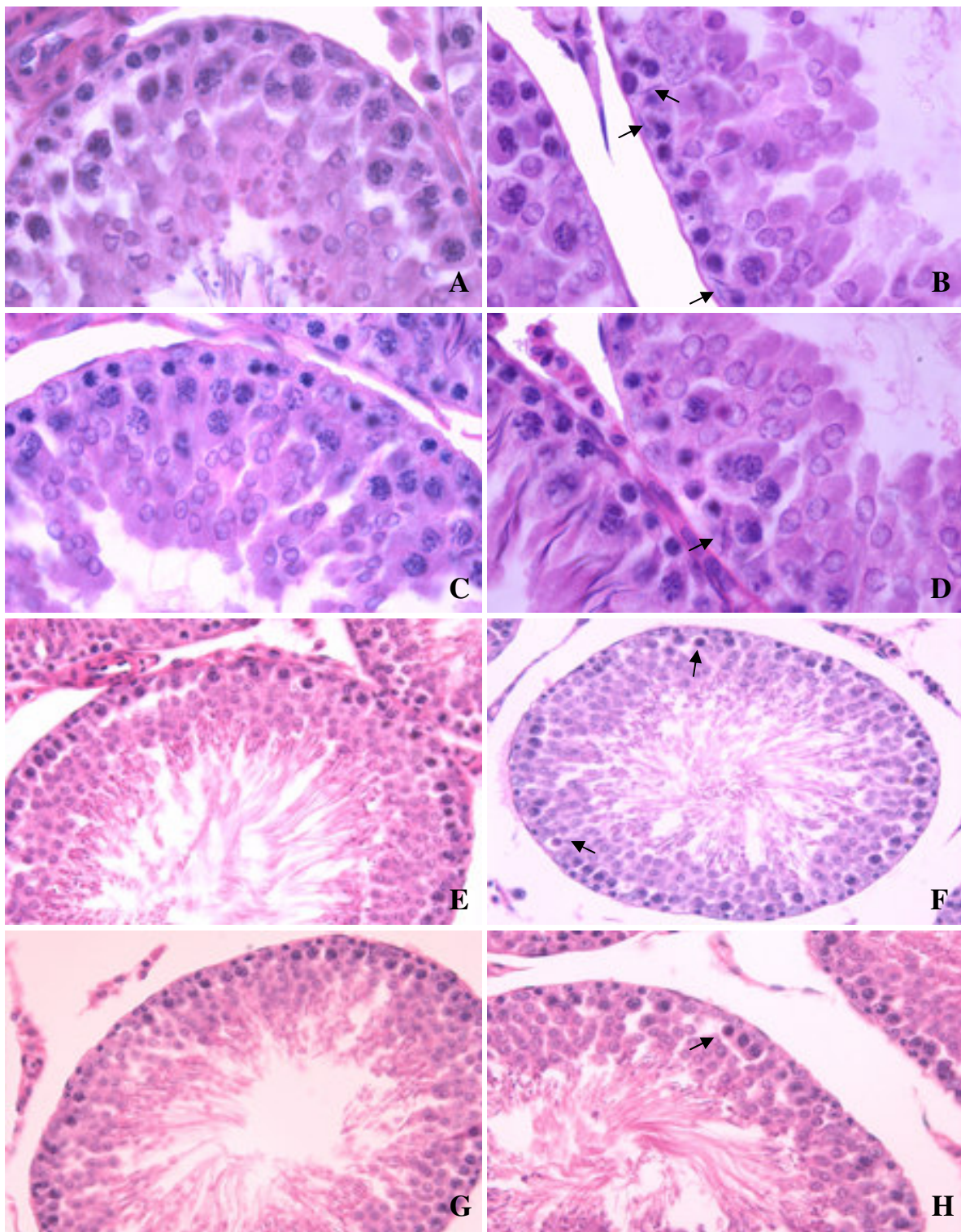
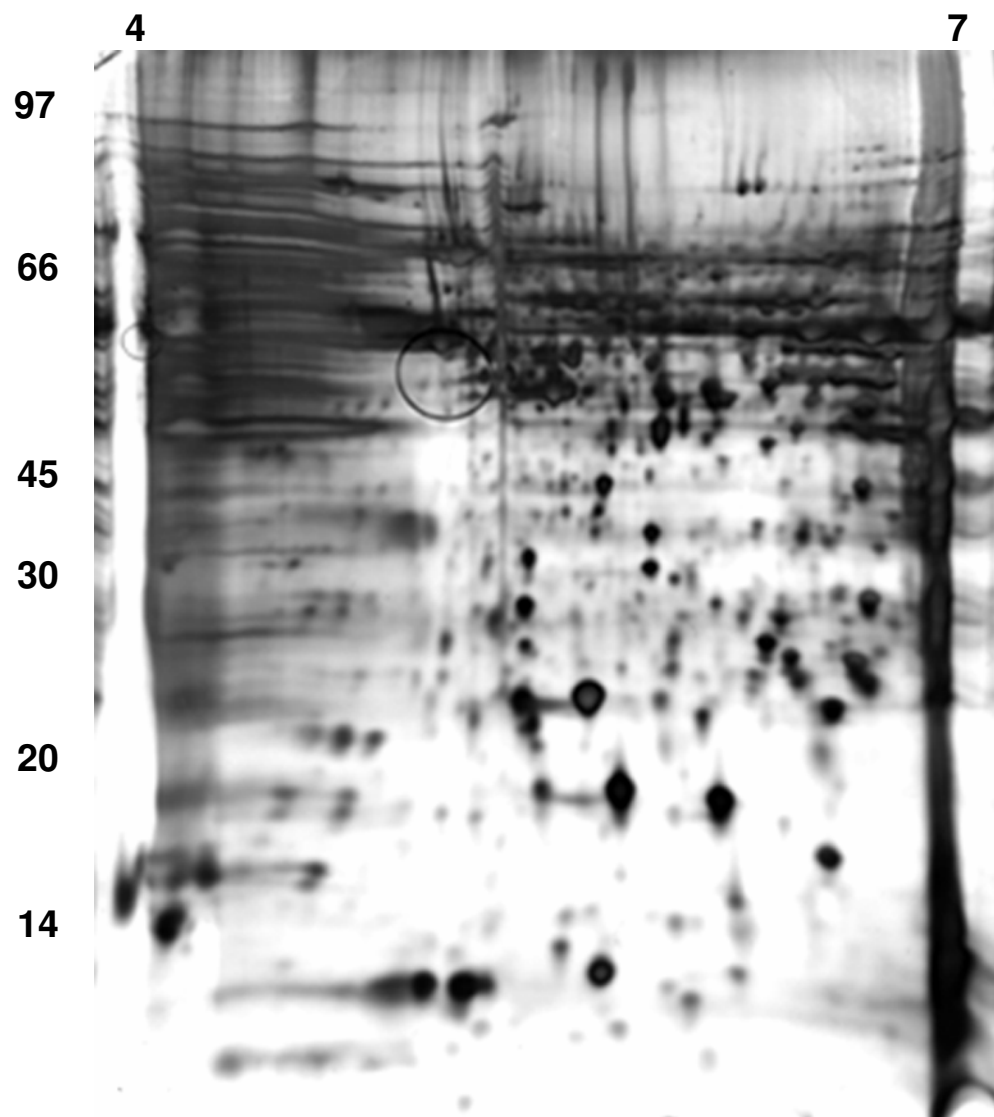


Figura 4



Conclusões finais

Concluiu-se que tanto a aceleração quanto o retardo do tempo de trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo provocaram alterações em parâmetros espermáticos, principalmente sobre o número e a motilidade dos espermatozóides. No entanto, só houve prejuízo da fertilidade quando houve uma diminuição no tempo de trânsito, provavelmente porque o processo de maturação espermática foi prejudicado. O presente trabalho também reafirmou o importante papel da testosterona na função epididimária de transporte dos gametas.

Referências bibliográficas da Introdução

Amann, R. P., Johnson, L., Thompson, D. L. & Pickett, B. W. (1976) Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. *Biology of Reproduction*, **15**, 586-592.

Bhatt, R. V. (2000) Environmental influence on reproductive health. *International journal of gynaecology and obstetrics*, **70**, 69-75

Billups, K. L., Tillman, S. L. & Chang, T. S. K. (1991) Ablation of the inferior mesenteric plexus in the rat: alteration of sperm storage in the epididymis and vas deferens. *The Journal of Urology*, **143**, 625-629.

Bordjiba, O., Steiman, R., Kadri, M., Semadi, A. & Guiraud, P. (2001) Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. *Journal of environmental quality*, **30**, 418-426.

Brooks, D. E. (1983) Epididymal functions and their hormonal regulation. *Australian journal of biological sciences*, **36**, 205-221.

Clermont, Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological reviews*, **52**, 198-236.

Cooper, T. G. (1998) Epididymis. In: *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 2. (eds. E. Knobil & J. D. Neill), pp. 1-17. Academic Press, California.

Cosentino, M. J. & Cockett, A. T. (1986) Structure and function of the epididymis. *Urological Research*, **14(5)**, 229-240.

Cuasnicú, P. S., Cohen, D. J., Ellerman, D. A., Busso, D., Da Ros, V. G. & Morgenfeld, M. M. (2002) Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. In: *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (eds. B. Robaire & B. T. Hinton), pp. 389-403. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York.

Ewing, L. L., Desjardins, C., Irby, D. C. & Robaire, B. (1977) Synergistic interaction of testosterone and oestradiol inhibits spermatogenesis in rats. *Nature*, **269**, 409-411.

França, L. R., Avelar, G. F. & Almeida, F. F. L. (2005) Spermatogenesis and transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, **63**, 300-318.

Gatti, J. L., Castella, S., Dacheux, F., Ecruyd, H., Métayer, S., Thimon, V. & Dacheux, J. L. (2004) Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal reproduction science*, **82-83**, 321-339.

Glover, T. D. (1982) The epididymis. In: *Scientific Foundations of Urology*. (eds. G. D. Chisholm & D. I. Williams), pp. 544-555. William Heinemann Medical Books Ltd, London.

Cooper, T. G. (1998) Epididymis. In: *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 2. (eds. E. Knobil & J. D. Neill), pp. 1-17. Academic Press, California.

Golden, R. J., Noller, K. L. & Titus-Ernstoff, L. (1999) Environmental endocrine modulators and human health: an assessment of the biological evidence. *Critical reviews in toxicology*, **28**, 109-227.

Goyal, H. O., Braden, T. D., Mansour, M., Willians, C. S., Kamaleldin, A. & Srivastava, K. K. (2001) Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters, but without alterations in sperm production and sperm morphology. *Biology of reproduction*, **64**, 927-934.

Goyal, H. O., Robateau, A., Braden, T. D., Willians, C. S., Srivastava, K. K. & Ali, K. (2003) Neonatal estrogen exposure of male rats alters functions at adulthood. *Biology of reproduction*, **68**, 2081-2091.

Hayward, S. W., Baskin, L. S., Haughney, P. C., Cunha, A. R., Foster, B. A., Dahiya, R., Prins, G. S. & Cunha, G. R. (1996^a) Epithelial developmental in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anatomica*, **155**, 81-93.

Hayward, S. W., Baskin, L. S., Haughney, P. C., Foster, B. A., Cunha, A. R., Dahiya, R., Prins, G. S. & Cunha, G. R. (1996^b) Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anatomica*, **155**, 94-103.

Henderson, N. A. & Robaire, B. (2005) Effects of PNU157706, a dual 5 α -reductase inhibitor, on rat epididymal sperm maturation and fertility. *Biology of Reproduction*, **72**, 436-443.

Hermo, L. & Robaire, B. (2002) Epididymal cell types and their functions. In: *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (eds. B. Robaire & B. T. Hinton), pp. 81-102. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York.

Jones, R. C. (1999) To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *International Journal of Andrology*, **22**, 57-67.

Kaleczyc, J., Majewski, M., Calka, J. & Lakomy, M. (1968) Adrenergic innervation of the epididymis, vas deferens, accessory genital glands and urethra in the boar. *Folia histochemica et cytobiologica*, **31**, 117-123.

Kempinas, W. G., Suarez, J. D., Roberts, N. L., Strader, L., Ferrell, J., Goldman, J. M. & Klinefelter, G. R. (1998^a) Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit after guanethidine - induced sympathsectomy. *Biology of reproduction*, **59**, 890-896.

Kempinas, W. G., Suarez, J. D., Roberts, N. L., Strader, L., Ferrell, J., Goldman, J. M., Narotsky, M. G., Perreault, S. D., Evenson, D. P., Ricker, D. D. & Klinefelter, G. R. (1998^b) Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biology of reproduction*, **59**, 897-904.

Klinefelter, G. R. & Suarez, J. D. (1997) Toxicant-induced acceleration of epididymal sperm transit: androgen-dependent proteins may be involved. *Reproductive toxicology*, **11**(4), 511-509.

Klinefelter, G. R. (2002) Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (eds. B. Robaire & B. T. Hinton), pp. 353-369. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York.

Lamano Carvalho, T. L., Guimarães, M. A., Kempinas, W. G., Petenusci, S. O. & Rosa E Silva, A. A. M. (1996) Effects of guanethidine-induced sympathectomy on the spermatogenic and steroidogenic testicular functions of prepubertal to mature rats. *Andrologia*, **28**, 117-122.

Mann, T. (1974) Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *Journal of reproduction and fertility*, **37**,

179-188.

Orgebin-Crist, M. C. (1969) Studies on the function of the epididymis. *Biology of reproduction*, **1**, 155-175.

Orgebin-Crist, M. C, Danzo, B. J. & Davies, J. (1975) Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: *Handbook of Physiology*, vol. 5 (eds. D. W. Hamilton & R. O. Greep), pp. 319-338, American Physiological Society, Washington.

Orgebin-Crist, M. C & Jahad, N. (1978) The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: inhibition by antiandrogens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis. *Endocrinology*, **103**(1), 46-53.

Rang, H. P., Dale, M. M. & Ritter, J. M. (2001) Transmissão noradrenérgica. In: *Farmacologia*. (ed. H.P. Rang, M.M. Dale & J.M. Ritter), pp. 116-135. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

Rao, M. V., Mehta, A. R., Sharma, A. K., Patil, J. S. & George, R. K. (1993) Effect of testosterone on diethylstilbestrol toxicity and comparison to a recovery study in the rat epididymis and vas deferens. *Reproductive Toxicology*, **7**(5), 453-461.

Reid, B. L. & Cleand, K. W. (1957) The structure function of the epididymis. I- The histology of the rat epididymis. *Australian journal of zoology*, **5**(3), 223-251.

Ricker, D. D. & Chang, T.S.K. (1996) Neuronal input from the inferior mesenteric ganglion (IMG) affects sperm transport within the rat cauda epididymis. *International Journal of Andrology*, **19**, 371-376.

Ricker, D. D., Crone, J. K., Chamness, S. L., Klinefelter, G. R. & Chang, T. S. K. (1997) Partial sympathetic denervation of the rat epididymis permits fertilization but inhibits embryo development. *Journal of Andrology*, **18**, 131-138.

Ricker, D. D. (1998) The Autonomic Innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility. *Journal of Andrology*, **19**, 1-4.

Robb, G. W., Amman, R. P. & Killian, G. J. (1978) Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. *Journal of reproduction and fertility*, **54**, 103-7.

Rodriguez, J. A. & Favaretto, A. L. V. (1999) Sistema reprodutor. In: *Fisiologia* (ed. M. M. Aires), pp 877-917, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Roy-Burman, P., Wu, H., Powell, W. C., Hagenkord, J. & Cohen, M. B. (2004) Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocrine-Related Cancer*, **11**, 225-324.

Russell, L. D., Ettlin, R. A., Sinha-Hikim, A. T. & Clegg, E. D. (1990) Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater.

Saito, K., O'donnell, L., McLachlan, R. I. & Robertson, D. M. (2000) Spermiogenesis failure is a major contributor to early spermatogenic suppression caused by hormone withdrawal in adult rats. *Endocrinology*, **141**, 2779-2785

Setchell, B. P. (2002) Innervation and vasculature of the excurrent duct system. In: *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (eds. B. Robaire & B. T. Hinton), pp. 35-48. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York.

Sharpe, R. M. (1993) Falling sperm counts in the men – is there an endocrine cause? *The Journal of endocrinology*, **137**, 357-360.

Sokol, R. Z. (1997) The hypothalamic – pituitary – gonadal axis as a target for toxicants. In: *Comprehensive toxicology* (eds. G. Sipes, C. A. McQueen & A. J. Gandolfi) pp. 87-98, Cambridge university Press, Cambridge.

Sujarit, S. & Pholpramool, C. (1985) Enhancement of sperm transport through the rat epididymis after castration. *Journal of Reproduction & Fertility*, **74**, 497-502.

Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J. & Frenette, G. (2005) Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Molecules & Diseases*, **35**, 1-10.

Sultan, C., Balaguer, P., Terouanne, B., Georget, V., Paris, F., Jeandel, C., Lumbroso, S. & Nicolas, J. C. (1994) Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Molecular and cellular endocrinology*, **178**, 99-105.

Toppari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L. J., Jégou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J. A., Meyer, O., Müller, J., Rajpert-De meys, E., Scheike, T., Sharpe, R. M., Sumpter, J. S. & Skakkebaek, N. E. (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental health perspectives*, **104** (4), 741–803.

Villanueva, I., Piñón, M., Quevedo-Corona, L., Martínez-Olivares, R. & Racotta, R. (2003) Epinephrine and dopamine colocalization with norepinephrine in various peripheral tissue: Guanethidine effects. *Life Sciences*, **73**, 1645-1653.

Wilcox, A. J., Baird D. D., Weinberg, C. R., Hornsby, P. P. & Herbst, A. L. (1995) Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol. *The New England Journal of Medicine*, **332**, 1411-1415.