

TATIANA PRATA MENEZES

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E PROTEÔMICA DOS
EPIDÍDIMOS DE *Calomys tener*, *Necomys lasiurus* e *Akodon cursor*
(RODENTIA, CRICETIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M543a Menezes, Tatiana Prata, 1987-
2017 Avalização histomorfométrica e proteômica dos epidídimos
de *Calomys tener*, *Necromys lasiurus* e *Akodon cursor*
(Rodentia, Cricetidae) / Tatiana Prata Menezes. – Viçosa, MG,
2017.

ix, 71f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Mariana Machado Neves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Roedores silvestres. 2. Reprodução. 3. Morfologia.
4. Morfometria. 5. Reprodução animal. 6. Histologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 599.35

TATIANA PRATA MENEZES

AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E PROTEÔMICA DOS EPIDÍDIMOS
DE *Calomys tener*, *Necomys lasiurus* e *Akodon cursor* (RODENTIA,
CRICETIDAE)

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e
Estrutural, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

Aprovada: 27 de julho de 2017.


Marcos de Lucca Moreira Gomes


Gisele Mendes Lessa Del Giudice


Clóvis Andrade Neves


Sérgio Luiz Pinto da Matta


Mariana Machado Neves
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao programa de Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade de realização do curso e crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de pesquisa, possibilitando a realização desse trabalho.

À minha orientadora, Mariana M. Neves, por esses 7 anos de orientação. Seus ensinamentos foram e ainda serão fundamentais na minha caminhada. Sem você não teria chegado até aqui. Obrigada por tudo!

Ao Sérgio da Matta, por ter confiado, incentivado e apoiado durante todos esses anos. Você foi uma das pessoas que não me deixou desistir e acreditou que eu conseguiria chegar até aqui. Obrigada pelas palavras ditas e pelos ensinamentos!

Aos professores do laboratório de Biologia Estrutural e do departamento de Biologia Geral, pelos ensinamentos, lições e ajuda.

À Beth, secretária do programa de Biologia Celular e Estrutural, por estar sempre a postos para nos ajudar em qualquer situação, incentivar e nos contagiar com a sua alegria diária. Você é uma mãe para todos nós.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Biologia Geral (Adriana, Gustavo e Leandro) e do prédio ECS, pela convivência diária, educação e alegria.

Ao meu pai, José, e meus irmãos, Thiago e Ítalo, por terem sido e continuarem sendo a minha base. Sem vocês, mais essa conquista não seria possível. Obrigada por terem me apoiado e incentivado em todos os momentos. Amo vocês!

À minha mãe, minha maior inspiração e minha maior saudade, por ter me ensinado a correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus avós, tios, tias, primos e primas que mesmo longe foram grandes incentivadores dessa caminhada.

À minha companheira de república e “irmã-gêmea”, Luiza, por ter me acompanhado até aqui e ter compartilhado alegrias e tristezas. Obrigada por estar do meu lado, amo você!

A todos os amigos e amigas do laboratório de Biologia Estrutural, em especial a Viviane, Graziela, Susana, Fernanda, Eduardo, Luiz, Ana Luiza, Beth, Verônica, Marli, Juliana, Marcela, Felipe, Janaína e Talita. Obrigada pela amizade, apoio nos momentos difíceis, troca de conhecimentos, momentos de descontração e

por terem sido uma verdadeira família (a família 333). Vocês foram fundamentais nessa caminhada. Vou levar cada um de vocês comigo, no coração e nas lembranças.

A todos os amigos e amigas do programa de Biologia Celular e Estrutural e da UFV que estiveram sempre presente.

Aos meus amigos (as) de longas datas: Camila, Gilda, Ana Cláudia V., Diogo, Luciano, Guilherme, Lívia e Paola, por entenderem minha ausência e por estarem comigo em todos os momentos.

Ao professor Arlindo e seus orientados (as), que me acolheram duas vezes com todo carinho na Universidade Federal do Ceará (UFC), obrigada pela ajuda, apoio e ensinamentos.

À professora Gisele Lessa e seus orientados (em especial a Adrielli e a Polly), por terem me auxiliado em coletas no campo, terem me passado seus ensinamentos e pela amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro a eventos científicos.

A todos aqueles que, de alguma forma, fizeram parte dessa caminhada e desse projeto, o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Mata Atlântica e roedores	3
2.2. Epidídimo	6
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
ARTIGO 1	16
Proteomes and morphological features of <i>Calomys tener</i> and <i>Necomys lasiurus</i> (Cricetidae, Sigmodontinae) epididymides	16
Abstract	16
Introduction	17
Materials and Methods	18
Animal capture	18
Epididymis collection	18
Histological procedure for light microscopy	19
Epididymal histomorphometry	20
Proteomic analysis	20
Gene ontology	21
Statistical analysis	22
Results	22
Epididymis morphology and histomorphometry	22
Proteomic analysis	26
Discussion	32
Literature Cited	35
Supplementary Data	40
Supplementary Data SD1	40
Supplementary Data SD2	40

ARTIGO 2	46
Proteoma, histomorfometria e tempo de trânsito dos espermatozoides do epidídimo de <i>Akodon cursor</i> (Rodentia, Cricetidae)	46
Resumo.....	46
1. Introdução	47
2. Material e Métodos	48
2.1. Coleta animal e comitê de ética	48
2.2. Coleta do epidídimo	48
2.3. Processamento histológico para microscopia de luz.....	49
2.3.1. Histomorfometria epididimária.....	49
2.4. Produção diária de espermatozoide por testículo, número de espermatozoides e tempo de trânsito no epidídimo	50
2.5. Análise proteômica	51
2.5.1. Digestão da amostra	51
2.5.2. Identificação de proteínas	51
2.5.3. Ontologia genética	52
2.5.4. Análise in silico de interação de proteínas.....	52
2.6. Análise estatística.....	52
3. Resultados.....	53
3.1. Morfologia e histomorfometria epididimária.....	53
3.2. Produção diária de espermatozoide por testículo, número de espermatozoides e tempo de trânsito no epidídimo	56
3.3. Análise proteômica	57
4. Discussão	60
5. Referências	64
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70

RESUMO

MENEZES, Tatiana Prata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Avaliação histomorfométrica e proteômica dos epidídimos de *Calomys tener*, *Necromys lasiurus* e *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae).** Orientadora: Mariana Machado Neves.

O Brasil está entre os países com biomas mais diversos e biologicamente mais ricos. A Mata Atlântica é um *hotspot* global de biodiversidade e o segundo maior bioma brasileiro em diversidade de espécies de mamíferos, no qual 30% deles são endêmicos. A presença de roedores na mata é de extrema importância, uma vez que influenciam a dinâmica das florestas atuando como dispersores de sementes e plântulas. Os roedores sul-americanos da subfamília Sigmodontinae formam um conjunto altamente diverso de mais de 382 espécies, dentre elas os roedores das espécies *Calomys tener*, *Necromys lasiurus* e *Akodon cursor*. Poucos trabalhos sobre os parâmetros reprodutivos dessas espécies foram encontrados e não existem estudos que descrevem o epidídimo dos mesmos. Assim, o objetivo desse trabalho foi descrever e comparar a morfologia, morfometria e proteínas do epidídimo de *C. tener* e *N. lasiurus*. Além disso, foi feita a descrição dos mesmos parâmetros da espécie *A. cursor*, bem como a avaliação da sua produção diária de espermatozoides. Desta forma, fragmentos dos epidídimos de *C. tener* e *N. lasiurus* e epidídimos inteiros de *A. cursor* foram processados para análise morfológica e morfométrica. Da mesma, fragmentos dos epidídimos de *C. tener* e *N. lasiurus* e epidídimos inteiros de *A. cursor* foram utilizados para análise de proteínas presente no fluido. Além disso, epidídimos e testículos de *A. cursor* foram utilizados para análise do tempo de trânsito epididimário. A comparação entre *C. tener* e *N. lasiurus* mostrou que a região da cauda teve os diâmetros, tubular e luminal, maiores quando comparados às outras regiões em *C. tener*. O epidídimo de *N. lasiurus* mostrou diferenças estatísticas entre as suas 3 regiões para os diâmetros tubular e luminal. A altura epitelial não mostrou diferenças entre regiões em cada espécie. O epitélio epididimário de *C. tener* e *N. lasiurus* foi composto de 3 tipos celulares (principal, basal e clara) que foram distribuídas igualmente entre as duas espécies. Na abordagem proteômica, 58 proteínas foram identificadas em *C. tener* e 64 em *N. lasiurus*. *A. cursor* teve o epidídimo morfológica e morfometricamente dividido em 5 regiões (segmento inicial, cabeça, corpo, cauda proximal e cauda distal), no qual o diâmetro tubular da cauda distal, assim como o seu diâmetro luminal, foram maiores

em relação às demais regiões. A comparação em relação à altura epitelial mostrou que o segmento inicial, a cabeça e a cauda proximal obtiveram maior altura epitelial do que o corpo e a cauda distal, sendo que da cabeça foi o maior e da cauda distal o menor. Células principal, basal, estreita e clara foram detectadas no epidídimo de *A. cursor*, sendo a célula estreita presente somente no segmento inicial e a clara nas demais regiões. As células principais foram as mais abundantes em todas as regiões do epidídimo de *A. cursor*, seguido da basal. A média da produção diária de espermatozoides de *A. cursor* foi de 4,07 dias e na abordagem proteômica, foram identificadas 22 proteínas. Pode-se concluir com esse trabalho que o estudo da biologia reprodutiva dessas espécies é importante para estudos futuros, bem como suas diferenças podem servir como parâmetro para estudos taxonômicos.

ABSTRACT

MENEZES, Tatiana Prata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Histomorphometric and proteomic evaluation of the epididymis of *Calomys tener*, *Necromys lasiurus* and *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae).** Adviser: Mariana Machado Neves.

Brazil is among the countries with the most diverse and biologically richest biomes. The Atlantic Forest is a global hotspot of biodiversity and the second largest Brazilian biome in diversity of mammal species, in which 30% of them are endemic. The presence of rodents in the forest is extremely important, since they influence the dynamics of forests acting as seed dispersers and seedlings. South American rodents of the subfamily Sigmodontinae form a highly diverse set of more than 382 species, among them the small wild rodent *Calomys tener*, *Necromys lasiurus* and *Akodon cursor*. Few studies on the reproductive parameters of these species have been found and there are no papers describing the epididymis of these species. Thus, the objective of this work was to describe and compare the morphology, morphometry and proteins of the epididymis of *C. tener* and *N. lasiurus*. In addition, a description was made of the same parameters of the *A. cursor* species, as well as the evaluation of their daily production of spermatozoa. For such, fragments of *C. tener* epididymis and *N. lasiurus* and whole epididymis *A. cursor* were processed for morphological and morphometric analysis. Similarly, fragments of *C. tener* and *N. lasiurus* epididymis and whole epididymis *A. cursor* were used for analysis of proteins present in the fluid. In addition, epididymis and testes of *A. cursor* were used for analysis of epididymal transit time. The comparison between *C. tener* and *N. lasiurus* showed that the cauda region had the tubular and luminal diameters, higher when compared to the other regions in *C. tener*. The epididymis of *N. lasiurus* showed statistical differences between its 3 regions for tubular and luminal diameters. Epithelial height did not show differences between regions in each species. The epididymal epithelium of *C. tener* and *N. lasiurus* was composed of 3 cell types (principal, basal and clear) that were distributed equally between the two species. In the proteomic approach, 58 proteins were identified in *C. tener* and 64 in *N. lasiurus*. *A. cursor* had the morphological and morphometrically divided epididymis in 5 regions (initial segment, caput, corpus, proximal and distal cauda), in which the tubular diameter of the distal cauda, as well as its luminal diameter, were larger in relation to the others regions. The comparison with respect to epithelial height

showed that the initial segment, the caput and the proximal cauda obtained greater epithelial height than the corpus and the distal cauda, with the caput being the largest and the distal cauda the smallest. Principal, basal, narrow and clear cells were detected in the epididymis of *A. cursor*, being the narrow cell present only in the initial segment and the clear cell in the other regions. The principal cells were the most abundant in all regions of the epididymis of *A. cursor*, followed by basal. The mean daily sperm production of was 4.07 days and in the proteomic approach, 22 proteins were identified. It can be concluded with this work that the study of the reproductive biology of these species is important for future studies, as well as their differences can serve as parameter for taxonomic studies.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica está entre os biomas brasileiros com o maior risco de extinção de espécies e perda de biodiversidade, devido ao desmatamento e a fragmentação de suas áreas (Peres 2001; Lambert et al. 2014; Magnago et al. 2014). A preservação dos seus remanescentes florestais depende da ação de vetores de dispersão de sementes e plântulas, como os roedores e morcegos, que atuam diretamente na manutenção de várias espécies de plantas e indiretamente na conservação de espécies animais.

Dentre os roedores, muitos pertencem à subfamília Sigmodontinae, a qual é composta por cerca de 382 espécies, sendo 235 endêmicas da América do Sul (Parada et al. 2015). Roedores como *Calomys tener*, *Necromys lasiurus* e *Akodon cursor* são considerados importantes dispersores de sementes e plântulas. Apesar disso, informações existentes na literatura sobre estes animais são escassas, estando geralmente relacionadas a distribuição geográfica, hábitos alimentares e transmissão de doenças (Alcântara et al. 2000; Chang e Zhang 2014; Lambert et al. 2014; Rozental et al. 2017). Em relação a biologia reprodutiva, pouco se sabe sobre aspectos reprodutivos nestas espécies, principalmente com relação ao epididímo. Foi encontrado um trabalho sobre a caracterização histológica e morfométrica de testículo em *Akodon cursor* (Balarini 2013) e *Necromys lasiurus* (Couto e Talamoni 2005).

O epididímo é um importante órgão do aparelho reprodutor masculino responsável por transportar e estocar os espermatozoides, garantindo concentração celular suficiente no momento da ejaculação. Sabe-se que, em mamíferos, os espermatozoides produzidos no testículo ainda são inférteis e imóveis, sendo que eles ganham a motilidade e a capacidade fecundante quando transitam pelo ducto epididimário, sofrendo o evento da maturação espermática (Cosentino e Cockett 1986; Robaire et al. 2007; Robaire e Hinton 2015). Durante este processo, os espermatozoides entram em contato com uma grande quantidade de proteínas presentes no fluido epididimário, o qual é produzido a partir da intensa atividade de absorção e secreção das células epiteliais (Robaire e Hinton 2015).

A identificação e caracterização dos tipos celulares presentes no epitélio do epididímo pode ser feita por análises microscópicas (Turner et al. 2003). Por outro lado, a identificação das proteínas do ducto pode ser feita pela abordagem da

proteômica, que permite a determinação de substâncias relacionadas ou não às mudanças pelas quais o espermatozoide é submetido nesta fase (Dacheux e Dacheux 2014).

Considerando que o padrão morfológico, morfométrico e de secreção proteica do epidídimo pode ser espécie-específico (Dacheux e Dacheux 2014), formulou-se a hipótese de que há diferenças entre a morfologia e a proteômica do epidídimo de *Calomys tener* e *Necomys lasiurus*, bem como a necessidade de descrição do epidídimo de *Akodon cursor* com base na histofisiologia e secreção de proteínas. Portanto, o objetivo geral desse trabalho foi caracterizar a histofisiologia epididimária comparativa das espécies de *Calomys tener* e *Necomys lasiurus* e a descrição do epidídimo de *Akodon cursor* com os seguintes objetivos específicos:

- Analisar características morfológicas do epidídimo destas espécies, considerando parâmetros macroscópicos e microscópicos, como biometria, histologia e histomorfometria de regiões do órgão, utilizando microscopia de luz;
- Identificar e descrever as proteínas presentes nas diferentes regiões do epidídimo, através da técnica do *shotgun*, e agrupá-las de acordo com a ontologia gênica e interações com outras proteínas, a partir de bancos de dados disponíveis na internet;
- Comparar os resultados obtidos entre as espécies *Calomys tener* e *Necomys lasiurus*;
- Analisar o tempo que os espermatozoides levam para transitar pelo epidídimo de *Akodon cursor*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mata Atlântica e roedores

O Brasil está entre os países com biomas mais diversos e biologicamente mais ricos devido ao fato de possuir áreas de alto valor para a conservação da biodiversidade e fornecer serviços-chave para o ecossistema, como armazenamento de carbono e regulação do clima (Avisar e Werth 2005; Sparovek et al. 2012).

A pressão sobre os biomas brasileiros variou ao longo do tempo e ocorreu, na maioria das vezes, pelo aumento da produção agropecuária (Sparovek et al. 2012). A Mata Atlântica é uma dessas áreas que sofre pressão e, na sua conformação inicial, cobria aproximadamente 15% do território brasileiro (Brondizio e Gurgel 1990). Seu desmatamento teve início no século XVI e acelerou no século XX, restando atualmente menos de 10% da sua área original (Câmara 2003; Tabarelli et al. 2005; Sparovek et al. 2012).

O bioma da Mata Atlântica é um *hotspot* global de biodiversidade e o segundo maior em diversidade de espécies de mamíferos, no qual 30% deles são endêmicos (Canale et al. 2012; Paglia 2012). A presença de roedores na mata é de extrema importância, uma vez que eles influenciam a dinâmica das florestas atuando como dispersores de sementes e plântulas (Fonseca 1989; Sánchez-Cordero e Martínez-Gallardo 1998; Pardini e Umetsu 2006; Paglia 2012).

A densidade populacional das espécies de roedores reflete diretamente na estrutura do bioma, devido ao fato de serem considerados presas para várias espécies, de acordo com os níveis tróficos da cadeia alimentar, bem como a sua abundância contribuir para a maior ou menor população de predadores (Terborgh 1988; 2000). Além disso, a perda de habitat pode influenciar a ocorrência de parasitas em roedores, afetando a relação positiva hospedeiro-parasita tornando-os um importante elo de transmissão de infecções para os seres humanos (Cardoso et al. 2016; Rozental et al. 2017).

A ordem Rodentia abrange aproximadamente 40% da mastofauna sul-americana, totalizando mais de 450 espécies (Paglia 2012). Nesta ordem está inserida à família Cricetidae que agrupa a grande maioria das espécies de roedores da América do Sul e a subfamília Sigmodontinae, que possui um marcado endemismo local (Reig 1984).

Os sigmodontinos compõem aproximadamente 20% das espécies da América do Sul totalizando 382 espécies, sendo 235 endêmicas deste continente (Parada et al. 2015). Segundo Reig (1984), essa subfamília possuía um ancestral relativamente antigo na fauna sul-americana que teria se diferenciado em diferentes episódios cladogênicos locais. A partir de uma linhagem ancestral, eles teriam se incorporado a América do Sul pelo extremo noroeste, tendo origem norte-americana. Nesse momento, deu-se início a uma diferenciação local ativa para distintos tipos de habitat e formas de vida, que estão relacionados a um longo processo adaptativo/evolutivo, pelo qual as espécies foram submetidas (Leite et al. 2014).

A distribuição taxonômica da subfamília Sigmodontinae foi baseada em vários aspectos comparativos, como padrões musculares, diferenças na anatomia das glândulas peniana e acessórias, morfologia estomacal, microestrutura do pelo, parasitas, biogeográfica, morfologia crânio-dentária e cromossômica (Reig 1984; Leite et al. 2014; Lessa et al. 2014).

O gênero *Calomys* compreende 13 espécies conhecidas e que habitam a América do Sul (Quintela et al. 2014). A espécie *Calomys tener* (Fig. 1) possui ampla distribuição nesse subcontinente e é capaz de sobreviver em diversos tipos de ambientes, desde o Cerrado até a Mata Atlântica (Nascimento et al. 2011; Quintela et al. 2014).



Figura 1. Imagem de um exemplar de *Calomys tener* disponível em: <http://www.ib.usp.br/labecoaves/f17.htm> (Acesso em: 13 Jun. 2017).

Necromys lasiurus (Fig. 2), anteriormente denominado *Zygodontomys lasiurus* e *Bolomys lasiurus*, está distribuído em regiões de Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica (Ghizoni et al. 2005). O comportamento alimentar dessa espécie é onívoro, mas alimenta-se preferencialmente de insetos e ocasionalmente de sementes e frutos

(Couto e Talamoni 2005; Ghizoni et al. 2005; Pires et al. 2010). Em relação à biologia reprodutiva, estudos com as gônadas desses animais observou que eles são capazes de reproduzirem ao longo do ano, porém há uma preferência pela estação chuvosa (Magnusson et al. 1995; Couto e Talamoni 2005; Ghizoni et al. 2005).



Figura 2. Imagem de um exemplar de *Necromys lasiurus* disponível em: <http://animaldiversity.org/accounts/Necromys_lasiurus/pictures/collections/contributors/pablo_goncalves/Bolomys3a/> (Acesso em: Acesso em: 13 Jun. 2017).

A espécie *Akodon cursor* (Fig. 3) é endêmica do Brasil, ocorrendo principalmente na Mata Atlântica (D'Andrea et al. 2007; Geise 2012). Essa espécie tem capacidade de se reproduzir ao longo do ano com um aumento exponencial no período chuvoso, devido à disponibilidade de alimento (D'Andrea et al. 2007; Geise 2012).



Figura 3: Imagem de um exemplar de *Akodon cursor* disponível em: Geise (2012) no livro *Mammalian Species*.

2.2. Epidídimo

Das espécies de roedores relatadas não foram encontrados trabalhos que descrevessem características morfofuncionais dos seus epidídimos.

O epidídimo é um órgão do aparelho reprodutor masculino que anatomicamente está localizado ao lado do testículo e ligado a ele pelo ducto eferente, que por sua vez converge para compor o ducto epididimário que dependendo da espécie pode medir desde 1m (camundongos) até 80m (equinos) (Robaire e Hinton 2015).

O ducto epididimário é único, alongado e altamente contorcido, envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo que emite septos para o interior do órgão, dividindo-o em segmentos ou regiões (Robaire e Viger 1995; Toshimori 1998; Primiani et al. 2007; Robaire e Hinton 2015). A quantidade de segmentos varia de acordo com a espécie estudada, sendo geralmente identificadas quatro regiões, denominadas como: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Sullivan et al. 2005; Robaire et al. 2007; Sullivan e Saez 2013; Robaire e Hinton 2015). As regiões epididimárias também podem ser diferenciadas com base na histologia por aspectos morfológicos, morfométricos (análise dos diâmetros tubular e luminal e da altura do epitélio) e funcionais (expressão gênica e restrição do trânsito de moléculas entre elas) (Cornwall e Hann 1995; Turner et al. 2003, 2007; Takano 2007). As funções dos septos de tecido conjuntivo são de dar suporte para o órgão e promover a separação funcional entre as regiões, através da seleção de moléculas que passam de um segmento para outro de modo a criar microambientes específicos (Robaire e Hinton 2015).

A região mais proximal do órgão é o segmento inicial, que é responsável por absorver o fluido oriundo do ducto eferente, além de secretar proteínas que dão início ao processo de maturação dos espermatozoides (Cornwall 2009; Robaire e Hinton 2015). As regiões da cabeça e do corpo são as que mais sintetizam e secretam substâncias, chegando a compor 80% do conteúdo do fluido luminal (Robaire e Hinton 2015). Já a cauda, região distal do órgão, é o local em que ocorrem intensa absorção e secreção dos constituintes do fluido, de modo a promover a manutenção dos componentes do fluido epididimário, além de manter os espermatozoides em estado quiescente e mais concentrados (Robaire e Viger 1995; Gatti et al. 2004).

Histologicamente, o epidídimo possui o epitélio caracterizado como pseudoestratificado, sendo o mesmo contornado por uma membrana limitante denominada de túnica ou lâmina própria, que serve de apoio para as células ali presentes (Clermont e Flannery 1970; Robaire e Hinton 2015). Existem vários tipos de células que compõem o epitélio epididimário, sendo que algumas são localizadas ao longo de todo o ducto (por exemplo, a célula principal) e outras somente em algumas regiões (por exemplo, a célula estreita) (Robaire et al. 2007; Shum et al. 2009; Robaire e Hinton 2015). As principais células identificadas no epitélio do epidídimo são denominadas como: células principais, basais, estreitas e claras (Clermont e Flannery 1970; Cheung et al. 2005; Robaire et al. 2007; Robaire e Hinton 2015).

Cada tipo celular possui os seus constituintes e as funcionalidades amplamente pesquisadas há décadas. As células principais são as mais abundantes em todo o epitélio epididimário, compreendendo de 65-80% do total de células. As suas funções são de síntese e secreção de substâncias (proteínas e lipídios), além de transportar água e íons (Primiani et al. 2007; Robaire e Hinton 2015). Essas células também são responsáveis por absorver íons bicarbonatos da luz do ducto ao longo do epidídimo, mantendo os espermatozoides em um estado latente para que não aconteça o processo de capacitação que é realizado somente no trato reprodutor feminino (Breton et al. 2016).

As células basais, assim como as principais, estão presentes em todas as regiões do epidídimo e é a segunda célula mais abundante (Cornwall 2009; Robaire e Hinton 2015). Sua estrutura é formada por inúmeros prolongamentos laterais que, por meio de fatores parácrinos com a ação da prostaglandina, auxiliam na função de controle do transporte de água pelas células principais e de eletrólitos nas células claras (Leung et al. 2004; Cheung et al. 2005; Robaire e Hinton 2015). Para tal função, as células basais também emitem prolongamentos citoplasmáticos que podem alcançar o lúmen do ducto epididimário de modo a detectar a presença de angiotensina II que coordena sua atividade (Shum et al. 2008, 2011). As células estreitas, presentes somente no segmento inicial, e as células claras, encontradas nas demais regiões, são responsáveis pela acidificação do fluido luminal (pH 6,5), para a manutenção dos espermatozoides em estado quiescente (Cooper 2007; Cornwall 2009; Shum et al. 2009; Robaire e Hinton 2015). A função de acidificação do fluido epididimário se deve pela presença das enzimas V-ATPase vacuolar e anidrase

carbônica II que são liberadas conforme o pH do lúmen vai se tornando alcalino (Robaire e Hinton 2015; Breton et al. 2016). Além disso, as células claras também realizam a endocitose do conteúdo da gota citoplasmática que é liberada pelo espermatozoide conforme o mesmo vai se tornando maduro (Robaire e Hinton 2015).

Tratando-se de um órgão altamente andrógeno-dependente, o epidídimo tem sua ação controlado pela testosterona e a 5α -di-hidrotestosterona que, por sua vez, se ligam a receptores específicos presentes ao longo de todo o epitélio epididimário (Robaire et al. 2007). Esses hormônios atuam regulando o funcionamento das células epididimárias de forma a controlar a transcrição gênica e a secreção de proteínas, influenciando a composição do fluido presente na luz do ducto e, indiretamente, na qualidade espermática (Robaire e Viger 1995; Primiani et al. 2007; Hamzeh e Robaire 2009).

Funcionalmente, o epidídimo é um importante órgão do aparelho reprodutor masculino, pois é nele que ocorre o transporte, a maturação e o armazenamento dos espermatozoides (Orgebin-Crist 1969; Robaire e Viger 1995; Gatti et al. 2004; Robaire e Hinton 2015). A maturação espermática é o evento definido pela aquisição da capacidade fertilizante do gameta masculino, onde o espermatozoide passa por modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. É através dessas alterações que o espermatozoide ganha a motilidade progressiva e capacidade de reconhecer e se ligar a zona pelúcida do gameta feminino. O armazenamento é uma característica adaptativa, que garante a quantidade e qualidade de espermatozoides em um ejaculado suficiente para fecundar o ovócito (Orgebin-Crist 1969; Toshimori 1998; Cooper e Yeung 2003; Gatti et al. 2004; Sullivan et al. 2005; Cooper 2007; Jones et al. 2007).

As proteínas presentes no fluido são capazes de atuar de diferentes formas na funcionalidade do órgão, no qual cada região realiza a secreção de um determinado grupo de proteínas, mudando a composição e as características do fluido ao longo do epidídimo (Robaire e Viger 1995). Algumas dessas proteínas interagem com o espermatozoide a fim de modificar proteínas de membrana ou alterar seus demais componentes (Dacheux et al. 2003; Gatti et al. 2004; Sullivan e Saez 2013). Além disso, existem proteínas que formam um revestimento nos gametas masculinos e são mantidas por interações eletrostáticas (Sullivan e Saez 2013). Por outro lado, proteínas como a ubiquitina são capazes de se ligar aos espermatozoides defeituosos,

promovendo sua degradação e remoção, evitando assim a aglomeração de gametas inviáveis para o processo reprodutivo (Sullivan e Saez 2013; Păunescu et al. 2014).

A aquisição da motilidade progressiva é um dos processos mais importantes em que os espermatozoides são submetidos em seu trânsito pelo epidídimo (Dacheux e Dacheux 2014; Siervo et al. 2016). Durante esse processo, espécies reativas de oxigênio (ROS) atuam na remodelação morfológica desses gametas e na ativação de vias intracelulares que levam ao desenvolvimento da motilidade (Du Plessis et al. 2015; Siervo et al. 2016). Por outro lado, o desequilíbrio de ROS, é capaz de causar patologias e tornar os espermatozoides inviáveis para reprodução fazendo-se necessária a presença de proteínas que terão o papel de controlar seus níveis, como por exemplo, a superóxido dismutase Cu Zn (Du Plessis et al. 2015; Siervo et al. 2016).

Desta forma, o estudo do epidídimo e a sincronia dos mecanismos pós-testiculares realizados no mesmo devem ser avaliados de modo a entender os processos responsáveis pela fertilidade masculina (Légaré et al. 2017).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA JM, REY PJ, SÁNCHEZ-LAFUENTE AM, VALERA F (2000). Early effects of rodent post-dispersal seed predation on the outcome of the plant-seed disperser interaction. *Oikos* 88:362–370.
- AVISSAR R, WERTH D (2005) Global hydroclimatological teleconnections resulting from tropical deforestation. *Journal of Hydrometeorology* 6:134–145.
- BALARINI MK (2013) Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico dos roedores silvestres *Akodon cursor* e *Oligoryzomys nigripes* (RODENTIA : Cricetidae). Viçosa UFV - Minas Gerais Brasil: 94.
- BRETON S, RUAN Y, PARK Y-J, KIM B (2016) Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. *Asian Journal of Andrology* 18:3.
- BRONDIZIO ES, GURGEL PC (1990) Atlas dos Remanescentes Florestais do Domínio Mata Atlântica[[n1]]Atlas of the Atlantic Forest remnants in Brazil. In: Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, vol. 560. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, São José dos Campos, S.P., (16 sagres, 18 maps, 35 pages):736–741.

- CAMARA IG (2003) Brief history of conservation in the Atlantic Forest. In: Galindo-Leal, C., Camara, I. (Eds.), *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook*. Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International, Island Press, Washington, pp. 31–42.
- CANALE GR, PERES CA, GUIDORIZZI CE, GATTO CAF, KIERULFF MCM (2012) Pervasive defaunation of forest remnants in a tropical biodiversity hotspot. *Plos One* 7:e41671.
- CARDOSO TS, SIMÕES RO, LUQUE JL, MALDONADO A, GENTILE R (2016) The influence of habitat fragmentation on helminth communities in rodent populations from a Brazilian Mountain Atlantic Forest. *Journal of Helminthology* 90:460-8.
- CHANG G, ZHANG Z (2014) Functional traits determine formation of mutualism and predation interactions in seed-rodent dispersal system of a subtropical forest. *Acta Oecologica* 55:43–50.
- CHEUNG K, LEUNG GPH, LEUNG MCT, SHUM WWC, ZHOU W, WONG PYD (2005) Cell–cell Interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. *The Journal of General Physiology* 125:443–454.
- CLERMONT Y, FLANNERY J (1970) Mitotic activity in the epithelium of the epididymis in young and old adult rats. *Biology of Reproduction* 3:283–292.
- COOPER TG (2007) Sperm maturation in the epididymis: A new look at an old problem. *Asian Journal of Andrology* 9:533–539.
- COOPER TG, YEUNG CH (2003) Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microscopy Research and Technique* 61:28–38.
- CORNWALL GA (2009) New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update* 15:213–227.
- CORNWALL GA, HANN R (1995) Specialized gene the epididymis expression in minireview. *Journal of Andrology* 16:379–383.
- COSENTINO MJ, COCKETT AT (1986) Structure and function of the epididymis. *Urological Research* 14:229–240.
- COUTO D, TALAMONI SA (2005) Reproductive condition of *Akodon montensis* Thomas and *Bolomys lasiurus* (Lund) (Rodentia, Muridae) based on histological and histometric analyses of testes and external characteristics of gonads. *Acta Zoologica* 86:111–118.

- D'ANDREA PS, GENTILE R, MAROJA LS, FERNANDES FA, COURA R, CERQUEIRA R (2007) Small mammal populations of an agroecosystem in the Atlantic Forest domain, southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia* 67:179–186.
- DACHEUX JL, DACHEUX F (2014) New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* 147:27–42.
- DACHEUX JL, GATTI JL, DACHEUX F (2003) Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy Research and Technique* 61:7–17.
- DU PLESSIS SS, AGARWAL A, HALABI J, TVRDA E (2015) Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32:509–520.
- FONSECA GAB (1989) Small mammal species diversity in Brazilian tropical primary and secondary forests of different sizes. *Revista Brasileira de Zoologia* 6:381–422.
- GATTI JL, CASTELLA S, DACHEUX F, ECROYD H, MÉTAYER S, THIMON V, DACHEUX J-L (2004) Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science* 82–83:321–339.
- GEISE L (2012) *Akodon cursor* (Rodentia: Cricetidae). In *Mammalian Species* 44:33-43
- GHIZONI IR, LAYME VMG, LIMA AP, MAGNUSSON WE (2005) Dinâmica populacional espacialmente explícita em uma população decrescente do roedor tropical, *Bolomys Lasiurus*. *Journal of Mammalogy* 86:677-682.
- HAMZEH M, ROBAIRE B (2009) Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. *Journal of Andrology* 30:200–212.
- JONES RC, DACHEUX JL, NIXON B, ECROYD HW (2007) Role of the epididymis in sperm competition. *Asian Journal of Andrology* 9:493–499.
- LAMBERT TD, SUMPTER KL, DITTEL JW, DUPRE S, CASANOVA K, WINKER A, ADLER GH (2014) Roads as barriers to seed dispersal by small mammals in a neotropical forest. *Tropical Ecology* 55:263–269.
- LÉGARÉ C, AKINTAYO A, BLONDIN P, CALVO E, SULLIVAN R (2017) Impact of male fertility status on the transcriptome of the bovine epididymis. *Molecular Human Reproduction* 23:355-369.

- LEITE RN, Kolokotronis S-O, Almeida FC , Werneck FP , Rogers DS, Weksler M (2014) In the Wake of Invasion: Tracing the Historical Biogeography of the South American Cricetid Radiation (Rodentia, Sigmodontinae). *Plos One* 9:e100687-e.
- LESSA EP, COOK JA, D'ELÍA G, OPAZO JC (2014) Rodent diversity in South America: transitioning into the genomics era. *Frontiers in Ecology and Evolution* 39:1-7.
- LEUNG GPH, CHEUNG KH, LEUNG CT, TSANG MW, WONG PYD (2004) Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: Role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Molecular and Cellular Endocrinology* 216:5–13.
- MAGNAGO LFS, EDWARDS DP, EDWARDS FA, MAGRACH A, MARTINS SV, LAURANCE WF (2014) Functional attributes change but functional richness is unchanged after fragmentation of Brazilian Atlantic forests. *Journal of Ecology* 102:475–485.
- MAGNUSSON WE, FRANCISCO AL, SANAIOTTI TM (1995) Home-Range size and territoriality in *Bolomys lasiurus* (Rodentia: Muridae) in an Amazonian savanna. *Journal of Tropical Ecology* 11:179–188.
- NASCIMENTO FF, PEREIRA LG, GEISE L, BEZERRA AMR, D'ANDREA PS, BONVICINO CR (2011) Colonization process of the brazilian common vesper mouse, *Calomys expulsus* (Cricetidae, Sigmodontinae): A biogeographic hypothesis. *Journal of Heredity* 102:260–268.
- ORGBIN-CRIST MC (1969) Studies on the Function of the Epididymis¹. *Biology of Reproduction* 1:155–175.
- PAGLIA AP (2012) Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição - Annotated checklist of Brazilian mammals 2nd Edition. *Occasional Papers in Conservation Biology*.
- PARADA A, D'ELÍA G, PALMA RE (2015) The influence of ecological and geographical context in the radiation of Neotropical sigmodontine rodents. *BMC Evolutionary Biology* 15:172.
- PARDINI R, UMETSU F (2006) Pequenos mamíferos não-voadores da Reserva Florestal do Morro Grande: distribuição das espécies e da diversidade em uma área de Mata Atlântica. *Biota Neotropica* 6:0–0.

- PĂUNESCU TG, SHUM WWC, HUYNH C, LECHNER L, GOETZE B, BROWN D, BRETON S (2014) High-resolution helium ion microscopy of epididymal epithelial cells and their interaction with spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 20:929–937.
- PERES CA (2001) Synergistic Effects on Amazonian Forest Vertebrates Fragmentation. *Conservation Biology* 15:1490–1505.
- PIRES AS, FERNANDEZ FAS, FELICIANO BR, FREITAS D (2010) Use of space by *Necomys lasiurus* (Rodentia, Sigmodontinae) in a grassland among Atlantic Forest fragments. *Mammalian Biology* 75:270–276.
- PRIMIANI N, GREGORY M, DUFRESNE J, SMITH CE, LIU YL, BARTLES JR, CYR DG, HERMO L (2007) Microvillar size and espin expression in principal cells of the adult rat epididymis are regulated by androgens. *Journal of Andrology* 28:659–69.
- QUINTELA FM, SILVEIRA EC, DELLAGNESE DG, CADEMARTORI CV (2014) *Calomys tener* (Winge, 1887) (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae): Filling gaps. *Check List* 10:650–654.
- REIG OA (1984) Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). *Revista Brasileira de Genética* 2:333-365.
- ROBAIRE B, HINTON BT (2015) The Epididymis. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Fourth Edition. Elsevier, Cambridge, United Kingdom:691-771.
- ROBAIRE B, SEENUNDUN S, HAMZEH M, LAMOUR SA (2007) Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. *Asian Journal of Andrology* 9:545–553.
- ROBAIRE B, VIGER RS (1995) Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of reproduction* 52:226–236.
- ROZENTAL T, FERREIRA MS, GUTERRES A, MARES-GUIA MA, TEIXEIRA BR, GONÇALVES J, BONVICINO CR, D'ANDREA PS, LEMOS ERS (2017) Zoonotic pathogens in Atlantic Forest wild rodents in Brazil: *Bartonella* and *Coxiella* infections. *Acta Tropica* 168:64-73.
- SÁNCHEZ-CORDERO VS, MARTÍNEZ-GALLARDO RM (1998) Postdispersal fruit and seed removal by forest-dwelling rodents in a lowland rainforest in Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 14:139–151.

- SHUM W, RUAN Y, SILVA N, BRETON S (2011) Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: Control of luminal acidification. *Journal of Andrology* 32:576–586.
- SHUM WWC, SILVA N, BROWN D, BRETON S (2009) Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *The Journal of Experimental Biology* 212:1753–1761.
- SHUM WWC, SILVA N, MCKEE M, SMITH PJS, BROWN D, BRETON S (2008) Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell* 135:1108–1117.
- SIERVO GE, OGO FM, VALÉRIO AD, SILVA TN, STAURENGO-FERRARI L, ALVARENGA TA, CECCHINI R, JR VERRI WA, GUARNIER FA, ANDERSEN ML, FERNANDES GS (2016) Sleep restriction in Wistar rats impairs epididymal postnatal development and sperm motility in association with oxidative stress. *Reproduction, Fertility, and Development* 26:A-H.
- SPAROVEK G, BERNDES G, BARRETTO AGOP, KLUG ILF (2012) The revision of the Brazilian forest act: Increased deforestation or a historic step towards balancing agricultural development and nature conservation? *Environmental Science and Policy* 16:65–72.
- SULLIVAN R, SAEZ F (2013) Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: Their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction* 146:R21-R35.
- 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, and Diseases* 35:1–10.
- TABARELLI M, PINTO LP, SILVA JMC, HIROTA M, BEDE L (2005) Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic forest. *Conservation Biology* 19:695–700.
- TAKANO H (2007) Histological division of mouse epididymis based on regional differences. *Hirosaki University Repository for Academic Resources* 59:S292–S301.
- TERBORGH J (1988) *The Big Things that Run The World-A Sequel to EO Wilson* Author (s): John Terborgh Published by : Blackwell Publishing for Society for Conservation Biology Stable. *Conservation Biology* 2:402–403.

- TERBORGH J (2000) The fate of tropical forests: A matter of stewardship. *Conservation Biology* 14:1358–1361.
- TOSHIMORI K (1998) Maturation of mammalian spermatozoa: Modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell and Tissue Research* 293:177–187.
- TURNER TT, BOMGARDNER D, JACOBS JP, NGUYEN QAT (2003) Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 125:871–878.
- TURNER TT, JOHNSTON DS, JELINSKY SA, TOMSIG JL, FINGER DJN (2007) Segment boundaries of the adult rat epididymis limit interstitial signaling by potential paracrine factors and segments lose differential gene expression after efferent duct ligation. *Asian Journal of Andrology* 9:565–573.

ARTIGO 1

Proteomes and morphological features of *Calomys tener* and *Necromys lasiurus* (Cricetidae, Sigmodontinae) epididymides

Doi: 10.1093/jmammal/gyw201

Abstract

Environmental factors, including exposure to anthropogenic factors such as endocrine disruptors, can affect the luminal fluid of the epididymides in which sperm reside during maturation, causing male reproductive dysfunction. We describe and compare epididymal morphology, histomorphometry, and proteomes of *Calomys tener* and *Necromys lasiurus*, 2 species of South American sigmodontine rodent whose reproductive biology has been little studied. Five *C. tener* and 6 *N. lasiurus* were collected in a protected area of Atlantic Forest (Minas Gerais State, Brazil), where exposure to anthropogenic influences should be minimal. The left epididymis was processed for histological analysis under light microscopy, and the right was used to assess protein expression using shotgun proteomics. *Calomys tener* presented higher mean values for luminal and tubular diameters than *N. lasiurus* in the caput region. We observed similar morphologies and relative frequencies in the epididymal epithelium of principal, basal, and clear cells in the 2 species. Shotgun proteomics detected 58 and 64 proteins in 1 or more epididymal regions of *C. tener* and *N. lasiurus*, respectively. Aldose reductase, superoxide dismutase Cu-Zn, carboxylesterase 5A, and clusterin were only detected in the epididymis of *N. lasiurus*. The epididymides of *C. tener* and *N. lasiurus* differed in both histomorphometry and protein expression, suggesting that describing the epididymis in closely related species may provide a complementary tool for taxonomic studies. Knowledge of epididymal histophysiology helps establish a foundation for better understanding of the reproductive biology of these rodents, and our data from a protected area create a baseline for studies investigating the effects of environmental endocrine disruptors on functionality of the epididymal epithelium.

Key words: Atlantic Forest, epididymal epithelium, histomorphometry, reproductive biology, shotgun proteomics, small wild rodents

Introduction

The epididymis is a thin, long, highly convoluted tubule lined by an epithelium comprised mainly of principal and basal cells, in addition to narrow, apical, halo, and clear cells, depending on the species (Arrighi 2014). With the exception of halo cells, these cells orchestrate processes of secretion and absorption of proteins, ions, water, and protons into and from the epididymal lumen. They contribute to the establishment of a luminal environment suitable for sperm maturation, concentration, and storage (Robaire and Hinton 2015). Indeed, epididymal proteins interact strongly with sperm causing morphological and functional modifications during their transit through the epididymis (Cornwall 2009; Dacheux and Dacheux 2014).

The luminal fluid in which sperm reside during maturation can be modified by lifestyle and environmental factors, causing male reproductive dysfunctions as described for humans (Aitken 2013). In this way, animals exposed to anthropogenic environments can be affected as well.

Calomys tener and *Necromys lasiurus* are small sigmodontines occupying open areas of Cerrado and Atlantic Forest edges. Their subfamily Sigmodontinae is the most diverse and widely distributed mammalian group in the Western Hemisphere (Rosalino et al. 2013; Salazar-Bravo et al. 2013). While the monophyly of this subfamily is supported by molecular data, the morphological heterogeneity of the group hinders diagnosis is based on morphological characters (Pacheco 2003). Traditionally, sigmodontine genera have been united in groups, and most of them are properly recognized at the tribal level. *Necromys lasiurus* is classified within the tribe Akodontini (D'Elía et al. 2007), whereas *C. tener* is a member of the tribe Phyllotini (Salazar-Bravo et al. 2013).

There is little information about the reproductive biology of either species, including the physiology and morphology of the epididymis. We describe and compare histological parameters and protein expression of the epididymides of *C. tener* and *N. lasiurus* from a protected area in the Atlantic Forest of Brazil, where they are unlikely to be exposed to disruptive anthropogenic factors. Our data add to an understanding of the reproductive biology of sigmodontine rodents, provide a baseline for comparison to more disturbed sites, and suggest the possibility that descriptions of the epididymides may be of utility in taxonomic studies.

Materials and Methods

Animal capture.—Animal sampling was performed at a preserved fragment of Atlantic Forest (20°81'S, 42°85'W) located in the private reserve of natural heritage (PRNH) Rubens Rezende Fontes in Minas Gerais State, Brazil, from July to December 2012. Sexually mature rodents were trapped using Sherman (H. B. Sherman Traps, Inc., Tallahassee, Florida), Tomahawk (Tomahawk Live Trap Co., Hazelhurst, Wisconsin), and pitfall traps (e.g., Barros et al. 2015; Kluever et al. 2016). Permits for field collection were provided by Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio; number 22289-1). This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. All experimental procedures were reviewed and approved by the Committee on the Ethics and Use of Animal Experiments of Federal University of Viçosa (UFV/ CEUA process number 09/2012), and conformed to the guidelines for the use of wild mammals in research of the American Society of Mammalogists (Sikes et al. 2016).

Epididymis collection.—Five *C. tener* (19.61 ± 2.89 g) and 6 *N. lasiurus* (24.85 ± 3.44 g) were sedated with xylazine hydrochloride (10 mg/kg intramuscular), anesthetized with ketamine hydrochloride (150 mg/kg intramuscular), and euthanized (Souza et al. 2016). Epididymides were removed, dissected (Figs. 1A and 1B), and weighed. The epididymal somatic index (ESI) was obtained by computing the ratio between epididymis weight (EW) and body weight (BW), where $ESI = EW/BW \times 100$. The left epididymis was used for histology and the right was used for proteomic analysis. Analyses were conducted on the caput, corpus, and cauda regions.

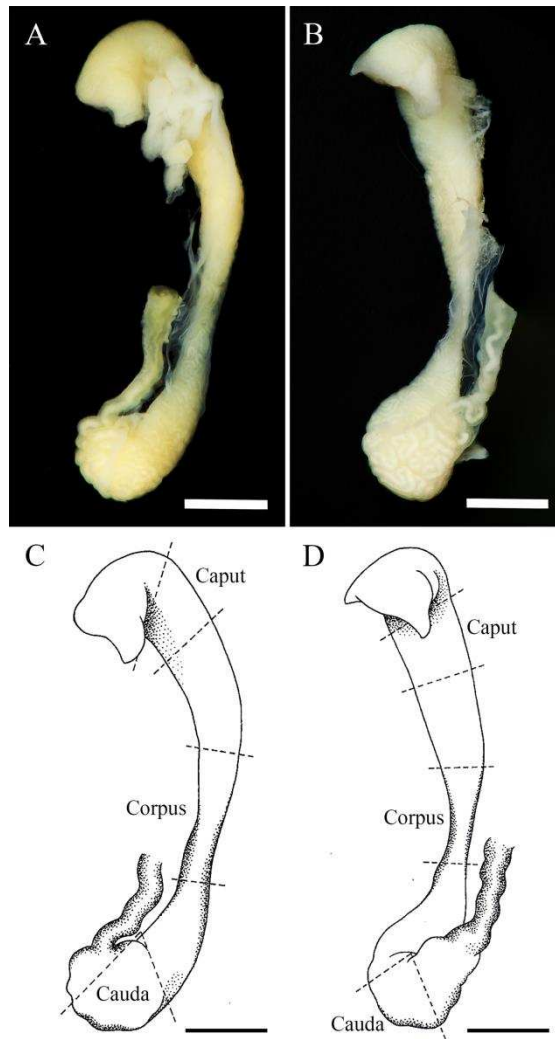


Fig. 1.—Epididymis of *Calomys tener* (A and C) and *Necromys lasiurus* (B and D) showing 3 anatomical regions: caput, corpus, and cauda. Bars: 1.5 mm (photos: José Lino Neto and Camila Folly Baptista).

Histological procedure for light microscopy.—The entire epididymides were immersed in Karnovsky fixative solution (2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde in 0.1 M pH 7.2 sodium phosphate buffer), dehydrated in crescent ethanol series (70%, 80%, 90%, and 100%), and embedded in 2-hydroxyethyl methacrylate (Historesin, Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, Illinois). Sections with a thickness of 3 μ m were stained with toluidine blue-sodium borate (1%), and qualitatively analyzed using light microscope (Olympus BX41; Olympus Corp., Center Valley, Pennsylvania).

Epididymal histomorphometry.—For morphometric analysis, digital images of the 3 epididymal regions were obtained using a light microscope (Olympus BX53) equipped with a digital camera (Olympus DP73) and analyzed with Image-Pro Plus 4.5 (v. 4.0—Media Cybernetics Inc., Rockville, Maryland) software. The mean tubular diameter of each epididymal region was obtained by measuring at random 20 tubular cross sections, as circular as possible, per animal (n = 4 animals per species). These sections were also used to measure the luminal diameter and epithelial height, which was obtained between the tunica propria to tubular lumen. The epithelial height for each tubule was estimated as the average of 4 diametrically opposed measurements (Souza et al. 2016).

The relative distribution of epithelial cell types in the epididymis was estimated by cell count in different sections of the duct (Beu et al. 2009). Cells were counted in 10 sections per region per animal. The result of the crude cell count was corrected by applying Amann's formula (Amann 1962): [cell number] × [section thickness/section thickness + $\sqrt{(\text{nuclear diameter of the cell}/2)^2 - \sqrt{(\text{nuclear diameter of the cell}/4)^2}$]. This calculation provides a corrected value for the number of cells counted in histological sections.

Proteomic analysis.—The right epididymis from 5 *C. tener* and 6 *N. lasiurus* were divided into caput, corpus, and cauda regions (Figs. 1C and 1D). Each fragment was put immediately into separated Petri dishes and cut several times. Thereafter, each sample was immersed in a microtube containing 0.01 M PBS with protease inhibitors (Protease Inhibitor cocktail P8340; Sigma-Aldrich, Urbana, Illinois—Martins et al. 2013), where they were maintained for 10 min in order to facilitate delivery of epididymal fluid. Then, the microtubes were centrifuged at 700 rpm for 10 min at 4°C. The recovered supernatant was centrifuged again at 14,000 rpm for 10 min at 4°C. The resulting supernatant was recovered and evaluated under light microscopy to detect any contamination with red blood cells, epithelial cells, and spermatozoa. Samples were stored at -20°C until processing for mass spectrometry.

Epididymal fluid samples were concentrated to 10 µl at room temperature and subsequently diluted in deionized water (50 µl) and 50 mM sodium bicarbonate (10 µl), followed by warming at 80°C for 30 min and centrifuging at 10,000 rpm for 10 min. Thereafter, we added 2.5 µl dithiothreitol (DTT; 100 mM) to each sample, resulting in the sample being alkylated with iodoacetamide (IAA; 300 mM). The samples were stirred, warmed at 60°C for 30 min, and centrifuged at 10,000 rpm for

10 min. Trypsin (400 ng; Promega, Madison, Wisconsin, Cat. # V5111) was added to samples with 50 µg of total proteins that were maintained at 37°C overnight (van Tilburg et al. 2015). The protein digestion was quenched with 10 µl of trifluoroacetic acid (5%) for 90 min at 37°C. Samples were then centrifuged (14,000 rpm for 30 min at 6°C), and the supernatant was transferred to microtubes. The extracts were concentrated and resuspended in 10 µl of 5% acetonitrile containing 0.1% formic acid and transferred to injection vials.

Peptides resulting from the digestion were analyzed by capillary chromatography coupled to mass spectrometry (capillary liquid chromatography/tandem nanoelectrospray ionization mass spectrometry [CapLC-MS/MS]) using a SYNAPT G2 HDMS spectrometer. The spectrometer was connected to a liquid chromatography unit of ultra-performance (UPLC) nanoACQUITY in the Proteomics Unit of the Faculty of Pharmacy, University of Fortaleza, as described by Souza et al. (2012).

The spectrometer was operated to acquire MS/MS spectra of tryptic peptides in MSE mode, using the charge state recognition and strength limit as selection criteria through the MassLynx 4.1 application. One scan was performed at 2 s mass ratio data/charge (m/z) between 400 and 1500 to obtain MS/MS data. All ions were subjected to the dissociation induced by collision process (DIC) in the presence of argon. The resulting ion spectra (6–8 s) were processed using the Protein Lynx Global Server 2.5 application and converted into peak list files (PKL) to search in databases. For identification of proteins, the searches were conducted using the Protein Lynx Global Server 4.1 application against the database of the order Rodentia in the Swissprot database following the criteria: maximum 1 missed cleavage of trypsin, monoisotopic peptides with variable modification of the methionine oxidation, and fixed carbamidomethylation variation of the cysteines. The selected mass limits of tolerance for the variation of the peptides and fragments are 0.3 and 0.1 Da, respectively.

Gene ontology.—Data from epididymal protein identification obtained after MASCOT search were analyzed using software for protein research notes (STRAP), an open-source application for the 2 species. The gene ontology terms for biological processes, cellular components, and molecular function were obtained from databases and UniProtKB EBI GOA (Bhatia et al. 2009).

Statistical analysis.—Analysis of variance (ANOVA) was used to compare histomorphometric parameters (epithelial height, and tubular and luminal diameters) of epididymides within and between species, considering a level of significance of 5%. First, we considered epididymal regions as factors (caput, corpus, and cauda) and histomorphometric parameters as response variables, comparing regions within each species. Then, we performed a posteriori Tukey's HSD test to account for the differences between each pair of factors (Zar 2010). We also compared the same histomorphometric features from each epididymal region between species. We chose ANOVA since it is considered the most powerful test to compare 2 or more factors (explanatory variables or treatments). Moreover, all of our response variables followed the ANOVA premises, which are normal distributions and homogeneous variances (Zar 2010). Results were expressed as mean \pm SE.

Results

Epididymis morphology and histomorphometry.—Epididymis weight and epididymal somatic index in *C. tener* and *N. lasiurus* were, respectively, 0.04 ± 0.014 g and 0.048 ± 0.005 g, and $0.189 \pm 0.05\%$ and $0.202 \pm 0.02\%$. In regard to histological aspects, the epididymis in *C. tener* and *N. lasiurus* presented many septa of connective tissue that became thinner when in contact with the duct sections, forming the intertubular compartment rich in blood vessels (Figs. 2A–F), lymph vessels, fibroblast, macrophages, and mast cells. The tubular compartment was composed of a tunica propria and a columnar pseudostratified epithelium covering the epididymal duct and delimiting the lumen with sperm (Figs. 2A–F). A thick layer of smooth muscle in the cauda region was easily identified around the duct sections (Figs. 2E and 2F).

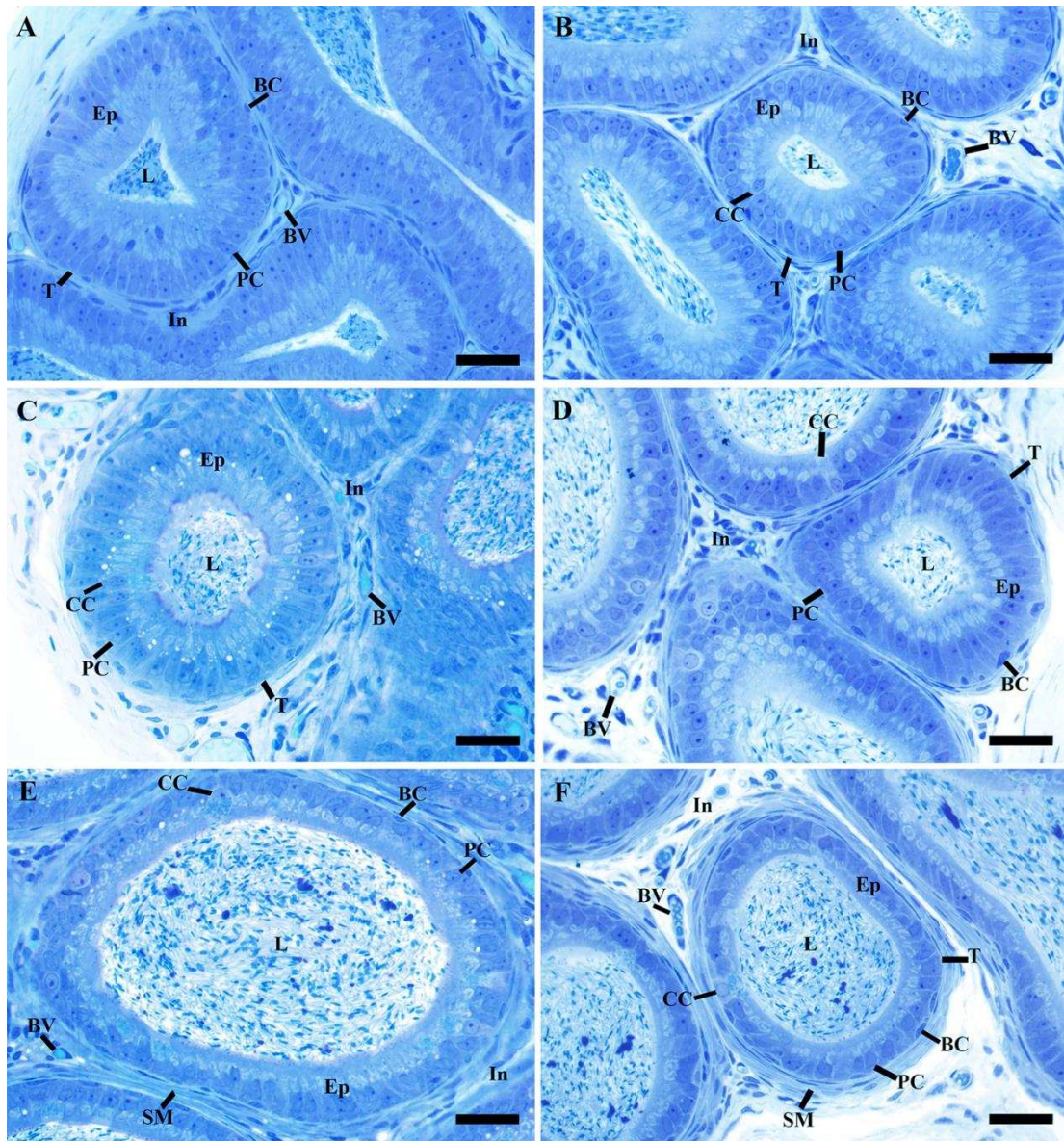


Fig. 2.—Photomicrographs of epididymal regions in *Calomys tener* (A, C, and E) and *Necromys lasiurus* (B, D, and F). Epithelium (Ep), intertubular compartment (In), lumen (L), blood vessels (BV), tunica propria (T), principal (PC), basal (BC), and clear (CC) cells, and smooth muscle (SM) cells. A and B: caput; C and D: corpus; E and F: cauda. Tissue samples were stained with toluidine blue. Bars: 20 μ m.

Epididymal regions were identified by histological features such as epithelial height, and tubular and luminal diameters (Fig. 2). The cauda region (Fig. 2E) presented the highest tubular ($F_{2,9} = 5.68$, $P = 0.025$) and luminal diameters ($F_{2,9} = 14.16$, $P = 0.002$) when compared to the other regions in *C. tener* (Table 1; Figs. 2A and 2C). The epididymis of *N. lasiurus* (Figs. 2B, 2D, and 2F) showed statistical differences among its 3 regions for tubular ($F_{2,9} = 41.26$, $P \ll 0.001$) and luminal

diameters ($F_{2,9} = 135.31$, $P \ll 0.001$; Table 1). The epithelial height did not show differences among regions in each species (*C. tener*: $F_{2,9} = 1.5$, $P = 0.27$; *N. lasiurus*: $F_{2,9} = 3.96$, $P = 0.058$). Moreover, *C. tener* showed the highest values for luminal ($F_{1,6} = 64.37$, $P \ll 0.001$) and tubular ($F_{1,6} = 12.32$, $P = 0.013$) diameters in the caput region when compared to *N. lasiurus* (Table 1).

Table 1.—Histomorphometry of the epididymis in *Calomys tener* and *Necromys lasiurus*. Mean \pm SE. Upper case superscript letters (A, B, C) in the same column indicate differences among epididymis region ($P < 0.05$) by Tukey’s test. Lower case superscript letters (a, b) in the same row indicate differences among species ($P < 0.05$) by Tukey’s test.

	Epididymis region	<i>Calomys tener</i>	<i>Necromys lasiurus</i>
Tubular diameter (μm)	Caput	127.7 \pm 9.3 ^{Ba}	82.1 \pm 3.3 ^{Cb}
	Corpus	133.9 \pm 11.5 ^{Ba}	108.3 \pm 6.5 ^{Ba}
	Cauda	206.7 \pm 19.0 ^{Aa}	164.1 \pm 4.4 ^{Aa}
Luminal diameter (μm)	Caput	63.3 \pm 3.2 ^{Ba}	27.8 \pm 0.9 ^{Cb}
	Corpus	76.7 \pm 5.1 ^{Ba}	59.7 \pm 4.7 ^{Ba}
	Cauda	158.9 \pm 16.1 ^{Aa}	123.6 \pm 2.7 ^{Aa}
Epithelial height (μm)	Caput	32.2 \pm 3.4 ^{Aa}	27.1 \pm 1.8 ^{Aa}
	Corpus	28.6 \pm 3.4 ^{Aa}	24.3 \pm 1.1 ^{Aa}
	Cauda	23.9 \pm 1.9 ^{Aa}	20.3 \pm 0.9 ^{Aa}

The epididymal epithelium was essentially composed of 3 cell types, identified under light microscopy as principal, basal, and clear cells (Fig. 3). Their structure and shape were similar in *C. tener* and *N. lasiurus*. Principal cells were the most abundant cell type along the epididymal duct, characterized by a columnar shape. Their nuclear shape was elongated in some histological sections (Fig. 3A), but it was predominantly spherical in the caput (Fig. 3C), corpus (Figs. 3B and 3D), and cauda regions. Basal cells were also observed along the epididymal epithelium. However, they were located in the basal portion, close to the tunica propria. The nuclei of these cells were observed in elongated or rounded format (Figs. 3A and 3C). Clear cells were identified in the 3 regions as a columnar cell intercalated among adjacent principal cells, showing oval, lightly stained, basally arranged nuclei with conspicuous nucleoli. The apical cytoplasm of these cells was also lightly stained, except for vesicles located in the supranuclear portion (Figs. 3C and 3D).

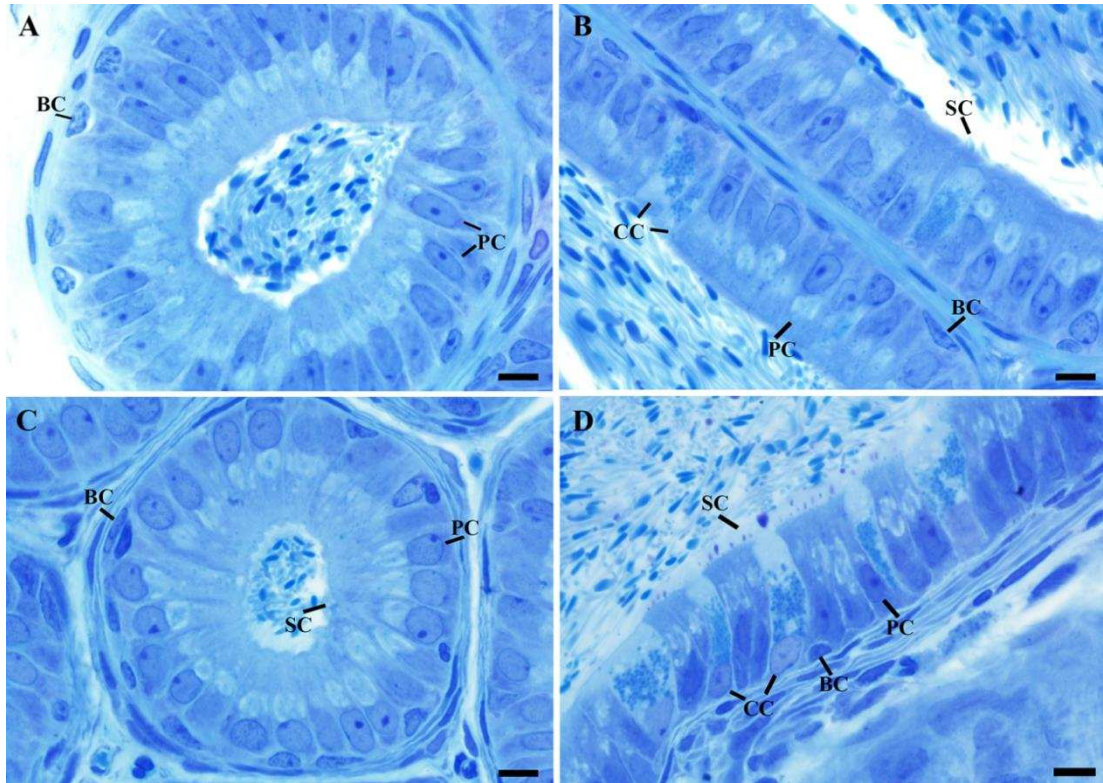


Fig. 3.—Photomicrographs of the epididymis caput and corpus in *Calomys tener* (A and B) and *Necromys lasiurus* (C and D), showing principal (PC), basal (BC), clear (CC) cells, and the stereocilia (SC). Tissue samples were stained with toluidine blue. Bars: 5 µm.

With regards to the relative frequency of epithelial cell types, principal cells were the most predominant throughout the epididymis, followed by basal and clear cells (Figs. 4A–C). There was no significant difference between species for the distribution of cells in each segment (Supplementary Data SD1).

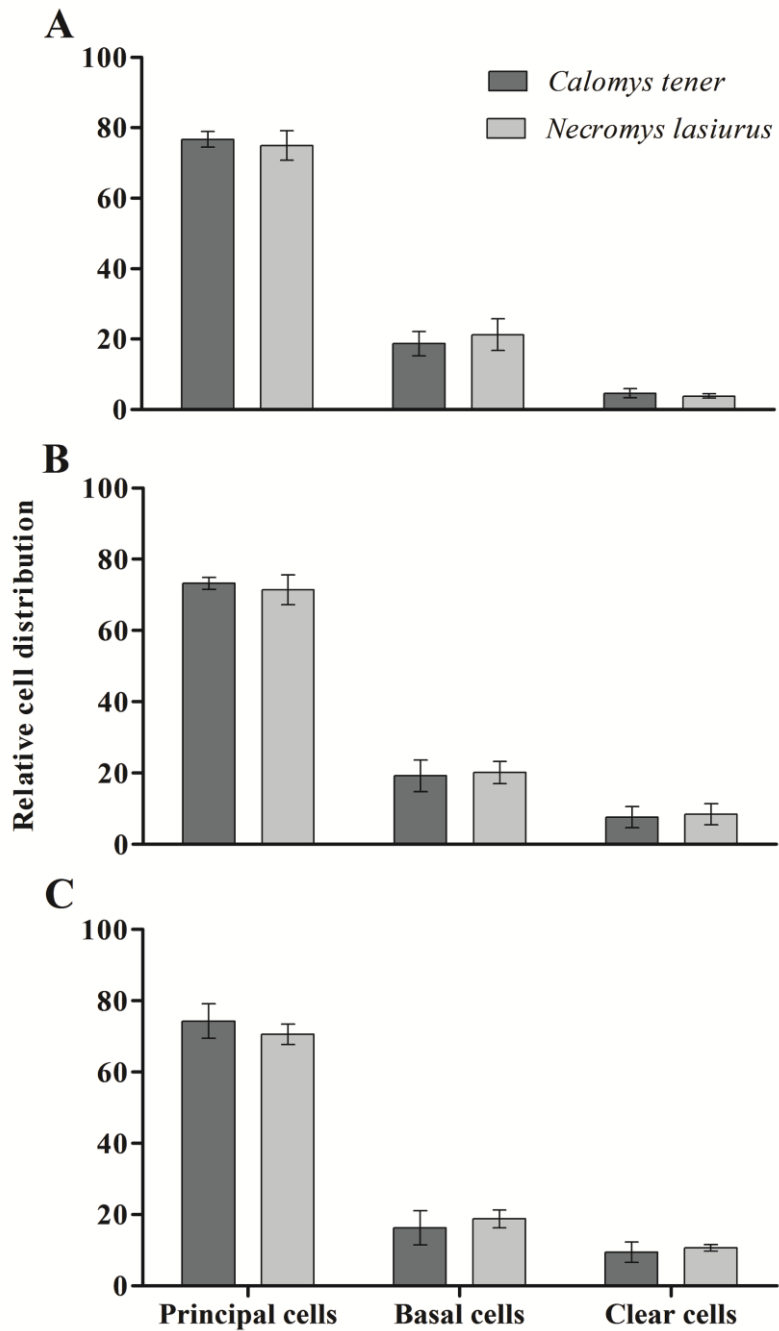


Fig. 4.—Relative cell distribution in 3 epididymal regions (% of total) in *Calomys tener* and *Necromys lasiurus*. A: caput; B: corpus; C: cauda. Bars represent mean \pm SE. $P > 0.05$.

Proteomic analysis.—Based on mass spectrometric analysis, 32 proteins were identified in the caput, 35 in the corpus, and 29 in the cauda regions of the epididymis of *C. tener*, of which 9, 12, and 11 proteins were found in each region, respectively. On the other hand, we detected 33, 20, and 31 proteins in the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis of *N. lasiurus*, respectively. Of these

proteins, 19, 7, and 24 were found in each respective region (Table 2; Supplementary Data SD2). Moreover, aldose reductase, superoxide dismutase Cu-Zn, carboxylesterase 5A, and clusterin were detected in the epididymis of *N. lasiurus*, whereas they were not expressed in *C. tener* (Table 2).

Table 2.—Proteins detected by shotgun proteomics (LC-ESI-MS/MS) in the luminal fluid of different regions of the epididymides of *Calomys tener* and *Necromys lasiurus* from Minas Gerais state, Brazil. Protein searches were run using the Protein Lynx Global Server (v. 2.4) against Rodentia entries of the Swissprot database.

Protein	<i>Calomys tener</i>			<i>Necromys lasiurus</i>		
	Caput	Corpus	Cauda	Caput	Corpus	Cauda
14-3-3 protein beta chain	x	x	x	x		
14-3-3 protein epsilon chain	x	x	x			
14-3-3 protein gamma chain		x				
14-3-3 protein sigma chain	x		x			
14-3-3 protein theta chain	x	x				
14-3-3 protein zeta chain	x	x	x			
26S proteasome non ATPase regulatory subunit 13	x					
5-nucleotidase domain-containing protein 1		x				
78 kDa glucose-regulated protein	x		x			
Actin beta	x	x	x	x	x	
Actin gamma 1	x	x	x	x	x	
Adenine phosphoribosyl transferase				x		
Adenylate kinase isoenzyme 1						x
AHNAK 1 fragment						x
Albumin	x	x	x	x	x	x
Aldehyde dehydrogenase cytosolic 1	x		x			
Aldose reductase				x	x	
Alpha crystallin B chain						x
Alpha globin	x	x		x	x	
Alpha-1-inhibitor 3						x
Annexin A5	x	x				
ATP dependent zinc metalloprotease YME1L1	x					
Beta actin-like protein 2	x	x		x	x	
Beta globin	x	x	x	x	x	x
Cadherin-11						x
Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2						x
Calpain 8				x		
Carbonic anhydrase 3	x	x	x	x	x	x
Carboxylesterase 5A					x	
Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 3				x		
Cathepsin 2					x	
Centrosomal protein of 63 kDa		x				
Clusterin					x	
Cofilin 1						x
Collagen type III alpha 1 chain		x				
Complement C1r B subcomponent					x	

Table 2.— Continued

Protein	<i>Calomys tener</i>			<i>Necromys lasiurus</i>		
	Caput	Corpus	Cauda	Caput	Corpus	Cauda
Conserved oligomeric Golgi complex subunit 7			x			
Creatine kinase B type		x				
Creatine kinase muscle			x			x
CREB ATF bZIP transcription factor					x	
Disks large homolog 1		x				
DENN domain containing protein 4B				x		
Deoxynucleotidyltransferase terminal interacting protein 1				x		
DNA topoisomerase 2 alpha				x		
Dynactin subunit 5						x
Dystonin isoform 6	x					
Enolase alpha				x	x	x
Enolase beta			x			x
Epsilon 2 globin	x	x		x	x	x
Ethanolamine phosphate cytidyltransferase		x				
Fatty acid-binding protein 4	x	x				
Ferritin light chain 1						x
Fructose biphosphate aldolase A						x
Glutathione S transferase A3				x		
Glutathione S transferase alpha 5				x		
Glutathione S transferase Mu 4	x	x	x			
Heat shock 27 kDa protein 1						x
Heat shock 70 kDa protein 1-like			x			
Heat shock cognate 71 kDa protein	x	x	x	x		
Heat shock related 70 kDa protein 2	x	x	x			
Histone H2A type 1			x			
Inducible heat shock protein 70 kDa		x		x		
Leucine zipper protein 2				x		
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2B				x		
Malate dehydrogenase						x
Multiple PDZ domain protein				x		
Murinoglobulin 1						x
Myoglobin						x
Myosin light chain 1 3 skeletal muscle isoform						x
Na H exchange regulatory cofactor NHE RF3					x	
Neuropeptide VF fragment			x			
Parvalbumin alpha						x
Peroxiredoxin 6			x	x	x	
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1			x	x		
Phosphoglycerate mutase 2						x
Pre-mRNA splicing factor SLU7	x					
Profilin 1	x	x	x	x	x	
Protein 2010300C02Rik		x				
Protein LOC100360997	x					
Pyruvate kinase isoenzyme M2			x			
Retinal dehydrogenase 2				x		
Ribonucleoside diphosphate reductase subunit M2 B						x
Rho GDP dissociation inhibitor 1	x					
Serine threonine protein kinase tousled like 1	x					

Table 2.— *Continued*

Protein	<i>Calomys tener</i>			<i>Necomys lasiurus</i>		
	Caput	Corpus	Cauda	Caput	Corpus	Cauda
Serine threonine protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform			x			
Superoxide dismutase Cu Zn						x
Tektin 4				x		
Testis specific H1 histone		x				
Tetraspanin-6						x
Transaldolase	x					
Transferrin	x	x		x		
Trinucleotide repeat containing gene 6A protein		x				
Triose-phosphate isomerase			x	x		x
Tubulin alpha 1B chain	x	x				
Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1					x	
Ubiquitin B		x	x	x		
Ubiquitin C						x
Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase		x				
Ubiquitin-40 S ribosomal protein S27a						x
Ubiquitin-60 S ribosomal protein L40		x	x	x	x	x
Vinculin		x	x			
Zinc finger protein 250	x					

Based on analysis of gene ontology, proteins were grouped according to biological process, cellular component, and molecular function (Figs. 5–7). Cellular processes and regulation were the 2 main biological processes identified for epididymal proteins in *C. tener* and *N. lasiurus* (Fig. 5). However, only the cauda region in *N. lasiurus* presented proteins that participate in the immune system response. Moreover, we did not detect proteins related to localization in the caput region of *N. lasiurus* (Fig. 5). With regards to the cellular component, the detected proteins were mainly from cytoplasm, nucleus, and intracellular organelles (Fig. 6). The most prominent molecular function of epididymal proteins in *C. tener* and *N. lasiurus* was related to binding, followed by catalytic activities (Fig. 7). Other proteins were related to structural molecular activity, which were not present in the cauda and caput regions from the epididymis of *C. tener* and *N. lasiurus*, respectively. In addition, we detected proteins related to antioxidant activities in the cauda and corpus regions in the epididymides of *C. tener* and *N. lasiurus*, respectively (Fig. 7).

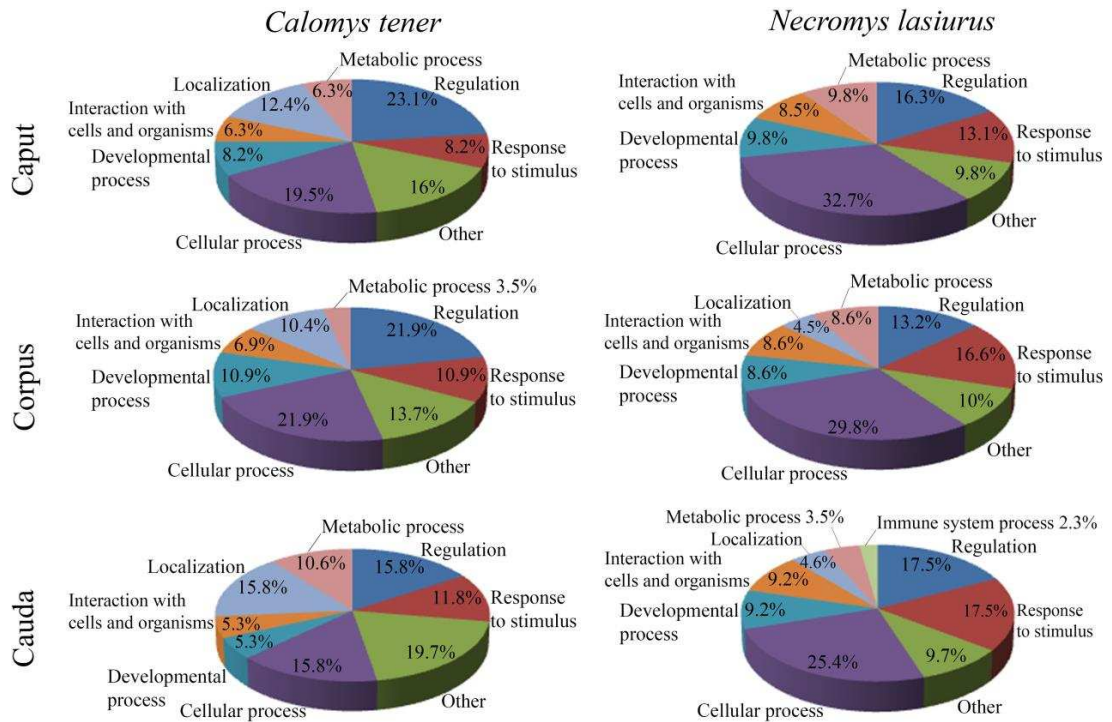


Fig. 5.—Pie charts showing gene ontology annotations of proteins identified in luminal fluid from epididymal regions of *Calomys tener* and *Necromys lasiurus* according to biological process. Protein data were analyzed using the application STRAP (Boston University, School of Medicine), from databases UniProtKB and EBI GOA.

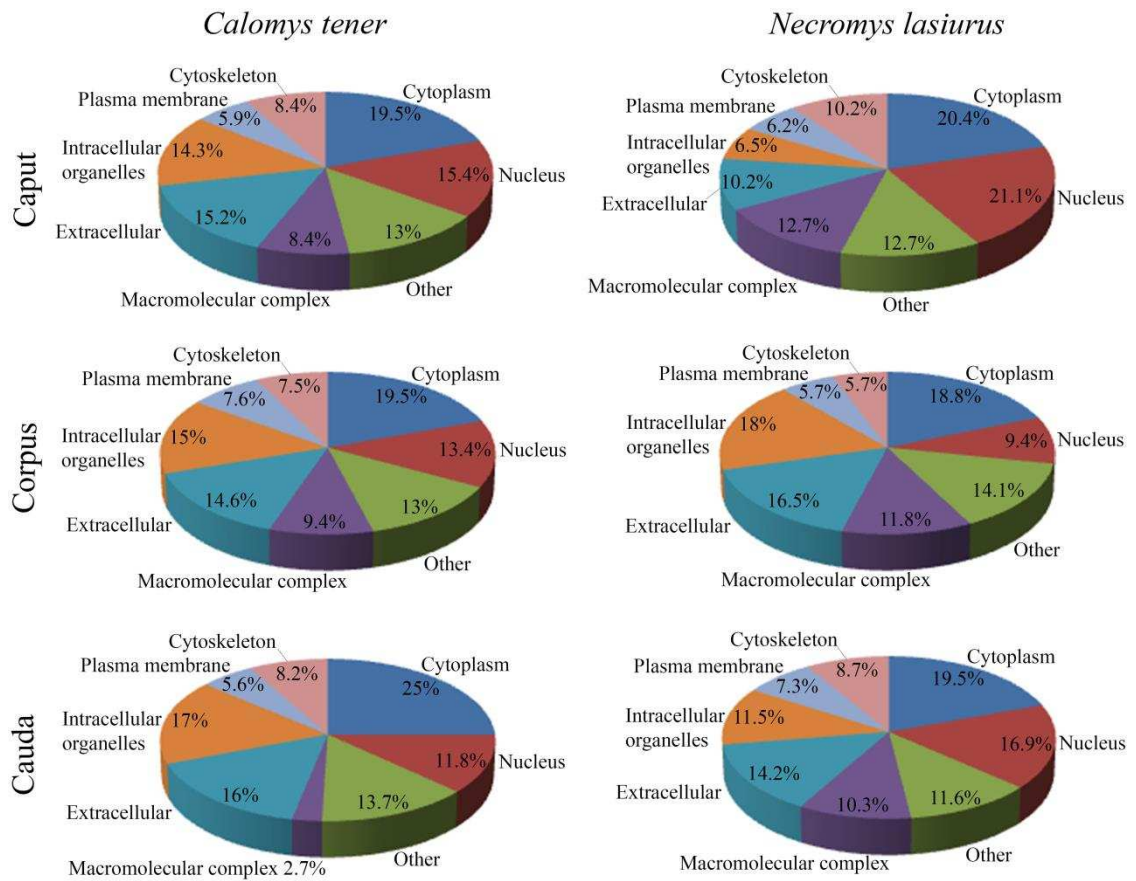


Fig. 6.—Pie charts showing gene ontology annotations of proteins identified in luminal fluid from epididymal regions of *Calomys tener* and *Necromys lasiurus* according to cellular component. Protein data were analyzed using the application STRAP (Boston University, School of Medicine), from databases UniProtKB and EBI GOA.

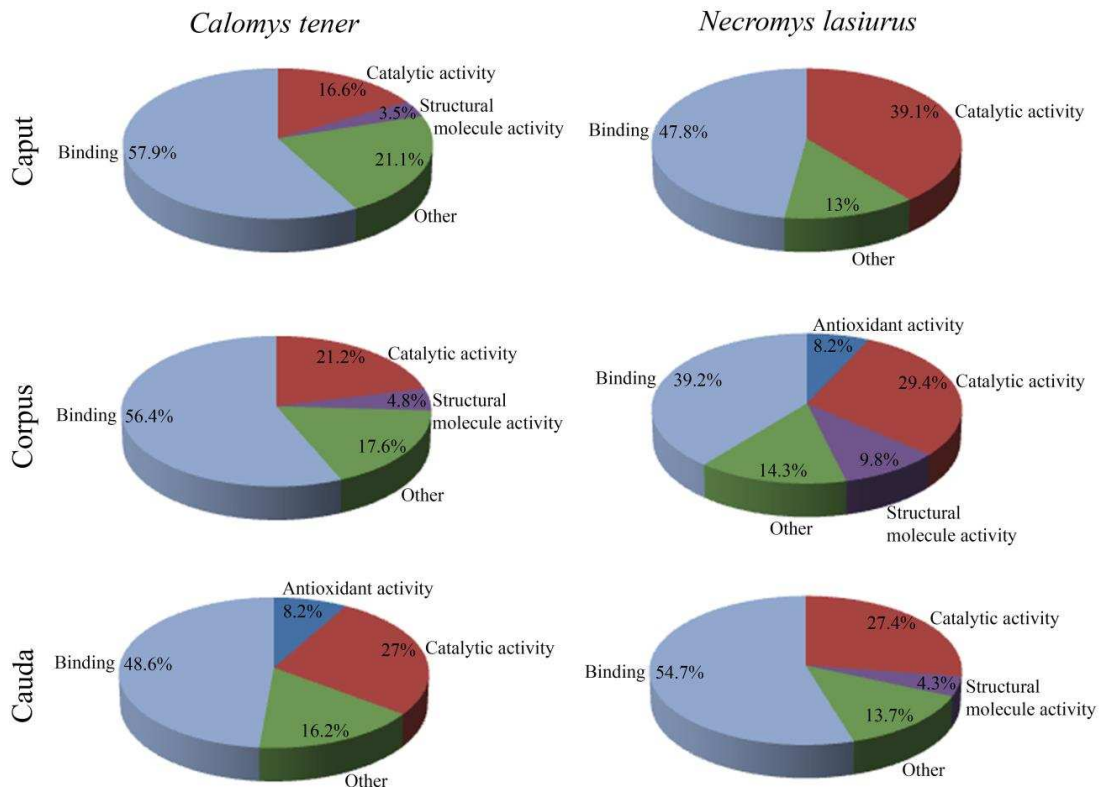


Fig. 7.—Pie charts showing gene ontology annotations of proteins identified in luminal fluid from epididymal regions of *Calomys tener* and *Necromys lasiurus* according to molecular function. Protein data were analyzed using the application STRAP (Boston University, School of Medicine), from databases UniProtKB and EBI GOA.

Discussion

This is the first study describing aspects of epididymal histology and the proteomes of 2 sigmodontine rodents from open areas on the periphery of the Brazilian Atlantic Forest, in an area generally protected from anthropogenic disturbance. Our results showed *C. tener* and *N. lasiurus* epididymides presented differences related to their histomorphometry and protein expression, whereas the morphology and distribution of the epithelial cell types were similar across the 2 species.

Calomys tener had a lower epididymal somatic index than *N. lasiurus*, possibly due to its lower body mass. Observed differences between species for the tubular and luminal histomorphometry are not related to body mass, but to other factors such as presence of fluid and sperm in the luminal duct and testosterone production (Hamzeh

and Robaire 2009). Thus, differences in epididymal somatic index and histomorphometry may reflect distinct functional aspects of *C. tener* and *N. lasiurus* individuals.

Reduction in epithelial height from the proximal to distal regions, as well as the progressive increase in diameter of the duct and lumen along their epididymides, has been reported in other mammals (Takano 2007; Castro et al. 2016). These findings may indicate functional differences between epididymal regions, such as absorption, secretion, and maintenance of the luminal fluid, related to sperm maturation and storage (Cornwall 2009; Robaire and Hinton 2015).

The morphology and distribution of epithelial cells described in *C. tener* and *N. lasiurus* are similar to the same cell types reported in the epididymides of other rodents (Serre and Robaire 1998; Domeniconi et al. 2007; Takano 2007). Principal cells are responsible for protein production and endocytosis (Robaire and Hinton 2015), whereas basal cells have been related to immune response and paracrine regulation of the principal cell secretion via PGE2 signaling (Shum et al. 2008; Arrighi et al. 2014). The high frequency of clear cells in distal epididymal regions in *C. tener* and *N. lasiurus* indicates they have a more predominant acidifying role in the distal portion, where sperm cells are stored, than the proximal regions (Shum et al. 2008). Furthermore, the presence of vesicles in large number and different sizes stained with toluidine blue in the clear cell cytoplasm suggests a marked endocytic role for these cells in the epididymal epithelium (Domeniconi et al. 2007).

A gel-free proteomic-based approach allowed identification of molecules present in each species and epididymal region. In this context, proteins expressed in the epididymal fluid of *C. tener* and *N. lasiurus* have also been described as part of the epididymal epithelium or fluid in several other species, indicating they are well conserved (Gatti et al. 2004; Dacheux et al. 2012; Souza et al. 2012). Moreover, few proteins are exclusive to the epididymis, as most of them are secreted by tissues and structures in the female reproductive tract and other organs of the male reproductive tract, including testes and accessory sex glands (Hao et al. 2006; Belleanné et al. 2011; Souza et al. 2012; Liu et al. 2015).

Furthermore, many proteins described in the epididymides of these wild rodents are also present in other organs and secretions of the body, including bone and tooth extracellular matrix, blood, milk, and fluids (Moura et al. 2010; Belleanné et al. 2011; de Menezes et al. 2016). By analogy with activity of these proteins in

other tissues, general functions within the epididymis can be suggested, such as sperm protection against oxidative stress, membrane remodeling, maturation, and motility acquisition (Holmes et al. 2008; Griffiths et al. 2009; Belleannée et al. 2011; Dacheux and Dacheux 2014).

Aldose reductase, superoxide dismutase Cu-Zn, carboxylesterase 5A, and clusterin were expressed only in the epididymis of *N. lasiurus*. These proteins have been identified in epididymides and spermatozoa from other mammals (Holland et al. 1982; Abou-Haila and Fain-Maurel 1986; Griffiths et al. 2009; Baba et al. 2011), and in other tissues (Boonyuen et al. 2015; Kador et al. 2016). Indeed, secretion pattern of proteins are generally species-specific. In regard to the epididymis, several hundred proteins identified from its luminal fluid have varying concentrations between species (Gatti et al. 2004; Dacheux et al. 2012). No phylogenetic studies of mammals have been carried out using epididymal proteins, but the major proteins seem to be a proteomic signature for closely related species, as observed for bovid species (Dacheux and Dacheux 2014).

The presence of proteins from blood and extracellular matrix in our findings, as well as proteins described as part of cells, may indicate an epididymal fluid contamination by disrupted cells. The proteins detected were alpha and beta globin, murinoglobulin 1, mioglobulin, collagen type III alpha 1 chain, actin, tubulin, myosin light chain 1 3 skeletal muscle isoform, creatine phosphokinase, creatine kinase B type, histone 1, testisspecific histone 1, and DNA topoisomerase 2 alpha. Although we have checked each fluid sample under light microscopy to assure there were no signs of spermatozoa, epithelial cells, and red blood cells, the tiny size of the epididymis may have contributed to the cellular disruption during the luminal fluid collection. It is known that the epididymis is a highly vascularized tissue with a great complexity of cell types (Cornwall 2009; Robaire and Hinton 2015). Nevertheless, the presence of those proteins has not interfered in our results, since we identified proteins that have been previously detected in other species, using the same methodology (Souza et al., 2012; van Tilburg et al. 2015).

In summary, the epididymides of *C. tener* and *N. lasiurus* presented differences related to histomorphometric features and protein expression. The knowledge of epididymis histophysiology sets the foundations for comprehensive understanding of reproductive biology in those small rodents. Moreover, the study of morphological characters in South American rodents is necessary, since the great majority of studies

have been performed in murines. We suggest further studies describing the epididymis in closely related species from both genera in order to certify if the approaches used here would be helpful as a complementary tool for taxonomic studies. Finally, we described the epididymis histology and proteomes in animals from preserved habitat, which creates a comparison baseline for studies evaluating the effects of environmental endocrine disruptors on the functionality of the epididymal epithelium.

Literature Cited

- ABOU-HAILA, A., FAIN-MAUREL, M. A. 1986. Electrophoretic characterization of mouse epididymal esterases in inbred lines and in a natural population. *Andrologia* 18:624-634.
- AITKEN, R. J. 2013. Human spermatozoa: revelations on the road to conception. *F1000 Prime Reports* 5:39-47.
- AMANN, R. P. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. *American Journal of Anatomy* 110:49-67.
- ARRIGHI, S. 2014. Are the basal cells of the mammalian epididymis still an enigma? *Reproduction, Fertility and Development* 26:1061-1071.
- BABA, S. P., J. HELLMANN, S. SRIVASTAVA, AND A. BHATNAGAR. 2011. Aldose reductase (AKR1B3) regulates the accumulation of advanced glycosylation end products (AGEs) and the expression of AGE receptor (RAGE). *Chemico-biological Interaction* 191:357-363.
- BARROS, C. S., T. PUTTKER, B. T. PINOTTI, AND R. PARDINI. 2015. Determinants of capture-recapture success: an evaluation of trapping methods to estimate population and community parameters for Atlantic forest small mammals. *Zoologia (Curitiba, Online)* 32:334–344.
- BELLEANNÉE, C., V. LABAS, A. P. TEIXEIRA-GOMES, J. L. GATTI, J. L. DACHEUX, AND F. DACHEUX. 2011. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *Journal of Proteomics* 74:59-78.
- BEU, C. C. L., A. M. ORSI, AND R. F. DOMENICONI. 2009. Structure of the lining epithelium of the cauda epididymis of the golden hamster. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 38:49-57.

- BHATIA, V. N., D. H. PERLMAN, C. E. COSTELLO, AND M. E. MCCOMB. 2009. Software tool for researching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. *Analytical Chemistry* 81:9819-9823.
- BOONYUEN, U., K. PROMNARES, S. JUNKREE, N. P. DAY, AND M. IMWONG. 2015. Efficient in vitro refolding and functional characterization of recombinant human liver carboxylesterase (CES1) expressed in *E. coli*. *Protein Expression and Purification* 107:68-75.
- CORNWALL, G. A. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update* 15:213–227.
- CASTRO, M. M., B. KIM, E. HILL, M. C.Q. FIALHO, L. C.H. P. PUGA, M. B. FREITAS, S. BRETON, AND M. MACHADO-NEVES. 2016. The expression patterns of aquaporin 9, vacuolar H⁺-ATPase, and cytokeratin 5 in the epididymis of the common vampire bat. *Histochemistry and Cell Biology* doi: 10.1007/s00418-016-1477-9 [Epub ahead of print].
- DACHEUX, J. L., C. BELLEANNÉE, B. GUYONNET, V. LABAS, A. P. TEIXEIRA-GOMES, H. ECROYD, X. DRUART, J. L. GATTI, AND F. DACHEUX. 2012. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 58:197-210.
- DACHEUX, J. L., AND F. DACHEUX. 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* 147:R27-42.
- D'ELÍA, G., U. F. J. PARDIÑAS, P. TETA, AND J. L. PATTON. 2007. Definition and diagnosis of a new tribe of sigmodontine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae), and a revised classification of the subfamily. *Gayana* 71:187–194.
- DE MENEZES, E. B., M. VAN TIBURG, G. PLANTE, R.V. OLIVEIRA, A. A. MOURA, AND P. MANJUNATH. 2016. Milk proteins interact with goat binder of sperm (BSP) proteins and decrease their binding to sperm. *Cell and Tissue Research* doi:10.1007/s00441-016-2438-2 [Epub ahead of print].
- DOMENICONI, R. F., A. M. ORSI, C. C. L. BEU, AND S. L., FELISBINO. 2007. Morphological features of the epididymal epithelium of gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Tissue & Cell* 39:47-57.
- GATTI, J. L., S. CASTELLA, F. DACHEUX, H. ECROYD, S. MÉTAYER, V. THIMON, AND J. L. DACHEUX. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science* 82-83:321-339.

- GRIFFITHS, G. S., D. S. GALILEO, R. G. ARAVINDAN, AND P. A. MARTIN-DELEON. 2009. Clusterin facilitates exchange of glycosyl phosphatidylinositol-linked SPAM1 between reproductive luminal fluids and mouse and human sperm membranes. *Biology of Reproduction* 81:562-570.
- HAMZEH, M., AND B. ROBAIRE. 2009. Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. *Journal of Andrology* 30:200-212.
- HAO, Y., N. MATHIALAGAN, E. WALTERS, J. MAO, L. LAI, D. BECKER, W. LI, J. CRITSER, AND R. S. PRATHER. 2006. Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biology of Reproduction* 75:726-733.
- HOLLAND, M. K., J. G. ALVAREZ, AND B. T. STOREY. 1982. Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction* 27:1109-1118.
- HOLMES, R. S., L. A. COX, AND J. L. VANDEBERG. 2008. Mammalian carboxylesterase 5: Comparative biochemistry and genomics. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D, Genomics and Proteomics* 3:195-204.
- KADOR, P. F., M. WYMAN, AND P. J. OATES. 2016. Aldose reductase, ocular diabetic complications and the development of topical Kinostat[®]. *Progress in Retinal and Eye Research* 54:1-29.
- KLUEVER, B. M., E. M. GESE, AND S. J. DEMPSEY. 2016. The influence of wildlife water developments and vegetation on rodent abundance in the Great Basin Desert. *Journal of Mammalogy* 97:1209–1218.
- LIU, Q., Q. Z. XIE, Y. ZHOU, AND J. YANG. 2015. Osteopontin is expressed in the oviduct and promotes fertilization and preimplantation embryo development of mouse. *Zigote* 23:622-630.
- MARTINS, J. A. M., C. E. A. SOUZA, F. D. A. SILVA, V. G. CADAVID, F. C. NOGUEIRA, G. B. DOMONT, J. T. A. DE OLIVEIRA, AND A. A. MOURA. 2013. Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. *Small Ruminant Research* 113:115-127.
- MOURA, A. A., C. E. A. SOUZA, B. A. STANLEY, D. A. CHAPMAN, AND G. J. KILLIAN. 2010. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *Journal of Proteomics* 73: 2006-2020.
- PACHECO, V. R. 2003. Phylogenetic analyses of the Thomasomyini (Muroidea: Sigmodontinae) based on morphological data [PhD]. New York: City University of New York.

- ROBAIRE, R., AND B. HINTON. 2015. The epididymis. Pp. 691-771 in Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 4th ed. (T.M. Plant and A.J. Zeleznik, eds.). Elsevier, Cambridge, United Kingdom.
- ROSALINO, L. M., P. S. MARTINS, C. GHELIER-COSTA, P. C. LOPES, AND L. M. VERDADE. 2013. Allometric Relations of Neotropical Small Rodents (Sigmodontinae) in Anthropogenic Environments. *Zoological Science* 30: 585-590.
- SALAZAR-BRAVO, J., U. F. J. PARDIÑAS, AND G. D'ELÍA. 2013. A phylogenetic appraisal of Sigmodontinae (Rodentia, Cricetidae) with emphasis on phyllotine genera: systematics and biogeography. *Zoologica Scripta* 42: 250–261.
- SERRE, V., AND B. ROBAIRE. 1998. Segment-specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. *Biology of Reproduction* 58:497-513.
- SHUM, W. W., N. DA SILVA, M. MCKEE, P. J. SMITH, D. BROWN, AND S. BRETON. 2008. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell* 135:1108-1117.
- SIKES, R. L., AND THE ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. 2016. 2016 Guidelines of the American Society of mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogy* 97:663–688.
- SOUZA, A. C. F., S. C. MARCHESI, R. P. FERRAZ, G. D. A. LIMA, J. A. OLIVEIRA, AND M. MACHADO-NEVES. 2016. Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current issues* 79:274-286.
- SOUZA, C. E., J. P. REGO, C. H. LOBO, J. T. OLIVEIRA, F. C. NOGUEIRA, G. B. DOMONT, M. FIORAMONTE, F. C. GOZZO, F. B. MORENO, A. C. MONTEIRO-MOREIRA, J. R. FIGUEIREDO, AND A. A. MOURA. 2012. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *Journal of Proteomics* 75:4436-4456.
- TAKANO, H. 2007. Histological division of mouse epididymis based on regional differences. *Hirosaki Medical Journal* 59:S292-S301.
- VAN TILBURG, M. F., M. G. SALLES, M. M. SILVA, R. A. MOREIRA, F. B. MORENO, A. C. MONTEIRO-MOREIRA, J. A. MARTINS, M. J. CÂNDIDO, A. A. ARAÚJO, AND A. A. MOURA. 2015. Semen variables and sperm membrane protein profile of

Saanen bucks (*Capra hircus*) in dry and rainy seasons of the northeastern Brazil (3°S). *International Journal of Biometeorology* 59:561-573.

ZAR, J. H. 2010. *Biostatistical analysis*. 5th ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Supplementary Data

Supplementary Data SD1.—ANOVA values for relative cell distribution.

	Principal Cells		Basal Cells		Clear Cells	
<i>Caput</i>	$F_{1,6} = 0.57$	$P = 1.0$	$F_{1,6} = 0.81$	$P = 1.0$	$F_{1,6} = 1.11$	$P = 0.33$
<i>Corpus</i>	$F_{1,6} = 0.63$	$P = 1.0$	$F_{1,6} = 0.12$	$P = 1.0$	$F_{1,6} = 0.16$	$P = 1.0$
<i>Cauda</i>	$F_{1,6} = 1.76$	$P = 0.23$	$F_{1,6} = 0.87$	$P = 1.0$	$F_{1,6} = 0.67$	$P = 1.0$

Supplementary Data SD2.—Proteins detected in the epididymal fluid.

Protein	Protein accession	Protein entry	Protein score	Protein average mass (Da)	Isoelectric point (pI)	Epididymis		
						Caput	Corpus	Cauda
<i>Calomys tener</i>								
14-3-3 protein beta chain	P35213	1433B_RAT	254.3149	28054.4568	4.81	x	x	x
14-3-3 protein epsilon chain	P62259	1433E_MOUSE	158.5151	29173.9848	4.63	x	x	x
14-3-3 protein gamma chain	P61982	1433G_MOUSE	114.7835	28302.6606	4.80		x	
14-3-3 protein sigma chain	Q5EBB0	Q5EBB0_RAT	59.4668	27916.3992	4.78	x		x
14-3-3 protein theta chain	P68254	1433T_MOUSE	111.3527	27778.3525	4.69	x	x	
14-3-3 protein zeta chain	P63101	1433Z_MOUSE	83.1697	27771.2128	4.73	x	x	x
26S proteasome non ATPase regulatory subunit 13	Q9WVJ2	PSD13_MOUSE	54.5870	42809.5104	5.46	x		
5-nucleotidase domain-containing protein 1	Q8C5P5	NT5D1_MOUSE	51.6323	53094.4748	5.91		x	
78 kDa glucose-regulated protein	P20029	GRP78_MOUSE	47.0859	72422.1642	5.07	x		x
Actin beta	P60710	ACTB_MOUSE	623.4218	41736.8880	5.29	x	x	x
Actin gamma 1	P63259	ACTG_RAT	637.6520	41792.9956	5.31	x	x	x
Albumin	P07724	ALBU_MOUSE	1166.2190	68692.7974	5.75	x	x	x

Supplementary Data SD2.— Continued

Protein	Protein accession	Protein entry	Protein score	Protein average mass (Da)	Isoelectric point (pI)	Epididymis		
						Caput	Corpus	Cauda
<i>Calomys tener</i>								
Aldehyde dehydrogenase cytosolic 1	P13601	AL1A7_RAT	272.4889	43893.2706	5.93	x		x
Alpha globin 1	Q91VB8	Q91VB8_MOUSE	6661.7710	15112.2259	7.97	x	x	
Annexin A5	P48036	ANXA5_MOUSE	202.3928	35752.5122	4.82	x	x	
ATP dependent zinc metalloprotease YME1L1	O88967	YMEL1_MOUSE	46.5336	80028.1769	9.01	x		
Beta actin-like protein 2	Q8BFZ3	ACTBL_MOUSE	227.3494	42004.3519	5.30	x	x	
Beta globin	Q18PE4	Q18PE4_MUSCR	3236.6850	16000.4967	7.13	x	x	x
Carbonic anhydrase 3	P16015	CAH3_MOUSE	1176.3210	29366.3425	6.89	x	x	x
Centrosomal protein of 63 kDa	Q3UPP8	CEP63_MOUSE	90.8648	80448.9220	5.52		x	
Collagen type III alpha 1 chain	P08121	CO3A1_MOUSE	81.2747	138943.6402	6.11		x	
Conserved oligomeric Golgi complex subunit 7	G3IGG2	G3IGG2_CRIGR	79.3713	84384.8287	5.20			x
Creatine kinase B type	P07335	KCRB_RAT	155.7070	42725.3851	5.39		x	
Creatine kinase muscle	P07310	KCRM_MOUSE	1201.4760	43045.0759	6.58			x
Disks large homolog 1	Q62696	DLG1_RAT	40.0752	100570.9777	5.64		x	
Dystonin isoform 6	Q91ZU6	DYST_MOUSE	68.0976	67148.0019	5.61	x		
Enolase beta	P21550	ENOB_MOUSE	756.5317	47024.9939	6.73			x
Epsilon 2 globin	O88753	O88753_RAT	2549.7780	16388.0553	6.65	x	x	
Ethanolamine phosphate cytidyltransferase	Q922E4	PCY2_MOUSE	58.8666	43446.1999	6.25		x	
Fatty acid-binding protein 4	P04117	FABP4_MOUSE	440.0092	14649.9187	8.53	x	x	
Glutathione S transferase Mu 4	P08009	GSTM4_RAT	1106.7520	25680.7684	6.84	x	x	x
Heat shock 70 kDa protein 1-like	P16627	HS71L_RAT	188.4791	70549.3337	5.90			x
Heat shock cognate 71 kDa protein	P63017	HSP7C_MOUSE	76.9429	70871.1979	5.37	x	x	x
Heat shock related 70 kDa protein 2	P17156	HSP72_MOUSE	57.2747	69641.7852	5.50	x	x	x
Histone H2A type 1	P22752	H2A1_MOUSE	171.3921	14135.5084	11.05			x

Supplementary Data SD2.— *Continued*

Protein	Protein accession	Protein entry	Protein score	Protein average mass (Da)	Isoelectric point (pI)	Epididymis		
						Caput	Corpus	Cauda
<i>Calomys tener</i>								
Inducible heat shock protein 70 kDa	Q61696	HS71A_MOUSE	205.0123	70079.2764	5.52		x	
Neuropeptide VF fragment	B1PB89	B1PB89_PHOSU	83.8841	16594.9496	11.63			x
Peroxiredoxin 6	O35244	PRDX6_RAT	118.0520	24818.6370	5.64			x
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P70296	PEBP1_MOUSE	795.6816	20830.4876	5.19			x
Pre-mRNA splicing factor SLU7	Q8BHJ9	SLU7_MOUSE	80.4391	68080.3629	6.65	x		
Profilin 1	P62962	PROF1_MOUSE	1228.4910	11820.4235	8.46	x	x	x
Protein 2010300C02Rik	E9Q3M9	E9Q3M9_MOUSE	85.9239	125910.5416	7.01		x	
Protein LOC100360997	D3ZJ60	D3ZJ60_RAT	103.2971	14440.3512	7.65	x		
Pyruvate kinase isoenzyme M2	P11980	KPYM_RAT	199.4068	58722.9689	6.63			x
Rho GDP dissociation inhibitor 1	Q5XI73	GDIR1_RAT	141.3211	23407.4544	5.10	x		
Serine threonine protein kinase tousled like 1	Q8C0V0	TLK1_MOUSE	41.5093	86623.6724	8.93	x		
Serine threonine protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	G3H2G5	G3H2G5_CRIGR	99.3318	66213.7584	4.99			x
Testis specific H1 histone	Q5RKG3	H1FNT_RAT	66.4722	47073.4984	11.93		x	
Transaldolase	Q9EQS0	TALDO_RAT	63.5225	37460.1651	6.57	x		
Transferrin	Q921I1	TRFE_MOUSE	162.8571	76724.1230	6.94	x	x	
Trinucleotide repeat containing gene 6A protein	Q3UHK8	TNR6A_MOUSE	54.6155	203222.0920	6.48		x	
Triose-phosphate isomerase	P48500	TPIS_RAT	1416.5250	26848.9898	6.89			x
Tubulin alpha 1B chain	P68360	TBA1B_MERUN	184.7471	50151.7822	4.94	x	x	
Ubiquitin B	P0CG51	UBB_RAT	634.3126	34368.5505	6.94		x	x
Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase	E9Q6Y8	E9Q6Y8_MOUSE	51.5875	146319.4449	9.31		x	
Ubiquitin-60 S ribosomal protein L40	P62984	RL40_MOUSE	452.5316	14072.6538	9.87		x	x

Supplementary Data SD2.— Continued

Protein	Protein accession	Protein entry	Protein score	Protein average mass (Da)	Isoelectric point (pI)	Epididymis		
						Caput	Corpus	Cauda
<i>Calomys tener</i>								
Vinculin	Q64727	VINC_MOUSE	72.7987	116717.6834	5.77		x	x
Zinc finger protein 250	Q7TNU6	ZN250_MOUSE	65.9967	59873.1698	8.70	x		
<i>Necromys lasiurus</i>								
14-3-3 protein beta chain	P35213	1433B_RAT	225.7520	28054.4568	4.81	x		
Actin beta	P60710	ACTB_MOUSE	3033.1580	41736.8880	5.29	x	x	
Actin gamma 1	P63259	ACTG_RAT	3024.0620	41792.9956	5.31	x	x	
Adenine phosphoribosyl transferase	Q64414	APT_GERCA	258.6316	19590.9722	7.65	x		
Adenylate kinase isoenzyme 1	P39069	KAD1_RAT	518.3739	21583.8188	7.66			x
AHNAK 1 fragment	Q38PF8	Q38PF8_RAT	194.5976	27442.3405	5.57			x
Albumin	P07724	ALBU_MOUSE	2559.8260	68692.7974	5.75	x	x	x
Aldose reductase	P45376	ALDR_MOUSE	154.4353	35732.3244	6.71	x	x	
Alpha crystallin B chain	P23928	CRYAB_RAT	357.6657	20088.8594	6.76			x
Alpha globin	Q61287	Q61287_MOUSE	2935.4770	15127.2808	7.97	x	x	
Alpha-1-inhibitor 3	P14046	A1I3_RAT	91.9268	163773.6937	5.70			x
Beta actin-like protein 2	Q8BFZ3	ACTBL_MOUSE	154.2290	42004.3519	5.30	x	x	
Beta globin	D0U279	D0U279_MUSSA	3148.8010	15817.2047	7.94	x	x	x
Cadherin-11	F1MAH6	F1MAH6_RAT	53.0844	88036.5772	4.72			x
Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2	A2A6M5	CACO2_MOUSE	131.7027	32350.2344	4.59			x
Calpain 8	Q78EJ9	CAN8_RAT	72.1960	79555.4476	5.52	x		
Carbonic anhydrase 3	P16015	CAH3_MOUSE	1677.1650	29366.3425	6.89	x	x	x
Carboxylesterase 5A	Q6AW46	EST5A_MOUSE	97.1976	64166.7824	5.50		x	
Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 3	Q63111	CEAM3_RAT	70.4452	78311.4312	6.91	x		
Cathepsin 2	Q9JI81	Q9JI81_MOUSE	77.0641	37803.2020	9.22		x	

Supplementary Data SD2.— Continued

Protein	Protein accession	Protein entry	Protein score	Protein average mass (Da)	Isoelectric point (pI)	Epididymis		
						Caput	Corpus	Cauda
<i>Necromys lasiurus</i>								
Clusterin	Q6P7S6	Q6P7S6_RAT	242.5533	51464.5709	5.52		x	
Cofilin 1	P45592	COF1_RAT	616.5244	18532.5747	8.22			x
Complement C1r B subcomponent	Q8CFG9	C1RB_MOUSE	114.4420	79936.5212	5.62		x	
Creatine kinase muscle	P07310	KCRM_MOUSE	2846.4410	43045.0759	6.58			x
CREB ATF bZIP transcription factor	Q91ZR3	ZHANG_MOUSE	97.9554	37825.0170	5.64		x	
DENN domain containing protein 4B	Q3U1Y4	DEN4B_MOUSE	104.4093	164740.6792	7.91	x		
Deoxynucleotidyltransferase terminal interacting protein 1	Q91Y53	TDIF1_RAT	177.6084	36691.9730	9.28	x		
DNA topoisomerase 2 alpha	Q01320	TOP2A_MOUSE	76.1073	172790.6281	8.73	x		
Dynactin subunit 5	Q9QZB9	DCTN5_MOUSE	65.2642	20140.6310	8.32			x
Enolase alpha	P17182	ENOA_MOUSE	1174.8530	47140.9311	6.37	x	x	x
Enolase beta	P21550	ENOB_MOUSE	1508.5920	47024.9939	6.73			x
Epsilon 2 globin	O88753	O88753_RAT	1384.1070	16388.0553	6.65	x	x	x
Ferritin light chain 1	P29391	FRIL1_MOUSE	401.7291	20802.4326	5.65			x
Fructose biphosphate aldolase A	P05064	ALDOA_MOUSE	1166.1890	39356.0199	8.30			x
Glutathione S transferase A3	P30115	GSTA3_MOUSE	229.0570	25360.5856	8.76	x		
Glutathione S transferase alpha 5	P46418	GSTA5_RAT	215.9012	25347.5612	8.42	x		
Heat shock 27 kDa protein 1	P42930	HSPB1_RAT	1397.5080	22892.6878	6.12			x
Heat shock cognate 71 kDa protein	P63017	HSP7C_MOUSE	238.1740	70871.1979	5.37	x		
Inducible heat shock protein 70 kDa	Q61696	HS71A_MOUSE	228.3772	70079.2764	5.52	x		
Leucine zipper protein 2	Q8BGY3	LUZP2_MOUSE	74.3420	39020.5574	8.70	x		
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2B	Q9D5U0	PCT2B_MOUSE	66.5842	58381.2041	9.07	x		
Malate dehydrogenase	O88989	MDHC_RAT	118.3667	36483.1983	6.16			x
Multiple PDZ domain protein	O55164	MPDZ_RAT	125.7459	218592.7091	4.94	x		

Supplementary Data SD2.— Continued

Protein	Protein accession	Protein entry	Protein score	Protein average mass (Da)	Isoelectric point (pI)	Epididymis		
						Caput	Corpus	Cauda
<i>Necromys lasiurus</i>								
Murinoglobulin 1	Q03626	MUG1_RAT	97.9486	165326.5994	5.68			x
Myoglobin	P04247	MYG_MOUSE	921.8777	17069.7117	7.06			x
Myosin light chain 1 3 skeletal muscle isoform	P02600	MYL1_RAT	681.8957	20679.6769	4.99			x
Na H exchange regulatory cofactor NHE RF3	Q9JIL4	NHRF3_MOUSE	69.5932	56498.7879	5.29		x	
Parvalbumin alpha	P32848	PRVA_MOUSE	6391.0310	11930.5491	5.02			x
Peroxiredoxin 6	O35244	PRDX6_RAT	596.5317	24818.6370	5.64	x	x	
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P70296	PEBP1_MOUSE	283.3854	20830.4876	5.19	x		
Phosphoglycerate mutase 2	O70250	PGAM2_MOUSE	73.5207	28827.1846	8.65			x
Profilin 1	P62962	PROF1_MOUSE	1076.1800	11820.4235	8.46	x	x	
Retinal dehydrogenase 2	Q62148	AL1A2_MOUSE	71.4732	56626.0716	5.58	x		
Ribonucleoside diphosphate reductase subunit M2 B	D6RFP5	D6RFP5_MOUSE	118.3586	12947.6365	5.04			x
Superoxide dismutase Cu Zn	P08228	SODC_MOUSE	374.9471	15942.7154	6.02			x
Tektin 4	Q149S1	TEKT4_MOUSE	71.8110	52036.5645	5.83	x		
Tetraspanin-6	B0BN20	B0BN20_RAT	76.8273	27535.3207	8.43			x
Transferrin	Q921I1	TRFE_MOUSE	516.8394	76724.1230	6.94	x		
Triose-phosphate isomerase	P48500	TPIS_RAT	477.9515	26848.9898	6.89	x		x
Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	Q66JP1	Q66JP1_MOUSE	564.0725	14728.3645	9.87		x	
Ubiquitin B	Q6NZC5	NZC5_MOUSE	668.7114	34362.6330	7.80	x		
Ubiquitin C	P0CG50	UBC_MOUSE	666.5030	82550.2253	8.65			x
Ubiquitin-40 S ribosomal protein S27a	P62982	RS27A_RAT	690.4499	17950.9477	9.68			x
Ubiquitin-60 S ribosomal protein L40	P62984	RL40_MOUSE	650.1167	14072.6538	9.87	x	x	x

ARTIGO 2

Proteoma, histomorfometria e tempo de trânsito dos espermatozoides do epidídimo de *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae)

Resumo

O epidídimo é o órgão responsável por alterações pós-gonadais nos espermatozoides, envolvendo a maturação espermática. Os ecossistemas brasileiros, como a Mata Atlântica, têm passado por processo de fragmentação e pequenos roedores, como *Akodon cursor*, são importantes para a dispersão de sementes. Procurando entender a reprodução desses animais, o objetivo deste trabalho foi descrever e comparar os parâmetros histomorfológicos e tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo da espécie *A. cursor*. Oito *A. cursor* foram coletados em uma área de Mata Atlântica no município de Viçosa no estado de Minas Gerais, Brasil (S 20°81' O 42°85'). Seis epidídimos foram processados para análise histológica. Quatro epidídimos, juntamente com o testículo, foram processados para a análise do tempo de trânsito que os espermatozoides levam para passar por esse ducto. Quatro epidídimos foram utilizados para análise de proteômica. Histomorfometricamente, a cauda distal apresentou maiores diâmetros tubular e luminal e a altura epitelial foi maior no segmento inicial. Na análise do trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo, observou-se que a duração é em média de $4,07 \pm 0,32$ dias. A análise pelo método *shotgun* identificou a expressão de 22 proteínas. Conclui-se que o epidídimo de *A. cursor* possui semelhanças com o de outras espécies de roedores, como ratos e camundongos, mas também possui algumas particularidades como menor tempo de trânsito dos espermatozoides.

Palavra-chave: células epididimárias, maturação, reprodução, *shotgun proteomics*, Sigmodontinae.

1. Introdução

A Mata Atlântica está entre os ecossistemas brasileiros que são acometidos pelo processo de fragmentação oriundo do desmatamento (Rambaldi e Oliveira, 2003; David et al., 2017). Considerada um dos *hotspots* de biodiversidade mundial, a Mata Atlântica é atualmente composta por 7% da sua área original que estão distribuídos em fragmentos (Ribeiro et al., 2009; Canale et al., 2012). Esses fragmentos estão separados e distanciados por áreas rurais e urbanas, provocando um isolamento das populações de espécies ali presentes e, com isso, a perda de biodiversidade (Peres, 2001; Magnago et al., 2014). A dinâmica desses fragmentos é mantida por vários fatores, dentre eles a ação de roedores, como *Akodon cursor*, que promovem a dispersão de sementes e plântulas (Vieira, 1997; Cáceres et al., 1999; Carvalho et al., 1999; Cáceres et al., 2008).

A. cursor é um roedor pertencente à ordem Rodentia, subfamília Sigmodontinae e tribo Akodontini, ocorre principalmente em áreas de Mata Atlântica ao leste do Brasil (D'Andrea et al., 2007; Geise, 2012). Essa espécie se reproduz durante o ano todo e sua dieta é insetívora-onívora (D'Andrea et al., 2007; Geise, 2012). Sendo assim, são uns dos responsáveis pela manutenção da população das espécies de plantas e sua densidade populacional precisa ser mantida para tal (Vieira, 1997; Carvalho et al., 1999; Cáceres et al., 2008).

O epidídimo é um órgão do aparelho reprodutor masculino formado por um ducto único, altamente enovelado e envolto por tecido conjuntivo, que o divide em quatro regiões denominadas de segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Cornwall e Hann, 1995; Robaire e Hinton, 2015). As principais funções deste órgão são transporte, armazenamento e maturação dos espermatozoides, promovendo a aquisição de motilidade progressiva e desenvolvimento da capacidade de fertilização (Cosentino e Cockett, 1986; Robaire e Hinton, 2015).

A maturação dos espermatozoides ao longo do ducto epididimário ocorre gradativamente conforme eles migram para a região distal do órgão, conferindo aos mesmos a capacidade de fertilização (Cosentino e Cockett, 1986; Dacheux e Dacheux, 2014; Robaire e Hinton, 2015). A região proximal do epidídimo é o local de intensa secreção e absorção de proteínas, sendo a responsável pelo início da aquisição da motilidade progressiva dos espermatozoides e o local onde eles adquirem capacidade de fertilização (Orgebin-Crist, 1969; Jones, 1999; Turner et al.,

2003). A região distal é responsável por estocar os espermatozoides, promovendo um ambiente propício para a permanência dos mesmos em estado quiescente e auxiliando na eliminação dos defeituosos (Turner et al., 2003; Dacheux e Dacheux, 2014).

Das células presentes no epitélio epididimário estão apoiadas pela lâmina própria e são denominadas como: principal, basal, estreita e clara (Robaire e Hinton, 2015). As células principais são as mais abundantes e atuam no processo de secreção e absorção de grande parte das proteínas e componentes do lúmen (Cornwall, 2009; Robaire e Hinton, 2015). As células basais, por sua vez, controlam as funções de secreção de prótons pelas células estreitas e claras mantendo, desta forma, a acidificação luminal próxima a valores fisiológicos e, conseqüentemente, a manutenção dos espermatozoides em estado quiescente (Cornwall, 2009; Shum et al., 2013).

Informações sobre a morfologia e fisiologia epididimária de *A. cursor* não foram encontradas na literatura. Assim, o objetivo desse trabalho foi descrever e comparar os parâmetros histomorfométricos do epidídimo, o tempo de trânsito dos espermatozoides e a expressão de proteínas referentes à espécie *A. cursor*.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta animal e comitê de ética

Roedores da espécie *Akodon cursor* foram capturados utilizando armadilhas dos tipos Sherman, Tomahawk e Pitfall (Gannon e Sikes, 2007), inseridas em uma área de Mata Atlântica no município de Viçosa em Minas Gerais – Brasil (S 20°81' O 42°85'), durante a primavera (novembro e dezembro). A licença para coleta de campo foi fornecida pelo Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade (ICMBio - nº 22289-1). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos para pesquisa animal aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV nº de protocolo: 09/2012).

2.2. Coleta do epidídimo

Oito machos de *A. cursor* ($32,6 \pm 2,3$ g) foram eutanasiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg /IM) e cloridrato de quetamina (150 mg/kg/IM; Virbac Brasil, São Paulo, SP). Os epidídimos foram removidos, dissecados e pesados. O índice epididimossomático (IES) foi obtido pela relação entre o peso do epidídimo (PE) e o peso corporal (PC), onde $IES = PE / PC \times 100$.

Seis epidídimos direitos foram processados inteiros para análise histológica. Quatro epidídimos, juntamente com o testículo, foram congelados a -20°C para posterior análise do tempo de trânsito que os espermatozoides levam para passar pelo ducto epididimário. Quatro epidídimos foram processados para análise do proteoma.

2.3. Processamento histológico para microscopia de luz

Os epidídimos foram fixados na solução de Karnovsky (2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em tampão de fosfato de sódio 0,1M pH 7,2), desidratados em séries crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) e emblocados em hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica). Preparações histológicas contendo seções com 3 μm de espessura foram coradas com azul de toluidina-borato sódio 1%, montadas com Entellan® (Merck) e analisadas qualitativamente utilizando microscópio Olympus BX41 (100x, 200x e 400x).

2.3.1. Histomorfometria epididimária

Para as análises morfométricas, imagens das regiões do epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo, cauda proximal e cauda distal) foram obtidas usando um microscópio de luz (Olympus Bx-53) equipado com uma câmera digital (Olympus DP73) e analisadas com o software ImageJ 1.43 (Rasband, 1997-2009, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Os diâmetros tubular e luminal e a altura do epitélio foram medidas para cada região de cada animal. O diâmetro tubular médio de cada região epididimária foi obtido por meio de medição aleatória de 20 seções transversais tubulares, o mais circular possível, por animal. Estas seções também foram usadas para medir o diâmetro luminal e a altura epitelial, que foi obtida a partir da lâmina própria para a luz tubular. A altura epitelial para cada túbulo foi a média de quatro medidas diametralmente opostas (Menezes et al., 2017).

A distribuição relativa dos diferentes tipos de células nas regiões do epidídimo foi estimada por contagem de células em diferentes seções do ducto (Beu et al., 2009; Menezes et al., 2017). As células foram contadas em 10 seções por região por animal. O resultado bruto da contagem de células foi corrigido aplicando a fórmula de Amann (Amann, 1962): [número de célula] x [espessura da secção / espessura da secção + $\sqrt{(\text{diâmetro nuclear da célula} / 2)^2 - \sqrt{(\text{diâmetro nuclear da célula} / 4)^2}}$]. Este cálculo fornece o valor corrigido do número de células contadas em seções histológicas. Os resultados foram expressos em percentual.

2.4. Produção diária de espermatozoide por testículo, número de espermatozoides e tempo de trânsito no epidídimo

Quatro epidídimos, juntamente com os testículos, foram descongelados ainda sob refrigeração e pesados para realização do processamento de análise do tempo de trânsito dos espermatozoides. O parênquima testicular foi pesado separadamente da albugínea e homogeneizado em 500 µl de solução salina triton resfriada por 3 min. Em seguida foi diluído (1:5) na mesma solução e transferido para a câmara de Neubauer, onde foi contabilizado o número de espermátides resistentes à homogeneização em duas contagens por animal. Para determinar a produção diária de espermatozoides, o número de espermátides por testículo foi dividido por 4,26 (Balarini, 2013), referente ao número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero de *Akodon cursor* (Kempinas et al., 1998; Robb et al., 1978).

Os espermatozoides da cabeça/corpo e da cauda do epidídimo foram contabilizados conforme descrito por Robb et al. (1978) e modificado por Kempinas et al. (1998). As duas regiões epididimárias seccionadas foram homogeneizadas separadamente por 3 min cada em 500 µL de solução salina-triton, sendo esse volume proporcional a cada 20 mg de tecido da cabeça/corpo e 10 mg de tecido da cauda. Em seguida, cada homogenato foi utilizado para contagem de espermatozoides com auxílio da câmara de Neubauer, no qual a solução da cabeça/corpo precisou ser diluída novamente (1:2). Para o cálculo do tempo de trânsito em cada região epididimária em dias, o número total de espermatozoide de cada segmento foi dividido pela produção espermática diária segundo Balarini (2013) (Kempinas et al., 1998; Robb et al., 1978).

2.5. Análise proteômica

2.5.1. Digestão da amostra

As amostras de fluido dos epidídimos foram concentradas para 10 µL à temperatura ambiente e posteriormente foi adicionada água deionizada (50 µL) em bicarbonato de sódio 50 mM (10 µL), seguido de aquecimento a 80°C durante 30 minutos. Em seguida os microtubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos e adicionou-se à amostra 2,5 µL de ditioneitol (DTT; 100 mM), sendo alquilados com iodoacetamida (IAA, 300 mM). As amostras foram agitadas, aquecidas a 60°C durante 30 min e centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 400 ng de tripsina (Promega, Cat. # V5111, Madison, WI, EUA) aos microtubos, que foram mantidos a 37°C durante a noite (van Tilburg et al., 2015). A digestão com proteína foi extinta com 10 µL de ácido trifluoroacético (5%; Thermo Scientific, Cat # 28904, Rockford, IL, EUA) durante 90 min a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (14.000 xg durante 30 min a 6 °C) e o sobrenadante foi transferido para microtubos. Os extratos foram concentrados e ressuspensos em 10 µL de 5% de acetonitrilo contendo 0,1% de ácido fórmico e transferidos para frascos de injeção (Waters, cat. # 1860385C) (Menezes et al., 2017).

2.5.2. Identificação de proteínas

Os peptídeos resultantes da digestão foram analisados por cromatografia capilar acoplada à espectrometria de massa (cromatografia líquida capilar / espectrometria de massa de ionização por pulverização nano eletrostática em tandem (CapLC-MS / MS)) usando o espectrômetro SYNAPT G2 HDMS. O espectrômetro foi conectado a uma unidade de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) nanoACQUITY na Unidade de Proteômica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) conforme descrito por Souza et al. (2012).

O espectrômetro foi operado para adquirir espectros MS / MS de peptídeos tripticos no modo MSE, usando o reconhecimento de estado de carga e o limite de resistência como critério de seleção através do aplicativo MassLynx 4.1. Uma

varredura foi realizada a 2 segundos de relação de massa / carga (m / z) entre 400 e 1500 para obter dados MS / MS. Todos os íons foram submetidos à dissociação induzida pelo processo de colisão (DIC) na presença de argônio. Os espectros de íons resultantes (6-8 seg) foram processados usando o aplicativo Protein Lynx Global Server 2.5 e convertidos em arquivos de lista de picos (arquivos de lista de picos, PKL) para pesquisar em bancos de dados. Para a identificação de proteínas, as pesquisas foram realizadas usando o aplicativo ProteinLynx Global Server 4.1 contra o banco de dados da ordem Rodentia na base de dados Swissprot, seguindo os critérios: máximo de uma clivagem perdida de tripsina, peptídeos monoisotópicos com modificação variável da oxidação da metionina e variação fixa de carbamidometilação de As cisteínas. Os limites de massa selecionados de tolerância para a variação dos peptídeos e fragmentos são 0,3 e 0,1 Da, respectivamente.

2.5.3. *Ontologia genética*

Os dados da identificação da proteína do epidídimo obtidos após a pesquisa MASCOT foram analisados usando o software para notas de pesquisa de proteína (STRAP), um aplicativo de código aberto para as espécies em estudo. Os termos da ontologia genética dos processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares foram obtidos a partir de bancos de dados e UniProtKB EBI GOA (Bhatia et al., 2009).

2.5.4. *Análise in silico de interação de proteínas*

As redes de interação proteína-proteína foram obtidas a partir do banco de dados STRING (<http://string-db.org/>; Rego et al., 2014) versão 10.5. O banco de dados do banco consiste em interações proteicas conhecidas e possíveis associações físicas (diretas) e funcionais (indiretas). A análise da rede foi avaliada para quinase C rica em alanina miristoilada (Marcks) mostrando intervalo de confiança de interação com outras proteínas de 90%. Assim, as análises foram realizadas com até 10 interações, utilizando a espécie *Mus musculus*.

2.6. *Análise estatística*

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM).

3. Resultados

3.1. Morfologia e histomorfometria epididimária

O peso do epidídimo e o índice epididimossomático de *Akodon cursor* foram $0,04 \pm 0,01$ g e $0,14 \pm 0,12\%$, respectivamente. O epidídimo dessa espécie é formado por um ducto único e altamente enovelado, sendo suas regiões denominadas de segmento inicial (SI), cabeça (CAB), corpo (COR), cauda proximal (CAP) e distal (CAD) (Fig. 1).

O compartimento intertubular é formado pelo conjuntivo presente entre as secções do ducto epididimário, sendo composto por vasos sanguíneos, fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Fig.1 e 2). O compartimento tubular é composto pela túnica própria e o epitélio, que é classificado como pseudoestratificado colunar, formando o ducto epididimário e delimitando o lúmen por onde passam os espermatozoides (Fig. 1).

As regiões estudadas no epidídimo de *A. cursor* foram identificadas por diferenças morfológicas e morfométricas, respectivamente visualizadas na Figura 1. O SI, CAB e CAP obtiveram maior altura epitelial do que o COR e a CAD, sendo que a CAB foi o maior e a CAD o menor. Os diâmetros tubular e luminal da CAD foram maiores em relação às demais regiões, por outro lado o SI apresentou os menores valores.

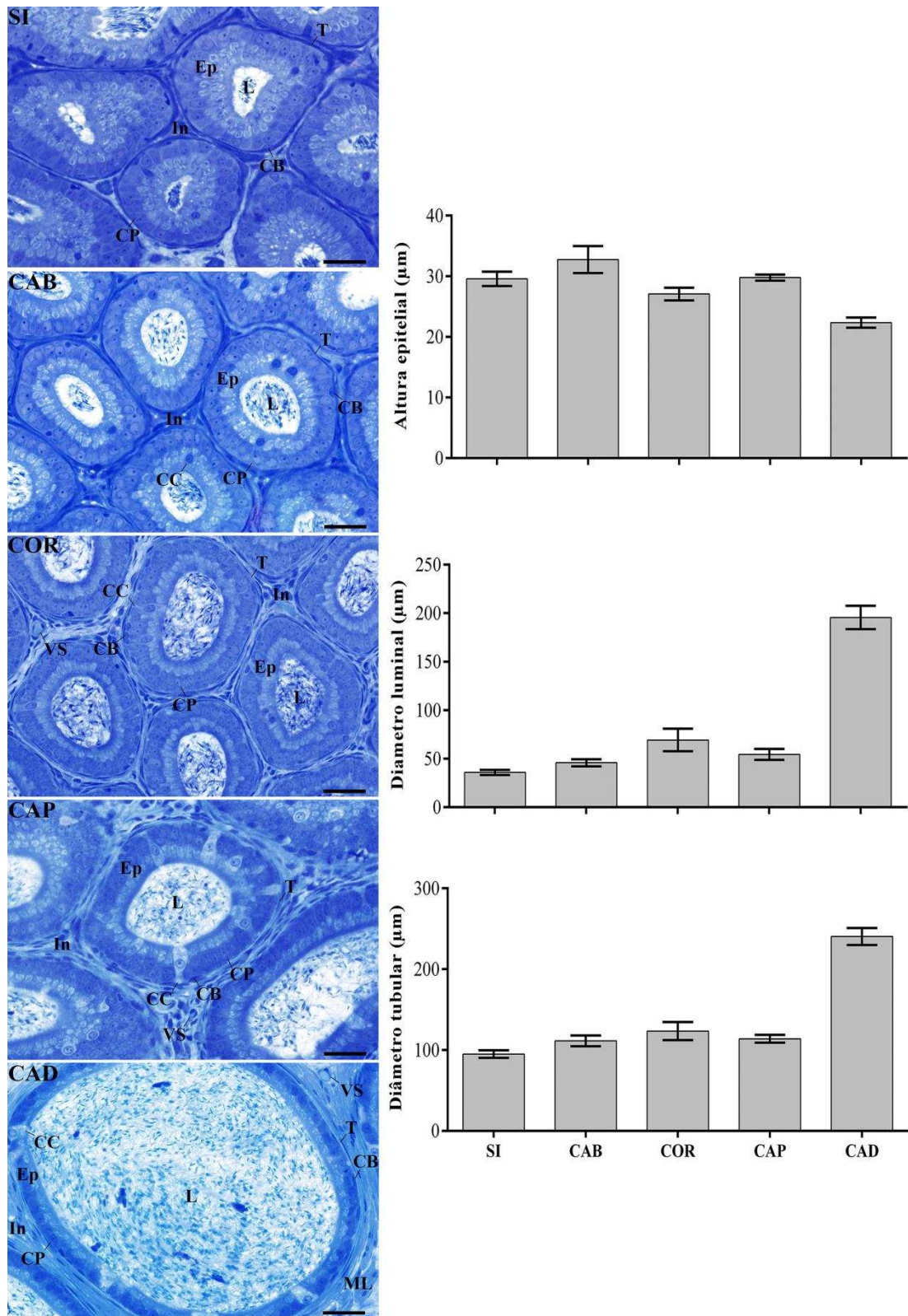


Fig. 1. Histomorfometria das cinco regiões do epidídimo de *Akodon cursor*: segmento inicial (SI), cabeça (CAB), corpo (COR), cauda proximal (CAP) e cauda distal (CAD). Epitélio (Ep), compartimento intertubular (In), lúmen (L), vaso sanguíneo (VS), túnica própria (T), célula principal (CP), célula basal (CB),

célula clara (CC) e músculo liso (ML). Azul de toluidina - borato sódio 1%. Barras: 20 μ m. As barras dos gráficos representam a média \pm erro padrão.

As células do epitélio epididimário apresentaram características evidenciadas na Figura 2, sendo possível visualizar as células principais do epitélio epididimário em formato colunar, com núcleo localizado na porção basal, com formato esférico contendo de 1 a 3 nucléolos. As células basais, presentes em todas as regiões, localizaram-se na base do epitélio, apresentando desde formatos achatados a achatados-arredondados. As células estreitas estão presentes somente no SI com seu núcleo na porção médio-apical do epitélio e de formato ovoide (Fig. 2SI). As células claras estão presentes nas regiões da CAB, COR, CAP e CAD, em formatos diversos, podendo ser desde cúbicas a caliciformes, com seu núcleo situado na porção médio-apical (Fig. 2CAB-CAD).

Em relação à proporção celular, as células principais foram as mais abundantes em todas as regiões estudadas (Fig. 2), sendo que o maior percentual foi de 81,13% no SI e o menor de 75% na CAD. A célula basal foi a segunda mais abundante, com a maior proporção na região da CAB, 15,59%, e a menor na CAD, 12,60%. As células estreitas, presentes apenas no SI, tiveram um percentual de frequência de 4,5%. As células claras foram encontradas na CAB, COR, CAP e CAD, apresentando maior distribuição na CAD (12,38%) e menor na CAB (5,82%).

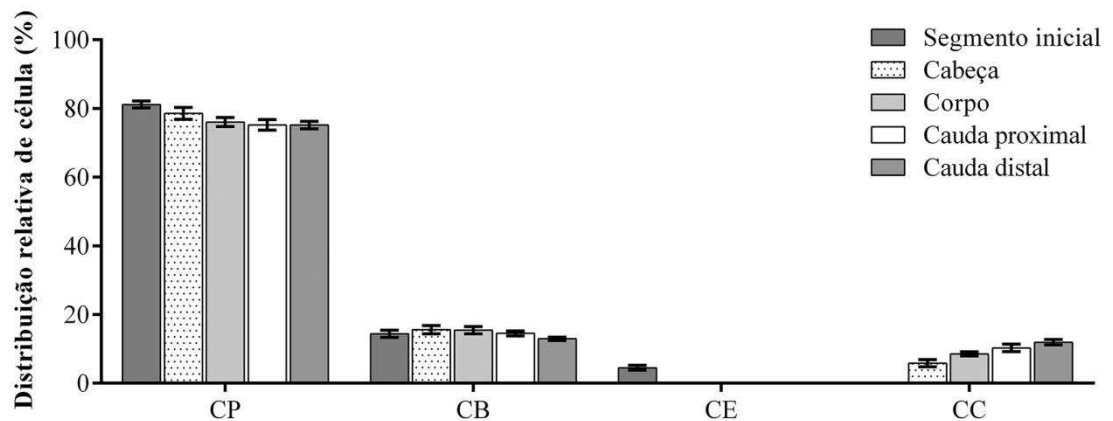
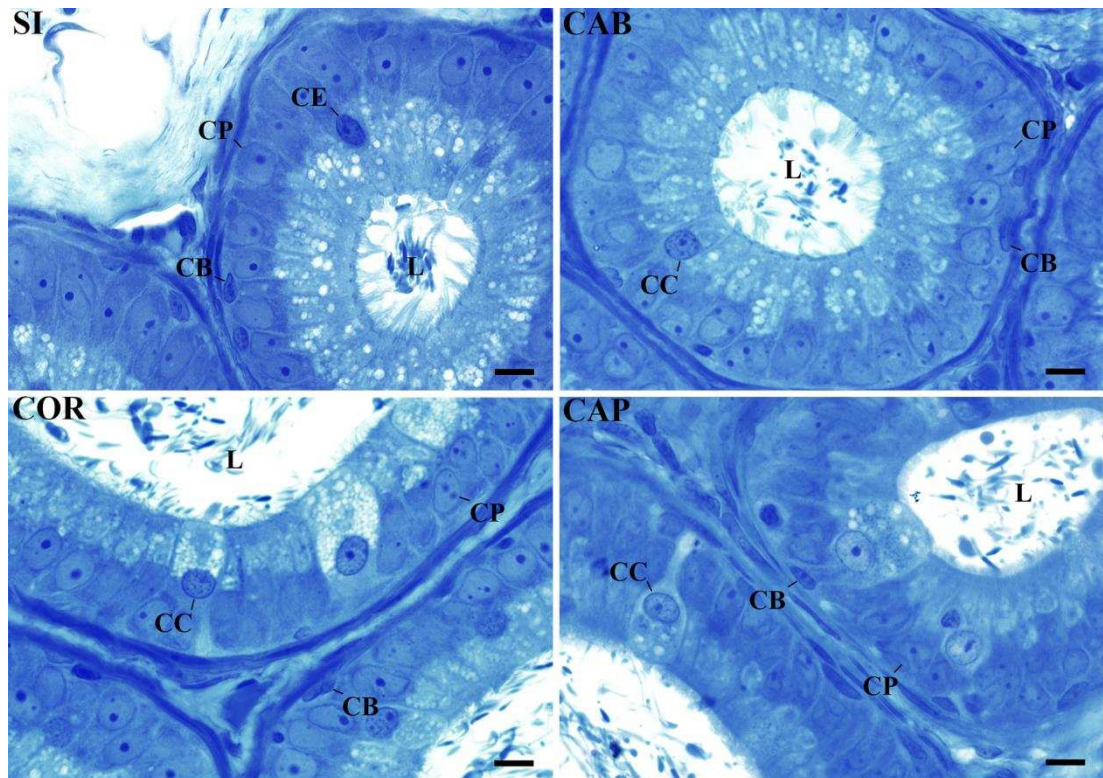


Fig. 2. Regiões do epidídimo de *Akodon cursor* e distribuição dos diferentes tipos celulares. Segmento inicial (SI), cabeça (CAB), corpo (COR), cauda proximal (CAP), lúmen (L), célula principal (CP), célula basal (CB), célula estreita (CE) e célula clara (CC). Azul de toluidina - borato sódio 1%. Barras: 5 μ m. As barras dos gráficos representam a média \pm erro padrão.

3.2. Produção diária de espermatozoide por testículo, número de espermatozoides e tempo de trânsito no epidídimo

Os resultados obtidos através das contagens de espermatozoides por testículo e epidídimo e tempo de trânsito pelo epidídimo foram expressos na Tabela 1.

Tabela 1

Produção diária de espermatozoides por testículo, número de espermatozoides e tempo de trânsito no epidídimo de *Akodon cursor*.

<i>Akodon cursor</i>	
Contagem de espermatozoide no testículo	
Número de espermatozoide ($\times 10^6$)	2,52 \pm 0,23
Número de espermatozoide ($\times 10^6$ /g)	25,49 \pm 2,63
Produção diária de espermatozoide ($\times 10^6$ /testículo/dia)	0,52 \pm 0,05
Contagem de espermatozoide no epidídimo	
Número de espermatozoide na cabeça/corpo ($\times 10^6$)	1,19 \pm 0,07
Número de espermatozoide na cabeça/corpo ($\times 10^6$ /g)	56,00 \pm 5,49
Tempo de trânsito do espermatozoide na cabeça/corpo (dias)	2,34 \pm 0,16
Número de espermatozoide na cauda ($\times 10^6$)	0,90 \pm 0,13
Número de espermatozoide na cauda ($\times 10^6$ /g)	111,88 \pm 18,78
Tempo de trânsito do espermatozoide na cauda (dias)	1,74 \pm 0,19
Tempo de trânsito do espermatozoide (dias)	4,07\pm0,32
Média \pm SEM	

3.3. Análise proteômica

Baseando na análise de espectrometria de massa, ao todo foram identificadas 22 proteínas no epidídimo de *Akodon cursor* (Tab. 2). Segundo a análise de ontologia gênica, as proteínas foram agrupadas de acordo com processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares (Fig. 3). Os maiores processos biológicos desse estudo foram regulação (24%) e processos celulares (22%) (Fig. 3A). Em relação à localização celular, proteína do citoplasma foi o mais abundante (15%), seguido de 14% de proteínas extracelulares (Fig. 3B). Como função molecular (Fig. 3C) de maior abrangência foi ligação, com 50%, seguido de atividade catalítica (22%).

Os processos de interação proteica para Marcks foram feitos com base na análise *in silico* (Fig. 4). Essa proteína está presente no epidídimo de *A. cursor*, e as interações apresentadas possuíram nível de confiança de 90% e interação com até 10 proteínas.

Tabela 2

Proteínas detectadas por *shotgun proteomics* (LC-ESI-MS/MS) no epidídimo de *Akodon cursor*. As buscas de proteínas foram feitas usando o Protein Lynx Global Server (v. 2.4) contra as entradas Rodentia do banco de dados Swissprot.

Proteínas	Acesso da proteína	Entrada da proteína	Pontuação da proteína	Massa média da proteína (Da)	Ponto isoeletrico (pI)
<i>14-3-3 protein beta chain</i>	P35213	1433B_RAT	464.2900	28054.4568	4.81
<i>14-3-3 protein theta chain</i>	P68254	1433T_MOUSE	173.9209	27778.3525	4.69
<i>14-3-3 protein zeta chain</i>	P63101	1433Z_MOUSE	1091.2710	27771.2128	4.73
<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	P20029	GRP78_MOUSE	198.4997	72422.1642	5.07
<i>Albumin</i>	P07724	ALBU_MOUSE	2792.9050	68692.7974	5.75
<i>Aldose reductase</i>	P45376	ALDR_MOUSE	342.6773	35732.3244	6.71
<i>Carbonic anhydrase 3</i>	P16015	CAH3_MOUSE	2736.8000	29366.3425	6.89
<i>Enolase alpha</i>	P17182	ENOA_MOUSE	828.7608	47140.9311	6.37
<i>Glutathione S transferase Mu 7</i>	Q80W21	GSTM7_MOUSE	1724.7000	25709.7006	6.34
<i>Heat shock 70 kDa protein 1-like</i>	P16627	HS71L_RAT	587.4894	70549.3337	5.90
<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	P63017	HSP7C_MOUSE	1584.4950	70871.1979	5.37
<i>Heat shock protein HSP 90 beta</i>	P11499	HS90B_MOUSE	402.8436	83281.4079	4.96
<i>Heat shock related 70 kDa protein 2</i>	P17156	HSP72_MOUSE	1052.4770	69641.7852	5.50
<i>Inducible heat shock protein 70 kDa</i>	Q61696	HS71A_MOUSE	183.1428	70079.2764	5.52
<i>Myristoylated alanine rich C kinase substrate</i>	P26645	MARCS_MOUSE	153.7113	29661.3414	4.33
<i>Peroxiredoxin 6</i>	O08709	PRDX6_MOUSE	77.4448	22494.2831	5.71
<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	P31044	PEBP1_RAT	278.3826	20801.4315	5.19
<i>Transferrin</i>	Q921I1	TRFE_MOUSE	1037.3470	76724.1230	6.94
<i>Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1</i>	Q66JP1	Q66JP1_MOUSE	2765.8040	14728.3645	9.87
<i>Ubiquitin C</i>	F1M0Q4	F1M0Q4_RAT	1180.7130	9477.9838	9.35
<i>Ubiquitin-40 S ribosomal protein S27a</i>	P62982	RS27A_RAT	670.7551	17950.9477	9.68
<i>Ubiquitin-60 S ribosomal protein L40</i>	P62984	RL40_MOUSE	421.7773	14072.6538	9.87

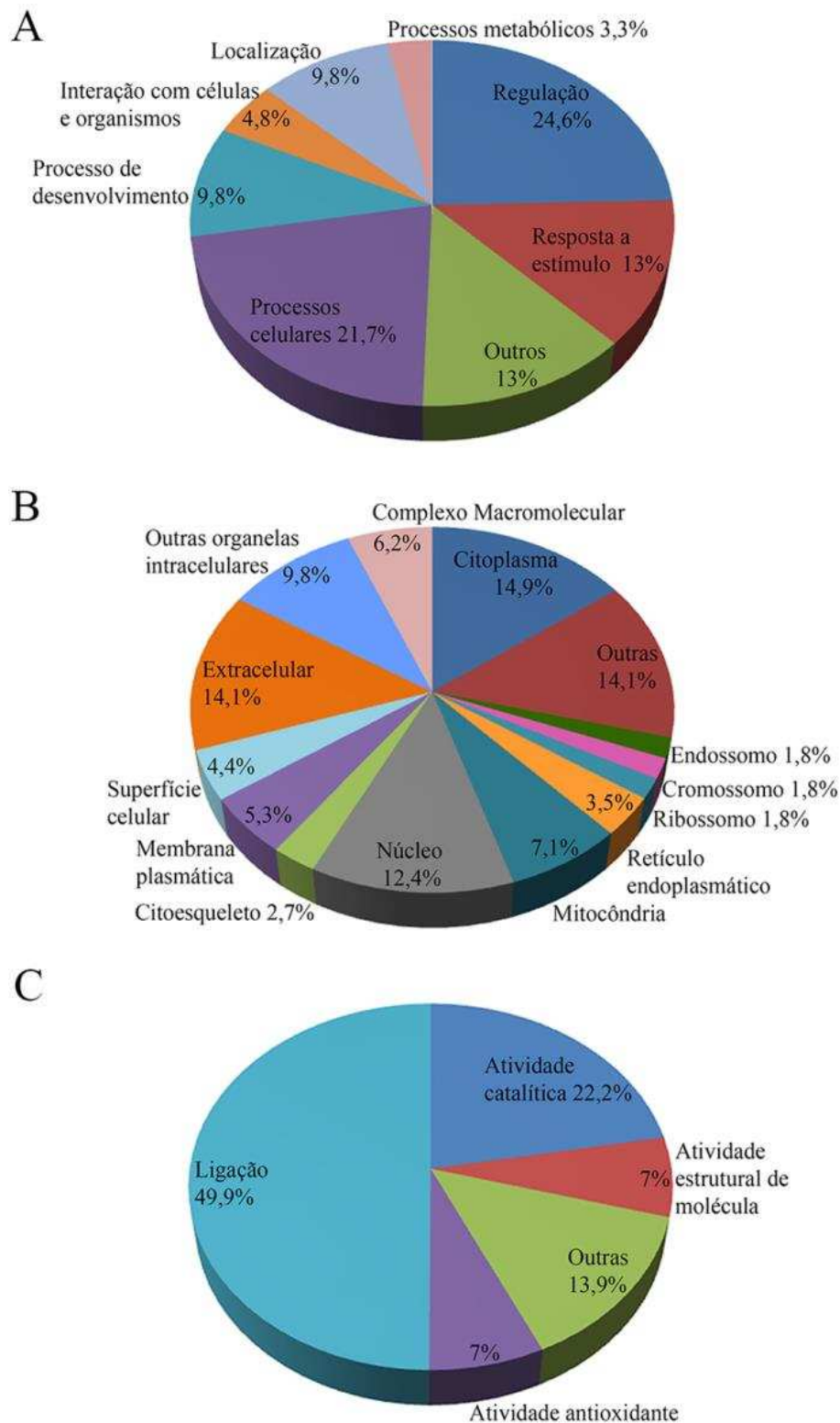


Fig. 3. Anotações de ontologia genética de proteínas identificadas no fluido luminal do epidídimo de *Akodon cursor* de acordo com o processo biológico (A), componente celular (B) e função molecular (C). Os dados de proteínas foram analisados utilizando a aplicação STRAP (Universidade de Boston, Faculdade de Medicina), das bases de dados UniProtKB e EBI GOA.

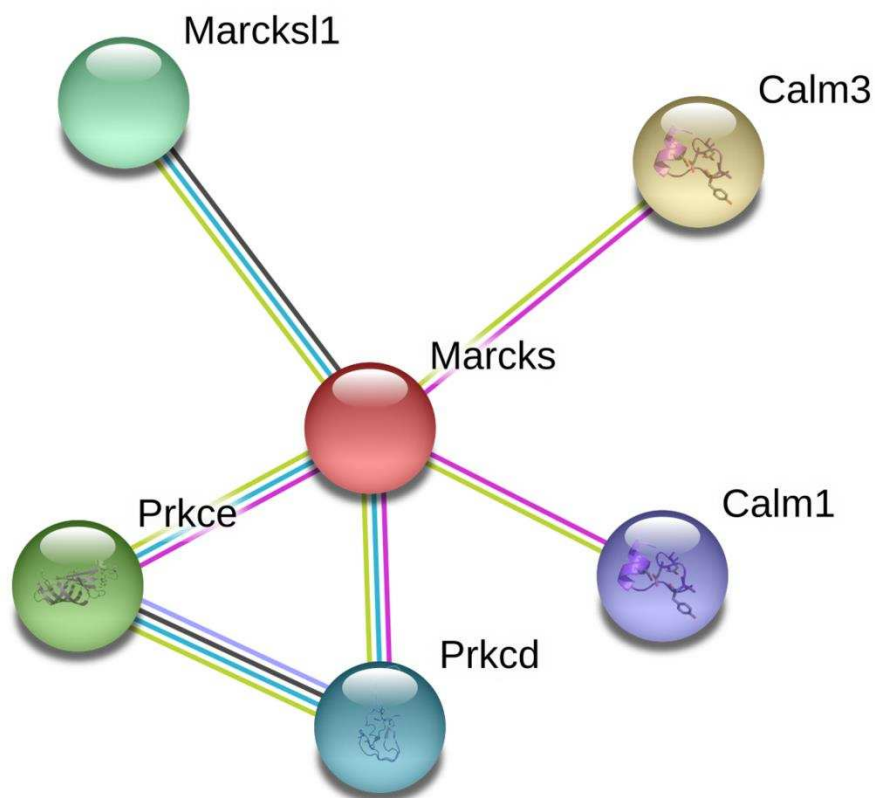


Fig. 4. Análise *in silico* da interação da proteína quinase C rica em alanina miristoilada (Marcks) presente no epidídimo de *Akodon cursor*. Análise feita com 90% de confiança e até 10 interações por meio do *software* STRING utilizando como base a espécie *Mus musculus*. Marcks: proteína quinase C rica em alanina miristoilada; Calm1: calmodulina 1; Calm3: calmodulina 3; Marcksl1: proteína 1 semelhante a Markcs; Prkcd: Proteína quinase C delta; Prkce: Proteína quinase C épsilon. Linha - Azul clara: proteína homóloga; Preta: co-expressão; Rosa: experimentalmente determinada; Verde: análise de dados e informações contidas em textos escritos; Azul escura: bancos de dados com curadoria.

4. Discussão

Este estudo descreve pela primeira vez o epidídimo de *A. cursor* quanto aos aspectos morfológicos, morfométricos, tempo de trânsito dos espermatozoides e secreção proteica. Nossos resultados descrevem aspectos importantes da fisiologia reprodutiva dessa espécie que poderão contribuir para estudos posteriores, focados no reprodutor masculino, bem como na sua preservação.

O epidídimo é um órgão andrógeno-dependente de forma que os hormônios controlam a dinâmica do mesmo e, com isso, o índice epididimossomático, que é calculado com base no peso do epidídimo e o peso corporal (Cosentino e Cockett, 1986; Hamzeh e Robaire, 2009; Robaire e Hinton, 2015). As regiões desse órgão são previamente separadas por septos de tecido conjuntivo que formam diferentes ambientes para secreção proteica e sua ação (Cornwall e Hann, 1995; Domeniconi et al. 2016).

O epitélio epididimário de ratos e camundongos possui o padrão em que a altura de epitélio é maior nos segmentos proximais, comparativamente com as regiões distais, por outro lado, os diâmetros tubular e luminal são menores (Serre e Robaire, 1998; Takano, 2007; Robaire e Hinton, 2015). Estudo do epidídimo de roedores que pertencem à mesma família de *A. cursor*, mostrou que seguem o padrão de ratos e camundongos (Menezes et al., 2017). Porém, é possível observar que o padrão em *A. cursor* foi um pouco diferente entre as regiões, devido ao fato do corpo possuir maiores diâmetros tubular e luminal do que a cauda proximal. Essas desigualdades entre as regiões epididimárias existem devido a diferenças funcionais ao longo do ducto, podendo estar relacionadas com secreção e absorção de componentes do fluido luminal, que são intensos durante o processo de maturação espermática (Cornwall e Hann, 1995; Robaire e Hinton, 2015).

Células principais, basais e claras foram observadas em *A. cursor*, sendo essas as mesmas descritas em ratos e camundongos, bem como nas espécies *C. tener* e *N. lasiurus* (Serre e Robaire, 1998; Robaire e Hinton, 2015; Menezes et al., 2017). A célula principal é a mais abundante no epidídimo, tanto da espécie em estudo como de outras, compondo em média 65-80% do epitélio epididimário (Cornwall, 2009; Robaire e Hinton, 2015; Menezes et al., 2017). Isso se deve pelo fato dessa célula ser responsável pela composição do fluido luminal e possuir grande maquinaria responsável por intensas atividades endocítica e secretória (Serre e Robaire, 1998; Takano, 2007; Cornwall, 2009; Robaire e Hinton, 2015).

A célula basal está presente em todas as regiões do epidídimo da espécie estudada e sua distribuição foi equivalente à de camundongos (Holschbach e Cooper, 2002). Sua atividade é de regular as funções das células principais, modulando o transporte de água e eletrólitos por meio da secreção de prostaglandina E2 (Leung et al. 2004; Cornwall, 2009; Shum et al., 2013; Robaire e Hinton, 2015).

A célula estreita, presente somente no SI, e a célula clara, presente na CAB, COR, CAP e CAD, possuem a mesma distribuição de ratos e camundongos (Robaire e Hinton, 2015; Breton et al., 2016). São responsáveis por realizam a acidificam o fluido luminal do epidídimo de modo a promover a maturação e motilidade dos espermatozoides (Breton et al., 1996; Robaire e Hinton, 2015; Breton et al., 2016).

O tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo de *A. cursor* foi em média de 4,07 dias e quando comparado com outros roedores foi mais próximo do camundongo C57BL/6 que, segundo Garcia et al. (2011), possui uma produção de 4,06 dias. Em relação à produção diária de espermatozoides por grama de testículo, a espécie em estudo apresentou produção de $25,49 \times 10^6$ /g de testículo, aproximando-se da produção diária de hamsters e ratos que ficam em torno de 24×10^6 /g (Robb et al., 1978; Amann, 1986).

A abordagem de proteínas, permitindo maior identificação de moléculas e reduzindo a perda de amostras, utilizada em *A. cursor* foi a mesma utilizada em *C. tener* e *N. lasiurus* (Menezes et al., 2017). Comparativamente, as proteínas detectadas em *A. cursor* foram, em sua maioria, iguais às de *C. tener* e *N. lasiurus*, porém com expressão de duas proteínas diferentes, sendo elas a substrato da proteína quinase C rica em alanina miristoilada (Marcks) e a proteína de choque térmico 90 (HSP90). O padrão de secreção proteica é espécie específico (Dacheux e Dacheux, 2014), justificando a diferença entre *C. tener* e *N. lasiurus* comparados a *A. cursor*, pertencente à mesma família. Funcionalmente, a Marcks é uma proteína multipotente e presente também no cérebro, sangue e óvulo (Mosevitsky et al., 2012). No aparelho reprodutor masculino, apresenta-se em células germinativas, principalmente em espermátides e em espermatozoides (Mosevitsky et al., 2012; Rodriguez Peña et al., 2013). No estudo da interação de proteínas *in silico*, pode-se observar que essa proteína possui a capacidade de ligação a calmodulina, podendo estar relacionada ao processo de fertilização (Mosevitsky et al. 2011; 2012). A HSP90 pertence ao grupo de proteínas HSPs de alto peso molecular e estão presentes desde a formação do gameta masculino no testículo até sua passagem pelo epidídimo (Majewska et al. 2017). A função dessa proteína está associada com a HSP70 realizando a dobragem e prevenindo a agregação de proteínas, além de estar envolvida na capacitação e maturação espermática (Dun et al., 2012; Majewska et al. 2017).

As demais proteínas descritas no epidídimo de *A. cursor* e semelhantes às identificadas nas espécies *C. tener* e *N. lasiurus* também estão presentes em outros

órgãos e secreções do corpo (por exemplo, sangue e fluidos) (Moura et al., 2010; Belleanné et al., 2011). A albumina é um exemplo, visto que é encontrada no sangue (Ochi et al., 2016) e epidídimo (Arroteia et al., 2014). No epidídimo, essa proteína pode estar envolvida no processo de remodelação da membrana dos espermatozoides, durante a maturação espermática e na reação acrossômica (Go e Wolf, 1985; Arroteia et al., 2014; van Tilburg et al., 2017). Além disso, atua na proteção dos espermatozoides contra radicais livres, mantém elevados os níveis de ATP dos espermatozoides e favorecendo a capacitação espermática (Armstrong et al., 1998; Moura et al., 2010; van Tilburg et al., 2017).

Proteínas relacionadas à função de proteção foram a maioria em *A. cursor*. A aldose redutase, presente nas duas regiões em estudo, é uma proteína de proteção dos espermatozoides impedindo lesão e processos inflamatórios, bem como contra o estresse oxidativo (Baba et al., 2011; Stanton et al., 2012; Tripathi et al., 2016). A anidrase carbônica 3, glutathione S transferase e a peroxiredoxina 6 são proteínas de proteção contra radicais de oxigênio, destruindo os radicais livres responsáveis pelo estresse oxidativo (Veri et al., 1993; Hermo et al., 2005; Sullivan e Saez, 2013).

Em resumo, esse trabalho foi o primeiro a caracterizar histomorfometricamente e fisiologicamente o epidídimo de *Akodon cursor*, bem como o tempo de trânsito do espermatozoide por esse órgão. O estudo da histofisiologia epididimária é capaz de definir as bases para a compreensão abrangente da biologia reprodutiva desses pequenos roedores silvestres. O estudo dos caracteres morfológicos de roedores sul-americanos é necessário, uma vez que pouco se sabe sobre sua reprodução e normalmente está relacionado com disponibilidade de habitat e alimento (D'Andrea et al., 2007).

Os dados gerados por esse trabalho são importantes para apoiar pesquisas que envolvam contaminantes ambientais e seus efeitos na reprodução. O epidídimo é geralmente um órgão-alvo de desreguladores endócrinos em animais silvestres que vivem em ambientes antrópicos devido a sua dependência de andrógenos. Portanto, todas as informações geradas podem ser usadas como modelo para futuros estudos que analisam o impacto de quaisquer fatores ambientais sobre a funcionalidade do epitélio do epidídimo.

5. Referências

- Amann, R.P., 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. *Am. J. Anat.* 110, 49-67.
- Amann, R.P., 1986. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environ Health Perspect.* 70:149-58.
- Armstrong, J.S., Rajasekaran, M., Hellstrom, W.J., Sikka, S.C., 1998. Antioxidant potential of human serum albumin: role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology. *J Androl.* Jul-Aug;19(4):412-9.
- Arroteia, K.F., Barbieri, M.F., Souza, G.H., Tanaka, H., Eberlin, M.N., Hyslop, S., et al., 2014. Albumin is synthesized in epididymis and aggregates in a high molecular mass glycoprotein complex involved in sperm-egg fertilization. *PLoS One* 9, e103566.
- Baba, S.P., Hellmann, J., Srivastava, S., Bhatnagar, A., 2011. Aldose reductase (AKR1B3) regulates the accumulation of advanced glycosylation end products (AGEs) and the expression of AGE receptor (RAGE). *Chem. Biol. Interact.*, 191, 357-63.
- Balarini, M.K., 2013. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico dos roedores silvestres *Akodon cursor* e *Oligoryzomys nigripes* (RODENTIA: Cricetidae). Universidade Federal de Viçosa, xi, 81f.
- Belleannée, C., Belghazi, M., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.P., Gatti, J.L., Dacheux, J.L., Dacheux, F., 2011. Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *Proteomics.* 11, 1952-64.
- Beu, C.C.L., Orsi, A.M., Domeniconi, R.F., 2009. Structure of the lining epithelium of the cauda epididymis of the golden hamster. *Anat. Histol. Embryol.*, 38, 49-57.
- Bhatia, V.N., Perlman, D.H., Costello, C.E., McComb, M.E., 2009. Software tool for researching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. *Anal.Chem.* 81, 9819-23.
- Breton, S., Ruan, Y.C., Parque, Y.J., Kim, B., 2016. Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. *Asian. J. Androl.*, 18, 3-9.

- Breton, S., Smith, P.J., Lui, B., Brown, D., 1996. Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nat Med.*, 2, 470-2.
- Cáceres, N.C., Dittrich, V.A.O., Monteiro-Filho, E.L.A., 1999. Fruit consumption, distance of seed dispersal and germination of Solanaceous plants ingested by the common opossum (*Didelphis aurita*) in southern Brazil. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 54, 225-234.
- Cáceres, N.C., Bornschein, M.R., Lopes, W.H., 2008. Uso do hábitat e a conservação de mamíferos no sul do bioma Cerrado, in: Reis, N.R., Peracchi, A.L., Santos, G.A.S.D. (Ed.), *Ecologia de Mamíferos*. Londrina, pp. 123-132.
- Canale, G.R., Peres, C.A., Guidorizzi, C.E., Gatto, C.A.F., Kierulff, M.C.M., 2012. Pervasive defaunation of forest remnants in a tropical biodiversity hotspot. *PloS One*, 7, e41671.
- Carvalho, F.M.V., Pinheiro, P.S., Fernandez, F.A.S., Nessimian, J.L., 1999. Diet of small mammals in Atlantic Forest fragments in southeastern Brazil. *Rev. bras. de Zootecias*, 1, 91-101.
- Cornwall, G.A., 2009. New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod. Update*, 15, 213–227.
- Cornwall, G.A., Hann, S.R., 1995. Specialized gene expression in the epididymis. *J. Androl.*, 16, 379-383.
- Cosentino, M.J., Cockett, A.T.K., 1986. Review Article: Structure and Function of the Epididymis. *Urol. Res.*, 14, 229-240.
- D'Andrea, P.S., Gentile, R., Maroja, L.S., Fernandes, F.A., Coura, R., Cerqueira, R., 2007. Small mammal populations of an agroecosystem in the Atlantic Forest domain, southeastern Brazil. *Braz. J. Biol.*, 67, 179-186.
- Dacheux, J.L., Dacheux, F., 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction.*, 147, R27-42.
- David, H.C., da Silva, G.F., Pezzopane, J.E.M., Netto, S.P., Pimentel, L.B., Araújo, E.J.G., Pelissari, A.L., 2017. Quantification and conservation status of forest fragments in part of Brazilian Atlantic Forest. *Afr. J. Agric. Res.*, 12, 740-749.
- Domeniconi, R.F., Souza, A.C., Xu, B., Washington, A.M., Hinton, B.T., 2016. Is the Epididymis a Series of Organs Placed Side By Side? *Biol. Reprod.*, 95, 10.
- Dun, M.D., Aitken, R.J., Nixon, B., 2012. The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. *Hum. Reprod. Update.*, 18, 420-35.

- Gannon, W.L., Sikes, R.S., 2007. The Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J. Mammal.*, 88, 809-823.
- Garcia, P.V., Arrotéia, K.F., Joazeiro, P.P., de Fátima, S.P.M., Kempinas W.G., Pereira L.A., 2011. Orchidopexy restores morphometric-stereologic changes in the caput epididymis and daily sperm production in cryptorchidic mice, although sperm transit time and fertility parameters remain impaired. *Fertil Steril.* 96:739-44.
- Geise, L., 2012. *Akodon cursor* (Rodentia: Cricetidae). *Mammalian Species.*, 44, 33-43.
- Go, K.J., Wolf, D.P., 1985. Albumin-Mediated Changes in Sperm Sterol Content During Capacitation. *Biology of Reproduction* 32, 145-153.
- Hamzeh, M., Robaire, B., 2009. Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. *J. Androl.*, 30, 200-12.
- Hermo, L., Chong, D.L., Moffatt, P., Sly, W.S., Waheed, A., Smith, C.E., 2005. Region- and Cell-specific Differences in the Distribution of Carbonic Anhydrases II, III, XII, and XIV in the Adult Rat Epididymis. *J. Histochem. Cytochem.*, 53, 699-713.
- Holschbach, C., Cooper, T.G., 2002. A possible extratubular origin of epididymal basal cells in mice. *Reproduction.*, 123, 517–525.
- Jones, R.C., 1999. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int. J. Androl.*, 22, 57-67.
- Kempinas, W.D., Suarez, J.D., Roberts, N.L., Strader, L., Ferrell, J., Goldman, J.M., Klinefelter, G.R., 1998. Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biol Reprod.*, 59, 890-6.
- Leung, G.P.H., Cheung, K.H., Leung, C.T., Tsang, M.W., Wong, P.Y.D., 2004. Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol. Cell. Endocrinol.*, 216, 5–13.
- Magnago, L.F.S., Edwards, D.P., Edwards, F.A., Magrach, A., Martins, S.V., Laurance, W.F., 2014. Functional attributes change but functional richness is unchanged after fragmentation of Brazilian Atlantic forests. *Journal of Ecology*, 102, 475–485.

- Majewska, A.M., Kordan, W., Kozirowska-Gilun, M., Wysocki, P., 2017. Identification and changes in the seasonal concentrations of heat shock proteins in roe deer (*Capreolus capreolus*) epididymides. *Reprod Domest Anim.*, 52, 107-114.
- Menezes, T.P., Castro, M.M., Vale, J.A., Moura, A.A.A., Lessa, G., Machado-Neves, M., 2017. Proteomes and morphological features of *Calomys tener* and *Necromys lasiurus* (Cricetidae, Sigmodontinae) epididymides. *J. Mammal.*, 98, 579-590.
- Mosevitsky, M.I., Silicheva, I., 2011. Subcellular and regional location of “brain” proteins BASP1 and MARCKS in kidney and testis. *Acta Histochem.*, 113, 13-8.
- Mosevitsky, M.I., Snigirevskaya, E.S., Komissarchik, Y.Y., 2012. Immunoelectron microscopic study of BASP1 and MARCKS location in the early and late rat spermatids. *Acta Histochem.*, 114, 237-43.
- Moura, A.A., Souza, C.E., Stanley, B.A., Chapman, D.A., Killian, G.J., 2010. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *J. Proteomics.*, 73, 2006-20.
- Rodriguez Peña, M.J., Castillo Bennett, J.V., Soler, O.M., Mayorga, L.S., Michaut, M.A., 2013. MARCKS Protein Is Phosphorylated and Regulates Calcium Mobilization during Human Acrosomal Exocytosis. *PLoS One.*, 8, e64551.
- Ochi, Y., Kazuma, Y., Hiramoto, N., Ono, Y., Yoshioka, S., Yonetani, N., Matsushita, A., Imai, Y., Hashimoto, H., Ishikawa, T., 2016. Utility of a simple prognostic stratification based on platelet counts and serum albumin levels in elderly patients with diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol.*, 96, 1-8.
- Orgebin-Crist, M.-C., 1969. Studies on the Function of the Epididymis. *Biol Reprod.*, 1, 155-175.
- Peres, C.A., 2001. Synergistic effects of subsistence hunting and habitat fragmentation on Amazonian forest vertebrates. *Conservation Biology.*, 15, 1490-1505.
- Rambaldi, D.M., Oliveira, D.A.S., 2003. Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- Rego, J.P., Crisp, J.M., Moura, A.A., Nouwens, A.S., Li, Y., Venus, B., Corbet, N.J., Corbet, D.H., Burns, B.M., Boe-Hansen, G.B., McGowan, M.R., 2014.

- Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Animal Reproduction Science* 148, 1-17.
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J., Hirota, M.M., 2009. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed?: implications for conservation. *Biological Conservation.*, 142,1141-1153.
- Robaire, R., Hinton, B.T., 2015. The epididymis, in: Plant, T.M., Zeleznik, A.J. (eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Four edition. Elsevier, Cambridge, pp. 691-771.
- Robb, G.W., Amann, R.P., Killian, G.J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fert.*, 54, 103-107.
- Serre, V., Robaire, B., 1998. Segment-specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. *Biol. Reprod.*, 58, 497-513.
- Shum, W.W.C., Hill, E., Brown, D., Breton, S., 2013. Plasticity of Basal Cells during Postnatal Development in the Rat Epididymis. *Reproduction.*, 146, 455-69.
- Souza, C.E., Rego, J.P., Lobo, C.H., Oliveira, J.T., Nogueira, F.C., Domont, G.B., Fioramonte, M., Gozzo, F.C., Moreno, F.B., Monteiro-Moreira, A.C.O., Figueiredo, J.R., Moura, A.A., 2012. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *J Proteomics* 75, 4436-56.
- Stanton, P.G., Sluka, P., Foo, C.F., Stephens, A.N., Smith, A.I., Mclachlan, R.I., O'Donnell, L., 2012. Proteomic changes in rat spermatogenesis in response to in vivo androgen manipulation; impact on meiotic cells. *PLoS One* 7, e41718.
- Sullivan, R., Saez, F., 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction.*, 146, R21-35.
- Takano, H., 2007. Histological division of mouse epididymis based on regional differences. *Hirosaki Medical Journal.*, 59, S292-S301.
- Tripathi, M., Singh, A.P., Gupta, G., Rajender, S., 2016. Concomitant and discrete expressions of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in the male reproductive tract. *Acta Histochem.*, 118(8), 776-783.
- Turner, T.T., Bomgardner, D., Jacobs, J.P., Nguyen, Q.A., 2003. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction.*, 125, 871-878.

- van Tilburg, M.F., Salles, M.G., Silva, M.M., Moreira, R.A., Moreno, F.B., Monteiro-Moreira, A.C., et al., 2015. Semen variables and sperm membrane protein profile of Saanen bucks (*Capra hircus*) in dry and rainy seasons of the northeastern Brazil (3°S). *Int J Biometeorol* 59, 561-73.
- van Tilburg, M.F., Sousa, S.D., Ferreira de Melo, R.B., Moreno, F.B., Monteiro-Moreira, A.C., Moreira, R.A., de Alencar Moura, A., 2017. Proteome of the rete testis fluid from tropically-adapted Morada Nova rams. *Anim Reprod Sci.* 176, 20-31.
- Veri, J.P., Hermo, L., Robaire, B., 1993. Immunocytochemical Localization of the Yf Subunit of Glutathione S-Transferase P Shows Regional Variation in the Staining of Epithelial Cells of the Testis, Efferent Ducts, and Epididymis of the Male Rat. *J. Androl.*, 14, 23-44.
- Vieira, M.V., 1997. Dynamics of a rodent assemblage in a cerrado of southeast Brazil. *Rev Bras Biol.*, 57, 99-107.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do estudo Avaliação Histomorfométrica e Proteômica dos Epidídimos de *Calomys tener*, *Necomys lasiurus* e *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) foi possível observar que:

- É o primeiro estudo histofisiológico do epidídimo das espécies *Calomys tener*, *Necomys lasiurus* e *Akodon cursor*;
- Histomorfometricamente, *C. tener* possui maiores diâmetros tubulares e luminais nas três regiões estudadas (cabeça, corpo e cauda) do que *N. lasiurus*;
- A proporção de distribuição das células principal, basal e clara foi semelhante nas duas espécies (*C. tener* e *N. lasiurus*), sendo a principal a mais abundante;
- Na abordagem proteômica, 58 proteínas foram identificadas em *C. tener* e 64 em *N. lasiurus*;
- A comparação da análise de ontologia genética das proteínas encontradas nas regiões nas espécies *C. tener* e *N. lasiurus*, pode-se observar em processos biológicos que houve diferenças entre as espécies, bem como ausência de proteínas relacionadas à localização na cabeça de *C. tener* e ausência de proteínas relacionadas ao processo do sistema imune na cauda de *N. lasiurus*. Em relação à ontologia genética dos componentes celulares, houve similaridade entre as duas espécies. Já em relação as funções moleculares, a houve diferença na presença de atividade estrutural da molécula que foi ausente na cabeça de *N. lasiurus* e na cauda de *C. tener*;
- *A. cursor* possui o epidídimo dividido em 5 regiões, denominadas segmento inicial, cabeça, corpo, cauda proximal e cauda distal;
- A região da cauda distal de *A. cursor* obteve maior diâmetro tubular e luminal quando comparado com as demais regiões;
- As regiões do corpo e cauda distal de *A. cursor* têm menor altura epitelial do que as demais regiões;
- As células principais, basais, estreitas e claras foram observadas no epidídimo de *A. cursor*, sendo a célula estreita presente somente no segmento inicial e a clara nas demais regiões;

- As células principais foram as mais abundantes em todas as regiões do epidídimo de *A. cursor*, seguido da basal;
- O tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo de *A. cursor* é de 4,07 dias;
- Nos epidídimos de *A. cursor* foram identificadas 22 proteínas que realizam diversos processos, desde proteção até a maturação dos espermatozoides.