

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

MOLINE SEVERINO LEMOS

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO ÂNULO NUCLEAR DE
ESPERMATOZOIDE BOVINO

UBERLÂNDIA
2013

MOLINE SEVERINO LEMOS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO ÂNULO NUCLEAR DE
ESPERMATOZOIDE BOVINO**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural Aplicadas da Universidade Federal
de Uberlândia, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre.**

**Área de concentração: Biologia da
Reprodução**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti

**UBERLÂNDIA
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L557c
2013

Lemos, Moline Severino, 1986-

Caracterização morfológica e bioquímica do ânulo nuclear de espermatozoide bovino / Moline Severino Lemos. -- 2013. 46 f : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Bovino - Reprodução - Teses. 3. Bovino - Espermatozoides - Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora por terem me dado forças, saúde e por iluminar meu caminho para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida;

Aos meus pais, Lincoln e Terezinha, por todo amor, exemplo e dedicação que sempre tiveram comigo, heróis, que me ensinaram a não temer desafios e a superar os obstáculos com humildade;

Ao meu irmão Rafa e minha cunhada pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo;

A minha vovó Terezinha, por todo aconchego, mimos, orações e exemplos de fé e força;

Agradeço ao meu quarteto biomédico que tanto amo, Daniel, Taís e Débora, que me fizeram uma pessoa melhor, são os melhores amigos que alguém poderia ter, são presentes que o papai do céu me deu; estarão sempre nas minhas melhores lembranças desses meus últimos seis anos e sei que independente do caminho que cada um trilhar agora vamos sempre estar presente na vida um do outro;

Ao Higor Silvério, pelo companheirismo, amor e paciência;

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti, meu orientador e amigo, por confiar em mim, pela paciência, por sempre estar disponível e por todo aprendizado... foi ele que me fez apaixonar pela pesquisa e com certeza esse trabalho só foi possível por sua causa;

Aos professores Dr. Fábio de Oliveira e Dr. Alberto da Silva Moraes, agradeço por toda ajuda e carinho, profissionais que admiro tanto;

A todo corpo docente do programa de pós-graduação em biologia celular e estrutural aplicadas, pelos ensinamentos transmitidos e pelo espaço cedido para a realização desse trabalho. Tenham certeza de que aprendi muito com vocês e que levo em minha bagagem um pouco de cada um;

Aos mestres que tive o prazer de conhecer ao longo da minha formação acadêmica: Prof. Ernesto Bernardi, Profa. Dra. Benvinda Rosalina, Prof. Dr. Dennys Xavier, Profa. Estela Oliveira, Prof. Dr. Marco Aurélio Martins, Profa. Dra. Karen, Profa. Dra. Tatiana Tomiosso, Profa. Dra. Neide Maria, Prof. Dr. Sérgio Vitorino, Prof. Frederico Balbino, Prof. Dr. Júlio Mendes...

Aos meus amigos e irmãos de toda vida, Janaina, Flaiane, Joyce Valadão, Marcella Finotti, Jéssica Rosa, Gustavo Rosa, Bruna Lorena, Fernanda Chaves, Paula Mendes, Cássio, Ludmila, Verônica, Tamara Faria, Priscila Bianca, Gabi Gonçalves, Érica, Juliana, Nathy, Carla Mamede, Lays Rocha, João Paulo, Maria Stela, Niel Bernardes, Lara Reis, Sidney, Tafarel, Alexssandra... que me mostram o quanto é importante se ter amigos, sempre dividindo comigo momentos alegres e especiais, com eles a estrada se torna mais divertida e bonita!!!

Agradeço aqueles que mesmo distante fisicamente sempre se fizeram presentes na minha vida, Camila Martinelli, Telma, Larissa, Jonatas, Filho, Duda, Rafael Pires, Gleisy, Gustavo Borges, Laís Campos, Flávia Borges...torcendo por minha felicidade e me inspirando cada um da sua forma;

Ao Dr. Marcius Kleber e a minha terapeuta Dra. Virgínia, pelo amor e cuidados quando meu corpo esteve doente;

A Dra. Priscila Moreira e Dra. Aline de Lúcio, agradeço por toda ajuda nos experimentos e amizade que levarei sempre comigo;

Aos técnicos, Mariani, Marcelo e Rosiane pela atenção e paciência, adoro vocês!!!

Ao laboratório de atrito e desgaste da UFU em especial ao Prof. Sinésio e ao técnico Flávio pela ajuda na utilização do microscópio eletrônico de varredura;

Ao Prof. Dr. Carlos Ueira do laboratório de Biotecnologia da UFU, a Bruna França e Washington, pela atenção, carinho e disponibilidade;

Aos membros da banca pelo aceite e pela disponibilidade em ler o trabalho e dar suas sugestões;

À FAPEMIG em especial, pelo financiamento do projeto e da minha bolsa de mestrado; ao CNPq, ao ICBIM e à Universidade Federal de Uberlândia;

Enfim agradeço a todos familiares, amigos e colegas que contribuíram para que eu pudesse concluir esse sonho. Muito Obrigada!!! Amo muito vocês!!!

*"Há um tempo em que é preciso abandonar as
roupas usadas, que já tem a forma do nosso
corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos
levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo
da travessia e, se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado, para sempre, à margem de nós
mesmos..."(Fernando Pessoa)*

RESUMO

A matriz nuclear dos espermatozoides possui papel crucial na regulação, fragmentação e degradação do DNA antes e depois da fertilização, e na replicação do DNA paterno depois da fertilização. Com o propósito de melhor conhecer a organização da matriz nuclear de espermatozoides de touros, o ânulo nuclear da matriz nuclear de espermatozoides bovinos foi isolado e por visualização em microscopia eletrônica de varredura foram mensurados seu comprimento e largura. Com o isolamento do ânulo nuclear, verificou-se que este em espermatozoides de touro possui formato elíptico com comprimento e largura médios de 1,10 μm e 0,54 μm , respectivamente. Além disso, a análise citoquímica permitiu caracterizar o ânulo nuclear como uma estrutura glicoproteica complexada com DNA e o MALD-TOF evidenciou que o complexo é formado por inúmeras proteínas sendo algumas de alto peso molecular. Dentre estas proteínas, existem algumas com grande peso molecular (em torno de 400 kDa), já identificadas no genoma bovino, mas ainda não caracterizadas. Existem outras proteínas (KTR9 e proteína associada ao microtúbulo) que sugerem ser o ânulo nuclear uma estrutura transenvoltório nuclear e outras que sugerem que o mesmo participe do processo de compactação da cromatina (MGC127041, MGC137211) e mesmo da morfogênese (KRT9 e DPY19L2) da cabeça durante a espermiogênese.

Palavras-chave: Espermatozoide, matriz nuclear, microscopia de varredura, ânulo nuclear

ABSTRACT

The sperm nuclear matrix has the critical role in regulation of DNA fragmentation and degradation before and after fertilization, and paternal DNA replication after fertilization. In order to better understand the organization of the nuclear matrix sperm of bulls the annulus nuclear the nuclear matrix of bovine sperm was isolated and visualization in scanning electron microscopy were measured its length and width. With the isolation of the nuclear annulus, it was found that in this bull sperm has an elliptical shape with the mean length and width 1.10 μm and 0.54 μm respectively. In addition, histochemical analysis allowed characterization of the annulus, as a nuclear structure glycoprotein complexed with DNA and MALD-TOF showed that the complex is formed by any of numerous proteins with high molecular weight. Among these proteins, there are some high molecular weight (about 400 kDa), as identified in bovine genome but not yet characterized. There are other proteins (KTR9 and microtubule-associated protein), which suggest that the annular structure is trans nuclear envelope and other that suggests it participates in the process of chromatin condensation (MGC127041, MGC137211), and morphogenesis (KRT9 and DPY19L2) of the head during spermiogenesis.

Keywords: *nuclear annulus*, nuclear matrix, scanning electron microscopy, spermatozoon.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** Níveis equivalentes de embalagem DNA em células somáticas (esquerda) e células espermáticas (direita).....19
- FIGURA 2-** Coloração citoquímica dos ânnulos nucleares: (A) xilydina ponceau (para identificar componentes proteicos), (B) PAS (glicoproteínas neutras) e (C) azul de toluidina pH 4.0 (evidencia DNA).....29
- FIGURA 3-** Eletromicrografias de ânnulos nucleares: (A) vários ânnulos nucleares isolados em menor aumento; (B) ânnulo nuclear isolado com suas mensurações: PaR1-Pa1 (Comprimento) e PaR2-Pa2 (Largura).....30
- FIGURA 4-** Microscopia eletrônica de varredura: (A) ânnulo nuclear (vermelho) ligado à cabeça do espermatozóide por cromatina (azul). (B) vários anéis nucleares isolados.....31
- FIGURA 5-** Separação das proteínas do por eletroforese (SDS-PAGE): (A) abordagem 1 e (B) abordagem 2.....32
- FIGURA 6-** Perfil cromatográfico da cromatografia HPLC fase reversa. Na abcissa tem-se a numeração dos tubos coletados e na ordenada à leitura da absorbância, a linha vermelha- leitura em 214 nm e a azul- leitura em 280 nm.....34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Extração ânulo nuclear.....	23
3.2. Análise Citoquímica.....	24
3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	25
3.4. Análise por LC-MS/MS da amostra purificada.....	25
3.5. Cromatografia Fase Reversa HPLC.....	27
3.6. Estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Análise Citoquímica.....	29
4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	30
4.3. Análise por LC-MS/MS da amostra purificada.....	32
4.4. Cromatografia Fase Reversa HPLC.....	34
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÃO.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1- INTRODUÇÃO

Estudos recentes com roedores têm sugerido que a matriz nuclear dos espermatozoides possui papel crucial na regulação do DNA depois da fertilização, regulando fragmentação e degradação do DNA antes e depois da fertilização, e a replicação do DNA paterno depois da fertilização. Este dois processos estão intimamente ligados e podem responder a sinais provenientes do zigoto *in vivo*.

Na maioria das células, o DNA é funcionalmente organizado por uma rede proteica designada de matriz nuclear. Quando isolada e visualizada por microscopia eletrônica, esta ultraestrutura assemelha-se a arquitetura fibrosa do citoesqueleto. A lista de proteínas compreendendo a matriz nuclear é vasta e, até certo grau é do tipo célula dependente. Associado com a matriz nuclear tem-se várias proteínas estruturais como actina e miosina e lamina B, bem como fatores de transcrição tais como os modificadores de topoisomerases (JOHNSON et al., 2011).

A matriz nuclear é necessária para a replicação do DNA apoia a sugestão de que a matriz nuclear espermática fornece um pouco da composição de pronúcleo do zigoto recém-fertilizado (BARTON et al., 2005). Apesar da quase inexistência de pesquisas sobre a matriz nuclear de espermatozoides de touro, Beletti et al (2004) observaram que as alterações na cromatina de espermatozoides bovinos ocorrem principalmente em regiões onde o DNA se liga a matriz nuclear, ou seja, no eixo central e na base da cabeça. Por sua importância para a função do pronúcleo paterno e conseqüentemente para a fertilização e desenvolvimento do embrião e devido à localização da maioria das alterações da cromatina espermática, acredita-se que as pesquisas sobre integridade do DNA espermático em touros devem se focar na matriz nuclear e sua associação com o DNA. No entanto, pouco ou quase nada se sabe sobre a localização e caracterização da matriz nuclear de espermatozoides de touro.

Com o presente trabalho objetivou-se identificar e caracterizar o ânulo nuclear (componente da matriz nuclear) de espermatozoides de touro.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Descoberta e características dos espermatozoides

Os espermatozoides foram descritos pela primeira vez a mais de 300 anos por Leeuwenhoek. Ele notou que cada um dos *animalículos*, como foram denominados os espermatozoides, tinham uma cabeça e uma cauda. Houve grande controvérsia sobre o real significado dos espermatozoides por muitos anos, até que em 1830 eles foram reconhecidos como parte do sêmen e essenciais para fertilidade do indivíduo (STECHELL et al., 1982).

A capacidade de fecundação dos espermatozoides está em função de alguns dos aspectos funcionais mais importantes, como a motilidade progressiva, capacitação, reação acrossômica e habilidade de ligação e penetração no ovócito resultando no desenvolvimento embrionário (JONES, 1998). Os espermatozoides para serem capazes de fecundar o ovócito, devem ser morfológica e funcionalmente normais, características originadas no testículo durante a espermatogênese (NISHIMUNE e OKABE, 1993) e complementadas na passagem pelo epidídimo (fase de maturação) (BANKS, 1992).

2.2- Desenvolvimento fetal e gametogênese masculina

Durante a vida fetal e neonatal, a gametogênese e a esteroidogênese parecem independentes, ao passo que no início da puberdade elas se tornam intimamente relacionadas. Os testículos, assim como os ovários, possuem dupla função: uma endócrina e outra exócrina. Sendo, a espermatogênese, estimulada pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e aumentada pela ação dos andrógenos, principalmente a testosterona (BANKS, 1992).

A estrutura básica dos testículos permanece inalterada desde a diferenciação sexual até o início da puberdade. Os cordões seminíferos são delimitados por células de sustentação, enquanto que as células germinativas indiferenciadas ou gonócitos ocupam a parte central (BANKS, 1992).

O tecido intersticial que preenche o espaço entre os cordões sexuais é composto de células alongadas do tipo conjuntivo e de células esteroidogênicas, reconhecidas por um retículo liso abundante e pela presença de mitocôndrias com cristas tubulares. As células de Leydig secretam andrógenos logo que a função gonadotrófica seja desencadeada. Contudo, as células de Leydig são sensíveis às gonadotrofinas e sua atividade esteroidogênica contínua depende intimamente da secreção gonadotrófica. Em bovinos, a secreção de gonadotrofinas tem início com 45 dias e, as células de Leydig fetais são rapidamente

estimuladas pelo LH e a testosterona até a regressão da função gonadotrófica (HAFEZ, 1995).

No início da puberdade recomeça a secreção de gonadotrofinas e as células de Leydig são reativadas. Em suínos, as células de Leydig que foram ativadas durante a vida fetal e neonatal, ocupam grandes áreas entre os túbulos, enquanto que após a puberdade, as células peritubulares é que são mais ativas (VAN STRAATEN e WENSING, 1978). Esta observação tende a dar reforço à hipótese há muito debatida de que existem duas populações de células de Leydig, uma fetal e outra na puberdade.

Do ponto de vista prático, um animal macho atinge a puberdade quando for capaz de emitir gametas e de manifestar sequências completas de comportamento sexual. Basicamente, a puberdade é o resultado de um ajustamento gradual entre a atividade gonadotrófica em crescimento e a habilidade das gônadas de simultaneamente a esteroidogênese e a gametogênese. No macho, a testosterona aumenta progressivamente desde os níveis muito baixos até os de adulto, em resposta à secreção de gonadotrofinas. O alcance da secreção de testosterona aumenta à medida que a puberdade avança, e finalmente os níveis médios de testosterona permanecem definitivamente altos (BANKS, 1992).

No início da puberdade, os níveis de secreção gonadotrófica aumentam sua amplitude e frequência pulsáteis (FOSTER et al., 1978).

O espermatozoide é o produto final da gametogênese masculina, a qual ocorre dentro dos túbulos seminíferos dos testículos. Este processo envolve uma série de divisões mitóticas das células germinativas primordiais, duas divisões meióticas dos espermatócitos e um processo de remodelagem das espermatídes, dito espermiogênese, antes do gameta masculino ser liberado na luz dos túbulos seminíferos por espermição e para uma espermatogênese ótima os testículos dos mamíferos devem descer para a bolsa escrotal (BANKS, 1992).

A espermatogênese está ligada, como qualquer outro fenômeno metabólico, ao acionamento de hormônios, mediante o comando da hipófise e dos testículos. É uma sequência de eventos pelos quais as espermatogônias se transformam no final em espermatozóides. A espermatogênese ocorre a nível dos tubos seminíferos dos testículos e divide-se em quatro fases: multiplicação, crescimento, maturação e diferenciação ou espermiogênese (BANKS, 1992).

A função testicular normal requer estimulação hormonal pelas gonadotrofinas que por sua vez, são controladas por secreções pulsáteis de hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo.. Tamanha a importância do eixo-hipotálamo- hipófisário -gonadal é comprovada quando realiza-se a hipofisectomia, resultando na cessação da espermatogênese.

Sendo restaurada após tratamento com FSH e LH ou FSH e testosterona, feito imediatamente a cirurgia em ratos. Em outras espécies, contudo, requerem FSH em adição ao esteroide para a manutenção da espermatogênese (BANKS, 1992).

Outros hormônios (prolactina, hormônio do crescimento e hormônio estimulante da tireóide) podem apresentar papéis secundários no suporte à função testicular embora não existam evidências que comprovem tal fato (SCHANBACHER, 1984).

Imprescindível à espermatogênese é a presença e expressão de várias proteínas específicas para cada uma das suas fases de formação celular. Dentre estas proteínas, de extrema importância estão as histonas, que, na fase final da espermatogênese, são substituídas por protaminas cujo papel é reorganizar o DNA, constituindo-se uma estrutura altamente condensada, a cromatina (WARD et al., 1999).

No processo de reorganização da cromatina, desempenha papel importante o grupo de proteínas de transição (TP - *transition nuclear proteins*) (YU et al., 1999). No início da meiose e pós-meiose, foi observado que as proteínas HSP70 (*heat-shock proteins*), HSP70-2 e HSC70T são responsáveis pela proteção contra o estresse térmico, esclarecendo, entre outros fatores, os eventuais aparecimentos de patologias espermáticas em animais criados em climas tropicais (EDDY, 1999).

Nos bovinos a espermatogênese demora 65 dias para ocorrer e a temperatura normal da espermatogênese é de 2°C a menos que a temperatura da cavidade abdominal que é de aproximadamente 39°C, variando de acordo com as raças. Sendo que a produção diária de espermatozoides no touro adulto é da ordem de 12 a 14 bilhões (HAFEZ e HAFEZ, 2000).

O reprodutor bovino como parte imprescindível à cadeia de produção animal deve apresentar eficiente potencial de fertilidade *in vitro* e *in vivo*, ou seja, capacidade de fecundação. Em particular, o potencial reprodutivo *in vitro* é cada vez mais utilizado para garantir a rápida transmissão de características produtivas desejáveis. Nesse sentido, tem-se procurado, por intermédio das técnicas de reprodução assistida, testar e utilizar todas as estruturas celulares espermáticas que possam apresentar capacidade fecundante como: as células primordiais oriundas dos túbulos seminíferos (MARTINS et al., 2000), os espermatozoides epididimais (KIKUCHI et al., 1998) e ejaculados. Entretanto, para o sucesso destas técnicas, é importante que se conheçam os fatores e mecanismos envolvidos na sua capacidade fecundante, desde a formação até saída através do ejaculado.

Alguns parâmetros tradicionais como vigor, a motilidade, a concentração e a

morfologia espermática são utilizados na avaliação do sêmen. Entretanto, reprodutores com espermograma normal podem se comportar como subférteis, ou passarem por períodos de subfertilidade. As alterações na compactação da cromatina dos espermatozoides são possíveis explicações encontradas para tais comportamentos (BRITTO e MELLO, 1988). Em razão da imperfeita compactação de cromatina, o DNA torna-se mais susceptível ao estresse oxidativo (TWIGG et al., 1998). Além disso, sabe-se por meio de outros estudos que espermatozoides que sofrem fragmentação da cromatina espermática podem ser incapazes de realizar fertilização (YAMAUCHI et al., 2007).

2.3- A estrutura da cromatina espermática

Como demonstrado em algumas pesquisas à morfologia da cabeça dos espermatozoides é basicamente condicionada pela estrutura nuclear e esta nos espermatozoides dos mamíferos é quase que totalmente constituída de cromatina, portanto espera-se que alterações em tais estruturas gerem o aparecimento de anomalias morfológicas (SAILER et al., 1996; FERRARI et al., 1998; OSTERMEIER et al., 2001; BELETTI et al., 2005).

Espermatozoides de touro com anomalia na compactação da cromatina foram diferenciados pela primeira vez por Gledhill (1966), sendo que estes apresentavam uma resposta mais intensa à reação de Feulgen. Segundo Evenson et al. (1980) com a utilização de desnaturação ácida ou térmica, posterior coloração com alaranjado de acridina (AA) e análise em citofotômetro de fluxo com ultravioleta, os espermatozoides com cromatina normal coram-se em verde e os com alteração, em vermelho alaranjado. O método de Evenson et al. (1980) foi modificado por Tejada et al. (1984), que utilizaram coloração com AA em esfregaços de sêmen humano, obtendo bons resultados na diferenciação de espermatozoides normais e anômalos.

Essa metodologia, apesar de ser mais subjetiva que a de Evenson et al. (1980), dispensa o uso do citofotômetro de fluxo tornando seu custo menor. Mello (1982) desenvolveu o método da "metacromasia induzida" utilizando Azul de Toluidina, (AT) em pH 4,0, após hidrólise ácida, sendo que os espermatozoides normais coram-se de verde à azul claro e os anormais de azul escuro a magenta. Esse método é ainda mais barato, pois dispensa o uso de microscopia de fluorescência. Como a avaliação visual de esfregaços de sêmen é de certa forma subjetiva, Beletti et al. (2004) desenvolveram um software para avaliação de

esfregaços corados com AT, utilizando-se imagens digitais capturadas em microscópio de luz acoplado à câmera ligada a microcomputador. Isto possibilitou uma avaliação mais objetiva, permitindo inclusive caracterizar diferentes tipos de alterações cromatínicas. No entanto, este tipo de avaliação é ainda pouco acessível aos profissionais de campo.

A estrutura do espermatozoide maduro pode ser dividida em duas regiões: a cabeça e a cauda ou flagelo. A cabeça é composta pelo acrossoma e o núcleo, sendo que a do espermatozoide é menor do que o da maioria das células somáticas, pois sua cromatina está altamente condensada (EDDY, 2006). As principais proteínas nucleares associadas à cromatina nuclear são as protaminas, proteínas básicas relativamente pequenas (25-65 aminoácidos) ricas em arginina e alguns resíduos de cisteína (STECHELL, 1982).

Em relação a cromatina de espermatozoides de mamíferos, sua unidade básica que é o toroide de protamina, foi descrito pela primeira vez por Balhorn e colaboradores em 1982 (ALLEN et al., 1992; HUD et al., 1993). Esta consiste em cerca de 50kb de DNA o qual está firmemente enrolado pelas protaminas, formando uma estrutura em forma de “donut”(rosca). Outro nível de arranjo da cromatina é a organização estrutural do DNA em domínios no formato de alças de 20 a 50kb (RISLEY et al., 1986; WARD e COFFEY, 1989; KRAMER e KRAWET, 1996) (FIGURA 1).

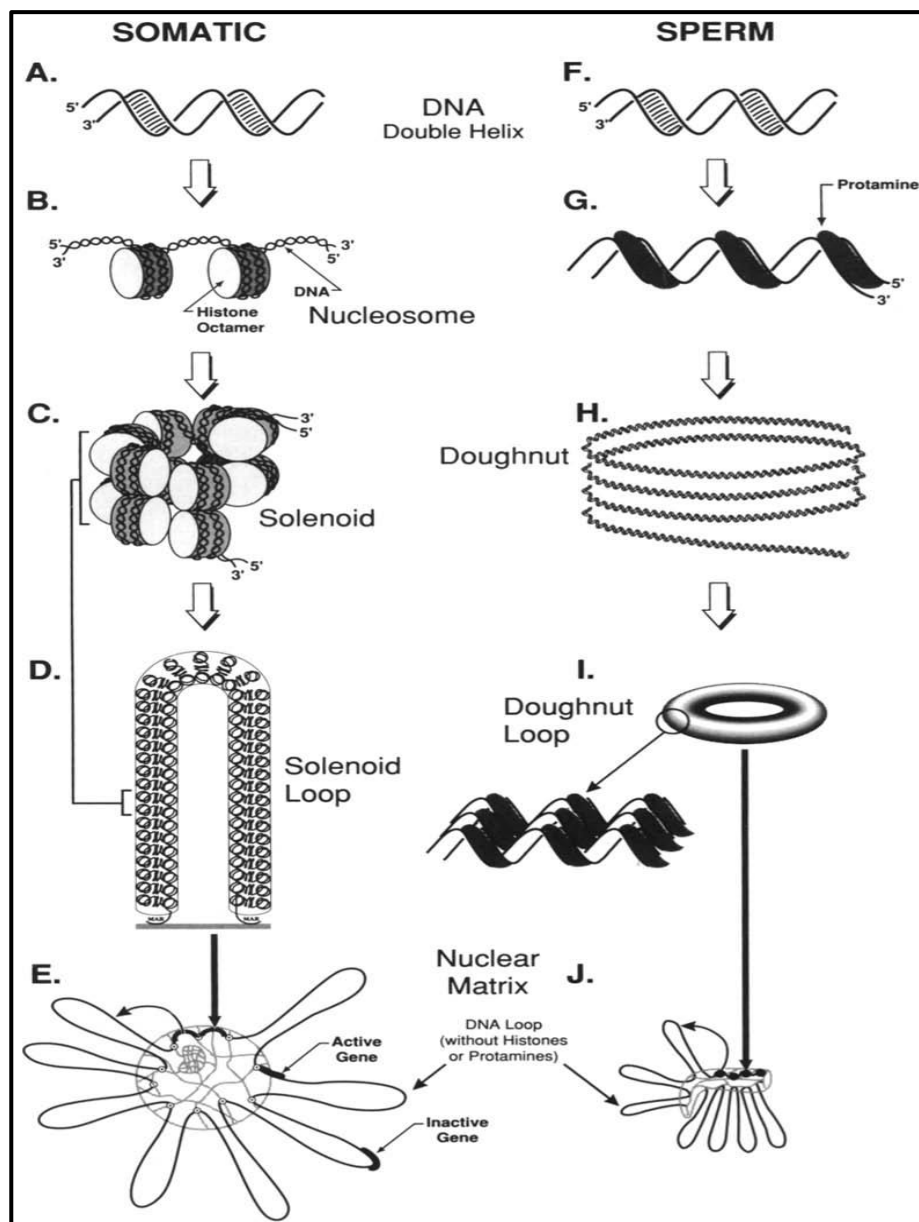


Figura 1: Níveis equivalentes de embalagem DNA em células somáticas (esquerda) e células espermáticas (direita) (WARD, 1993).

Posteriormente, foi proposto o modelo “donut-alça” para a estrutura da cromatina espermática, sugerindo que ambos os níveis organizacionais são relacionados (SOTOLONGO et. al., 2003). Neste modelo, cada domínio em forma de alça de DNA é condensado em um único toroide de protamina. Estes domínios em forma de alça são fixados à matriz nuclear proteínaica em locais determinados de regiões de anexação da matriz (MARs) (SHAMAN et. al., 2007).

O genoma paterno no espermatozoide de mamíferos é condensado em uma forma específica para o tipo de célula, presumivelmente para proteger o DNA durante o trânsito do trato genital masculino para o óvulo antes da fertilização. A existência desta compactação da

cromatina tem consequências importantes para o desenvolvimento dos melhores diagnósticos médicos para infertilidade e para o estudo das estruturas de DNA no campo da biologia celular. Pesquisadores estão interessados em compreender a estrutura da cromatina de espermatozoides, a fim de determinar a melhor forma de interpretar os testes de integridade do DNA, o que afeta o resultado das tecnologias de reprodução assistida (AGARWAL e SAID, 2003; EVENSON e JOST, 2000; MORRIS et al., 2002; SAKKAS et al., 2002; TOMSU et al., 2002; VAN DER HEIJDEN et al., 2008).

2.4- A cromatina de espermatozoides de touro

Os espermatozoides de touro possuem características próprias, como por exemplo, apresentam um único tipo de protamina. Algumas pesquisas como a de Gagnon (1999) mostraram que alterações na proporção relativa das protaminas 1 e 2 em espermatozoides humanos podem influenciar a condensação da cromatina espermática, refletindo na fertilidade. Apesar de possuir somente um tipo de protamina, anormalidades na condensação da cromatina espermática podem ser encontradas em touros.

A baixa condensação da cromatina espermática pode acarretar defeitos no DNA. Esta susceptibilidade pode ser correlacionada à presença de fitas de DNA quebradiças, que podem ser devidos em parte, ao estresse oxidativo e, possivelmente, ao mecanismo apoptótico. Alguns espermatozoides com anormalidades na cromatina podem fecundar ovócitos *in vivo* e *in vitro*, porém o defeito no DNA pode persistir durante o período embrionário, induzindo apoptose, desestruturação embrionária e ao aborto (ELLINGTON et al., 1998; TWIGG et al., 1998).

Alterações no complexo DNA- proteína dos espermatozoides de mamíferos vêm sendo sugeridas como importantes causas de subfertilidade em várias espécies, como bovinos (GLEDHILL et al., 1966; BELETTI et al., 1995), leporinos (BELETTI et al., 1995) e humanos (COSTA et al., 1995; COSTA et al., 1996).

Sabe-se que o DNA dos espermatozoides de mamíferos é seis vezes mais condensado (POGANY et al., 1981; BALHORN et al., 1982) quando comparado ao DNA de um cromossomo mitótico, ou seja, é o DNA eucariótico mais altamente condensado conhecido.

Durante a condensação as histonas são substituídas gradualmente por proteínas de transição, que posteriormente são substituídas pelas protaminas (MARUSHIGE e MARUSHIGE, 1975).

Além de protaminas e histonas espermáticas específicas, tem sido demonstrado que a cromatina contém proteínas potencialmente ativas incluindo alguns fatores de transcrição (PITTOGGI et al., 2001). A cromatina pode também ter uma organização específica; alguns telômeros (ZALENSKAYA et al., 2000) e centrômeros (YARON et al., 1998).

A alta condensação da cromatina de espermatozoides de mamíferos sempre dificultou o estudo por técnicas microscópicas, dessa forma, os pesquisadores buscaram alternativas, como o uso de uma variedade de tampões e substâncias químicas como ureia (TSANEV e AVRAMOVA, 1981) e DTT (ditiotreitól) para extrair DNA por descondensação e alterar a estrutura nuclear para estudos da organização cromossômica em espermatozoides (WARD et al., 1989).

2.5- Matriz nuclear

Na maioria das células, o DNA é funcionalmente organizado por uma rede proteica denominada de matriz nuclear. Quando isolados e visualizados por microscopia eletrônica, esta ultraestrutura assemelha-se a arquitetura fibrosa do citoesqueleto. No caso da matriz nuclear de espermatozoides, só recentemente verificou-se a presença de uma população de RNAs que se ligam a essa matriz (JOHNSON et al., 2011).

Estudiosos mostraram que o DNA está organizado em zonas funcionais, como a região da matriz nuclear e a região do ânulo nuclear (WARD e McCARTHY, 2000).

A organização da matriz nuclear é essencial para a replicação do DNA e da cromatina que mantém histonas identificando genes que são importantes para o desenvolvimento do embrião. Estes dados suportam a visão emergente do genoma do espermatozoide como o fornecimento de, para além da sequência de DNA paterno, um quadro estrutural que inclui fatores moleculares regulatórios que são necessários para o desenvolvimento embrionário adequado (WARD, 2010).

Existem evidências de que alguns componentes da matriz nuclear sejam topoisomerases IIB (SHAMAN et al., 2006), actina, miosina, citoqueratinas e espectrinas (OCAMPO et al., 2005), possivelmente sintetase carbamil fosfato glutamino dependente, transaminase aspartato, dihidroorotase (OCAMPO et al., 2005; CARREY et al., 2002) e transcriptase reversa (GIORDANO et al., 2000).

A fração de nuclease hipersensitiva que provavelmente liga-se à uma estrutura típica nucleossomal, liga cada toroide e anexa as alças à matriz nuclear (SOTOLONGO et al.,

2003), potencialmente através da TOP2B (SHAMAN et al., 2006).

Dentre os vários componentes da matriz nuclear, tem-se um complexo evidenciado pela primeira vez por Ward e Coffey em 1989, o qual recebeu o nome de *annulus nuclear*.

2.5.1- Ânulo nuclear

Na década de 80, foi descrita a estrutura do ânulo nuclear após experimentos realizados em espermatozoides de hamster. Os pesquisadores observaram a existência desta estrutura protéica, um componente da matriz nuclear, onde o DNA permaneceu ancorado mesmo após a descondensação. O ânulo possui forma circular encaixando-se na base da cabeça e todos os cromossomos contidos no espermatozoide se ligam nele em pelo menos um ponto (WARD e COFFEY, 1989).

Assim, semelhante às alças que se localizam entre cada “donut” e se ligam as componentes da matriz presente no centro da cabeça, essas alças de DNA ligadas ao Ânulo seriam regiões de maior fragilidade, coincidindo com as alterações cromatínicas identificadas por Beletti et al. (2004) que utilizaram a análise de imagem de espermatozoides corados com azul de toluidina e observou que estas alterações são encontradas predominantemente na base e no eixo central da cabeça.

Mais recentemente estudos com espermatozoides de roedores têm demonstrado que a matriz nuclear desses espermatozoides possui papel fundamental na regulação do DNA tanto na fragmentação quanto na degradação deste antes e após a fertilização (SHAMAN et al., 2006), podendo influenciar a replicação do DNA paterno após a fertilização (SHAMAN et al., 2007); Martins, 2000 e Johnson e colaboradores, 2011 têm fornecido evidências de seu papel em toda transcrição.

É nítido que nas duas ultimas décadas o estudo da importância da matriz nuclear na organização estrutural do DNA e sua relação com a função nuclear têm sido mais frequente, mas a maioria das pesquisas ainda são realizadas com células somáticas.

É conhecido que a matriz nuclear em células somáticas atua como suporte estrutural para a replicação do DNA (GERDES et al., 1994; DIJKWEL e HAMLIM, 1995), participa também da transcrição do RNA (CHANG et al., 1995; COCKRILL e GARRARD, 1986) e da degradação da cromatina que ocorre durante a apoptose nas células somáticas (LI et al., 1999; SOLOVYAN et al., 2002; IAROVAIA et al., 2004).

Sabe-se que os espermatozoides podem fornecer ideias importantes sobre a função da

cromatina em células eucarióticas, que normalmente não poderiam ser obtidas através de outros tipos de células, ou seja, estudá-los tem uma grande relevância.

Ainda que seja pequeno o número de pesquisas sobre a matriz nuclear de espermatozoides de touro e de identificação da estrutura do Ânulo nuclear, algumas alterações cromatínicas em espermatozoides de bovinos já foram descritas por Beletti et al. (2004), as quais ocorrem principalmente em regiões onde o DNA se liga a matriz nuclear, ou seja, no eixo central e na base da cabeça. Mas, mesmo se conhecendo tão pouco o Ânulo nuclear, acredita-se que esta estrutura desempenha um papel muito importante na organização do DNA espermático. Logo, é fundamental o estudo de componentes da matriz nuclear de espermatozoides para melhor compreender como o DNA espermático está organizado e também conhecer qual o papel do ânulo nuclear na estabilidade do material genético.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Extração ânulo nuclear

Para purificação dos ânulos nucleares, a cada extração utilizou-se oito palhetes de sêmen de 0,5 mL cada. Este material foi lavado duas vezes seguidas com tampão fosfato de sódio (PBS) por centrifugação à 670 g, por 30 minutos, à 4°C. (Iniciando com concentração de aproximadamente 1×10^7 spz/mL).

Depois disso o pellet foi ressuscitado em 1 mL de tampão Tris 50 mM e 1 mL de sacarose 2,2M. Em seguida, a amostra foi sonicada por 17 minutos em gelo, com pulso de 30 segundos e intervalo de 15 segundos para separação das caudas das cabeças. Foi determinada a concentração de cabeças por contagem em câmara de Neubauer, que geralmente foi em torno de 1×10^7 cabeças/mL.

O material após sonicado foi ultracentrifugado a 75.600 g por 45 minutos a 4°C, em um gradiente que consistia de 2 mL de cloreto de cério (CsCl) a 2,82 M no fundo de um tubo de 11,5 mL para ultra-centrífuga, sobreposto por 4mL de sacarose 2,2 M e recoberto por 2 mL de amostra em tampão 25 mM Tris-HCl e Sacarose 1,1 M, 7.5 pH. Após a centrifugação o sobrenadante contendo as caudas foi retirado cuidadosamente por pipetagem e o pellet ressuscitado com tampão Tris 25 mM, e lavado três vezes por centrifugação a 1000 g por 30 minutos a 4°C para se retirar o excesso de CsCl.

Posteriormente o pellet foi ressuspensão com Tris 25 mM, 2M NaCl e 10% de Triton num volume de 2 mL e homogeneizado com vórtex. Para romper a membrana celular, a amostra foi deixada nesta solução por 24 horas e homogeneizada a cada duas horas, exceto no período noturno.

Após estas 24 horas, o material foi lavado três vezes em Tris 25 mM por centrifugação a 670 g por 30 minutos. O pellet resultante foi ressuspensão com dois mL de solução de ditioneitol (DTT) 40 mM em Tris 25 mM e 2 M de NaCl. Nesta solução, a amostra foi mantida por 96 horas (4 dias) em geladeira. Importante ressaltar que a amostra foi homogeneizada frequentemente ao longo das 96 horas de experimento.

Um esfregaço numa lâmina de vidro foi feito e corada com xilidina ponceau por 15 minutos, para visualização da amostra.

Foi adicionado à 2 mL de amostra 20 µL de DNase I a 4000 unidades por mL diluída em água destilada seguido de incubação por 2 horas a 37 °C.

A amostra foi diluída em Tampão Tris 25 mM, 2 M NaCl e 10 mM MgCl₂ (diluição de 25 vezes- 1ml de amostra para 25 mL de Tampão) e distribuída cuidadosamente em 4 tubos de ultracentrífuga (6,5 mL por tubo), os quais já continham 3mL de Tris 25 mM, 2,41 M CsCl e 50m MgCl₂, evitando que as duas soluções se misturassem. Finalmente estes tubos foram ultracentrifugados a 113.000 g, por 1,5 h, a 4°C.

Os pellets dos tubos foram ressuspensão em 2 mL de Tris 25 mM colocados numa única alíquota. Foi construído um gradiente contínuo de sacarose (30-50% v/v) e os pellets homogeneizados foram colocados sobre este gradiente e centrifugado por 30 min à 2000 g, a 4 °C.

A fração enriquecida em âmulos nucleares foi diluída em um volume de Tris 50 mM e centrifugado por uma hora à 113000 g a 4°C. Então, a amostra foi preparada para a microscopia de varredura e de força atômica.

3.2- Análise citoquímica

O material isolado foi espalhado sobre três lâminas histológicas e em seguida foi submetido a três distintas colorações por 15 minutos: xilidina ponceau 3% para identificar

componentes proteicos, PAS (ácido periódico de Schiff) para marcar carboidratos neutros e azul de toluidina 0,025%, pH 4.0, para evidenciar DNA.

3.3- Microscopia Eletrônica de Varredura

Ao final de cada etapa do processamento do material (coleta do material, separação da cauda da cabeça por sonicação, tratamento com triton X-100 10%, material após tratamento com DTT e alíquota tratada com DNase I), foram separadas alíquotas, as quais foram preparadas para análise em microscopia de varredura.

O material de cada etapa do procedimento foi preparado espalhando-se uma gota sobre lamínulas circulares de vidro de 0,8 mm, as quais, após secagem, foram colocadas em fixador karnovsky pH 7,2 (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% e tampão cacodilato 0,2 M) por 1 hora e lavadas com PBS. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1% (OsO₄) por 1 hora. Depois o material foi lavado em PBS por 2 vezes. A próxima etapa foi a desidratação feita através de soluções de concentração crescente de etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e três vezes em 100%). Logo em seguida as amostras foram dissecadas em ponto crítico utilizando-se o equipamento CPD 030 (Bal-Tec) e coladas em “stubs” (suporte de amostras). Posteriormente foi realizada a cobertura da superfície das lamínulas com ouro (20nm de espessura) utilizando-se o aparelho Bal Tec SCD 050 Sputter Coater. Os preparados prontos foram visualizados e analisados em um microscópio de varredura FEG- Supra 40 (Zeiss).

3.4- Análise por LC-MS/MS da amostra purificada

A LC-MS/MS é uma técnica química que combina as capacidades de cromatografia líquida (ou HPLC) de separação física, com as capacidades de análise de espectrometria de massa de massa. LC-MS é uma técnica poderosa usada para muitas aplicações, que tem muito de alta sensibilidade e seletividade.

Utilizou-se 3 abordagens experimentais diferentes:

- **abordagem 1:** redução e alquilação das proteínas seguida de eletroforese para separação das proteínas e análise por espectrometria de massas para a identificação das proteínas.
- **abordagem 2:** desnaturação das proteínas em tampão de ureia, seguida de redução e alquilação das proteínas e eletroforese para separação das proteínas antes da análise por espectrometria de massas.

- **abordagem 3:** desnaturação das proteínas em tampão de ureia, seguida de redução e alquilação das proteínas e análise direta por espectrometria de massas.

Abordagem experimental 1 e 2:

Concentração da Amostra. Duas alíquotas de 100 μ L em Tris 25 mM, 2 M NaCl (aproximadamente 100 μ g) de amostra foram concentradas até 30 μ L usando o sistema Amicon Ultra 0.5, que retém as proteínas com peso molecular superior a 3.000 Da (Millipore).

Redução / Alquilação:

Abordagem 1: Em 30 μ L de amostra foi adicionado 30 μ L de tampão de eletroforese XT 2X (Bio-Rad, cód. 161-0791, Lote 1610791 Rev B) contendo 100 μ g de ditioneitol para a redução das pontes de dissulfeto das proteínas. Após incubação a 100°C por 5 min, as amostras foram alquiladas com 300 μ g de iodoacetamida por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro.

Abordagem 2: Antes da redução e alquilação das proteínas foi realizada a desnaturação das proteínas com ureia. Em 30 μ L de amostra foi adicionado 70 μ L de tampão ureia 8M, Tris 100 mM, pH 8.8. contendo 100 μ g de ditioneitol para a redução das pontes de dissulfeto das proteínas. Após a incubação por 2 horas a temperatura ambiente, a amostra foi alquilada com 300 μ g de iodoacetamida por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após a redução e alquilação adicionou 100 μ L de água. Amostra foi concentrada até 30 μ L usando o sistema Amicon Ultra 0.5 e ressuspendemos em 30 μ L de tampão de eletroforese XT 2X (Bio-Rad, cód. 161-0791, Lote 1610791 Rev B).

Separação das Proteínas por Eletroforese em SDS-PAGE. A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi utilizada como principal ferramenta analítica para a separação e caracterização das proteínas presentes nas amostras. Cerca de 30 μ L de cada amostra foram aplicados no gel. Foram utilizados géis de poliacrilamida 8-16%. A eletroforese foi realizada com 40 V/gel por 3 horas e 40 minutos em sistema Mini-PROTEAN II Electrophoresis System (Bio-Rad, EUA). Foram carregados 5 μ L de um padrão de peso molecular pré-corado (Bio-Rad, cód.161-0374, Lote L1610374). Para visualização das proteínas, os géis foram corados com coomassie gel code blue stain reagent (Thermo, cód. 24590) conforme recomendações do fabricante (FIGURA 5).

Abordagem experimental 3:

Concentração da Amostra. Uma alíquota de 400 μL (aproximadamente 400 μg) de amostra foi concentrada até 80 μL usando o sistema amicon ultra 0.5, que retém as proteínas com peso molecular superior a 3.000 Da (Millipore).

Redução / Alquilação. Após a concentração em 80 μL foi adicionado 80 μL de tampão ureia 8M, Tris 100 mM, pH 8.8., e 400 μg de ditioneitol (4 μL) para a redução das pontes de dissulfeto das proteínas. Após a incubação por 2 horas a temperatura ambiente, a amostra foi alquilada com 1200 μg de iodoacetamida (12 μL) por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro.

Digestão com Tripsina e Análise por Espectrometria de Massas Avançada. O volume da amostra foi diluído 5 vezes (180 μL) com de solução de bicarbonato de amônio 0,1M obtendo um volume de 1080 μL . Amostra foi concentrada até 35 μL usando o sistema Amicon Ultra 0.5, que retém as proteínas com peso molecular superior a 3.000 Da (Millipore). A amostra foi então incubada com 50 μL (5 μg) de tripsina 0,1 $\mu\text{g/mL}$ diluída em bicarbonato de amônio 0,1 M. A digestão foi realizada a 37°C, durante a noite. Paramos a digestão com 100 μL de ácido fórmico 10% e secamos em speed vac. As amostras secas foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo LTQ-ORBITRAP (Thermo- Finnigan) acoplado a um sistema de cromatografia de nanoflow (LC-MS/MS).. Os dados brutos adquiridos foram automaticamente processados pelo “Computational Proteomics Analysis System – CPAS” [Rauch et al, J. Proteome Res., 2006]. Os peptídeos identificados, em banco de dados de bovinos, que atingiram o critério mínimo de qualidade foram então agrupados em proteínas, utilizando-se o algoritmo “Protein Prophet” e foi gerada uma lista de identificações com taxa de erro inferior a 1.0%.

3.5- Cromatografia Fase Reversa HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C2/C1 (4,6 x 100 mm) foi feita de 1 mg do complexo purificado. A coluna foi equilibrada nos solventes de corrida (solvente A: acetonitrila 5%, TFA 0,1%; solvente B: acetonitrila 60%, TFA 0,1%) e a eluição seguiu com um gradiente de 0 – 100% de concentração do solvente B, com um fluxo

de 0,5 mL/min. durante 110 minutos. Os picos foram monitorados na absorvância de 214 nm e 280 nm, e registrados por software Unicorn (Unicorn, Inc.).

3.6- Estatística descritiva

Os dados referentes às mensurações do ânulo nuclear estão demonstrados na forma de média e desvio padrão.

4- RESULTADOS

4.1- Análise citoquímica

A amostra purificada teve marcação positiva para as três colorações, visualizado na figura 2.

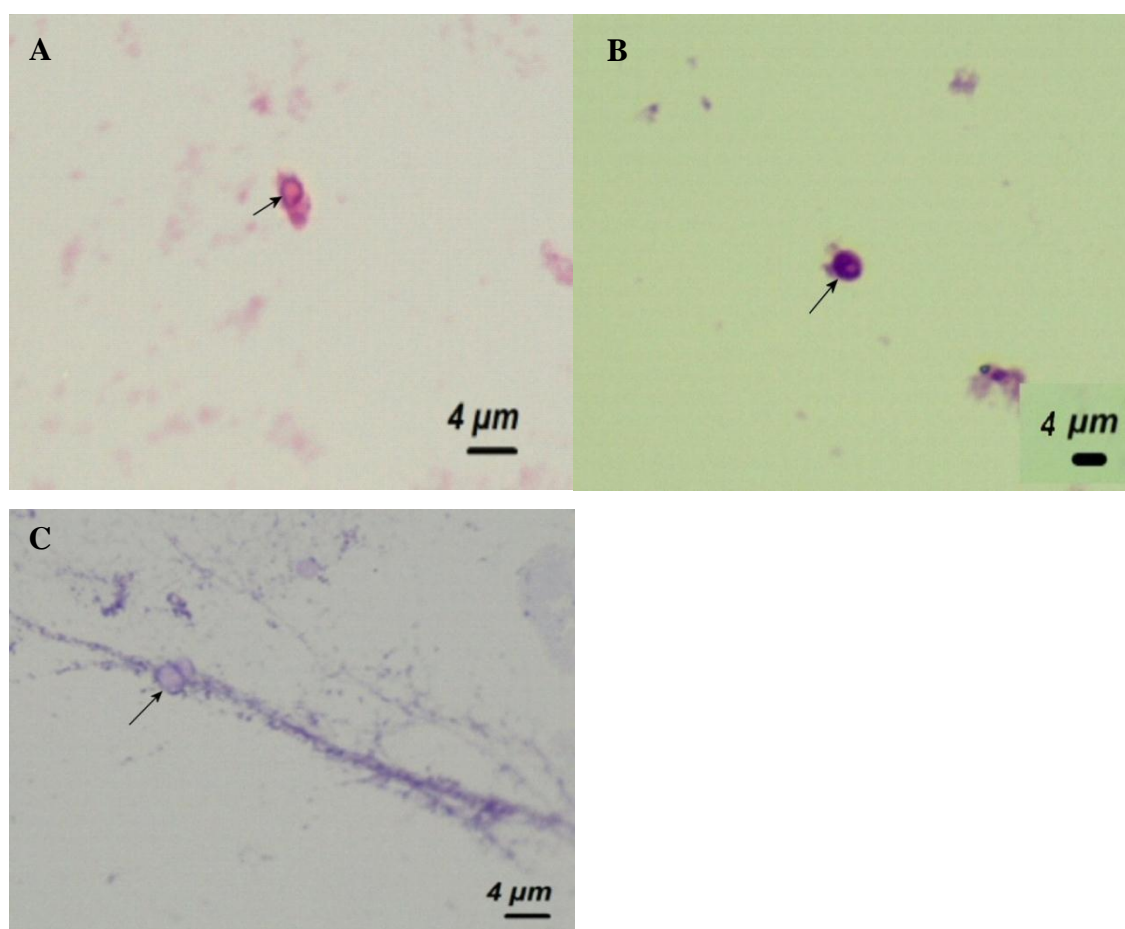


Figura 2- Coloração citoquímica dos ânnulos nucleares: (A) xilydina ponceau (para identificar componentes proteicos), (B) PAS (glicoproteínas neutras) e (C) azul de toluidina pH 4.0 (evidencia DNA).

5.2- Microscopia Eletrônica de Varredura

Uma vez isolado o ânulo nuclear, foram feitas mensurações da largura e comprimento de 30 anulus, utilizando o próprio programa do microscópio de varredura. Obtendo-se como

resultado um comprimento médio de $1,10 \pm 0,18 \mu\text{m}$ e largura média de $0,54 \pm 0,073 \mu\text{m}$. Na figura 3 observa-se um anulo nuclear isolado com suas medidas (comprimento de $1,25 \mu\text{m}$ e largura de $0,56 \mu\text{m}$).

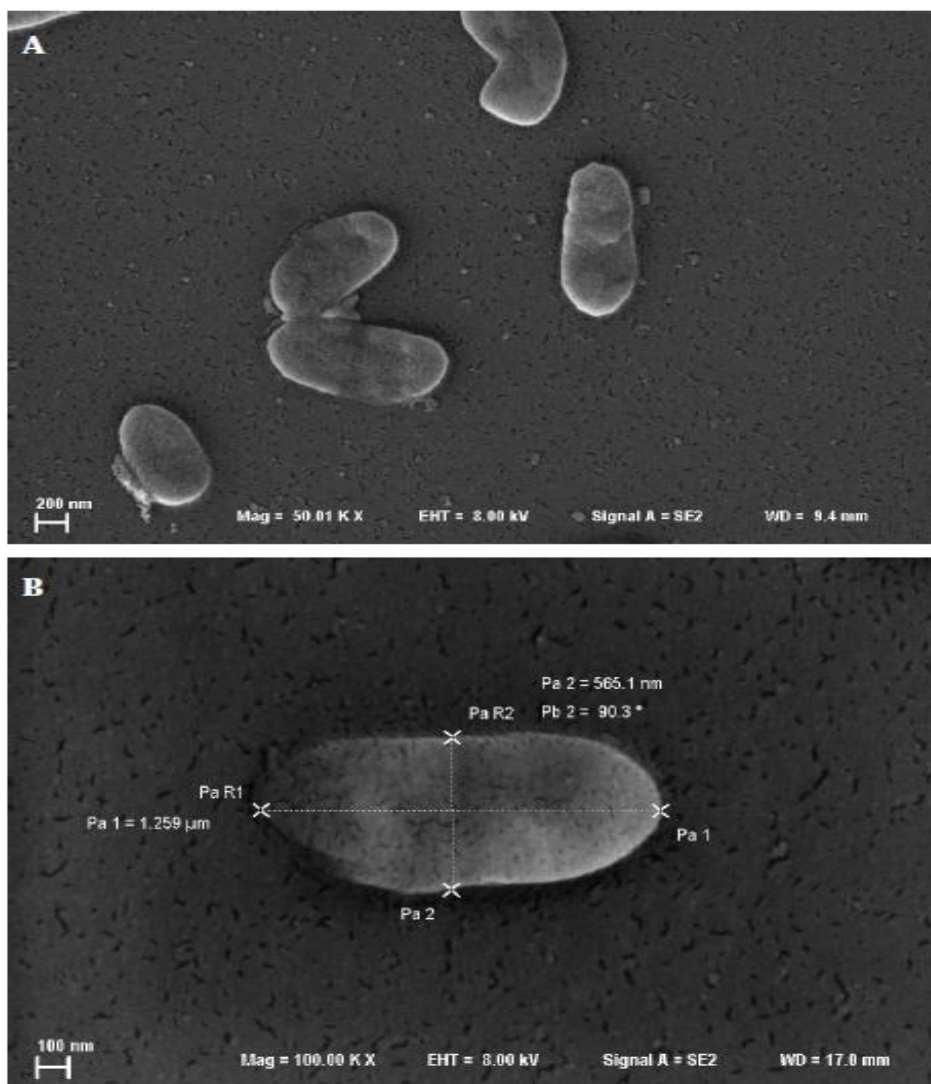


Figura 3- Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura de anulos nucleares: (A) anulos nucleares isolados; (B) anulo nuclear isolado com suas mensurações: PaR1-Pa1 (comprimento) e PaR2-Pa2 (largura).

Já na figura 4, observa-se o anulo nuclear ligado à cabeça de espermatozoide bovino por cromatina.

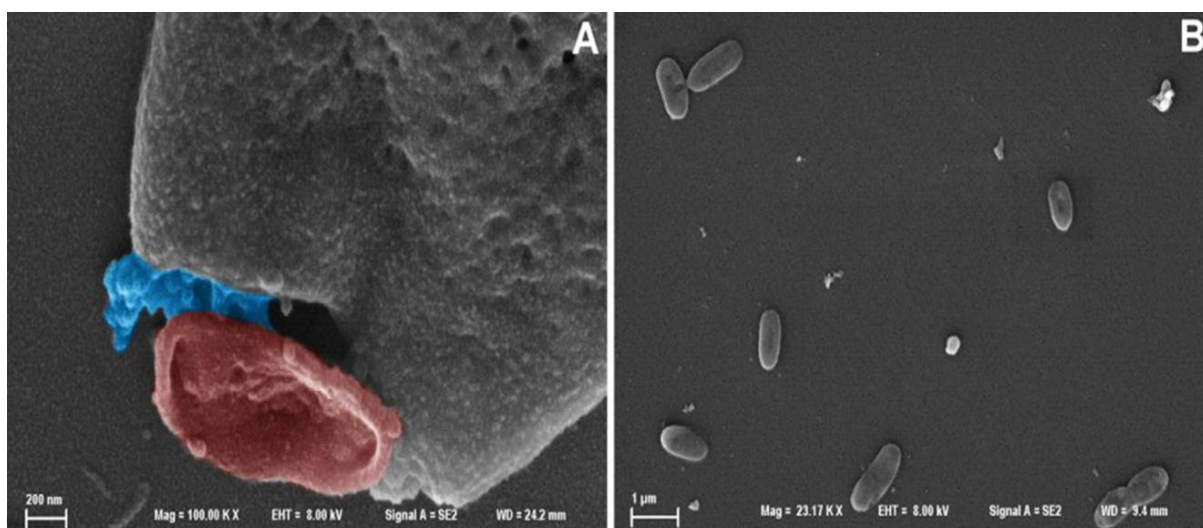


Figura 4- Microscopia eletrônica de varredura: **(A)** ânulo nuclear (vermelho) ligado à cabeça do espermatozoide de touro por cromatina (azul). **(B)** vários anéis nucleares isolados.

4.3- Análise por LC-MS/MS da amostra purificada

A figura 5 mostra o gel de eletroforese SDS-PAGE realizado com as amostras da abordagem 1 (redução e alquilação das proteínas) e abordagem 2 (desnaturação com ureia antes da redução e alquilação das proteínas).

Como pode ser observado, com as abordagens de 1 e 2 de preparação da amostra não foi possível a visualização das proteínas por eletroforese. Seguiu-se, portanto a partir daqui com a análise das proteínas pela abordagem 3 (desnaturação, redução e alquilação das proteínas e análise direta por espectrometria de massas).

Com a abordagem 3, após digestão da amostra com tripsina e análise em espectrômetro de massas, identificou-se 18 proteínas diferentes presentes na amostra.

No quadro abaixo é apresentada a lista das proteínas detectadas na amostra, em ordem decrescente de abundância (estimada pela contagem de peptídeos obtidos, indicada na segunda coluna).

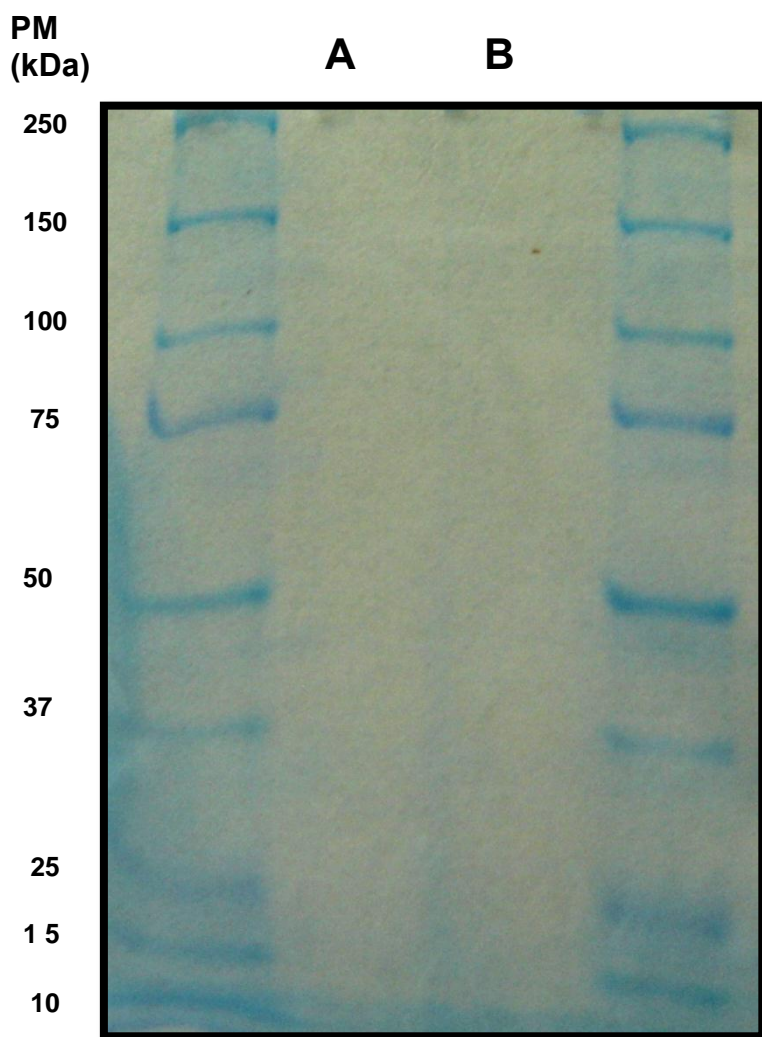


Figura 5: Separação das proteínas do por eletroforese (SDS-PAGE): (A) abordagem 1 e (B) abordagem 2. Sendo nas extremidades do gel o padrão de peso molecular (PM).

Quadro 1- Proteínas detectadas através do MALD-TOF em ordem decrescente de peptídeos encontrados.

Proteína	Número de Peptídeos	Nome do gene	Peso Molecular (Da)	Descrição
sp P02769 ALBU_BOVIN	46	ALB	69293.0	Precursor de albumina sérica
tr F1MPK6 F1MPK6_BOVIN	9		439305.4	Fragmento Proteico não caracterizado
IPI00556624	8	KRT1	66067.0	Queratina 1
IPI00019359	7	KRT9	62064.3	Queratina 9-citoesqueleto
tr F1MCF8 F1MCF8_BOVIN, tr F1MLW7 F1MLW7_BOVIN	6		24501.4	Proteína não caracterizada
sp P00767 CTRB_BOVIN	6	CTRB1	25755.0	Quimotripsinogênio B
sp P61603 CH10_BOVIN	4	HSPE1	10932.0	Proteína de choque térmico (mitocondrial)
tr F1MER7 F1MER7_BOVIN	4		466028.8	Fragmento protéico não caracterizado
tr F1MBU8 F1MBU8_BOVIN	4	DPY19L2	89528.3	Proteína transmembrânica estrutural
tr E1BC58 E1BC58_BOVIN	3	RAB2B	24167.3	Proteína subacrossomal de espermatozoide bovino
tr F1MLW0 F1MLW0_BOVIN	3		62075.7	Fragmento protéico não caracterizado
sp P11179 ODO2_BOVIN, tr F1MEQ3 F1MEQ3_BOVIN, tr E1BAP2 E1BAP2_BOVIN, tr Q3SYT9 Q3SYT9_BOVIN, sp Q5E9A3 PCBP1_BOVIN, tr Q17QV0 Q17QV0_BOVIN	2	DLST	48973.0	Componente do complexo desidrogenase 2-oxoglutarato
tr Q3SYT9 Q3SYT9_BOVIN, sp Q5E9A3 PCBP1_BOVIN, tr Q17QV0 Q17QV0_BOVIN	2	MGC127996	36801.0	Semelhante ao poli (rC) de proteína de ligação 2
sp P02318 HSP1_BOVIN	2	PRM1	6758.0	Protamina P1
sp P63048 RL40_BOVIN, sp P62992 RS27A_BOVIN, sp P0CG53 UBB_BOVIN, tr E1B9K1 E1B9K1_BOVIN, sp P0CH28 UBC_BOVIN	2	MGC127041	14728.0	Similar à proteína ribossomal S27a
sp Q2KIU3 HP252_BOVIN	2	MGC137211	22911.0	Poliubiquitina
tr F1N7Y0 F1N7Y0_BOVIN, sp P19803 GDIR1_BOVIN	2	ARHGDIA	11496.7	Rho proteína PIB-inibidor de dissociação
tr F1MEW3 F1MEW3_BOVIN	2		199349.8	Proteína associada à microtúbulo

4.4- Cromatografia Fase Reversa HPLC

O extrato submetido ao HPLC mostrou vários picos e cada pico representa um peptídeo, o que coincide com o resultado obtido no MALD-TOF (FIGURA 6).

Como observado, a leitura em 280 nm apresentou picos com baixa absorbância, isto pode ser justificado pela baixa concentração da amostra.

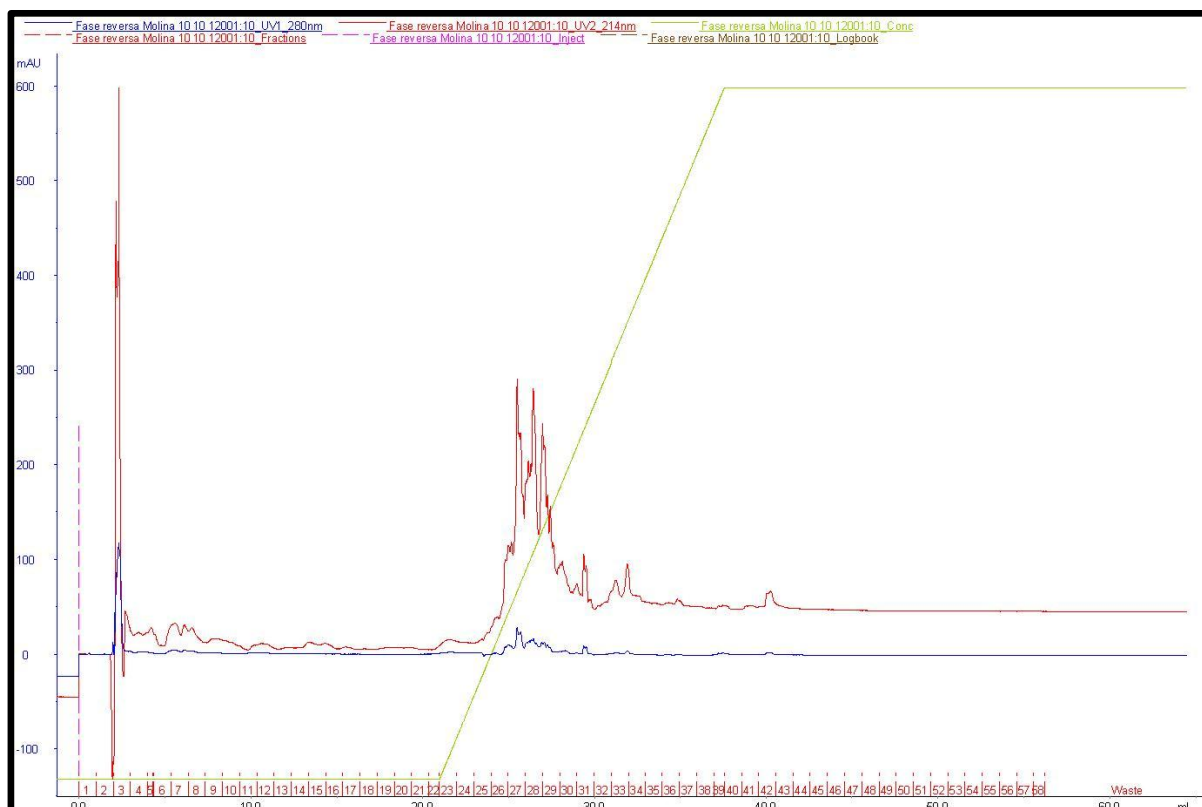


Figura 6- Perfil Cromatográfico da cromatografia HPLC fase reversa. Na abcissa tem-se a numeração dos tubos coletados e na ordenada à leitura da absorbância, a linha vermelha- leitura em 214 nm e a azul- leitura em 280 nm.

6- DISCUSSÃO

O ânulo nuclear foi primeiramente descrito por Ward e Coffey (1989) em experimentos realizados com espermatozoides de hamster, onde observaram a existência de uma estrutura proteica, um componente da matriz nuclear, no qual o DNA permaneceu ancorado mesmo após a descondensação. Em bovinos, tal estrutura ainda não havia sido descrita.

O ânulo nuclear de espermatozoides de touro apresenta uma forma mais elíptica do que o de hamster que tende a ser esférica (WARD e COFFEY, 1989). Isto condiz com a morfologia das cabeças dos espermatozoides destas espécies, sendo a de hamster mais cilíndrica com a base circular e a de touro espatular com a base achatada (elíptica).

Ainda que sejam necessários mais estudos para se compreender o real papel do ânulo nuclear, sabe-se que este pode desempenhar um papel importante na fixação de DNA (WARD e COFFEY, 1989) como visto nos resultados do presente trabalho, onde foi observado que o ânulo nuclear é um complexo glicoproteico com DNA ancorado.

Ward e Coffey (1989) também sugeriram que é a região em que se localiza o ânulo nuclear a última a ter a sua cromatina descondensada após a fertilização. Assim, acredita-se que o ânulo seja uma região organizadora do DNA e de sua descondensação. Estes pesquisadores defendem que o ânulo nuclear funcione como um centro organizador no qual o DNA espermático se ancora.

Quanto às dimensões do ânulo nuclear, em bovinos ele apresenta comprimento médio de $1,10 \pm 0,18 \mu\text{m}$ e largura média de $0,54 \pm 0,073 \mu\text{m}$, já no espermatozoide de hamster o ânulo possui $1,23 \mu\text{m}$ de comprimento por $0,86 \mu\text{m}$ de largura (WARD e COFFEY, 1989).

A técnica de eletroforese unidimensional utilizada não foi eficaz para a separação de frações proteicas. Provavelmente porque os tratamentos prévios pelo qual a amostra passou não foram suficientes para fragmentar o ânulo, não possibilitando a identificação de seus componentes pelo “SDS-page”.

O uso de histoquímica permitiu identificar o ânulo como sendo uma estrutura glicoproteica (PAS positiva) com fitas de DNA anexas, identificadas pelo azul de toluidina pH 4,0.

Como visualizado nos resultados a técnica de MALD-TOF permitiu identificar várias proteínas presentes na amostra, sendo provavelmente algumas delas contaminação, como o precursor de soro albumina. O CTRB1 é o gene que codifica a tripsina utilizada no processo de preparação do material que foi utilizado na técnica de MALD-TOF.

A KRT1 participa da constituição de âncoras acrossômicas existentes durante a formação da cabeça da espermátide (KIERSZENBAUM et al., 2003). A KRT1 também foi identificada como componente da cauda de espermatozoides de touro (HINSCH, et al., 2003). De forma semelhante a proteína RAB2 é uma proteína subacrossomal de espermatozoides bovinos envolvida na biogênese acrossomal (MOUNTJOY et al., 2008). Portanto, provavelmente estas proteínas devam ser contaminação da amostra.

Já em relação a KRT9, ela foi encontrada constituindo anel perinuclear da manchete. Tal anel é uma estrutura microtubular que se forma na base da cabeça, na região central da manchete, durante o processo de alongamento e condensação nuclear (KIERSZENBAUM, 2001). É tido como importante fator na morfogênese da cabeça do espermatozoide. Considerando que o anel perinuclear da manchete se forma em posição oposta ao ânulo nuclear, sendo o primeiro na face citoplasmática e o segundo na face nuclear, é grande a possibilidade destas estruturas terem algum tipo de associação transenvoltório nuclear.

A proteína HSPE1, uma chaperona encontrada na amostra, parece estar envolvida, juntamente com outras moléculas de chaperona, na modificação da superfície de espermatozoides de camundongos durante a capacitação para tornar essas células funcionalmente competentes e iniciar o processo de fertilização (WALSH et al., 2008). Tal dado seria um indicativo que esta proteína seja contaminante e não componente do ânulo nuclear. Contudo, não se pode descartar a possibilidade desta proteína estar ancorada no ânulo, uma vez que as chaperonas são proteínas que participam do processo de enovelamento proteico e destruição de proteínas com configuração incorreta, podendo ser esta a função desta proteína no ânulo.

Outra proteína que parece estar envolvida no processo de capacitação espermática é a ARHGDIA, que está expressa em testículos humanos. Ela atua com outras proteínas influenciando na fluidez da membrana plasmática para promover a capacitação (WANG et al., 2010). Ou seja, também deve ser uma proteína não componente do ânulo.

A expressão do gene DPY19L2 resulta em uma proteína localizada na membrana nuclear interna, principalmente na região voltada para o acrossoma. A não expressão deste gene leva a desestabilização da lâmina nuclear densa (NDL) e da junção acroplaxoma-envoltório nuclear, levando a uma falha na formação da manchete e do acrossoma (PERRIN et al., 2012). A globozoospermia em humanos também tem como principal causa a deleção e não expressão do gene DPY19L2 (KOSCINSKI et al., 2011). DPY19 foi recentemente considerada uma nova família de proteínas transmembranas estruturais (PERRIN et al., 2012). Portanto, é muito provável que a DPY19L2 seja um componente do ânulo nuclear ou esteja associada a ele, sendo um importante componente na morfogênese da cabeça espermática. Alterações nesta proteína também são acompanhadas por alterações no DNA, tais como fragmentação e aneuploidia (PERRIN et al., 2013) e a maioria das alterações da cromatina espermática de touro encontra-se na região do ânulo (BELETTI et al., 2005), corroborando com a provável participação da DPY19L2 na constituição do ânulo nuclear.

A DLST (dihidrolipoil succiniltransferase) é uma proteína do complexo desidrogenase 2-oxiglutarato, o qual está associado ao ciclo do ácido cítrico (LEHNINGER et al., 2008), ou seja, é uma proteína mitocondrial e provavelmente seja uma contaminação.

A proteína MGC127996 até hoje foi apenas descrita em bovino como semelhante à poli (rC) proteína-2 (STRAUSBERG et al., 2002), porém nada mais foi publicado sobre esta proteína. Por sua vez a poli (rC) proteína-2 propriamente dita é descrita como uma proteína multifuncional, que se liga a RNA e participa de diversas funções celulares, entre elas o transporte de RNA entre núcleo e citoplasma e vice-versa (KIM et al., 2000). Portanto, a presença desta proteína compondo o ânulo nuclear sugere que tal estrutura não seja apenas uma âncora de DNA, mas também possui importante atividade na expressão gênica. Talvez não seja importante enquanto o espermatozoide percorre seu trajeto até o ovócito, pois neste período praticamente não existe transcrição (CARREL, 2012), mas tenha importância após a fecundação, no início do desenvolvimento embrionário.

Apesar da MGC127041 ser identificada inicialmente como similar à proteína ribossomal S27a, Liu et al. (2005) identificou sua participação no processo de ubiquitinação e degradação de histonas durante o processo de compactação da cromatina na espermiogênese. Isto sugere que o ânulo nuclear participa do processo de compactação cromatínica ou por ser a região que por último seja compactada, ainda possua substâncias que participem deste processo (BELETTI et al., 2004)

A proteína MGC137211, também conhecida como Proteína HP-25 homologa 2, foi identificada apenas em bovinos e nada se sabe sobre ela, apenas que é uma poliubiquitina. A HP-25 propriamente dita foi identificada como uma proteína expressa no fígado de esquilos hibernantes, mas não em esquilos não hibernantes. Por isso é conhecida como proteína de hibernação (TSUKAMOTO et al., 2007). Considerando que pouco se sabe sobre esta proteína em bovinos, seria a primeira vez que se descreve sua localização nesta espécie. Sendo ela uma poliubiquitina (um oligômero formado pela sequência de ligação isopeptídica da glicina C-terminal de uma molécula de ubiquitina ao resíduo lisina de outra molécula de ubiquitina) e sabendo que a sinalização por ubiquitina e suas cadeias tem um papel não proteolítico no transporte pela membrana, na estrutura e transcrição da cromatina, na reparação de DNA e diversas outras vias sinalizadoras, provavelmente esta proteína esteja juntamente com a MGC127041 envolvida no processo de compactação da cromatina.

A protamina 1 encontrada em pouca quantidade parece ser componente do ânulo nuclear e que como visto em espermatozoides de hamster, a protamina presente no ânulo

nuclear parece não sofrer degradação proteolítica pela DNase I e pode ser estruturalmente independente do volume das protaminas do núcleo (WARD e COFFEY, 1989).

A presença de proteína associada ao microtúbulo também sugere que o ânulo nuclear seja uma estrutura transenvoltório nuclear e não só nuclear o que justificaria o aparecimento desse tipo proteico que é típico do citoplasma. No entanto, não se pode descartar que também seja contaminação.

Além dessas proteínas, tem-se no quadro 1 algumas proteínas de peso molecular variável, algumas em torno de 400 kDa e que ainda não foram caracterizadas, que provavelmente sejam constituintes do complexo do ânulo nuclear. Logo há a necessidade de melhor explorar e estudar estas proteínas para que se tenha uma compreensão mais ampla da função do ânulo nuclear.

Apesar da necessidade de estudos complementares, o presente trabalho permite afirmar que o ânulo nuclear é uma estrutura proteica complexa, muito estável e com prováveis atividades de âncora de DNA e participação no controle da expressão gênica após a fecundação.

6- CONCLUSÃO

O ânulo nuclear de espermatozoides bovino é uma estrutura elíptica com comprimento aproximado de 1,10 μm e largura de 0,54 μm , quimicamente constituído por um complexo glicoproteico, muito estável, de difícil fragmentação, onde se inserem fitas de DNA. Dentre as proteínas constituintes deste complexo, existem algumas com grande peso molecular (em torno de 400 kDa), já identificadas no genoma bovino, mas ainda não caracterizadas. Existem outras proteínas (KTR9 e proteína associada ao microtúbulo) que sugerem ser o ânulo nuclear uma estrutura transenvoltória nuclear e outras que sugerem que o mesmo participe do processo de compactação da cromatina (MGC127041, MGC137211) e mesmo da morfogênese (KRT9 e DPY19L2) da cabeça durante a espermiogênese.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL A, SAID TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction Update**, v.9, p.331-345, 2003.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3rd ed. New York: Garland, 1994. 342p.

BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**, 2ª ed. São Paulo: Editora Manole, 1992. , 629p.

BARTON, T. S.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F. Epigenetic programming in the preimplantation rat embryo is disrupted by chronic paternal cyclophosphamide exposure. **PNAS**. v. 102, p. 7865- 7870, 2005.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Influência da temperatura testicular sobre o complexo DNA-proteína em espermatozóides de coelho. **Revista Brasileira de Genética**. v. 18, p. 131, 1995.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v.22, n.2, p.85-90, 2005.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry**, v.79, n.1, p.17-23, 2004.

BRITTO, C.M.C.; MELLO, M.L. Induced nuclear metachromasy evaluated in spermatozoa of "pé duro" bulls. **Brazilian Journal of Genetics**, v.11, n.3, p.349-354, 1988.

COSTA, E. N.; BELETTI, M. E. Uso da metacromasia induzida na detecção de anomalias ao nível de complexo DNA-proteína em espermatozóides humanos. **Revista Brasileira Genética**, v. 18, p. 567, 1995.

COSTA, E. N.; BELETTI, M. E.; SOUSA, M. C. N.; RESENDE, E. V. The anomalous DNA protein complex in human spermatozoa of varicocele cases. **Brazilian Journal Genetics**. v. 19, n. 3, p. 147, 1996.

DU, Z. F.; WEI, W.; WANG, Y. F.; CHEN, X. L.; CHEN, C. Y.; LIU, W. T.; LU, J. J.; MAO, L. G.; XU, C. M.; FANG, H.; ZHANG, X. N. A novel mutation within the 2B rod domain of keratin 9 in a Chinese pedigree with epidermolytic palmoplantar keratoderma combined with knuckle pads and camptodactyly. **European Journal of Dermatology**. v. 21,

p. 675-9, 2011.

EDDY, M. Spermatogenesis and HSP70 chaperones. **Biology of Reproduction**, v.60, Suppl. 1, p.74, 1999.

EDDY, E. M. The spermatozoon *In* NEIL, J. D. Ed(s). **Knobil and Neill's Physiology of reproduction** United States of America: Elsevier, p; 3-54, 2006.

EVENSON D, JOST L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods Cell Science**, v.22, p.169-189, 2000.

EVENSON, D.P.; DARZYNKEIWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v.210, n.4474, p.1131-1133, 1980.

FERRARI, M.R.; SPIRITO, S.E.; GIULIANO, S.M.; FERNÁNDEZ, H.A. Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa. **Andrologia**, v.30, n.2, p.85-89, 1998.

FOSTER, D.L.; LEMONS, J. A.; JAFFE, R.B.; NISWENDER, G.D. Sequential patterns of circulating luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in female sheep from early postnatal life through the first estrous cycles. **Endocrinology**, v. 97, p. 985, 1978.

GLEDHILL, B. L.; GLEDHILL, M. P.; RIGLER Jr, R.; RINGERTZ, N. R. Atypical changes of desoxyribonucleoprotein during spermiogenesis associated with a case of infertility in bull. **Journal Reproduction Fertility**, v. 12, p. 575-578, 1966.

GLEDHILL, B.L. Studies on the DNA content, dry mass and optical area of morphologically normal and abnormal bull spermatozoa heads. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.7, n.1, p.1-20, 1966.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 6a ed. GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. (ed) Espermatozóide e plasma seminal, Kiawah Island: Academic Press, 1995, p.167-190.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. New York: Wiley-Blackwell, 2000, 509p.

HINSCH, E.; BOEHM, J. G.; GROEGER, S.; MUELLER- SCHLOESSES, F.; HINSCH, K. Identification of Cytokeratins in Bovine Sperm Outer Dense Fibre Fractions. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p. 155-160, 2003.

HOFMANN, R. M.; PICKART, C.M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. **Cell**, v. 96, p. 645-653, 1999.

HUD, N.V.; ALLEN, M. J.; DOWNING, K. H.; LEE, J.; BALHORN, R. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. **Biochemical biophysical research communications**, v. 193, p. 1347-1354, 1993.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, v.9, p.401, 1964.

JOHNSON, G. D.; LALANCETTE, C.; LINNEMANN, A. K.; LEDUC, F.; BOISSONNEAULT, G.; KRAWETZ, S. A. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. **Reproduction**. v. 141, p. 21-36, 2011.

JONES, R. Spermiogenesis and sperm maturation in relation to development of fertilizing capacity. In: LAURIA, A.; GANDOLFI, F.; ENNE, G. et al. (Eds.) **Gametes, development and function**. Roma: Serono Symposia, 1998. p.205-218.

KIERSZENBAUM, A. L; RIVKIN, E; TRES, L.L. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. **Molecular Biology Cell**, v.11, p. 4628- 40, 2003.

KIERSZENBAUM, A. L. Keratins: Unraveling the Coordinated Construction of Scaffolds in Spermatogenic Cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 1-2, 2002.

KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKI, N. et al. Cryopreservation and ensuing "in vitro" fertilization ability of boar spermatozoa from epididymis stored at 4°C. **Theriogenology**, v.50, p.615-633, 1998.

KIM, J. H.; HAHM, B.; KIM, Y. K; CHOI, M.; JANG, S. K. Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. **Journal of Molecular Biology**, v.298, p. 395-405, 2000.

KOSCINSKI, I; ELLNATI, E; FOSSARD, C; REDIN, C; MULLER, J; VELEZ DE LA CALLE, J; SCHMITT, F; BEN KHELIFA, M; RAY, P.F; KILANI, Z; BARRATT, C.L. DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia. **The American Journal of Human Genetics**, v.88, p. 344-50, 2011.

LEHNINGER, A; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5^a ed. New York: H. W. Freeman, 2008, 1263p.

LIU, Z.; OUGHTRED, R.; WING, S. S. Characterization of E3Histone, a novel testis ubiquitin protein ligase which ubiquitinates histones. **Molecular Cell Biology**, v.7, p. 2819-2831, 2005.

MARTINS, C.F.; SILVA, A.E.D.F.; MATARAZZO, R. et al. Evaluation of the quality of cryopreserved bovine epididimal spermatozoa by analysis of motility, acrossomal status, penetration ability in oocytes and integrity of sperm chromatin. **Biology of Reproduction**, v.62, Supl.1, p.156, 2000.

MARUSHIGE Y, MARUSHIGE K.; Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p.39-45, 1975a.

McLEAN I. W, NAKANE P. K. Periodate-lysina-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.22, p. 1077-1083, 1974.

MELLO, M.L.S. Induced metachromasy in bull spermatozoa. **Histochemistry**, Berlin, v.74, n.3, p.387-392, 1982.

MORRIS ID, ILOTT S, DIXON L, BRISON DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. **Human Reproduction**, v.17, p.990–998, 2002.

MOUNTJOY, J.R; XU, W; McLEOD, D; HYNDMAN, D; OKO, R. RAB2A: a major subacrosomal protein of bovine spermatozoa implicated in acrosomal biogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 223-32, 2008.

NISHIMUNE, Y.; OKABE, M. Mammalian male gametogenesis, growth, differentiation and maturation of germ cells. **Development and Growth Differentiation**, v.34, p.479-486, 1993.

OSTERMEIER, C.G.; SARGEANT, G.A.; YANDELL, B.S.; EVENSON, D.P.; PARRISH, J.J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, v.22, n.4, p.595-603, 2001.

PERRIN, C.; COAT, M. H.; NGUYEN, M.; TALAGAS, F.; MOREL, J.; AMICE, M. Molecular cytogenetic and genetic aspects of globozoospermia: a review. **First International Journal of Andrology**, v. 45, p. 1-9, 2012.

PIRRE, V.; MARTINEZ, G.; COUTTON, C.; DELAROCHE, J.; YASSINE, S.; NOVELLA, C.; PERNET-GALLAY, K.; HENNEBICQ, S.; RAY, P. F. Absence of Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. **Development**, v. 139, p. 2955-2965, 2012.

PIRHONEN, A.; LINNALA-KANKKUNEN, A.; MAENPAA, P. H. Identification of phosphoserine residues in protamines from mature mammalian spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 981-986, 1994.

POGANY, G. C.; CORZETT M; WESTON S; BALHORN R. DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. **Experimental Cell Research**, v.136, n.1, p.127-136, 1981.

SAILER, B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry**, v.24, n.2, p.167-173, 1996.

SAKKAS D, MOFATT O, MANICARDI GC, MARIETHOZ E, TAROZZI N, BIZZARO D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1061–1067, 2002.

SCHANBACHER, B.D.. Hormonal regulation of the male pituitary. In **PROC. 10 TH INT. CONGRESS ON ANIMAL REPROD. ARTIF. INSEM.**, Urbana-Champaign, 1984, v. 4, p. 11-18.

SHAMAN, J. A.; PRISZTOKA, R.; WARD, W.S. Topoisomerase IIB and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 741-74, 2006.

SHAMAN, J. A.; YAMAUCHI, Y.; WARD, W.S. Function of the Sperm Nuclear Matrix. **Archives of Andrology**, v. 53, p. 135-140, 2007.

STRAUNSBURG, R. L.; FEINGOLD, E. A.; GROUSE, L.H.; DERGE, J. G.; KLAUSNER, R. D.; COLLINS, F. S.; WAGNER, L.; SHENMEN, C. M.; SCHULER, G. D.; ALTSCHUL, S. F.; ZEEBERG, B.; BUETOW, K. H.; SCHAEFER, C. F.; BHAT, N. K.; HOPKINS, R. F.; et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. **PNAS**, v. 99, p. 16899-16903, 2002.

SUTOVSKY, P; MORENO, R. D.; RAMALHO- SANTOS, J.; DOMINKO, T.; SIMERLY, C.; SCHATTE, G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. **Nature**, v.402, p. 371-372, 1999.

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, v.42, n.1, p.87-91, 1984.

TOMSU M, SHARMA V, MILLER D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. **Human Reproduction** v.17, p.1856–1862, 2002.

TSUKAMOTO, D.; FUJII, G.; KONDO, N.; ITO, M.; SHIBA, T.; TAKAMATSU, N. USF is involved in the transcriptional regulation of the chipmunk HP-25 gene. **Gene**, v. 396, p. 268-272, 2007.

TWIGG, J.P.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v.13, n.7, p.1864-1871, 1998.

VAN DER HEIJDEN GW, RAMOS L, BAART EB, VAN DEN BERG IM, DERIJCK AA, VAN DER VLAG J, MARTINI E, de BOER P. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. **BMC Developmental Biology**, v. 8, p.34, 2008.

VAN STRAATEN, H.M.W.; WENSING, G.J.G. Leydig cell development in the testis of the pig. **Biology Reproduction**, v. 18, p. 86-93, 1978.

WALSH, A; WHELAN, D; BIELANOWICZ, A; SKINNER, B; AITKEN, R.J; O'BRYAN, M.K; NIXON, B. Identification of the molecular chaperone, heat shock protein 1 (chaperonin 10), in the reproductive tract and in capacitating spermatozoa in the male mouse. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 983-93, 2008.

WANG, L; CHEN, W; ZHAO, C; HUO, R; GUO, X. J; LIN, M; HUANG, X.Y; MAO, Y. D; ZHOU, Z. M; SHA, J. H. The role of ezrin-associated protein network in human sperm capacitation. **Asian Journal Andrology**, v. 5, p. 667-76, 2010.

WARD, W.S; COFFEY, D.S. Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 361-70, 1989.

WARD, W. S. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 48, p.1193-201, 1993.

WARD, W.S.; McCARTHY, S.; KLAUS, A. The function of higher order sperm chromatin structures. **Biology of Reproduction**, v.60, Suppl. 1, p.84, 1999.

WARD, W.S; McCARTHY, S. Interaction of Exogenous DNA with the Nuclear Matrix of Live Spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v 56, p. 235-237, 2000.

WARD, W.S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. **Molecular Human Reproduction** v. 16, p. 30-36, 2010.

YAMAUCHI , Y.; SHAMAN, J. A.; WARD, W.S. Topoisomerase II mediated breaks in spermatozoa cause the specific degradation of paternal DNA in fertilized oocytes. **Biology of**

Reproduction, v.76, p.666-672, 2007.

YU, Y.E.; UNNI, E.; ZHANG, Y. et al. Spermatogenesis in mice lacking transition nuclear proteins in condensing spermatids. **Biology of Reproduction**, v.60, Suppl. 1, p.76, 1999.