

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ELISSON TERÊNCIO SOUZA

LOCALIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES CROMATÍNICAS EM ESPERMATOZOIDES DE
TOURO E SUA RELAÇÃO COM A MARCAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DE
PROTAMINA

UBERLÂNDIA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ELISSON TERÊNCIO SOUZA

LOCALIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES CROMATÍNICAS EM ESPERMATOZOIDES DE
TOURO E SUA RELAÇÃO COM A MARCAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DE
PROTAMINA

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

Área de concentração: Biologia da Reprodução

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2014



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Área de Concentração: Biologia Celular

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico, Número 026/2014 do PPGBC

Data: 29 de Agosto de 2014

Discente: Elisson Terêncio Souza Matrícula nº. 11212BCE003

Título do Trabalho: "Localização de alterações cromatínicas em espermatozoides de touro e sua relação com a marcação imunocitoquímica de protamina".

Às oito horas e trinta minutos do dia vinte e nove de agosto de 2014 no bloco 2B, na sala 2B228 - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Bruno Augusto Nassif Travençolo /UFU; Belico de Vasconcelos/UNIUBE e Marcelo Emílio Beletti /UFU orientador do candidato. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti apresentou a Comissão Examinadora e o candidato Elisson Terêncio Souza, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente ocorreu conforme as normas do Programa. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Concluída a arguição, a qual se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato Elisson Terêncio Souza aprovado

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 11:10. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Bruno Augusto Nassif Travençolo

UFU

Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos

UNIUBE

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UFU

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Dedico esse trabalho à minha mãe Elaine pelo exemplo de dedicação e esforço, e à minha esposa Rebecca, por todo acompanhamento e incentivo para conclusão dessa etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela graça e alegria de concluir mais essa etapa na minha vida.

À minha esposa Rebecca, por todo amor, carinho e incentivo que ela sempre me oferece.

À minha mãe Elaine, ao meu tio Elias, aos meus irmãos Junior e Pâmella, ao meu sogro Marquinhos, minha sogra Nane e a meu cunhado Marcos Filho, por vocês terem me acompanhando e incentivado.

Ao meu orientador prof. Marcelo Emílio Beletti, por sua disponibilidade e investimento de tempo, recursos e paciência na minha formação e no meu trabalho.

Ao profs. Cláudio Vieira Silva e Bruno Augusto Nassif Travençolo. A ajuda de vocês foi essencial para conclusão desse trabalho.

Aos alunos e colegas dos laboratórios da UFU de Biologia da Reprodução, Tripanossomatídeos e Centro de Microscopia Avançada.

Ao prof. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues, e aos alunos e técnicos do laboratório de microscopia Confocal da UFTM.

Aos técnicos e funcionários dos laboratórios de Histologia e Centro de Microscopia Avançada da UFU: Juscélia, Fabrício, Ester, Mariani e Rosiane.

Aos amigos, Homero, Gabriel, Hallana, Rombledo Leonardo, Thaisa, Jeverton (Magrão), Juliana Lane, Luiz Gonzaga, Daniel, Maurício, Ricardo, Raquel, Fábio e Paula. Pelas orações e pelo encorajamento durante toda essa etapa.

Aos amigos da Aliança Bíblica Universitária e da Igreja Sal da Terra (Centro Oeste).

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

À todos os que, de forma direta ou indireta, contribuíram para realização desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

"Não conseguimos nada sozinhos neste mundo, e o que quer que aconteça é o resultado da tapeçaria completa da vida e todos os nós individuais tecidos de uns nos outros que criam algo."

Sandra Day O'Connor

RESUMO

As alterações na cromatina dos espermatozoides vêm sendo relacionada como causa de subfertilidade em diversas espécies de mamíferos. Um dos fatores que leva a essas alterações é a deficiência de protamina. No presente trabalho analisou-se a localização das alterações da cromatina de espermatozoides de touros e a sua relação com a marcação imunocitoquímica da protamina. Amostras de sêmen de touros férteis e subférteis foram examinadas pela análise computacional de imagens de esfregaços corados com azul de toluidina (AT), DAPI e marcados com anticorpo anti protamina 1 (PR1). Para avaliação das lâminas de AT foram utilizadas duas análises computacionais distintas: uma convencional, em que se obtêm o valor da descompactação percentual (DESC%) e heterogeneidade (HET) médias da cromatina dos espermatozoides e outra alternativa, na qual se classifica as alterações de acordo com a localização da alteração na cabeça do espermatozoide e se calcula a porcentagem de espermatozoides com cada tipo de alteração nas amostras. Em ambas se comparavam as amostras de touros férteis e subférteis. A análise convencional mostrou um aumento significativo ($p=0,01$) tanto de DESC% quanto de HET nas amostras subférteis. Já análise alternativa mostrou um aumento nas amostras subférteis das alterações na metade basal (AMB) $p=0,05$ e cabeças totalmente alteradas (CTA) $p=0,04$. Essa análise computacional alternativa também foi aplicada à coloração com DAPI onde as amostras subférteis apresentaram um aumento das alterações na base (AB) $p=0,02$. Já as alterações dispersas (AD) foram maiores com o $p=0,02$ nas amostras férteis. Na marcação com anti-PR1 as alterações na base (AB) mostraram-se maiores nas amostras subférteis com o $p=0,01$. A porcentagem de coincidência das marcações com DAPI e anti-PR1 foi baixo. Com esses resultados concluímos que, com a técnica alternativa foi possível propor uma classificação das alterações nas colorações e na imunomarcação, porém essa técnica apresentou uma baixa eficiência para distinguir touros férteis dos subférteis. A coloração com DAPI avaliada em microscopia confocal se apresentou como uma possível alternativa para a coloração com AT. A técnica convencional com AT foi a que mostrou um melhor resultado para diferenciação entre os grupos férteis e subférteis. A imunomarcação de PR1 mostrou que essa proteína se distribui por toda cabeça do espermatozóide de touro e que as alterações cromatínicas nessas células não possuem relação com a quantidade de PR1.

Palavras-chave: análise computacional de imagens, cromatina espermática, protamina

ABSTRACT

Changes in the chromatin of sperm have been linked to subfertility in several species of mammals. One of the factors that leads to these changes is protamine deficiency. In this study we analyzed the location of changes of chromatin in the sperm of bulls and the relationship with the markup of protamine immunocytochemistry. Semen samples of fertile and subfertile bulls were examined through computational analysis of images of smears stained with toluidine blue (TB), DAPI and marked with protamine 1 (PR1) antibody. For the evaluation TB blades were used in two separate analyses: a conventional, where we obtained the value of decompression percentage (DESC%) and average chromatin heterogeneity (HET) of sperm, and an alternative, which labels changes according to the location of the change in the head of the sperm and percentage of sperm with each type of change in the samples. In both was compared samples from fertile and subfertile bulls. Conventional analysis showed a significant increase ($p = 0.01$) both DESC% and HET in subfertile samples. On the other hand, alternative analysis showed an increase in subfertile samples of changes in basal half (AMB) $p = 0.05$ and totally changed heads (CTA) $p = 0.04$. This alternative computational analysis was also applied to staining with DAPI, where the subfertile samples showed an increase in base alterations (AB) $p = 0.02$. The dispersed changes (AD) were higher with $p = 0.02$ in the fertile samples. On labeling with anti-PR1, changes in the base (AB) were higher in subfertile samples with $p = 0.01$. With these results we conclude that, with the alternative technique was possible to propose a classification of changes in staining and immunolabelling, but this technique showed a low efficiency to distinguish fertile from subfertile bulls. DAPI staining assessed in confocal microscopy is presented as a possible alternative for staining with AT. The conventional technique with AT showed the best result for differentiation between fertile and subfertile groups. PR1 Immunostaining showed that this protein is distributed throughout the bull sperm head, and that chromatin alterations in these cells have no relation with the amount of PR1.

Keywords: computational image analysis, sperm chromatin, protamine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ligação da protamina no sulco menor da fita de DNA e formação dos toróides (modificado de BRAUN, 2001).....	18
Figura 2 - Ligação da protamina no sulco menor da fita de DNA e formação dos toróides (modificado de BRAUN, 2001).....	18
Figura 3 - Modelo “donut- alça” de ligação a matriz nuclear (modificado de SHAMAN, 2007).	19
Figura 4 - Desenho esquemático das alterações cromatínicas em espermatozoides.	23
Figura 5 - Fotomiografias representativas de cabeças de espermatozoides identificadas pela análise computacional de esfregaços de sêmen de touros férteis e subférteis corados com AT. Alteração na base (A); alteração na metade basal (B); alteração no eixo central (C); alteração dispersa (D); cabeça totalmente alterada (E); normal (F); Barra (-) equivalente a 5 micrometros.....	25
Figura 6 - Fotomiografias representativas de cabeças de espermatozoides identificadas pela análise computacional de esfregaços de sêmen de touros férteis e subférteis com marcação de DNA e protamina. Normal (A); alteração na base (B); alteração na metade basal (C); alteração dispersa (D); cabeça totalmente alteradas (E); DNA(1); PR1(2); Barra (-) equivalente a 5 micrometros.....	25
Figura 7 - Marcação nuclear fluorescente em espermatozoides de touro. Marcação DNA - azul (A); PR1 - verde (B). Setas apontam células com marcação mais intensa total (setas brancas) ou parcial (setas amarelas) ; Barra (-) equivalente a 20 micrometros.....	26
Tabela 1 - Mediana da porcentagem de espermatozoides portadores de cada uma das classificações das alterações cromatínicas identificadas por AT em touros férteis e subférteis.	26
Tabela 1 - Mediana da porcentagem de espermatozoides portadores de cada uma das classificações das alterações cromatínicas identificadas por marcação com DAPI em touros férteis e subférteis.	27

Tabela 3 - Mediana da porcentagem de espermatozoides portadores de cada uma das classificações das alterações cromatínicas identificadas por imunomarcação com anticorpo anti-PR1 em touros férteis e subférteis.	27
Tabela 4 - Número de espermatozoides com cada tipo de alteração identificados por marcação com DAPI e contra PR1 e a porcentagem de espermatozoides caracterizados com o mesmo tipo de alteração nas duas marcações.....	28
Tabela 2 - Mediana da descompactação percentual e heterogeneidade médias da cromatina.	28
Tabela 6 - Médias e desvios padrão da porcentagem de espermatozoides portadores de cada uma das classificações das alterações cromatínicas, identificadas por três diferentes métodos, independente da fertilidade do touro.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Alaranjado de acridina
AB	Alteração na base
AD	Alteração dispersa
AEC	Alteração no eixo central
AMB	Alteração na metade basal
Anti-PR1	Anticorpo anti-protamina 1
AT	Azul de toluidina
CTA	Cabeça totalmente alterada
Da	Daltons
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindole
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
FCT	Fatores de células tronco
HSP-70-2	Proteínas <i>heat-shock</i> 70-2
ICBIM	Instituto de Ciências Biomédicas
Kb	Kilo pares de base
MARs	Regiões de anexação de matriz
MATLAB	Matrix laboratory
PBS	Tampão fosfato de sódio
PGNSAPO	Tampão de bloqueio
PPD	1,4 Phenylenediamine
PR1	Protamina 1
PTs	Proteínas nucleares de transição
PT1	Proteínas nuclear de transição tipo 1
PT2	Proteínas nuclear de transição tipo 2
SCSA	Ensaio de estrutura de cromatina espermática
TA	Total de alterações
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	12
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 - Características dos espermatozoides	14
2.2 - Espermatogênese	14
2.2.1 - Espermatoцитogênese	15
2.2.2 -Espermatiogênese	16
2.4 - Avaliação da cromatina espermática	20
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 - Amostras de sêmen	21
3.2 - Coloração com azul de toluidina e captura de imagens	21
3.2 - Imunocitoquímica e microscopia de fluorescência	22
3.3 - Análise computacional das imagens	22
3.4 - Análise Estatística	24
4 - RESULTADOS	25
5 - DISCUSSÃO	30
6 - CONCLUSÃO	35
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	36

1 - INTRODUÇÃO

A primeira descrição dos espermatozoides ocorreu há mais de 300 anos pelo naturalista holandês Anton Leeuwenhoek, que os relata como *animalículos* com uma cabeça e uma cauda (STECHELL et al., 1982). Apenas em 1830 essas células foram reconhecidas como parte do sêmen e importantes para a fertilidade. Porém, só a partir da década de oitenta do século passado é que os pesquisadores têm dado mais atenção às essas células, deixando de olhar para elas apenas como um vetor do material genético paterno (BRAUN, 2001; ERENPREISS et al., 2006).

Rotineiramente a qualidade do sêmen é dada segundo a concentração, a motilidade e a morfologia dos espermatozoides. Porém, esses exames de rotina estão sujeitos à uma avaliação visual do avaliador, o que confere certo grau de subjetividade nos resultados (BELETTI, et al., 2005a). Além disso, já foi descrito por Rocha et al. (2002) e Erenpreiss et al. (2006), que existe uma baixa correlação entre características seminais e a fertilidade, propondo que as causas de baixa fertilidade possa estar relacionado a alterações das membranas espermáticas ou da cromatina.

A cromatina dos espermatozoides maduros se difere em sua estrutura e composição da cromatina das células somáticas. Durante a espermogênese ocorre a substituição ordenada das histonas por nucleoproteínas específicas que possuem um caráter básico, são ricas em arginina e cisteína oxidata. Essas nucleoproteínas são chamadas protaminas e elas têm uma alta capacidade de compactar o material genético dos espermatozoides. Nem todas as histonas são substituídas e a quantidade retida de histonas varia de acordo com a espécie. Essa nova estrutura nuclear influenciará a morfologia da cabeça dos espermatozoides (SAILER et al., 1996; FERRARI et al., 1998, ROCHA et al., 2002).

Durante esse processo de protaminação pode ocorrer algumas falhas graves provocadas principalmente por apoptose, presença de espécies reativas de oxigênio e deficiência de protamina, causando assim, o dano no complexo DNA-proteína. Esses danos podem levar à má compactação da cromatina e consequentemente a uma subfertilidade do macho (OLIVA, 2006; BARROSO et al., 2009; SIMON et al., 2011).

A avaliação da integridade da cromatina dos espermatozoides pode ser realizada por várias técnicas como esfregaços corados com AT, alaranjado de acridina e azul de anilina, o

ensaio Cometa, técnica de Tunel e ensaio de estrutura de cromatina espermática (MELO, 1982; TEJADA, et al., 1984; HAMMADEH et al., 2001; GORCYZA, et al., 1993; MCKELVEY-MARTIN et al., 1997; EVENSON et al., 2002) . A análise computacional de imagens de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina (AT) vem se mostrando como uma importante ferramenta para a observação das alterações na cromatina espermática (BELETTI et al., 2005a). Porém, nesta avaliação computacional até então, não se obtém o número total de espermatozoides alterados, apenas a média da descompactação de todas as cabeças da amostra.

Utilizando marcação com DAPI, com anticorpo anti-protamina 1 (anti-PR1), coloração com AT e análise computacional de imagem, o presente trabalho tem como objetivos verificar a distribuição da protamina na cabeça do espermatozóide de touro, verificar a relação entre a localização das alterações na cromatina de espermatozoide com a imunomarcação de protamina 1 (PR1), testar métodos alternativos de avaliação de cromatina e verificar quais das técnicas utilizadas melhor diferencia touros férteis de subférteis.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Características dos espermatozoides

Os gametas masculinos são formados nos túbulos seminíferos, localizados no interior dos testículos. O processo é conhecido como espermatogênese, no qual as células germinativas sofrem contínuas divisões celulares e mudanças de desenvolvimento que originarão células altamente especializadas que são os espermatozoides maduros. A etapa final de diferenciação é conhecida como espermiogênese (GARDNER; HAFEZ, 2004).

Segundo Gardner e Hafez (2004) morfologicamente os espermatozoides podem ser divididos em três regiões: cabeça, acrossomo e cauda. O acrossomo é localizado recobrindo a extremidade do núcleo espermático e possui em seu interior várias enzimas hidrolíticas que participam no processo de fertilização. A cauda pode ser dividida entre o colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal, ambas envolvidas na motilidade celular.

A maior parte da cabeça da célula espermática é composta pelo núcleo, que é achatado e de forma oval, e contém uma cromatina altamente condensada devido à associação do DNA com proteínas nucleares. Na espermiogênese ocorre uma substituição de grande parte das proteínas histônicas pelas protaminas, resultando numa maior compactação e estabilidade do núcleo do espermatozoide (BALHORN, 1982; GARDNER; HAFEZ, 2004; GATEWOOD et al., 1990).

Erros nesse processo de compactação podem acarretar a formação de espermatozoides anômalos comprometendo seriamente a fertilidade do macho (KRETSER et al., 1998).

2.2 - Espermatogênese

A espermatogênese é o processo pelo qual os espermatozoides são produzidos. Em bovinos, ela dura aproximadamente 61 dias. Possui duas fases distintas a espermatocitogênese que é a fase de divisão celular com duração aproximada de 44 dias, e espermiogênese, onde ocorre a metamorfose celular e dura aproximadamente 17 dias (AMANN, 1983).

Na fase embrionária do macho ocorre a migração das células germinativas primordiais do saco vitelínico para as gônadas indiferenciadas. Acontece então a associação com células mesenquimais precursoras da célula de Sertoli, formando-se, dessa maneira, os túbulos seminíferos. Após várias divisões, as células primordiais, que são chamadas de gonócitos, irão se diferenciar antes da puberdade, formando as espermatogônias (KRETSER et al., 1998; GARDNER ; HAFEZ, 2004).

Proteínas c-kit são receptores de superfície essenciais para que ocorra a migração das células germinativas primordiais. Os fatores de célula tronco (FCT) produzidos pelas células de Sertoli se ligam nas c-kit. Um estudo com camundongos, no qual foi induzido mutações nos receptores c-kit, mostrou ausência de células germinativas nos testículos pela falha na ligação dos FCTs (REITH; BERNSTEIN, 1991).

2.2.1 - Espermatocitogênese

A espermatogênese ocorre dentro dos túbulos seminíferos e inicia-se a partir da puberdade, fase na qual a ação de hormônios específicos induz as espermatogônias a entram em processo de divisão formando os tipos A1, A2, A3 e A4 de espermatogônias. O tipo A4, após a divisão para uma forma intermediária (tipo In), formará as espermatogônias do tipo B (GARDNER; HAFEZ, 2004).

As espermatogônias do tipo B, após algumas divisões, formarão os espermatócitos primários, que, logo após sua formação, duplicam o seu DNA e entram na prófase da primeira divisão meiótica. Dessa divisão surgirão duas células menores que são os espermatócitos secundários. Estes, após divisão celular, originarão duas células haplóides conhecidas como espermátides. Essas células permanecem ligadas às espermátides vizinhas por meio de pontes citoplasmáticas e a comunicação entre essas células é importante para o crescimento concomitante de grupos de células germinativas (Figura 1).

Ainda não estão totalmente esclarecidas todas as moléculas que participam dessa fase da espermatogênese. Porém, já foram identificadas algumas proteínas que se mostraram essenciais nesse processo. É o caso da proteína *heat-shock 70-2* (HSP-70-2). Em um trabalho com animais geneticamente modificados, sem a HSP-70-2, observou-se que os espermatócitos falharam em completar a meiose e houve um considerável aumento de apoptose dessas células. Outro estudo aponta a HSP-70-2 como um integrante essencial do complexo sinaptonêmico, responsável pelo pareamento dos cromossomos homólogos durante a prófase da meiose. Embora em camundongos HSP-70-2-/- também ocorra a formação do complexo sinaptonêmico, o processo de desinapse não ocorre na ausência dessa proteína (KRETSE, et al., 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011; GARDNER; HAFEZ, 2004).

BYSKOV et al. (1995) identificou em extrato de testículo de bovinos e no fluído folicular humano, uma série de esteróis (4,4-dimethyl-5a-cholest-8,24-diene-3P-ol, o C29 sterol, também chamado de 4,4-dimethyl-zymosterol) que induz a meiose em oócitos desnudados de camundongos. Outros estudos sobre a ação desses esteróis pode prover importantes informações sobre o processo de meiose.

Durante a meiose ocorre também a modificação da morfologia das mitocôndrias. Esse fenômeno serve também como um marcador citológico de meiose. Já nos espermatócitos primários aparece um maior espaço entre as cristas transversais das mitocôndrias, e, posteriormente, esses espaços irão se tornar vacúolos. Essas alterações ocorrem devido à secreção pelas células de Sertoli de ativina, que age como um modulador paracrino essencial (KRETSER, et al., 1998 apud SEITZ, et al., 1995).

2.2.2 -Espermiogênese

Na fase final, conhecida como espermiogênese, as espermátides arredondadas sofrerão várias e progressivas modificações morfológicas que as transformarão nos espermatozoides. Essas alterações são a formação do acrosomo, um lisossomo modificado que fica unido à superfície do núcleo oposto a membrana celular; formação do aparelho flagelar e cauda, que inclui a constituição do axonema, um conjunto de microtúbulos que se forma à partir dos centríolos das espermátides; o alongamento do núcleo das espermátides e ao mesmo tempo a compactação da cromatina, influenciando na morfologia da cabeça dos espermatozoides (BALHORN, 1989; SAILER et al., 1996; KRETSER, et al., 1998; GARDNER; HAFÉZ, 2004).

A condensação da cromatina inicia-se ainda nas espermátides redondas haploides, onde as histonas dos nucleossomos são substituídas por proteínas nucleares de transição (PTs), que vão mediar a troca das histonas por protaminas. Essas proteínas foram identificadas em vários mamíferos como humanos, ratos, camundongos, javali e carneiro. As principais PTs são as PT1 e PT2, e ambas são codificadas por um único par de genes Tnp1 e Tnp2. Elas têm a função de mediar a troca das histonas pelas protaminas (AOKI E CARRELL, 2003; MEISTRICH, et al., 2003).

A PT1 não contém cisteína, porém possui cerca de 20% de lisina e 20% de arginina distribuídos uniformemente e massa molecular de 6200 daltons (Da). É uma proteína com a sequência de aminoácidos bastante conservada entre os mamíferos e muito expressada. PT2 com massa molecular de 13000 Da, possui 5% de cisteína, 10% de lisina e 10% de arginina, não possui uma sequência bem conservada e sua expressão em abundância varia entre as espécies. Com experimentos *in vitro* pode-se observar algumas possíveis funções para as PTs. PT1 provoca o relaxamento da fita de DNA com o fomento da atividade da topoisomerase I, relaxa o DNA em partículas nucleossomais e também diminui a temperatura de fusão do DNA. Sendo assim, acredita-se que sua função seja facilitar as retiradas das histonas. No caso de PT2, acredita-se que seja uma proteína ligada a condensação do DNA, pois ela provoca

uma elevação na temperatura de fusão do DNA e compacta o DNA em núcleos nucleossomais (MEISTRICH, et al., 2003).

Experimentos *in vivo* para testar a função de PT1 e PT2, foram realizados em camundongos knockouts $Tnp1^{-/-}$ e $Tnp2^{-/-}$. Observou-se em ambos anormalidades na configuração da cauda dos espermatozoides, na motilidade progressiva e na viabilidade. Houve alterações também em alguns aspectos da cromatina como o processamento incompleto da protamina 2 (PR2) e processo acabado de condensação de cromatina (MEISTRICH, et al., 2003; ZHAO et al., 2001).

Finalmente as PTs são retiradas e substituídas por protaminas, que são proteínas altamente básicas, ricas em arginina (até 70% de arginina), e podem ser encontradas de duas formas: protamina 1 (PR1) e protamina 2 (PR2). A família de protaminas PR1 foi encontrada em todas as espécies de vertebrados estudados, enquanto PR2 estão presentes em apenas alguns mamíferos como os camundongos e humanos (OLIVA, 2006; BALHORN, 2007; VRIES, et al., 2012).

As protaminas se ligam no sulco menor da fita do DNA e, os seus grupos de arginina que são carregados positivamente, neutralizam os grupos fosfato da cadeia de DNA que tem carga negativa, anulando dessa forma a repulsão entre as fitas. Os grupos carboxiterminal e aminoterminal das moléculas de protaminas, formam ligações dissulfeto intra e intermolecular fazendo dessa forma que as fitas de DNA se encaixem lado a lado, formando um conjunto linear bem compacto e estável de aproximadamente 50Kb, chamados toróides ou “donuts” (BALHORN, 1982; BALHORN, 1991) (Figuras 1 e 2).

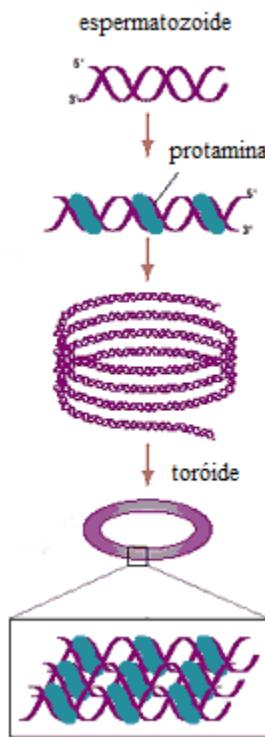


Figura 1 - Ligação da protamina no sulco menor da fita de DNA e formação dos toróides (modificado de BRAUN, 2001).

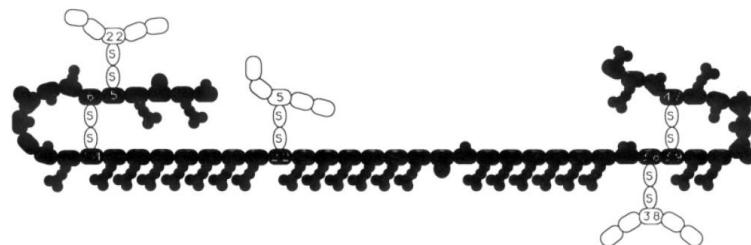


Figura 2 - Intra e intermolecular ligações dissulfeto em protamina bovina (BALHORN, 1991).

O processo de protaminação, além de gerar uma alta compactação da cromatina, garante a integridade do genoma paterno protegendo a informação genética da ação de nucleases, potenciais agentes mutagênicos durante o transporte dos espermatozoides no trato genital masculino e feminino. Ainda, permite que a célula espermática adquira uma forma pequena e hidrodinâmica, facilitando o seu transporte no trato feminino (OLIVA, 2006; SHARMA; AGARWAL, 2011).

Os toróides são fixados a uma matriz nuclear proteica em locais específicos chamados de regiões de anexação da matriz (MARs), através de domínios de DNA em forma de alça (WARD, 2010; BELETTI, 2013) (Figura 4).

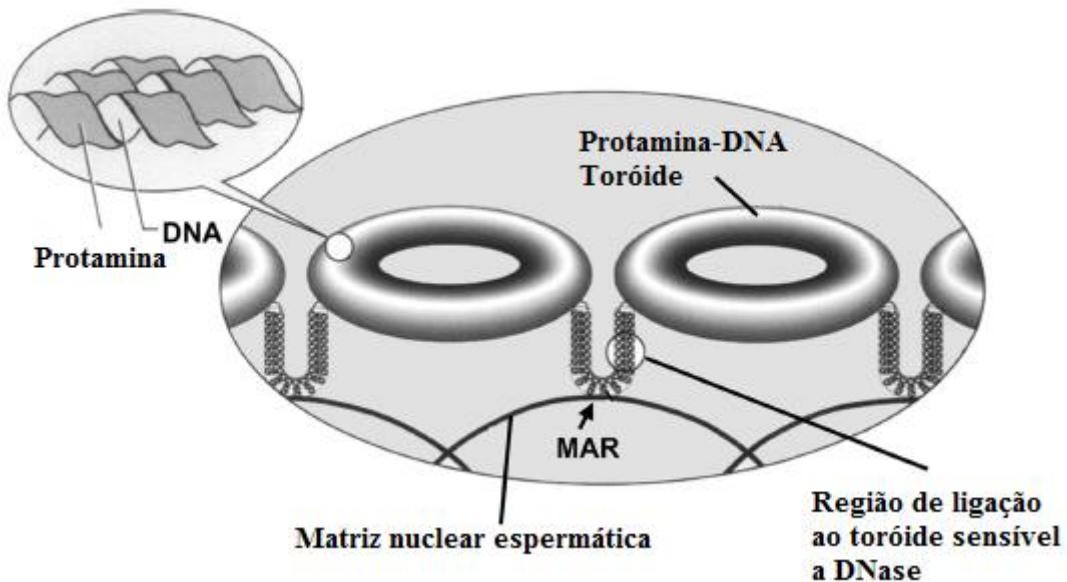


Figura 3 - Modelo “donut- alça” de ligação a matriz nuclear (modificado de SHAMAN, 2007).

Estudos recentes têm sugerido que essas alças de DNA, que estão intercaladas entre os toróides, possuem sequências de nucleossomos, geralmente contendo DNA hipometilado. Estas histonas distribuídas de forma regular e estratégica são associadas a regiões promotoras de genes, e acredita-se que desenvolvam um importante papel no desenvolvimento embrionário inicial e na herança epigenética paterna. Dependendo da espécie e da técnica utilizada na quantificação, essa porcentagem varia entre 2 a 15% nos espermatozoides dos mamíferos (SOTOLONGO, et al., 2003; WARD, 2010; BELETTI, 2013).

Alguns erros podem ocorrer durante esse processo de compactação da cromatina, como alteração na recombinação do DNA, mecanismos apoptóticos, ação anormal das topoisomerases, reparo anormal do DNA na espermatogênese e protaminação incompleta, sendo que essa última deixa os espermatozoides mais susceptíveis a ataques de agentes endógenos e exógenos, radicais livres ou mutagênicos. Esses erros no conjunto DNA-proteínas vêm sendo apontados como causas de subfertilidades em algumas espécies de mamíferos como humanos, camundongos e touros (GLEDHILL, et al., 1966; BELETTI et al., 2005; OLIVA, 2006; SIMON et al., 2011).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que essas anormalidades na cromatina não impedem que as células espermáticas fecundem ovócitos, porém o defeito no DNA pode persistir durante todo período embrionário, induzindo a apoptose, fragmentação embrionária e aborto espontâneo no primeiro trimestre de gestação (SILVA, et. al., 2008 apud ELLINGTON et al., 1998 e TWIGG et al., 1998).

2.4 - Avaliação da cromatina espermática

Por meio de um espermograma de rotina não é possível detectarmos com precisão erros de condensação de cromatina. Por isso faz-se necessário a utilização de outras técnicas para avaliar a integridade da cromatina e fragmentação do DNA espermático. Em 1966, Gledhill utilizou a reação de Feulgen, e observou no microscópio de luz variações de intensidade da reação, que foram identificadas como alterações na compactação da cromatina. Posteriormente outros testes foram utilizados, tais como esfregaços corados com AT, alaranjado de acridina e azul de anilina, o ensaio Cometa, técnica de Tunel e ensaio de estrutura de cromatina espermática (em inglês SCSA) (MELO, 1982; TEJADA, et al., 1984; HAMMADEH et al., 2001; GORCYZA, et al., 1993; MCKELVEY-MARTIN et al., 1997; EVENSON et al., 2002).

O método de “metacromasia induzida”, que utiliza o AT, um corante catiônico, é um método simples e eficaz e foi criado por Mello (1982). As células espermáticas que se encontram com a cromatina bem compacta, se coram de verde ao azul claro. Já as células com defeito o corante se liga aos grupos fosfatos ionizados do DNA, levando a ressonância de elétrons entre as moléculas de AT, resultando em uma coloração de azul escuro a magenta. Para otimização desse processo, é necessário que as amostras sofram uma hidrólise ácida antes da coloração com AT.

As lâminas com os esfregaços são geralmente analisadas de forma visual por microscópio de luz e isso pode dar margens a erros devido à subjetividade dos avaliadores. Para minimizar esse erro, Beletti et. al., (2005a), desenvolveram um software para análise de esfregaços corados com AT, capaz de avaliar a descompactação da cromatina dos espermatozoides, bem como a heterogeneidade na compactação da cromatina dos espermatozoides. Dessa forma, a análise computacional vem se tornando uma importante ferramenta para o estudo de alterações de cromatina.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Amostras de sêmen

As amostras do sêmen de touros com padrões normais foram adquiridas em Centrais de processamento de sêmen. As amostras subférteis de toruro foram fornecidos pelo laboratório de Biologia da Reprodução do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todas as amostras eram de sêmen congelado e mantidas em nitrogênio líquido. Foram utilizadas oito amostras de touros férteis e oito amostras de touros subférteis. Foram considerados touros férteis aqueles que já vinham sendo comercializados pelas Centrais por pelo menos cinco anos, sem qualquer relato de problemas por parte dos criadores que adquiriram sêmen destes animais e com pelo menos 65% de não retorno após a primeira inseminação artificial em propriedades com escrituração confiável. As amostras de sêmen de touros subférteis foram obtidas em experimentos anteriores do Laboratório de Biologia da Reprodução do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU. Estas amostras são de animais que sofreram insulação escrotal por dois a três dias e que tiveram seu sêmen coletado, congelado e posteriormente utilizadas em produção *in vitro* de embriões, obtendo-se baixas taxas de clivagem e de blastocistos morfologicamente normais (MARTINS, 2013).

3.2 - Coloração com azul de toluidina e captura de imagens

Após o descongelamento dos pallets de sêmen em banho-maria a 37° C por um minuto, 50 microlitros de cada amostra, foi retirado para confecção de esfregaços. Com os esfregaços já secos, realizou-se uma hidrólise ácida (ácido clorídrico a 4N) por 15 minutos, lavagem em água destilada corrente e secagem em temperatura ambiente (BELETTI e MELLO, 2004). As lâminas foram coradas com AT, acrescentando-se uma gota do corante a 0,025% (peso/volume), pH 4,0 em tampão ácido cítrico-fosfato de sódio (tampão McIlvaine), e logo após cobriu-se a lâmina com uma lamínula. Após 3 minutos as lâminas foram levadas ao microscópio de luz modelo Leica DM500, com objetiva de 100x (imersão), acoplado a uma câmera Leica ICC50 para captura de imagens, através do software Leica LAS EZ versão 1.8.1, instalado em um microcomputador (PC).

3.2 - Imunocitoquímica e microscopia de fluorescência

O restante de cada amostra foi colocado em um microtubo de 2,0 ml e lavado três vezes seguidas com tampão fosfato de sódio (PBS) por centrifugação a 100g, por 10 minutos cada lavagem, à temperatura ambiente.

O pellet formado foi ressuspensionado com 1,5 ml de solução de 10mM de ditiotreitol (DTT) mais 0,5% de Triton X-100 e 100UI de heparina sódica (Hepamax) em tampão Tris 25 mM. Cada amostra foi mantida em solução de DTT por uma hora. Novamente efetuou-se a lavagem em PBS, conforme descrito anteriormente (LI, et al., 2008).

Posteriormente fez-se a fixação em paraformoldeído a 4% por uma hora, e novamente a lavagem por mais três vezes em tampão PBS.

As amostras foram aplicadas em lâminas para imunofluorescência e deixou-se secar à temperatura ambiente.

Anticorpo primário que se liga a PR1 (Hup 1 N - Briar Patch Biosciences LLC) foi adicionado na diluição 1:100 em tampão de bloqueio PGNSAPO (PBS, 0,15% gelatina, 0,1% azida e 0,1% saponina) em todas as amostras e ficou na geladeira (1-4°C) overnight.

Posteriormente, lavaram-se as lâminas em PBS, e aplicou-se o anticorpo secundário (Alexa Fluor® 488 rabbit Anti-Mouse IgG (H+L), A-1159, Life Technologies) na diluição de 1:100, juntamente com 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) na diluição de 1:500 pelo tempo de uma hora.

Após lavagem foi adicionado glicerina com 1,4 phenylenediamine (PPD) na lâmina e posteriormente ela foi coberta com uma lamínula e vedada com esmalte.

A captura das imagens de fluorescência foi feita em um microscópio confocal Zeiss, modelo LSM 710, com os softwares ZEN BLACK 2010 e AXIO VISION SE64, no laboratório de microscopia confocal da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

3.3 - Análise computacional das imagens

As imagens obtidas por microscopia foram processadas e avaliadas por um software desenvolvido em linguagem MATLAB e executado no programa Octave (gratuito).

O software executa a segmentação das cabeças dos espermatozoides e delimita a região onde está localizada a alteração da cromatina, quando existente. Tal região é identificada pela coloração mais intensa nas lâminas avaliadas em microscopia de luz transmitida e por maior intensidade de fluorescência nas lâminas avaliadas em microscopia confocal. Esse processo foi realizado nas células espermáticas coradas com AT, na marcação do DNA com DAPI e na marcação de PR1 com o anticorpo.

A classificação das alterações cromatínicas (figura 5) foi baseada no trabalho realizado por Beletti et. al., (2005a), porém com algumas adaptações.

- **N:** normal, sem alteração;
- **AB:** alteração na base (atinge no máximo o terço basal da cabeça);
- **AMB:** alteração na metade basal (além do terço basal, atinge também até dois terços da cabeça);
- **AEC:** alteração no eixo central (ocorre em todo o eixo central sem atingir as laterais da cabeça);
- **AD:** alteração dispersa (atinge pontos dispersos e não contínuos da cabeça);
- **CTA:** cabeça totalmente alterada (a cabeça como um todo está alterada).

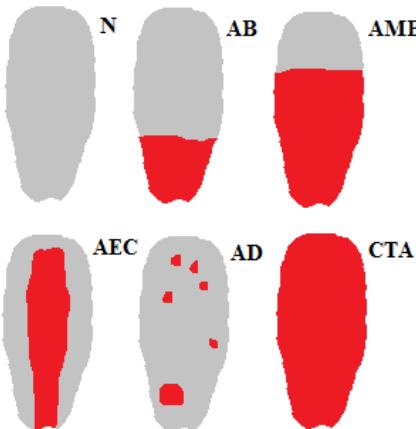


Figura 4 - Desenho esquemático das alterações cromatínicas em espermatozoides.

A mesma imagem utilizada para avaliar a marcação com DAPI, também foi utilizada para avaliar a marcação de protamina.

As imagens coradas com AT e já segmentadas também foram avaliadas por algoritmo desenvolvido em ambiente de programação Scilab. Este algoritmo selecionou automaticamente as seis cabeças mais compactadas e homogêneas de cada amostra, sendo estas tidas como cabeças referência ou padrão. A média dos valores de *pixel* destas cabeças foi considerada como o valor de referência da coloração normal dos espermatozoides (cabeças-padrão). Depois, para cada imagem, a diferença entre o valor médio das cabeças-padrão e o valor médio de cada cabeça analisada foi determinada. Esta diferença foi transformada em porcentagem (**DESC%**) do valor médio das cabeças padronizadas. O coeficiente de variação dos níveis de cinza (**HET**) de cada cabeça foi calculado, o qual representa quantitativamente a heterogeneidade da compactação de cada cabeça (SILVA et al., 2008).

3.4 - Análise Estatística

Para a comparação entre os métodos, foi utilizado o teste de “t” pareado, pois as mesmas amostras foram avaliadas pelas três marcações (AT, DAPI e PR1) concomitantemente. Foram considerados estatisticamente significantes, os casos onde o valor de “p” foi $\leq 0,05$. Não foi realizado teste estatístico comparando DESC% e HET com os demais métodos.

Para verificar a existência de diferença estatística entre amostras de animais férteis e subférteis, considerando que neste caso os dados não possuían distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov), optou-se pelo teste não paramétrico de Wilcoxon.

4 - RESULTADOS

Exemplos de alterações cromatínicas dos espermatozoides de touros por meio da análise computacional dos esfregaços corados com AT e marcados com DAPI e anticorpo anti-PR1 estão demonstrados nas figuras 4 e 5.

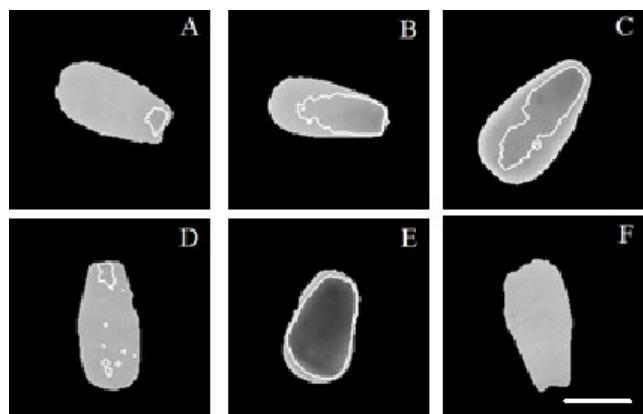


Figura 5 - Fotomiografias representativas de cabeças de espermatozoides identificadas pela análise computacional de esfregaços de sêmen de touros férteis e subférteis corados com AT. Alteração na base (A); alteração na metade basal (B); alteração no eixo central (C); alteração dispersa (D); cabeça totalmente alterada (E); normal (F); Barra (-) equivalente a 5 micrometros.

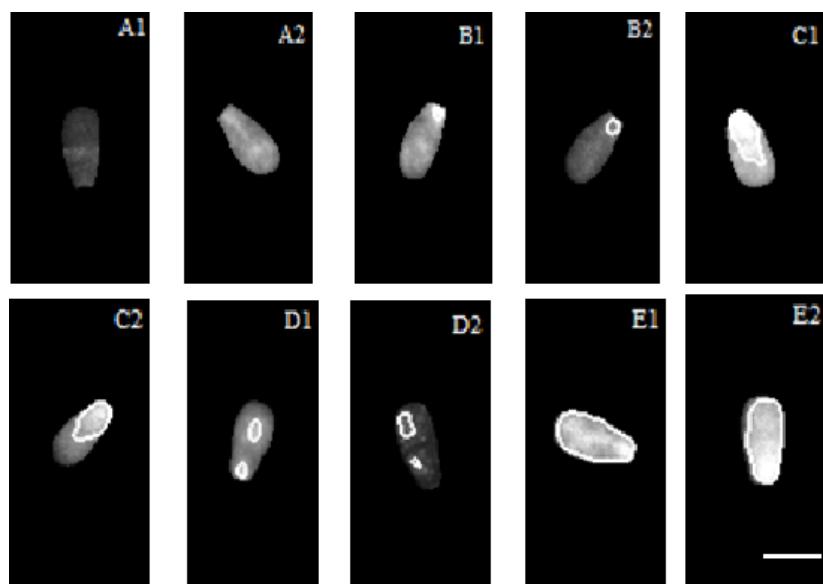


Figura 6 - Fotomiografias representativas de cabeças de espermatozoides identificadas pela análise computacional de esfregaços de sêmen de touros férteis e subférteis com marcação de DNA e protamina. Normal (A); alteração na base (B); alteração na metade basal (C); alteração dispersa (D); cabeça totalmente alteradas (E); DNA(1); PR1(2); Barra (-) equivalente a 5 micrometros.

A figura 8 apresenta as mesmas células, porém com marcações distintas de DAPI e anticorpo contra PR1.

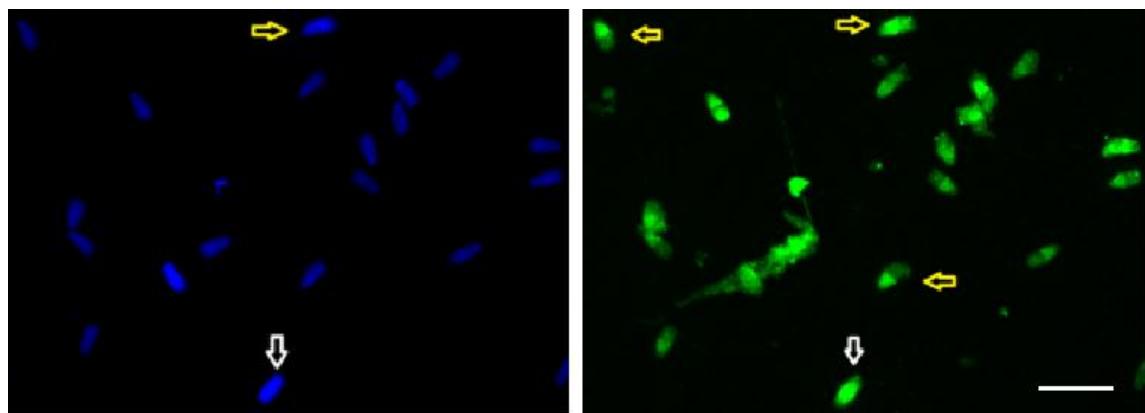


Figura 7 - Marcação nuclear fluorescente em espermatozoides de touro. Marcação DNA - azul (A); PR1 - verde (B). Setas apontam células com marcação mais intensa total (setas brancas) ou parcial (setas amarelas) ; Barra (-) equivalente a 20 micrometros.

As medianas da porcentagem dos espermatozoides portadores de cada uma das alterações identificadas por AT, DAPI e anticorpo anti-PR1, estão descritas respectivamente nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 3 - Mediana da porcentagem de espermatozoides portadores de cada uma das classificações das alterações cromatínicas identificadas por AT em touros férteis e subférteis.

	Touros Férteis	Touros Subférteis	P
AB	31,12	15,51	0,51
AMB	1,35	5,03	0,05
AEC	0	0,46	0,08
AD	4,02	2,20	0,53
CTA	1,77	2,97	0,04
TA	40,17	33,89	0,88

p≤0,05 (em vermelho) indica diferença estatística entre touros férteis e subférteis.
 Legenda: AB – alteração na base; AMB – alteração na metade basal; AEC – alteração no eixo central; AD – alteração dispersas; CTA – cabeça totalmente alterada; TA – total de alterações.

Tabela 4 - Mediana da porcentagem de espermatozoides portadores de cada uma das classificações das alterações cromatínicas identificadas por marcação com DAPI em touros férteis e subférteis.

	Touros Férteis	Touros Subférteis	P
AB	6,54	55,49	0,02
AMB	3,24	9,14	0,07
AEC	0	0	-
AD	33,29	9,82	0,02
CTA	2,79	2,30	0,32
TA	49,16	76,34	0,08

p≤0,05 (em vermelho) indica diferença estatística entre touros férteis e subférteis.

Legenda: AB – alteração na base; AMB – alteração na metade basal; AEC – alteração no eixo central; AD – alteração dispersas; CTA – cabeça totalmente alterada; TA – total de alterações.

Tabela 5 - Mediana da porcentagem de espermatozoides portadores de cada uma das classificações das alterações cromatínicas identificadas por imunomarcação com anticorpo anti-PR1 em touros férteis e subférteis.

	Touros Férteis	Touros Subférteis	P
AB	1,67	15,74	0,01
AMB	10,70	14,09	0,27
AEC	0	0	-
AD	26,18	20,58	0,44
CTA	1,24	1,12	0,64
TA	42,32	59,44	0,13

p≤0,05 (em vermelho) indica diferença estatística entre touros férteis e subférteis.

Legenda: AB – alteração na base; AMB – alteração na metade basal; AEC – alteração no eixo central; AD – alteração dispersas; CTA – cabeça totalmente alterada; TA – total de alterações.

A tabela 4 apresenta as médias e desvios padrão da porcentagem de cada uma das alterações encontradas, comparando as três marcações independente das amostras serem de touros férteis ou subférteis.

Tabela 6 - Número de espermatozoides com cada tipo de alteração identificados por marcação com DAPI e contra PR1 e a porcentagem de espermatozoides caracterizados com o mesmo tipo de alteração nas duas marcações.

	AB	AMB	AEC	AD	CTA	TA
DAPI	665	142	0	482	52	1341
Anti-PR1	256	272	0	481	30	1039
Coincidentes DAPI:anti-PR1	130	30	0	124	4	288
Porcentagens de coincidência	16,43%	3,79%	0,00%	15,68%	0,51%	13,77%

Legenda: AB – alteração na base; AMB – alteração na metade basal; AEC – alteração no eixo central; AD – alterações dispersas; CTA – cabeça totalmente alterada; TA – total de alterações

A tabela 5 apresenta a mediana da descompactação percentual e heterogeneidade médias da cromatina dos espermatozoides das amostras de sêmen de touros férteis e subférteis.

Tabela 7 - Mediana da descompactação percentual e heterogeneidade médias da cromatina.

	Touros Férteis	Touros Subférteis	P
DESC%	3,47	4,59	0,01
HET	3,93	5,74	0,01

p≤0,05 (em vermelho) indica diferença estatística entre touros férteis e subférteis.

Legenda: DESC% - porcentagem de descompactação percentual da cromatina; HET – heterogeneidade da cromatina

A tabela 6 apresenta a coincidência da localização da alteração cromatínica, nas mesmas células, quando marcadas com DAPI e anticorpo contra PR1.

Tabela 8 - Médias e desvios padrão da porcentagem de espermatozoides portadores de cada uma das classificações das alterações cromatínicas, identificadas por três diferentes métodos, independente da fertilidade do touro.

	AT	DAPI	ANTI-PR1
AB	31,77±26,45 ^A	29,20±26,07 ^A	11,60±11,51 ^B
AMB	3,87±4,12 ^A	6,59±4,55 ^A	12,60±8,62 ^B
AEC	0,53±0,98 ^A	0,00±0,00 ^B	0,00±0,00 ^B
AD	3,79±5,17 ^A	23,33±16,79 ^B	22,24±10,12 ^B
CTA	2,81±1,68 ^A	2,64±1,81 ^A	1,50±1,00 ^B
TA	43,14±30,59 ^{A,B}	60,79±20,07 ^A	46,41±16,20 ^B

Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística entre as médias.

Legenda: AB – alteração na base; AMB – alteração na metade basal; AEC – alteração no eixo central; AD – alterações dispersas; CTA – cabeça totalmente alterada; TA – total de alterações.

5 - DISCUSSÃO

As alterações de cromatina em espermatozoides têm sido consideradas importante causa de subfertilidade em diversas espécies de animais domésticos e no humano (BELETTI, 2013). Estas alterações vêm sendo estudadas ao decorrer dos anos através de várias técnicas. Apesar do SCSA ser considerado o método padrão para avaliação de alterações cromatínicas de espermatozoides, esse método possui problemas de repetibilidade. O método SCSA se caracteriza pela desnaturação ácida seguida por neutralização do meio por solução contendo o corante alaranjado de acridina (AA). Assim, espermatozoides com cromatina mal compactada terão seu DNA desnaturado e fluorescerão em vermelho. Já os espermatozoides com cromatina normal, não terão seu DNA desnaturado, fluorescendo em verde. Para obtenção de resultados confiáveis é necessário rigoroso cumprimento dos tempos determinados em protocolo, pois o fenômeno da fluorescência do AA é alterado ao longo do tempo quando este é exposto a luz (fenômeno de “photobleaching”). Além disso, após a neutralização do meio, existe uma tendência natural da fita de DNA desnaturada (fita simples) retornar a forma dupla fita, fazendo com que espermatozoides antes com fluorescência vermelha passem a fluorescer em verde. Assim, é importantíssimo que a leitura em citometria de fluxo, seja rigorosamente feita sempre três minutos após a adição da solução neutralizante contendo o corante (TEJADA et al., 1984; BELETTI; MELLO, 1995; EVENSON et al., 2002; BELETTI, 2013).

Na tentativa de obter-se métodos objetivos e de melhor repetibilidade, vem sendo proposta como alternativa, a análise computacional de imagem obtidas em microscopia. Contudo, é importante que se utilize marcadores e métodos estáveis, que pouco ou nada sejam influenciados pelo tempo que se demora para realizar a avaliação (BELETTI et al., 2004a; BELETTI et al, 2005a).

Beletti et al. (2004a), utilizando análise computacional de imagens obtidas de esfregaços de sêmen corados com AT, observaram que as alterações de descompactação de cromatina de espermatozoides de touro possuíam diversos padrões de localização. Baseado nesta informação, o presente trabalho propõe uma classificação destas alterações conforme sua localização (figura 5). Desta forma passou a ser possível determinar-se a porcentagem de espermatozoides com cada tipo de alteração nas amostras de sêmen, diferente de trabalhos até agora realizados com análise computacional de imagens de esfregaços de sêmen corados com

AT (BELETTI et al., 2004a; BELETTI et al, 2005a). Nestes trabalhos são obtidos valores referentes à compactação e heterogeneidade de cada espermatozoide analisado. Porém, ainda não se definiu a partir de que valor pode-se considerar o espermatozoide como portador de anomalia cromatínica. Assim, geralmente utiliza-se a média de todos os espermatozoides avaliados, obtendo-se um valor único para a amostra.

Quando os espermatozoides marcados com DAPI e com anticorpo anti-PR1 foram observados, percebeu-se que existiam espermatozoides marcados totalmente ou parcialmente de forma mais intensa quando se comparava com a maioria dos espermatozoides da amostra. (figura 7). Assim, decidiu-se aproveitar o algoritmo utilizado para identificar as regiões descompactadas nos espermatozoides corados com AT, para marcar as regiões com maior intensidade de fluorescência, quando utilizada marcação com DAPI e anticorpo anti-PR1 (figura 6).

No presente trabalho além de ser proposta a identificação do número de espermatozoides alterados em cada amostra e uma classificação dessas alterações conforme a localização da área alterada, também se comparou os resultados obtidos em amostras de touros férteis e subférteis (BELETTI et al., 2004a; BELETTI et al, 2005a).

Na avaliação das amostras realizadas quanto à porcentagem de espermatozoides alterados identificados com AT (tabela 1), somente houve diferença estatística entre os touros férteis e subférteis quanto às alterações na metade basal da cabeça (AMB) e em toda a cabeça (CTA). Como era esperado (BELETTI et al, 2005a), o número de espermatozoides com CTAs em touros subférteis foi maior do que em touros férteis. Essa alteração atinge toda a cromatina espermática e por isso ela é a que mais intensamente contribui para a subfertilidade das amostras. (BELETTI; MELLO, 1995; BELETTI et al., 2004a; ERENPREISS et al., 2006). Também em relação as alterações AMB, foi identificada maior quantidade nas amostras de touros subférteis, no entanto, a porcentagem destas alterações foi muito baixa (5,03%). O resultado da soma das alterações AMB às alterações CTAs, deixa mais consistente o quadro de subfertilidade dessas amostras. Inesperadamente, não houve diferença estatística entre os grupos, quando considerado o total de espermatozoides alterados, independente do tipo de alteração.

Com a intenção de se verificar se existe alguma relação entre a distribuição de PR1 no núcleo espermático e as áreas de descompactação cromatínica, realizou-se a marcação imunocitoquímica da PR1, sendo utilizado como sonda Alexa Fluor 488. Como marcador do DNA utilizou-se o DAPI. Apesar do uso do DAPI não ser comum para identificar alterações cromatínicas, segundo Nagamori et al. (2006), o DAPI também poderia ser utilizado para identificar regiões menos compactadas. Surpreendentemente, no presente trabalho obtiveram-se imagens em microscopia confocal onde facilmente se identificou cabeças com intensidade de fluorescência maior que a maioria das cabeças da amostra e cabeças com regiões mais intensamente fluorescentes. Utilizando-se o algoritmo para marcação das regiões mais intensamente fluorescentes, foi verificada diferença estatística entre touros subférteis e férteis quanto às alterações AB e AD, sendo AB em maior quantidade nos touros subférteis e AD em maior quantidade nos touros férteis (tabela 2). A grande diferença entre as porcentagens de espermatozoides portadores de AB nos dois grupos avaliados poderia justificar a subfertilidade das amostras analisadas. Já o grande número de alterações AD, aparentemente são artefatos de técnica ou não interferem na fertilidade. Quanto ao total de alterações, a diferença entre os grupos não chegou a ser estatisticamente significante ($p=0,08$). No entanto, se as alterações AD fossem desconsideradas, provavelmente o total restante seria diferente estatisticamente. Portanto, a marcação com DAPI, provavelmente seria mais adequada para a identificação dos diferentes tipos de localização de alterações cromatínicas, do que o AT, descartando-se as denominadas alterações dispersas (AD).

A maior intensidade de marcação com DAPI, provavelmente não seja por maior quantidade de DNA, mas por uma maior acessibilidade da molécula do fluoróforo aos sítios de ligação no DNA. Assim, regiões menos compactadas reteriam maior quantidade de corante, ou seja, de forma semelhante ao AT (BELETTI; MELLO, 1995).

O núcleo do espermatozoide de touro é fortemente compactado devido ao processo de protaminação (OLIVA, 2006). A marcação com anticorpo anti-PR1 só foi possível após um leve afrouxamento da cromatina utilizando DTT mais heparina. Com isso foi possível observar que geralmente há uma distribuição homogênea da PR1 por todo núcleo da célula espermática (figura 8). Esse resultado está de acordo com os encontrados por Zalensky et al.(1993) e por Li et al. (2008) em espermatozoides humanos e por Pittoggi et al. (1999), em núcleos espermáticos de camundongos.

As imagens com marcação contra PR1 também foram analisadas com o algoritmo que marca as regiões mais fluorescentes (tabela 3). Somente as porcentagens de espermatozoides

portadores de AB foram diferentes nos dois grupos, sendo maior no grupo subfértil. Como esta marcação destaca onde existiria PR1, as regiões de maior marcação deveriam ser as mais compactadas. No entanto, a maior intensidade de fluorescência também poderia ser devido a uma maior acessibilidade dos anticorpos aos抗ígenos da PR1. Na tentativa de esclarecer o que de fato levou a diferentes intensidades de marcação, avaliou-se o índice de coincidência entre as marcações com DAPI e anticorpo anti-PR1 (tabela 4). Com a baixa coincidência entre estas marcações em todos os tipos de alterações, fica claro que as regiões com fluorescência do DAPI mais intensa ocorrem em áreas diferentes das marcadas contra PR1. Ou seja, a marcação mais intensa contra PR1 não é devido à maior acessibilidade dos anticorpos, mas, provavelmente é devido à maior quantidade de PR1, o que geralmente leva a uma maior compactação. A figura 6 mostra claramente que as regiões marcadas mais intensamente com DAPI são diferentes das com marcação mais intensa contra PR1.

O método que utiliza AT e calcula a descompactação e a heterogeneidade da cromatina foi o que teve maior diferença entre o grupo de animais férteis e subférteis (tabela 5). Apesar deste método gerar resultados quantitativos de descompactação e heterogeneidade de cromatina para cada espermatozoide analisado, ainda não foi definido os valores para ambas variáveis que indicaria que o espermatozoide possui anomalia de cromatina. Por isso, os trabalhos realizados com este método (BELETTI et al., 2004a; BELETTI et al, 2005^a; RODRIGUES et al., 2009; KANAYAMA; BELETTI, 2011.) não utilizam a porcentagem de espermatozoides anômalos, mas a média dos valores dos espermatozoides de toda a amostra, independente se os espermatozoides são ou não anômalos. Mesmo com essa limitação, esse método foi o que melhor caracterizou as amostras subférteis.

Para avaliar se as marcações pelos métodos utilizados geram resultados diferentes, foi aplicado o teste “t” pareado (tabela 6). Observando esta tabela, percebe-se que não existe diferença entre os resultados de AT e DAPI para as alterações AB, AMB e CTA. Já as alterações AD são diferentes entre AT e DAPI e não são diferentes entre DAPI e anti-PR1. Esses resultados corroboram com a teoria de funcionamento semelhante da marcação com AT e DAPI. Já a não existência de diferença entre DAPI e anti-PR1 para as alterações ADs corroboram com a teoria de que este tipo de alteração são possíveis artefatos de técnica frequentes em marcadores fluorescentes.

Como o método que utiliza AT e calcula quantitativamente a descompactação e a heterogeneidade da cromatina de cada cabeça não define se o espermatozoide possui ou não

alteração de cromatina, não é possível calcular a porcentagem de espermatozoides alterados em cada amostra (BELETTI et al., 2004a; BELETTI et al, 2005^a; RODRIGUES et al., 2009; KANAYAMA; BELETTI, 2011). Assim, não se pode comparar os resultados deste método com os demais.

6 – CONCLUSÃO

Com esse trabalho concluímos que a PR1 geralmente se distribui por toda a cabeça do espermatozoide de touro, e que as alterações cromatínicas de espermatozoide de touro não possuem relação com a quantidade de PR1.

Dentre os métodos testados, o método de análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corados com AT quantificando a descompactação e a heterogeneidade da cromatina espermática de touro é o que melhor diferencia touros subférteis e férteis.

O método alternativo de análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corados com AT e que identificam a localização das alterações cromatínicas possibilitou classificar estas alterações, no entanto, pouco diferenciou touros subférteis e férteis.

A marcação com DAPI e avaliação em microscopia confocal pode ser um método alternativo para identificação de alterações na cromatina de espermatozoide de touro.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AMANN, R.P. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 12, p. 2606-2622, 1983.
- AOKI, V.W.; CARRELL, D.T. Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. **Asian J Androl**, Salt Lake City, v. 5, p. 315-328, 2003.
- BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **The Journal of Cell Biology**, Califórnia, v. 93, p. 298-305, Maio 1982.
- BALHORN, R. Mammalian protamines: Structure and Molecular Interactions. in ADOLPH, K. E. **Molecular Biology of Chromosome Function**. New York: Springer-Verlag, p. 366-395, 1989.
- BALHORN, R.; CORZETT, M.; MAZRIMAS, J.; WATKINS, B. Identification of bull protamine disulfides. **Biochemistry**, v. 30, p. 175-181, 1991.
- BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome Biology**, v. 8, p. 227.1-227.8, 2007.
- BARROSO, G.; VALDESPIN, C.; VEGA, E.; KERSHENOVICH, R.; AVILA, R.; AVENDAÑO, C.; OEHNINGER, S. Developmental sperm contribuition: fertilization and beyond. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 3, p. 835-848, 2009.
- BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Influência da temperatura testicular sobre o complexo DNA-proteína em espermatozoides de coelho. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p. 1331, 1995.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. **Analytical and Quantitative Cytology and Hystology**, v. 25, n. 2, p. 97-107, 2003.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic and Histochemistry**, Baltimore, v. 79, n. 1, p. 17-23, 2004a.
- BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Comparison between the toluidina blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v. 62, p. 398-402, 2004.
- 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, 2005a.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile Bostaurus and Bosindicus bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n.1-2, p. 105-116, 2005.

- BELETTI, M.E., Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Rev. Bras. Rep. Animal**, v. 37, p. 92-96, 2013.
- BYSKOV, A.G.; ANDERSON, C.Y.; NORDHOLM, L.; THOGERSEN, H.; XIA, G.; WASSMANN, O.; ANDERSEN, J.V.; GUDDAL, E.; ROED, T. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. **Nature**, v. 374, p. 559-562, 1995.
- BRAUN, R.E. Packaging paternal chromosomes with protamine. **Nature Genetics**, v. 28, p. 10-12, 2001.
- COELING, J.P.; ROZIJN, T.H.; MONFOORT, C. H. Isolation and parcial characterization of a basic protein from bovine sperm heads. **Biochem. Biophys. Acta**, Utrecht, v. 88, p. 353-356, 1969.
- ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 1, p. 11-29, 2006.
- EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 25-43, 2002.
- FERRARI, M.R.; SPIRITO, S.E.; GIULIANO, S.M.; FERNÁNDEZ, H.A. Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa. **Andrologia**, v. 30, p. 85-89, 1998.
- GARDNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. Barueri: Manole, 2004. cap. 7, p. 97-110.
- GARRET, C; BAKER, H.W. A new fully automated system for morphometric analysis of human sperm heads. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 63, n.6, p. 1306-1317, 1995.
- GATEWOOD, J.M.; COOK G.R.; BALHORN, R.; SCHIMD, C.W.; BRADBURY, E.M. Isolation of core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n.33, p. 20662-20666, 1990.
- GLEDHILL, B.L. Studies on the DNA content, dry mass and optical even of morphologically normal and abnormal bull spermatozoa heads. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 7, p. 1-20, 1966.
- 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.
- GORCYZA, W.; GONG, J.; DRAZYNKIEWICZ, Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyltransferase and nick translation assay. **Cancer Research**, v. 53, p. 1945-1951, 1993.

- HAMMADEH, M.E.; ZEGINIADOV, T.; ROSENBAUM, P.; GEORG, T.; SCHIMDT, W.; STREHLER, E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. **Archives of Andrology**, v. 46, p. 99-104, 2001.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Masculino. In: **Histologia Básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap. 21.
- KANAYAMA, C.Y.; BELETTI, M.E. Avaliação computacional da compactação da cromatina e de características morfométricas da cabeça de espermatozóides de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 94-99, 2011
- KRETSER, D.M.; LOVELAND, K.L.; MEINHARDT, A.; SIMORANKIR, D.; WREFORD, N. Spermatogenesis. **Human Reproduction**, Victoria, v. 13, s. 1, p. 1-8, 1998.
- LI, Y.; LALANCETTE, C.; MILLER, D.; KRAWETZ, S. A. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. **Asian Journal of Andrology**, v. 10, n. 4, p. 535-541, 2008.
- MARTINS, M.C. **Efeitos da insulação escrotal na produção de embriões bovinos**. 2013. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.
- MCKELVEY-MARTINS, V.J.; MELIA, N.; WALSH, I.K.; JOHNSTON, S.R.; HUGUES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; THOMPSON, W. Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1) human bladder washings and transitional cell carcinoma of bladder: and (2) human sperm and male fertility. **Mutation Research**, v.375, p. 93-104, 1997.
- MEISTRICH, M.L.; MOHAPATRA, B.; SHIRLEY, C.R.; ZHAO, M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. **Chromosoma**, Houston, v. 111, p. 483-488, 2003.
- MELO, M.L.S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v.74, p. 387-392, 1982.
- NAGAMORI, I.; YOMOGIDA, K.; IKAWA, M.; OKABE, M.; YABUTA, N.; NOJIMA, H. The testes-especific bZip type transcription factor *Tisp40* plays a role in ER stress responses and chromatin packaging during spermiogenesis. **Genes to Cells**, v. 11, p. 1161-1171, 2006.
- OLIVA, R. Protamines and male infertility. **Hum. Reprod. Update**, Barcelona, v.12, p. 417-435, 2006.
- PITTOGGI, C.; RENZI, L.; ZACCAGNINI, G.; CIMINI, D.; Degrassi, F.; GIORDANO, R. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. **J Cell Sci**, v.112, p. 3537-48, 1999.
- REITH, A.D.; BERNSTEIN, A. Molecular biology of the W and steel loci. **Genome Anal**, v.3, p. 105-133, 1991.

ROCHA, H.L.O.G.; BELETTI, M.E.; MARCOLINI, T.T.; AMORIM, D.A.Z. Uso de laranja de acridinia e azul de toluidina na avaliação da fertilidade masculina. **Journal of Bioscience**, v.18, n. 1, p. 65-77, 2002.

RODRIGUES, A.C.N.; ROCHA, J.V; BELETTI, M.E. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozóide de galo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1302-1307, 2009.

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

SHAMAN, J.A.; YAMAUCHI, Y.; WARD, W.S. Function of the sperm nuclear matrix. **Journal of Reproductive Systems**, v.53, p. 135-140, 2007.

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis: an overview. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1^a ed., USA: Springer, 2011. Cap. 2, p. 19-44, 2011.

SILVA, R.T.; MENDES JUNIOR, J.O.B.; BELETTI, M.E. Compactação da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozoides na produção de *in vitro* utilizando touros zebuíños. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 30(4), p. 473-478, 2008.

SIMON, L.; CASTILLO, J.; OLIVA, R.; LEWIS, S. E. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 23, p. 724-734, 2011.

SOTOLONGO, B.; LINO, E.; WARD, W.S. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. **Biol. Reprod.**, v.69, p. 2029-2035, 2003

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

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

VRIES, M.D.; RAMOS, L.; HOUSEIN, Z.; BOER, P.D. Chromatin remodeling initiation during human spermiogenesis. **Biology Open**, v.01, p. 446-457, 2012.

ZALENSKY, A.O.; BRENEMAN, J.W.; ZALENSKAYA, I.A.; BRINKLEY, B.R.; BRADBURY, E.M. Organization of centromeres in the decondensednuclei of mature human sperm. **Chromosoma** v.102, p. 509-518, 1993.

ZHAO, M.; SHIRLEY, C.R.; YU, Y.E.; MOHAPATRA, B.; ZHANG, Y.; UNNI, E.; DENG, J.M.; ARANGO, N.A.; WEIL, M.M.; RUSSEL, L.D.; BEHRINGER, R.R.; MEISTRICH, M.L. Targeted disruption of transition protein 2 gene subtly affects spermatogenesis in mice. **Molecular Cell Biology**, v.21, p. 7243-7255, 2001.

WARD, W.E. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. **Mol Human Reproduction**, v.16(1), p. 30-36, 2010.