

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

MULLER CARRARA MARTINS

AVALIAÇÃO DA COMPACTAÇÃO DE CROMATINA DURANTE A MATURAÇÃO EPIDIDIMÁRIA DO
ESPERMATOZOIDE DE TOURO

UBERLÂNDIA

2018

MULLER CARRARA MARTINS

AVALIAÇÃO DA COMPACTAÇÃO DA CROMATINA DURANTE A MATURAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE NO EPIDIDIMO DE TOUROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Mestrado, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Biotecnologias da reprodução

Orientador: Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M386a Martins, Muller Carrara, 1987
2018 Avaliação da compactação da cromatina durante a maturação do
 espermatozoide no epidídimo de touros [recurso eletrônico] / Muller
 Carrara Martins. - 2018.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.860>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Espermatozoides. 3. Cromatina. 4. Morfologia
(Animais). I. Beletti, Marcelo Emílio, (Orient.) II. Universidade Federal
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
III. Título.

CDU: 619

MULLER CARRARA MARTINS

AVALIAÇÃO DA COMPACTAÇÃO DE CROMATINA DURANTE A MATURAÇÃO EPIDIDIMÁRIA DO
ESPERMATOZOIDE DE TOURO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Mestrado, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal

Uberlândia, 29 de novembro de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
(Orientador – UFU-MG)

Prof. Dr. José Octavio Jacomini
(Examinador – UFU-MG)

Prof. Dra. Maria Lúcia Gambarini
(Examinador – UFG-GO externo)

*Aos meus pais Iridon e Nalva, aos meus irmãos
Murilo e Matheus, aos meus avos Abadio, Dalva, Juvenil
e Madalena, e a todos familiares e amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente àquele que guia meus passos, me abençoa, e me deu a graça de viver, Deus.

Agradeço aos meus pais, Iridon e Nalva por todo o apoio, dedicação, amor e carinho nesta longa jornada até aqui.

Agradeço aos meus irmãos Murilo e Matheus por todo o carinho e respeito.

Agradeço ao idealizador desta pesquisa, meu orientador, Marcelo Beletti. Sem suas ideias, dedicação, ensinamentos e paciência nada disso seria possível.

Agradeço meu co-orientador e amigo Benner pelo companheirismo e auxílio durante a execução desse projeto.

Aos colegas do laboratório de Biologia da reprodução, Amanda, Luiz, Luísa, Lucas, Luana, Pollyane, Mariane, pela ajuda e dedicação.

Aos amigos da 67ª turma, e demais amigos da medicina veterinária.

Aos componentes da banca, Prof. Jacomini e Prof.^a Maria Lúcia, por se disporem de seu tempo, e por contribuírem com suas experiências.

Enfim a todos que participaram direta ou indiretamente de minha vida e que contribuíram de algum modo para meu crescimento.

Obrigado!

“A vontade de se preparar tem que ser maior que a vontade de vencer. Vencer será consequência da boa preparação!”

Bernadinho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1, Tipos de alterações de cromatina. Normal, sem áreas de descompactação; DB, descompactação na base; DMB, descompactação na metade basal; DEC, descompactação no eixo central; DT, descompactação total; DD, descompactação dispersa; DA, descompactação na região apical, _____ 23

Figura 2, Associação da (A) área, (B) Fourier-F0, (C) descompactação e (D) heterogeneidade da cromatina com diferentes regiões (túbulo seminífero; cabeça, corpo e cauda do epidídimo; ducto deferente) do aparelho reprodutivo bovino, Cada ponto no gráfico representa um espermatozoide analisado ($n = 7010$), Para a realização do teste de Spearman as regiões do aparelho reprodutivo foram classificadas em: 1 = túbulo seminífero; 2 = cabeça, 3 = corpo, e 4 = cauda do epidídimo; e 5 = ducto deferente _____ 27.

Figura 3, A) Descompactação e B) heterogeneidade da cromatina (média \pm e,p,m) de espermatozoide coletados de diferentes regiões (túbulo seminífero; cabeça, corpo e cauda do epidídimo; ducto deferente) do aparelho reprodutivo bovino, A, B, C, D Letras diferentes indicam significância ($P < 0,05$), _____ 28.

Figura 4, Projeções dos parâmetros morfométricos (vetores) extraídos pela análise de componentes principais de acordo com diferentes regiões do aparelho reprodutivo bovino, (A) Todas as regiões combinadas; (B) túbulo seminífero, (C) cabeça, (D) corpo e (E) cauda do epidídimo; e (F) ducto deferente, Os eixos horizontais e verticais representam os Fatores 1 e 2, respectivamente, A, área; P, perímetro; L, largura; C, comprimento; L/C, razão largura comprimento; E, elipsidade; FF, fator forma; F0, Fourier 0; F1, Fourier 1; F2, Fourier 2; SLL, simetria latero-lateral; SAP, simetria anterior-posterior; DC, descompactação da cromatina; HC, heterogeneidade da cromatina, _____ 30.

Figura 5, Mensuração dos níveis de (A) descompactação e (B) heterogeneidade (média \pm e,p,m) dentro dos diferentes tipos de alterações de cromatina em espermatozoides bovino, A,B,C,D,E Letras diferentes indicam significância ($P < 0,001$), _____ 32.

Figura 6, ordem de compactação da cromatina; (A) cromatina totalmente descompactada; (B), cromatina compactada nas bordas; (C), cromatina compactada nas bordas e região apical; (D), cromatina compactada na região central, bordas e apical; (E), cromatina descompactação apenas na base; (E), cromatina totalmente compactada _____ 37.

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Parâmetros morfométricos (média \pm e.p.m) da cabeça de espermatozoides coletados em diferentes regiões (túbulo seminífero, cabeça, corpo e cauda do epidídimo; ducto deferente) do aparelho reprodutivo bovino _____ 26.

Tabela 2: Correlação entre os fatores (cargas) extraídos pela análise de componentes principais e os parâmetros morfométricos espermáticos avaliados em diferentes regiões do aparelho reprodutivo bovino _____ 29.

Tabela 3: Distribuição do tipo de descompactação da cromatina em espermatozoides coletados de diferentes regiões (túbulo seminífero; cabeça, corpo e cauda do epidídimo; ducto deferente) do aparelho reprodutivo bovino _____ 33.

Tabela 4: Efeito do tipo de descompactação da cromatina sobre os parâmetros morfométricos (média \pm e.p,m) da cabeça do espermatozoide bovino _____ 34.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Morfologia e função das estruturas	13
2.1.1 Testículos	13
2.1.2 Epidídimo	14
2.1.3Espermatozoide	15
2.2Espermatogênese	15
2.3 Cromatina espermática	16
2.3.1Protaminação	17
2.3.2 Técnicas e validação de análise de cromatina	17
2.4 Azul de Toluidina	17
2.5 Identificação e classificação das alterações de cromatina	18
2.6 Análises computacionais	19
2.7 Relação da integridade da cromatina com fertilidade	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivos específicos	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Obtenção das amostras	21
4.2 Confeções das lâminas	21
4.3 Análise computacional das imagens	21
4.3.1 Segmentação das cabeças dos espermatozoides	22
4.3.2 Classificação quanto aos tipos de alteração da cromatina	22
4.3.3. Descompactação e heterogeneidade da cromatina	23
4.4. Análises estatística	24
5. RESULTADOS	25

6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40

RESUMO

Os exames andrológicos atuais avaliam a concentração, vigor, motilidade, turbilhamento e patologias morfológicas dos espermatozoides; porém, mesmo aprovados em exames andrológicos, alguns touros não respondem de maneira eficaz, seja na monta natural ou em processos de fertilização *in vitro*. Alterações na cromatina dos espermatozoides pode ser um fator que influencia o desempenho dos touros e que geralmente não é avaliada em exames andrológicos. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a compactação da cromatina durante a maturação do espermatozoide no epidídimo, correlacionando características morfométricas da cabeça dos espermatozoides, a compactação da cromatina e a maturação epididimária. Para isso foram coletados espermatozoides do túbulo seminífero, cabeça, corpo e cauda do epidídimo, além do ducto deferente de cinco touros. Esses espermatozoides foram avaliados por análise de imagem computacional de esfregaços corados com azul de toluidina. No geral, espermatozoides do túbulo seminífero apresentaram menor área, perímetro, largura, comprimento, elipsidade, e harmônicas Fourier (F0, F1 e F2) quando comparados aos do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) e ducto deferente. A análise da descompactação e heterogeneidade da cromatina demonstrou que ambos os parâmetros decresceram no decorrer do processo de maturação espermática. A proporção de espermatozoides normais (com ausência de áreas de descompactação de cromatina) foi menor nos túbulos seminíferos em relação às demais regiões. Além disso, porcentagem superior de espermatozoides com descompactação de cromatina na base (DB), metade basal (DMB) e no eixo central (DEC) da cabeça foi observado nos túbulos seminíferos quando comparado as outras regiões analisadas. Observou-se que o tipo de descompactação da cromatina influencia parâmetros morfométricos da cabeça de espermatozoide. Cabeças que possuem descompactação total apresentam menor área quando avaliada por análise de imagem bidimensional, por outro lado, os que apresentam descompactação dispersas têm uma área maior, pois as cabeças com maior descompactação tendem a ser esféricas, com maior volume, mas com menor área quando observado bidimensionalmente e as de maior compactação são muito achatadas, com menor volume, mas com maior área. Foi possível verificar que na maturação espermática, inicialmente os espermatozoides apresentam descompactação cromatínica total, em seguida as bordas laterais iniciam o processo de compactação, logo após, temos compactação da região apical, depois da central e finalmente da região basal da cabeça. Enfim, ficou demonstrado que a maturação epididimária é importante para a compactação da cromatina e consequentemente, para a morfologia final dos espermatozoides.

Palavras-chave: Azul de toluidina, Condensação da cromatina, morfometria, morfologia.

ABSTRACT

The current andrological exams evaluate the concentration, vigor, motility, swirling and morphological pathologies of spermatozoa. However, even when approved for andrological examinations, some bulls do not respond effectively, either in natural mating or *in vitro* fertilization processes. Alterations in the sperm chromatin can be a factor that influence the performance of bulls and is usually not evaluate in andrological exams. This study aims to evaluate the condensation of chromatin during sperm maturation in the epididymis, correlating morphometric characteristics of spermatozoa, chromatin condensation and epididymal maturation. For this, spermatozoa were collected from the seminiferous tubule, head, body and tail of the epididymis, as well as the ductus deferens of five bulls. These spermatozoa were evaluated by computational image analysis of toluidine blue stained smears. In general, spermatozoa of the seminiferous tubule presented smaller area, perimeter, width, length, ellipticity, and Fourier harmonics (F0, F1 and F2) when compared to the epididymis (head, body and tail) and ductus deferens. The analysis of decondensation and heterogeneity of chromatin showed that both parameters decreased during the process of sperm maturation. The proportion of normal spermatozoa (with absence of chromatin decondensation areas) was lower in the seminiferous tubules in relation to the other regions. In addition, superior percentage of spermatozoa with chromatin decondensation in the base (DB), basal half (DBH) and central axis (DCA) of the head was observed in the seminiferous tubules when compared to the other analyzed regions. The type of chromatin decondensation influences morphometric parameters of the spermatozoa head. Heads that possess total decondensation have smaller area when evaluated by two-dimensional image analysis, conversely, heads with disperse decondensation have a larger area. Heads with larger decondensation tend to be spherical, with greater volume, but with smaller area when observed two-dimensionally, and those with dsipersed decondensation are quite flattened, with smaller volume, but larger area. During sperm maturation, the spermatozoa initially present total chromatin decondensation. Then, the lateral borders begin the condensation process, followed by condensation of the apical region, central region, and the basal region of the head, respectively. Therefore, it has been demonstrated that epididymal maturation is important for the chromatin condensation, consequently, for the final morphology of the spermatozoa.

Key-words: Toluidine blue stain, chromatin condensation, morphometry, morphology.

1- INTRODUÇÃO

O diagnóstico reprodutivo nas fazendas brasileiras é geralmente desprezado. Quando são analisados os dados referentes à andrologia, observa-se que o descaso é ainda maior. Os exames andrológicos atuais avaliam a concentração, vigor, motilidade, turbilhonamento e patologias morfológicas (BELETTI et al, 2005). Porém, mesmo aprovados em exames andrológicos, alguns touros não respondem de maneira eficaz, seja na monta natural ou em processos de fertilização *in vitro*. (BELETTI, COSTA 2003)

A cromatina da cabeça dos espermatozoides pode ser um fator que influencia o desempenho dos touros. Sabemos que esse material genético precisa ser reorganizado no decorrer do processo de maturação do espermatozoide. Durante a espermiogênese e maturação epididimal em mamíferos, a estrutura da cromatina espermática sofre substituição de histonas nucleares por proteínas de transição e posteriormente protaminas, levando a uma cromatina altamente condensada, a qual é resistente às agressões oxidativas (FRASER, STRZEZEK, 2007) para que o espermatozoide possa realizar o transporte seguro do material genético.

Para de analisar a cromatina podemos utilizar diversos testes como o de coloração por azul de toluidina, (BELETTI, MELO 1996), Essa técnica, chamada de metacromasia induzida e que consiste no uso de esfregaços de sêmen que após hidrólise ácida são corados com Azul de Toluidina, possibilita também a análise concomitante das alterações da cromatina espermática e da morfologia da cabeça dos espermatozoides. Moléculas do corante de azul de toluidina ligam aos fosfatos do DNA, fazendo com que espermatozoides normais exibam coloração que varia de verde a azul claro e os que possuem alteração de cromatina se corem de azul intenso a magenta.

A coloração com azul de toluidina seguida pela análise de imagem computacional pode ser utilizada na identificação de regiões com diferentes níveis de compactação de cromatina na cabeça do espermatozoide (CRUZ et al., 2014), podendo ser empregado para entender como é o mecanismo de compactação da cromatina durante a maturação epididimária, auxiliando na identificação de possíveis características relacionadas à subfertilidade.

Objetiva-se com o presente trabalho melhor compreender como acontece o processo de organização da cromatina espermática, correlacionando a maturação epididimária com a compactação da cromatina e as características morfométricas da cabeça dos espermatozoides, contribuindo na identificação de possíveis causas da subfertilidade de touros.

2. REVISÃO

2.1 Morfologia e função das estruturas do aparelho reprodutor masculino

O aparelho reprodutor masculino é composto por pênis, glândulas anexas, testículo, ductos excretores (CHACUR et al,2006). O pênis é o responsável pela cópula, e deposição do material genético masculino na fêmea. As glândulas anexas são a próstata, bulbo uretral, vesícula seminal e ampolas, produzindo a maior parte do plasma seminal. Os ductos excretores são responsáveis basicamente pelo deslocamento do espermatozoide e sua capacitação (RABELO et al, 2012). A uretra é a parte final, compondo o sistema urinário e o reprodutor. O ducto deferente possui uma grande camada muscular, que auxilia no transporte dos espermatozoides. Nos testículos acontece a produção de espermatozoides e o epidídimo tem a função de armazenamento e maturação dos espermatozoides. (JIANG et al, 2017).

2.1.1 Testículos

O testículo é a gônada sexual masculina, estrutura que produz os espermatozoides, conhecidos como gametas masculinos. Na maioria dos animais a constituição se da em pares, ficando localizado na maioria dos mamíferos no escroto, fora da cavidade abdominal (HAFEZ, HAFEZ, 2004), fato necessário para que tenham uma diferença de temperatura em relação a corporal interna, sendo fundamental para que ocorra a espermatogênese, produção do espermatozoide. (RAHMAN, et al. 2017).

Os testículos apresentam uma função produtora de hormônios, principalmente através das células de Leydig e células de Sertoli. As células de Sertoli encontram-se no interior do túbulo seminífero mantendo íntima relação com as células germinativas durante seu desenvolvimento (AMANN, 1993). As funções das células de Sertoli são o auxílio no controle da maturação e da migração das células germinativas, síntese de proteínas e esteroides, passagem das secreções entre os compartimentos tubulares e intersticiais (DADOUNE, DEMOULIN, 1993) e formação da barreira hemato-testicular (AMANN, 1993). Essa célula também é responsável pela conversão da testosterona produzida pela célula de Leydig em estrogênios e dihidrotestosterona (STANBENFELD, EDQVIST, 1996).

As células de Leydig encontrada entre os túbulos seminíferos, induzida pelo LH, têm como principal função a conversão de colesterol em pregnenolona e posterior produção de testosterona, que auxilia no desenvolvimento e manutenção da espermatogênese e das

características masculinas (O'DONNELL et al, 2001).

O espermatozoide ao ser formado se aloja no lúmen dos túbulos seminíferos, vão para os túbulos retos e depois para a rede testicular e em seguida para o epidídimo, onde completam sua maturação (HAFEZ, HAFEZ, 2004). Resumidamente a principal função dos testículos é a produção do gameta masculino, o espermatozoide.

2.1.2 Epidídimo

O epidídimo é um ducto enovelado que coleta e armazena os espermatozoides produzidos pelo testículo e está presente nos mamíferos do sexo masculino. Localiza-se posteriormente ao testículo, no saco escrotal, e desemboca na base do ducto deferente (OLIVA et al, 2009). Morfologicamente, o epidídimo pode ser dividido nas regiões: cabeça, corpo e cauda. Essa classificação baseia-se no estudo da altura do epitélio, do diâmetro tubular e da variação na frequência dos diferentes tipos celulares (GLOVER, NICANDER 1971).

A passagem dos espermatozoides que são produzidos nos testículos, ao longo do ducto epididimário determina as alterações necessárias para a capacidade fertilizante e da motilidade progressiva, processo denominado maturação espermática (SERRE, ROBAIRE, 1998). A maturação acontece por meio de passagem pelo epidídimo, onde a cromatina será compactada pela formação de pontes de dissulfeto e pontes de zinco entre as protaminas, também completando a formação de membranas e outras funcionalidades celulares (OLIVA, CASTILLO, 2011).

O processo tem início na cabeça do epidídimo seguindo pelo corpo até a cauda. Nele o espermatozoide passa por alterações morfológicas e bioquímicas resultantes da interação com o microambiente epididimário, adquirindo motilidade progressiva bem como potencial para sobrevivência e para o sucesso na fecundação (OLIVA et al., 2009)

A primeira porção do epidídimo está relacionada com a absorção de líquidos oriundos dos túbulos seminíferos. A cabeça e o corpo estão mais ligados à aquisição de motilidade, e fatores que vão auxiliar na identificação e fertilização do ovócito. A cauda está ligada ao armazenamento e eliminação de espermatozoides patológicos (SERRE, ROBAIRE, 1998). Durante o trânsito epididimário ocorre diminuição das porcentagens de cabeças espermáticas anormais (SRINGAM et al., 2011), defeitos acrossomais e anormalidades da peça intermediária (AXNÉR et al., 1999), sugerindo a participação do epidídimo na remoção de espermatozoides anormais. Apesar de apresentar motilidade e morfologia madura após o processo de maturação, os espermatozoides devem passar pelo processo de capacitação no trato reprodutivo feminino

(AUSTIN, 1951; CHANG, 1951) para só então terem a capacidade de fecundar. Ou seja, após a maturação epididimária o espermatozoide adquire a capacidade de se locomover, conseguindo alcançar o aparelho reprodutor feminino, porém ele só está completamente pronto para fecundar após o processo de capacitação uterina.

2.1.3 Espermatozoide

Espermatozoide é o produto do processo denominado espermatogênese, que resulta em uma célula altamente diferenciada em sua estrutura e função. (EDDY et al, 1994). Os espermatozoides são células haplóides, alongadas, constituídas de cabeça, cauda, colo, ou corpo, que une as duas estruturas (FLESCHE, GADELLA, 2000), membranas plasmática, acrossomal interna e externa e nuclear (HAFEZ, HAFEZ, 2004). A cauda é constituída por um axonema central, estrutura especializada do citoesqueleto, responsável pela motilidade espermática (MORTIMER, 2000). A cabeça do espermatozoide possui um formato arredondado e achatado, composta pelo núcleo, acrossoma e pequenas quantidades de estruturas do citoesqueleto e citoplasma (EDDY, O'BRIEN, 1994; FLESCHE, GADELLA, 2000). O espermatozoide de mamíferos é 10 vezes menor quando comparado à célula somática (MILLER et al., 2010) e por isso a organização do seu material genético é única, tornando sua cromatina altamente condensada e compactada (SHARMA, AGARWAL, 2011)

2.2 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo complexo pelo qual células germinativas dão origem a populações de espermatozoides (ROOSEN-RUNGE, 1977). As células germinativas são chamadas de espermatogônias, espermatócitos primário, secundário e espermátides (BANKS, 1992). Estima-se que entre 1500 e 2000 genes comandam a espermatogênese (RAZAVI et al., 2017).

Podemos dividir a espermatogênese em três fases: fase proliferativa (fase de proliferação ou mitótica), fase espermatocitogênica ou meiótica e a última, a de diferenciação ou espermiogênica (BANKS, 1992). Esse processo acontece em sua grande maioria nos túbulos seminíferos, onde as espermatogônias tipo A, através de um processo de mitose dá origem às espermatogônias tipo B, que logo em seguida iniciam um processo de meiose, formando os espermatócitos primários, que ao final da primeira divisão meiótica geram os espermatócitos secundários.

Após a segunda divisão meiótica surgem as espermatídes, que vão sofrer algumas transformações, dentre elas a cromatínica, dando origem ao espermatozoide. (RAHMAN et al., 2017). Nessa fase conhecida como espermiogênese, origina-se um espermatozoide haplóide com um núcleo condensado, um acrossoma e um flagelo (SENGER, 1999). O processo de diferenciação pode ser dividido em três fases; compactação da cromatina nuclear, formação de enzimas do acrossoma e desenvolvimento do flagelo com a implantação no núcleo.

Importante ressaltar que nessa etapa acontece a substituição das histonas pelas protaminas (HOLTEIN et al, 2003). Para que isso aconteça temos a desorganização dos nucleossomos, onde histonas são removidas e substituídas por protaminas, formando as estruturas toroidais ou toroides (OLIVA, CASTILLO, 2011).

Ainda no epitélio germinativo, existem as células de Sertoli. Essas células são conectadas por firmes junções de membrana, formando uma barreira hemato-testicular. Essa barreira separa o epitélio germinativo em um compartimento basal e um apical. Durante a espermatogênese, as células germinativas devem transpor essa barreira para finalizar a formação do espermatozoide no compartimento apical. Assim, no compartimento apical, os espermatozoides em formação não entram em contato com outras substâncias oriundas da difusão do sangue, evitando a auto eliminação dessas células pelo organismo (HOLSTEIN et al, 2003).

2.3 Cromatina

Cromatina é o complexo de DNA, RNA e proteínas que se encontra dentro do núcleo nas células eucarióticas. Nas células somáticas, as histonas são as principais proteínas encontradas na sua composição. A unidade básica da cromatina das células somáticas é o nucleossomo, formado por um octâmero de histonas (duas histonas H2A, duas H2B, duas H3 e duas H4) ao redor do qual estão duas voltas de DNA dupla-hélice (± 147 pares de bases) (RAVAZI, 2017). Assim as principais mudanças que acontecem no núcleo durante a espermatogênese são por conta da reorganização da cromatina (ZHAO 2001), principalmente pela substituição das histonas por protaminas, as proteínas que interagem com o DNA formando estruturas mais condensadas chamadas de toroides (BALHORN et al., 2000).

A unidade básica da cromatina de espermatozoides é o toroide de protamina (HUD et al.; 1993) Essa estrutura é formada por cerca de 50.000 pares de base de DNA firmemente enrolados pelas protaminas, formando uma estrutura em forma de “donut” (rosca) ou toroide. Essa constituição provavelmente é importante para a proteção e manutenção da estabilidade do DNA (BALHORN, 1982).

2.3.1 Protaminação

Durante o processo de espermiogênese, o principal evento é a substituição das histonas por protamina, isso é importante, pois um espermatozoide normal deve ter a cromatina altamente compacta e estável (BALHORN, 2011). As protaminas desempenham várias funções, entre elas condensar o material genético, tornando mais compactado e alterando a forma da cabeça, tornando o espermatozoide mais hidrodinâmico. Atua também na proteção do material genético contra a ação de agentes oxidantes e mecânicos, permite a reprogramação do material genético pelo ovócito, está envolvida no “imprinting” paterno durante a espermatogênese e ainda atua como verificador durante a espermatogênese (BELETTI, 2013).

2.3.2 Técnicas e validação de análise de cromatina

O método mais utilizado para identificar alterações na estabilidade da cromatina é a análise da estrutura da cromatina espermática baseado na avaliação por citometria de fluxo da coloração com laranja de acridina (OSTERMEIER et al., 2001). Esse método se baseia na avaliação da suscetibilidade do DNA à desnaturação pelo ácido ou calor. Com espermatozoides corados com laranja de acridina e com o auxílio do citômetro de fluxo, é possível quantificar os espermatozoides de acordo com a fluorescência emitida pela reação do corante com o DNA. Assim espermatozoides com cromatina normal emitem fluorescência verde e aqueles com cromatina anormal, fluorescência vermelha. O citômetro de fluxo, além de apresentar um alto custo, não permite uma avaliação concomitante da cromatina e da morfologia do espermatozoide (BELETTI, 2013).

2.4 Azul de toluidina

O Azul de toluidina (AT), é outro método utilizado para identificar alterações da cromatina e que permite avaliação concomitante da morfometria espermática (BELETTI, COSTA, 2003; BELETTI, MELLO, 2004, BELETTI et al., 2005). Este corante catiônico possui o fenômeno de metacromasia, ou seja, ocorre alteração de cor induzida pela ressonância de elétrons entre as moléculas do corante (MELLO, 1982).

As moléculas do corante do AT se ligam aos fosfatos de DNA, que não estejam bloqueados por protaminas. No espermatozoide com cromatina normal a maior parte dos

fosfatos estão bloqueados por protamina e poucas moléculas de corante se ligam ao DNA, existindo pouca ressonância de elétrons da molécula de corante, fazendo com que o espermatozoide se core em verde. Já os espermatozoides com alterações na cromatina possuem maior número de fosfatos livres onde um maior número de moléculas de corante se ligam e conseqüentemente, ocorre mais ressonância de elétrons, gerando a metacromasia, visualizada como uma cor variando de azul escuro à magenta (BELETTI, 2013).

A metacromasia induzida, que nada mais é que o aumento da sensibilidade da reação por hidrólise ácida antes da coloração, retira parte das protaminas, resultando na exposição dos fosfatos de DNA. Aqueles espermatozoides com a cromatina normal, ou seja, altamente compactada, são pouco afetados pela hidrólise e continuam apresentando uma coloração azul claro. Os que apresentam alterações na cromatina são mais susceptíveis à hidrólise e conseqüentemente permite que o AT se ligue aos fosfatos de DNA de forma mais intensa, resultando em um azul escuro ou magenta.

2.5 Identificação e classificação das alterações de cromatina

Com a utilização da técnica de coloração com azul de toluidina seguida por análise de imagem computacional é possível realizar identificação das áreas com descompactação de cromatina, possibilitando criar classes de alterações cromatínicas de acordo com a localização da descompactação. Souza et al. (2018) criou uma metodologia baseada em Beletti et al. (2005). Assim, as alterações cromatínicas foram divididas em: Normal, sem áreas de descompactação; DB, descompactação na base; DMB, descompactação na metade basal; DEC, descompactação no eixo central; DT, descompactação total; DD, descompactação dispersa; DA, descompactação na região apical.

A coloração com azul de toluidina seguida de análise de imagem computacional permite ainda a análise morfométrica da cabeça do espermatozoide. Com o auxílio de softwares pode-se analisar diversos fatores que vão influenciar na morfologia da cabeça do espermatozoide, entre eles, área, perímetro, largura, comprimento, elipsidade, razão largura comprimento, fator de forma, simetria látero-lateral, simetria ântero-posterior e as primeiras harmônicas da transformada integral de Fourier (Fourier 0, Fourier 1 e Fourier 2) (BELETTI, COSTA, 2003).

Área, largura, perímetro e comprimento são as principais medidas consideradas na análise do espermatozoide para identificar alterações morfológicas. A relação largura/comprimento é uma derivação das primeiras análises morfológicas (BELETTI et al, 2005). Elipsidade quantifica o alongamento da cabeça. Fator de forma indica um desvio no

contorno da cabeça (BELETTI et al., 2004). Fourier 0 correspondem à magnitude da transformada de Fourier obtida a partir do contorno do objeto (cabeça do espermatozoide) em análise. Ou seja, Fourier 0 está relacionado com o tamanho total dos espermatozoides. Fourier 1 esta associado com a esfericidade da porção anterior do cabeça do espermatozoide. Fourier 2 representa a alongação da cabeça do espermatozoide (BARTH,1989). Simetria lateral identifica a simetria ao longo da cabeça do espermatozoide, pode ser utilizada como um indicativo da hidrodinâmica do espermatozoide (GAMA-CAMPOS et al, 2013). Simetria ântero-posterior analisa o eixo secundário da cabeça do espermatozoide, influencia também na hidrodinâmica.

2.6 Análises computacionais

O uso da análise de imagens computacionais se tornou uma importante ferramenta no âmbito das pesquisas. As análises computacionais ampliaram a sensibilidade e objetividade das avaliações de esfregaços corados com azul de toluidina e permitem avaliar os espermatozoides um por um. Isso possibilita uma análise detalhada do estudo das alterações da cromatina espermática. Vários estudos utilizando análises computacionais de imagens vêm sendo realizados a fim de analisar a cromatina espermática (BELETTI, MELO., 2004; NAVES et al., 2004; BELETTI et al., 2005; SILVA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; KANAYAMA; BELETTI, 2011; CAMPOS et al., 2013; SOUZA et al., 2018)

O uso de análise de imagem assistida por computador é importante, pois elimina a subjetividade inerente a outros métodos, além de permitir um estudo detalhado das alterações da cromatina, ajudando a identificá-las e classificá-las de acordo com a localização (SOUZA et al., 2018).

2.7 Relação integridade da cromatina e fertilidade

Espermatozoides que apresentam graves alterações cromáticas podem apresentar alterações na forma da cabeça e, conseqüentemente, na sua hidrodinâmica, isso acaba por interferir na motilidade e no processo de fecundação. Alterações menos graves podem até não interferir na motilidade, porém os danos no DNA impossibilitariam a união dos pró-núcleos masculinos e femininos, inviabilizando o zigoto. Aqueles com alterações mais leves podem não interferir no processo de fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial, entretanto, as etapas posteriores do desenvolvimento embrionário podem se apresentar comprometidas. Menos frequente, a gestação pode até chegar a termo, porém os neonatos apresentariam alterações

genéticas de diversos tipos (BELETTI, 2013). Existe um conjunto de evidências que suportam a ideia de que a integridade da cromatina espermática é importante não apenas para a fertilização, mas também para o desenvolvimento embrionário normal (WARD, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a compactação da cromatina durante a maturação do espermatozoide no epidídimo.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1- Correlacionar características morfométricas da cabeça dos espermatozoides com a compactação da cromatina
- 2- Correlacionar características morfométricas da cabeça dos espermatozoides com a maturação epididimária
- 3- Correlacionar características da compactação da cromatina com a maturação epididimária

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras

O aparelho reprodutivo de touros mestiços (n=5) em idade reprodutiva, (> 36 meses) foram coletados após o abate em frigorífico e transportados ao laboratório dentro de 1 hora. No laboratório as seguintes estruturas foram isoladas com o auxílio de pinças e bisturi: testículos, cabeça, corpo, e cauda do epidídimo e ducto deferente. Em seguida, cada região foi delimitada por meio de ligadura com fio de sutura e posteriormente seccionada para a coleta de amostras de espermatozoide.

Para obtenção dos espermatozoides, as estruturas isoladas foram seccionadas, lavadas com 5 ml de solução fisiológica. Em seguida o material era centrifugado (5 minutos; 1000 rpm), e ressuspenso em solução fisiológica.

4.2 Confeções das lâminas

Após a obtenção dos espermatozoides, 3 esfregaços de cada região foram feitos e fixados em etanol-ácido acético (3:1; v/v) por um minuto e posteriormente em etanol 70% por três minutos. Após a fixação, as amostras foram secas em temperatura ambiente. Posteriormente os esfregaços foram hidrolisados em ácido clorídrico 4N por 20 minutos e lavados em água destilada. Após a secagem, foi colocada uma gota de Azul de Toluidina 0,025%, em tampão ácido cítrico-fosfato (tampão McIlvaine) pH 4,0 sobre os esfregaços, cobertos com lamínula e após três minutos, foram fotografadas em microscópio de luz convencional.

4.3 Análise computacional das imagens

As análises de imagens computacionais foram divididas em três etapas: segmentação das cabeças, classificação dos tipos de alteração da cromatina e análise quantitativa da descompactação e heterogeneidade de cromatina.

Imagens digitais de pelo menos 100 espermatozoides foram capturadas dos esfregaços, utilizando-se um microscópio (Leica DM500) acoplado a um sistema de captura de imagens (Leica ICC50), com objetiva de imersão de 100 X.

4.3.1 Segmentação das cabeças dos espermatozoides.

Inicialmente as imagens digitais foram segmentadas por limiarização (thresholding), onde foi obtida uma imagem denominada de máscara. A máscara é uma imagem binária, com apenas dois tons de cores, (preto e branco) que, quando combinada com a imagem original, cria uma imagem somente com as cabeças dos espermatozoides, eliminando da imagem original o fundo da imagem (background), a cauda e outros elementos corados. Dessa forma, a máscara permite separar cada cabeça de espermatozoide contido nas imagens originalmente capturadas no microscópio. Em seguida, é possível mensurar o número e valores de pixels e, conseqüentemente, identificar os tipos de alterações da cromatina.

As imagens utilizadas para definir as regiões de alterações passaram por processamento de imagem utilizando técnica matemática, chamadas de Operação de Erosão. Essa técnica permite descartar os pixels no perímetro da cabeça do espermatozoide e suavizar as imagens. Essas imagens foram usadas para identificar e segmentar as cabeças de espermatozoides de cada lâmina para, em seguida, serem processadas por programas desenvolvidos em linguagem MATLAB e executadas no OCTAVE, obtendo assim a área total de cada cabeça, e delimitando área e região com descompactação da cromatina (CRUZ et al., 2014).

4.3.2 Classificação quanto aos tipos de alteração da cromatina

Imagens de cada cabeça de espermatozoide foram processadas no software Octave que selecionou automaticamente as 20 cabeças com mais compactadas (mais claras). A média dos valores de pixel dessas 20 cabeças foram consideradas como valor padrão e valores menores que essa média indicam alterações. Em seguida, foi calculado um limiar de cada cabeça usando esses valores como referência e a região que fosse menor que essa média foi delineada pelo software. A imagem resultante foi suavizada, usando um filtro Gaussiano ($\sigma=2$, $r=2,5$) para reduzir o ruído e melhor delimitar a região alterada. Finalmente o delineamento foi realizado pela demarcação de linhas brancas definindo a região.

Dessa forma, tipos de alteração de cromatina de acordo com a localização da descompactação foram determinados (SOUZA et al, 2018). Resumidamente as alterações cromáticas foram divididas em: (1) Descompactação na base (DB), atinge no máximo o terço basal da cabeça; 2) Descompactação na metade basal (DMB), além do terço basal, atinge também até dois terços da cabeça; 3) Descompactação no eixo central (DEC), ocorre em todo o eixo

central sem atingir as laterais da cabeça; 4) Descompactação total (DT), a cabeça como um todo esta descompactada; 5) Descompactação dispersa (DD), áreas de descompactação dispersas na cabeça do espermatozoide; 6) Descompactação na região apical (DA), atinge a região apical da cabeça do espermatozoide; Normal (NORMAL), ausência de áreas de descompactação. (FIGURA 1). Todas as classificações foram realizadas pelo mesmo avaliador.

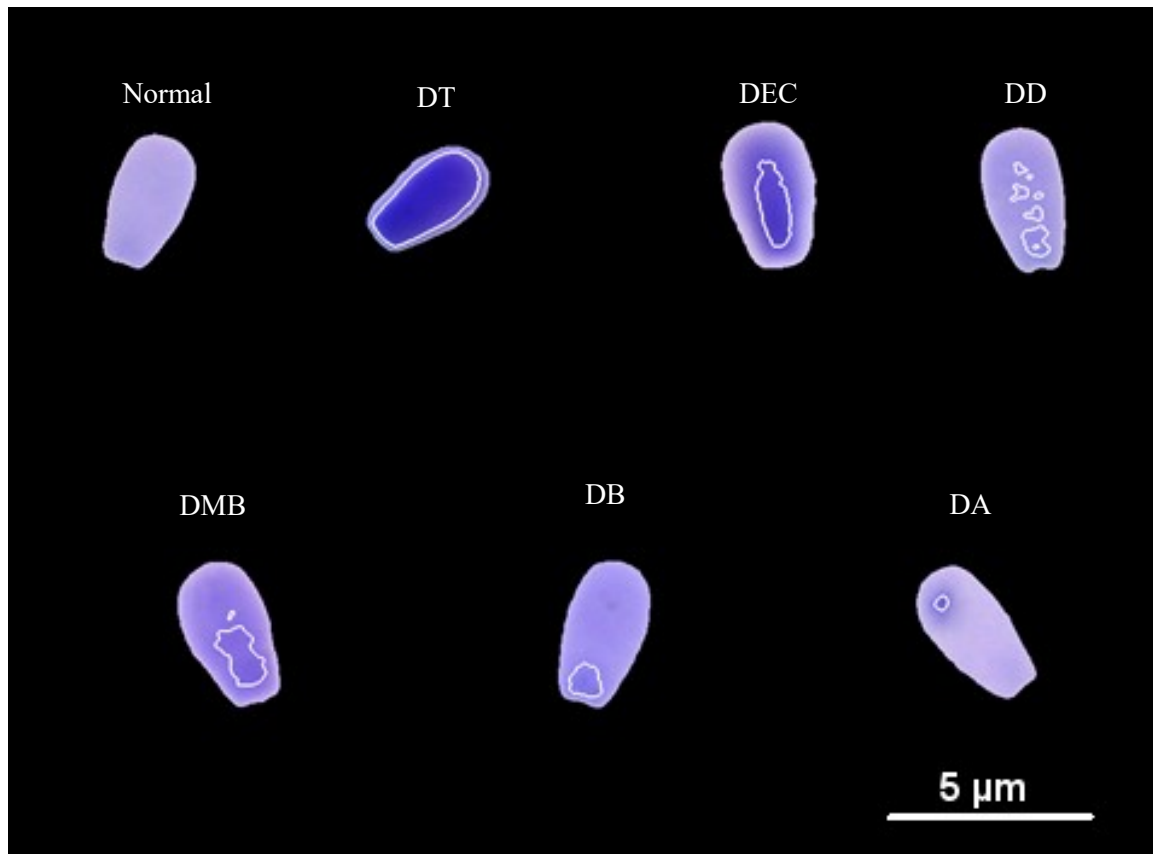


Figura 1, Tipos de alterações de cromatina. Normal, sem áreas de descompactação; DB, descompactação na base; DMB, descompactação na metade basal; DEC, descompactação no eixo central; DT, descompactação total; DD, descompactação dispersa; DA, descompactação na região apical.

4.3.3. Descompactação e heterogeneidade da cromatina

Para avaliação da descompactação e heterogeneidade da cromatina, imagens das cabeças espermáticas foram transformadas em tons de cinza. Os valores médios dos pixels das cabeças-padrão foram determinados automaticamente pelo software (as vinte cabeças mais claras e homogêneas). 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 do valor médio das

cabeças padronizadas, caracterizando quantitativamente a intensidade da descompactação da cromatina de cada cabeça avaliada. O coeficiente de variação dos níveis de cinza de cada cabeça também foi calculado, caracterizando quantitativamente a heterogeneidade da cromatina, ou seja, a variação da compactação cromatínica em toda extensão da cabeça do espermatozoide (BELETTI et al., 2005).

4.4. Análises estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Sigma Plot 11 (Systat Software Inc., USA). O teste Qui-quadrado foi utilizado para estabelecer a porcentagem dos diferentes tipos de alterações de cromatina nas regiões analisadas. Para determinar o coeficiente de correlação (r) entre as medidas morfométricas utilizou-se o teste de correlação de Spearman. A mensuração de parâmetros morfométricos, descompactação e heterogeneidade entre as regiões foram feito através do teste Anova (análise de variância) post hoc test, Dunn's Method, sem distribuição normal foi feito o teste Kolmogorov Smirnov. Para produzir um conjunto menor de variáveis não correlacionadas a partir do maior conjunto, utilizou-se a análise de componentes principais, essa abordagem permite que diversas variáveis sejam resumidas em alguns componentes principais (fatores) que explicam a variância total de uma matriz de dados. Além disso, um método de rotação varimax foi utilizado para identificar as variáveis mais relevantes que podem ser correlacionadas com cada fator.

5. RESULTADOS

Espermatozoides ($n = 7010$) coletados de diferentes regiões (túbulo seminífero, $n = 482$; cabeça do epidídimo, $n = 1635$; corpo do epidídimo, $n = 1240$; cauda do epidídimo, $n = 2388$ e ducto deferente, $n = 1265$) do aparelho reprodutor bovino foram analisados em relação aos parâmetros morfométricos da cabeça espermática (área, perímetro, largura, comprimento, razão largura/comprimento, elipsidade, fator forma, Fourier 0, Fourier 1, Fourier 2, simetria latero-lateral e simetria anterior-posterior), descompactação e heterogeneidade da cromatina.

No geral, espermatozoides do túbulo seminífero apresentaram menor ($P < 0,05$) área, perímetro, largura, comprimento, elipsidade, e harmônicas de Fourier (F0, F1 e F2) quando comparados aos do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) e ducto deferente (Tabela 1). A simetria latero-lateral foi maior ($P < 0,05$) nos espermatozoides coletados do ducto deferente em comparação as demais regiões avaliadas, exceto para a cabeça do epidídimo ($P > 0,05$). Os parâmetros razão largura/comprimento, fator forma e simetria anterior-posterior foram maiores ($P < 0,05$) nos espermatozoides do túbulo seminífero em relação aos do ducto deferente. Em adição, a área e o Fourier F0 apresentaram correlação positiva ($P < 0,0001$) na medida em que os espermatozoides avançam ao longo do aparelho reprodutivo (sentido túbulo seminífero - ducto deferente) (Figura 2AB)

A análise da descompactação e heterogeneidade da cromatina (Figura 3) demonstrou que ambos os parâmetros decresceram ($P < 0,05$) no decorrer do processo de maturação espermática. Dessa forma, a descompactação e heterogeneidade foram maiores ($P < 0,05$) no túbulo seminífero em relação as demais regiões avaliadas e associadas negativamente ($P < 0,0001$) com a migração ao longo do aparelho reprodutivo (Figura 2CD).

A Tabela 2 apresenta a correlação (cargas fatoriais) entre os principais fatores extraídos (Fatores 1 e 2) pela análise de componentes principais e os parâmetros morfométricos espermáticos avaliados em cada região do aparelho reprodutor. A análise de componentes principais permite que diversas variáveis sejam resumidas em alguns componentes (fatores) que explicam a variância total de uma matriz de dados (MARTINEZ-PASTOR, 2005). Dessa forma, considerando cargas fatoriais acima de 0,52 observou-se que os parâmetros área, perímetro, largura, comprimento e Fourier F0 contribuíram para a variação do Fator 1 em todas as regiões avaliadas, exceto na cauda do epidídimo. A razão largura/comprimento e elipsidade contribuíram em todas as regiões analisadas para o Fator 2. A descompactação e heterogeneidade da cromatina influenciaram o Fator 2 no túbulo seminífero e o Fator 1 na cabeça e cauda do epidídimo. No geral, os Fatores 1 e 2 representaram no mínimo 34,7 e 20,6%, respectivamente da variabilidade total dos parâmetros morfométricos.

Tabela 1. Parâmetros morfométricos (média \pm e.p.m) da cabeça de espermatozoides coletados em diferentes regiões (túbulo seminífero, cabeça, corpo e cauda do epidídimo; ducto deferente) do aparelho reprodutivo bovino.

	A (μm^2)	P (μm)	L (μm)	C (μm)	L/C	E	FF	F0	F1	F2	SLL	SAP
Túbulo seminífero	38,39 ^A	19,81 ^A	4,20 ^A	7,16 ^A	0,5885 ^A	0,2604 ^A	0,95 ^A	2731,00 ^A	340,40 ^A	303,99 ^A	0,9688 ^A	0,9377 ^A
(n = 482)	$\pm 0,39$	$\pm 0,1$	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,001$	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 34,62$	$\pm 7,86$	$\pm 6,58$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$
Cabeça	45,18 ^B	21,75 ^B	4,52 ^B	7,91 ^B	0,5714 ^B	0,2735 ^B	0,95 ^A	3399,67 ^B	430,86 ^{BD}	363,73 ^B	0,9698 ^{AB}	0,9312 ^B
(n = 1635)	$\pm 0,15$	$\pm 0,04$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 14,39$	$\pm 4,04$	$\pm 3,89$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$
Corpo	45,06 ^B	21,89 ^{BC}	4,47 ^C	7,99 ^C	0,5604 ^C	0,2826 ^C	0,95 ^A	3561,50 ^C	452,32 ^C	369,60 ^B	0,9687 ^A	0,9273 ^C
(n = 1240)	$\pm 0,19$	$\pm 0,05$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 17,89$	$\pm 5,26$	$\pm 4,78$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$
Cauda	45,49 ^B	21,97 ^C	4,46 ^C	8,03 ^C	0,5567 ^D	0,2859 ^D	0,94 ^B	3640,01 ^D	452,25 ^{BC}	363,55 ^B	0,9689 ^A	0,9282 ^B
(n = 2388)	$\pm 0,15$	$\pm 0,04$	$\pm 0,009$	$\pm 0,01$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 17,18$	$\pm 5,00$	$\pm 3,85$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$
Ducto	45,52 ^B	21,95 ^C	4,46 ^C	8,02 ^C	0,5569 ^{CD}	0,2854 ^{CD}	0,94 ^B	3612,73 ^D	427,62 ^D	354,14 ^B	0,9705 ^B	0,9320 ^B
(n = 1265)	$\pm 0,17$	$\pm 0,04$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 15,59$	$\pm 4,12$	$\pm 4,75$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$

^{A,B,C,D} Letras diferentes dentro da coluna indicam significância ($P < 0,05$).

A, área; P, perímetro; L, largura; C, comprimento; L/C, razão largura comprimento; E, elipsidade; FF, fator forma; F0, Fourier 0; F1, Fourier 1; F2, Fourier 2; SLL, simetria latero-lateral; SAP, simetria anterior-posterior

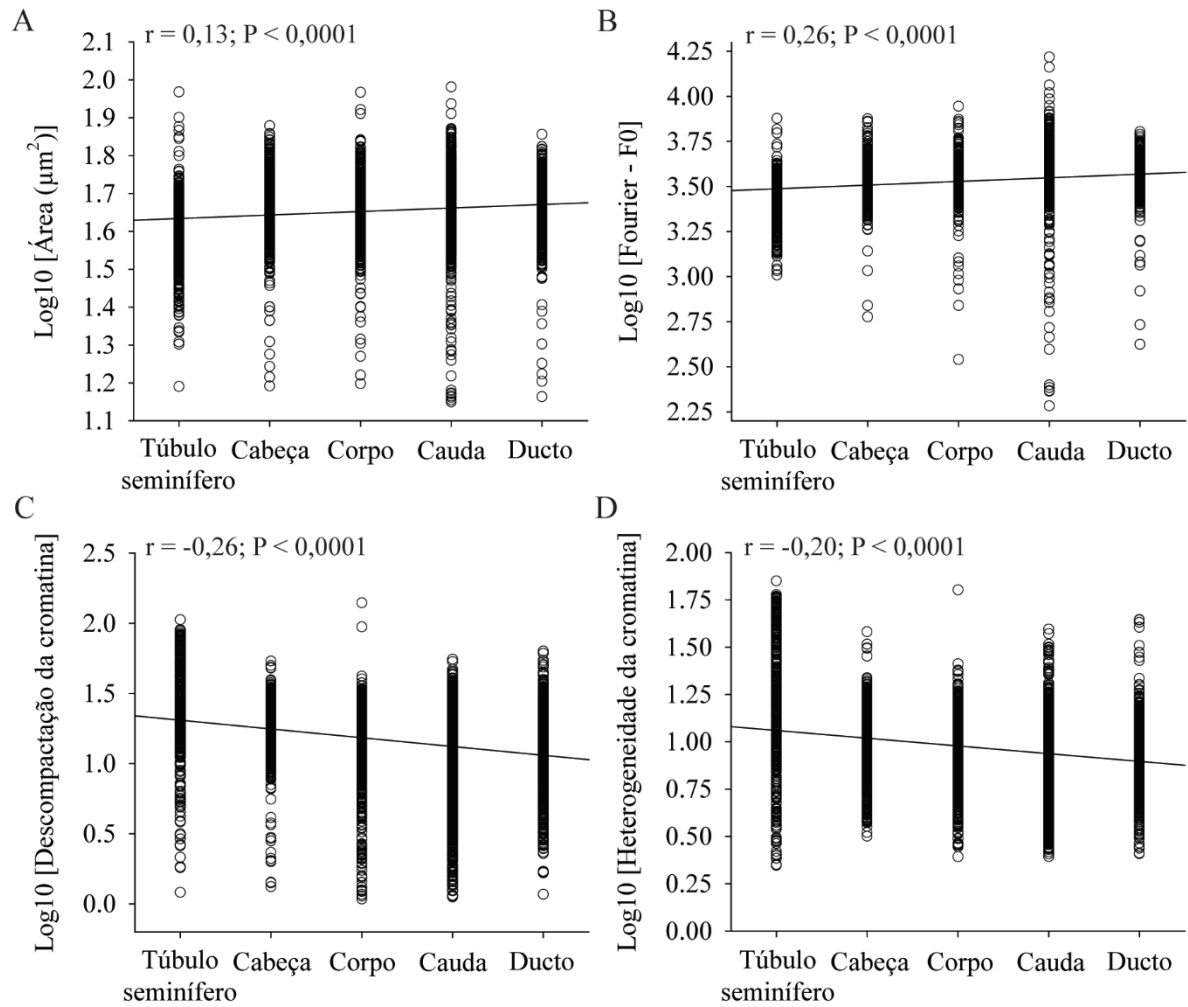


Figura 2, Associação da (A) área, (B) Fourier-F0, (C) descompactação e (D) heterogeneidade da cromatina com diferentes regiões (túbulo seminífero; cabeça, corpo e cauda do epidídimo; ducto deferente) do aparelho reprodutivo bovino, Cada ponto no gráfico representa um espermatozoide analisado ($n = 7010$), Para a realização do teste de Spearman as regiões do aparelho reprodutivo foram classificadas em: 1 = túbulo seminífero; 2 = cabeça, 3 = corpo, e 4 = cauda do epidídimo; e 5 = ducto deferente,

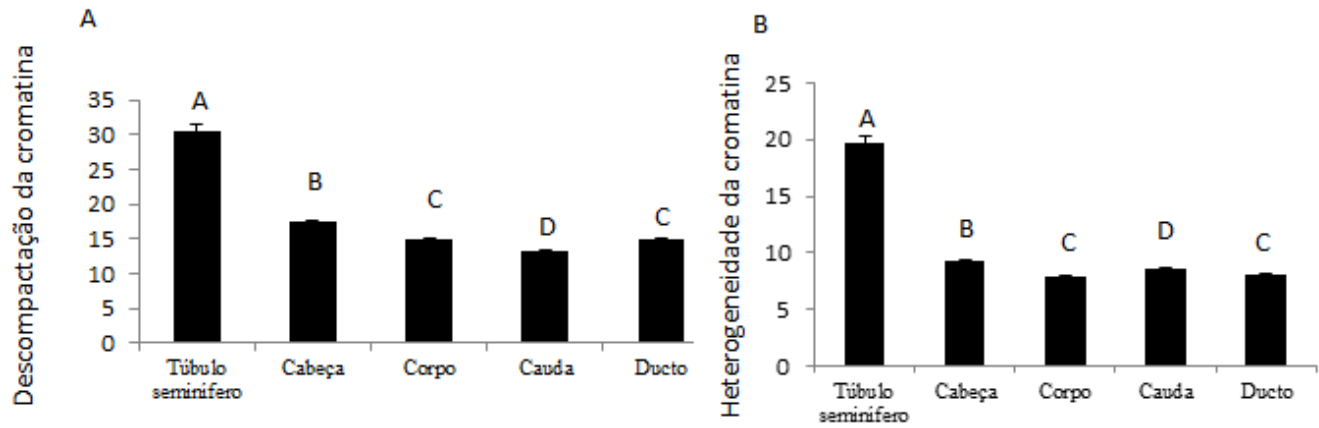


Figura 3, A) Descompactação e B) heterogeneidade da cromatina (média \pm e,p,m) de espermatozoide coletados de diferentes regiões (túbulo seminífero; cabeça, corpo e cauda do epidídimo; ducto deferente) do aparelho reprodutivo bovino,

A, B, C, D Letras diferentes indicam significância ($P < 0,05$),

Os resultados dos fatores principais foram exibidos em um gráfico (Figura 4) bidimensional com projeções das variáveis morfométricas espermáticas (vetores) nos eixos horizontal (Fator 1) e vertical (Fator 2). Os ângulos entre os vetores indicam as correlações entre as variáveis e o comprimento do vetor indica a contribuição da variável sobre a variância total da matriz de dados (LUCIO et al., 2016). Dessa forma, variáveis próximas uma da outra (por exemplo, área e perímetro; Fourier F0 e Fourier F1; Figura 4A) são positivamente correlacionadas (r próximo de 1). No sentido ortogonal, (por exemplo, comprimento e elipsidade; perímetro e razão largura/comprimento; Figura 4B) não possuem correlação (r próximo de 0); e no sentido oposto (por exemplo, elipsidade e razão largura/comprimento; Figura 4C), elas são negativamente correlacionadas (r próximo de -1). A contribuição de cada variável morfométrica dentro do Fator demonstrada na Figura 4 pode ser confirmada pelas cargas fatoriais da Tabela 2.

Tabela 2. †Correlação entre os fatores (cargas) extraídos pela análise de componentes principais e os parâmetros morfométricos espermáticos avaliados em diferentes regiões do aparelho reprodutivo bovino.

	Geral		Túbulo seminífero		Cabeça		Corpo		Cauda		Ducto	
	Fator 1	Fator 2	Fator 1	Fator 2	Fator 1	Fator 2	Fator 1	Fator 2	Fator 1	Fator 2	Fator 1	Fator 2
A (µm²)	0,979*	-0,044	0,978*	0,036	0,837*	0,404	0,942*	0,237	0,928*	0,074	0,940*	0,192
P (µm)	0,957*	0,225	0,955*	0,179	0,853*	0,250	0,927*	0,085	0,844*	-0,155	0,904*	0,014
L (µm)	0,924*	-0,142	0,909*	-0,267	0,687*	0,659*	0,810*	0,520	0,845*	0,363	0,816*	0,488
C (µm)	0,872*	0,358	0,907*	0,373	0,885*	-0,029	0,932*	-0,220	0,794*	-0,418	0,887*	-0,300
L/C	0,229	-0,560*	0,166	-0,886*	0,016	0,983*	0,101	0,966*	0,175	0,963*	0,166	0,961*
E	-0,238	0,576*	-0,168	0,882*	-0,020	-0,981*	-0,105	-0,965*	-0,188	-0,962*	-0,176	-0,959*
FF	0,457	0,346	0,344	-0,332	0,301	0,498	0,301	0,404	0,234	0,239	0,224	0,447
F0	0,615*	0,614*	0,679*	0,656*	0,730*	-0,411	0,740*	-0,567*	0,509	-0,666*	0,637*	-0,652*
F1	0,370	0,733*	0,445	0,438	0,174	0,007	0,232	-0,146	0,201	-0,286	0,269	-0,177
F2	0,371	0,228	0,452	-0,164	0,369	-0,032	0,384	-0,094	0,339	-0,159	0,389	0,006
SLL	-0,072	-0,286	0,036	0,053	-0,074	-0,195	-0,044	-0,293	0,050	-0,194	0,199	-0,182
SAP	-0,118	-0,862*	0,078	-0,615*	-0,054	0,214	-0,017	0,352	-0,012	0,405	-0,084	0,356
DC	-0,089	0,040	-0,198	-0,735*	0,560*	0,057	0,356	0,176	0,570*	0,063	0,378	0,240
HC	-0,079	0,044	-0,131	-0,786*	0,585*	0,148	0,452	0,265	0,613*	0,227	0,386	0,225
Variância total (%)	35,9	23,6	37,9	27,1	37,4	20,6	37,0	21,5	38,9	23,1	34,7	22,2

A área; P, perímetro; L, largura; C, comprimento; L/C, razão largura comprimento; E, elipsidade; FF, fator forma; F0, Fourier 0; F1, Fourier 1; F2, Fourier 2; SLL, simetria latero-lateral; SAP, simetria anterior-posterior; DC, descompactação da cromatina; HC, heterogeneidade da cromatina, †As cargas fatoriais foram rotacionadas e consideradas viáveis quando $r > 0,52$,

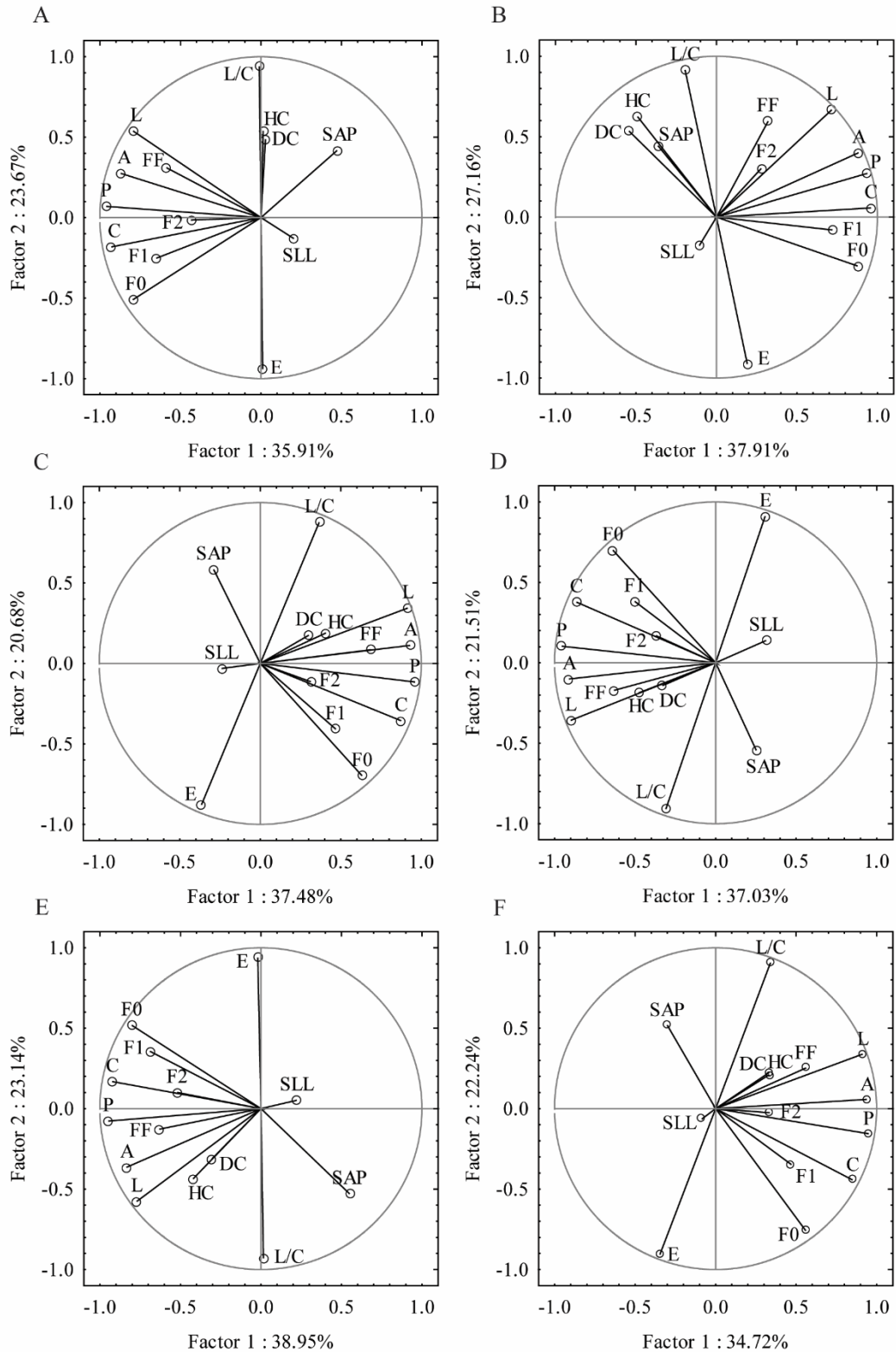


Figura 4, Projeções dos parâmetros morfométricos (vetores) extraídos pela análise de componentes principais de acordo com diferentes regiões do aparelho reprodutivo bovino, (A) Todas as regiões combinadas; (B) túbulo seminífero, (C) cabeça, (D) corpo e (E) cauda do epidídimo; e (F) ducto deferente, Os eixos horizontais e verticais representam os Fatores 1 e 2, respectivamente, A, área; P, perímetro; L, largura; C, comprimento; L/C, razão largura comprimento; E, elipsidade; FF, fator forma; F0, Fourier 0; F1, Fourier 1; F2, Fourier 2; SLL, simetria latero-lateral; SAP, simetria anterior-posterior; DC, descompactação da cromatina; HC, heterogeneidade da cromatina,

A distribuição do tipo de descompactação da cromatina em espermatozoides coletados de diferentes regiões (túbulo seminífero; cabeça, corpo e cauda do epidídimo; ducto deferente) do aparelho reprodutivo bovino foi analisada (Tabela 3). A proporção de espermatozoides normais (com ausência de áreas de descompactação de cromatina) foi menor ($P < 0,05$) nos túbulos seminíferos em relação as demais regiões. Além disso, porcentagem superior ($P < 0,05$) de espermatozoides com descompactação de cromatina na base (DB), metade basal (DMB) e no eixo central (DEC) foi observado nos túbulos seminíferos quando comparado às outras regiões analisadas. Em relação a descompactação na metade basal, o corpo do epidídimo foi o local onde se encontrou a menor ($P < 0,05$) proporção desse tipo de descompactação. Considerando a frequência dos tipos de descompactação da cromatina dentro de cada região avaliada, a descompactação no eixo central foi proporcionalmente mais observada nos túbulos seminíferos e cabeça do epidídimo, seguido da descompactação da base no corpo e cauda do epidídimo e ductos deferentes. A descompactação dispersa foi maior ($P < 0,05$) na cabeça e corpo do epidídimo em relação a cauda e ducto deferente. A descompactação apical foi semelhante ($P > 0,05$) entre as regiões analisadas.

O tipo de descompactação da cromatina influencia parâmetros morfométricos da cabeça de espermatozoide (Tabela 4). Cabeças que possuem descompactação total apresentam menor área, por outro lado, os que apresentam descompactação dispersas têm uma área maior. As células com descompactação na base, na metade basal, eixo central e descompactação apical são semelhantes em relação a área. O perímetro, largura e comprimento seguem o mesmo modelo, ou seja, apresenta os menores valores na descompactação total e os maiores nos espermatozoides que apresentam descompactação dispersa. Em relação aos Fourier (F0, F1, F2), os espermatozoides que apresentam a descompactação total sempre mostram os menores valores.

A descompactação e heterogeneidade foram quantificadas dentro dos diferentes tipos de alterações de cromatina (Figura 5). Como esperado, a descompactação foi maior ($P < 0,001$) nos espermatozoides que apresentaram a classificação descompactação total (DT) em relação aos demais tipos. A heterogeneidade seguiu o mesmo padrão, sendo superior ($P < 0,001$) nos espermatozoides com classificação DT em comparação aos demais.

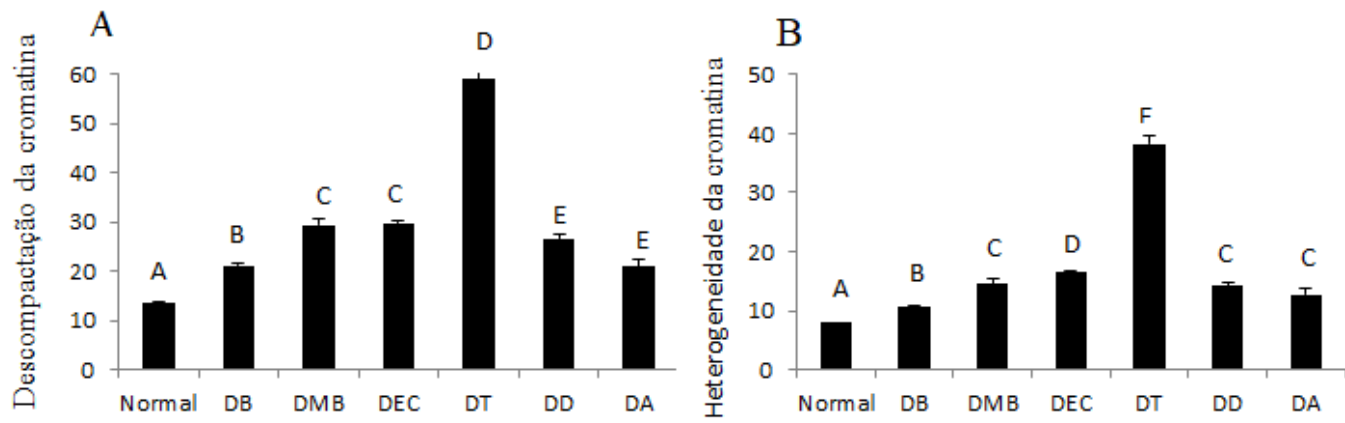


Figura 5, Mensuração dos níveis de (A) descompactação e (B) heterogeneidade (média \pm e,p,m)

dentro dos diferentes tipos de alterações de cromatina em espermatozoides bovino,

A,B,C,D,E Letras diferentes indicam significância ($P < 0,001$),

Tabela 3, Distribuição do tipo de descompactação da cromatina em espermatozoides coletados de diferentes regiões (túbulo seminífero; cabeça, corpo e cauda do epidídimo; ducto deferente) do aparelho reprodutivo bovino,

	Normal	DB	DMB	DEC	DT	DD	DA
Túbulo seminífero	47,9 ^A (231/482)	9,7 ^A (47/482)	3,1 ^A (15/482)	18,6 ^A (90/482)	17,6 ^A (85/482)	1,8 ^{BC} (9/482)	1,0 ^A (5/482)
Cabeça	84,0 ^B (1374/1635)	4,7 ^B (78/1635)	0,5 ^B (9/1635)	7,1 ^B (117/1635)	0,2 ^{BC} (4/1635)	2,8 ^C (47/1635)	0,3 ^A (6/1635)
Corpo	86,9 ^C (1078/1240)	5,7 ^{BC} (71/1240)	0,08 ^C (1/1240)	4,2 ^C (53/1240)	0,08 ^B (1/1240)	2,5 ^C (31/1240)	0,4 ^A (5/1240)
Cauda	87,5 ^C (2090/2388)	6,5 ^C (156/2388)	0,9 ^B (23/2388)	3,8 ^C (92/2388)	0,04 ^B (1/2388)	0,6 ^A (16/2388)	0,4 ^A (10/2388)
Ducto	85,7 ^{BC} (1084/1265)	6,7 ^C (85/1265)	0,7 ^B (10/1265)	4,7 ^C (60/1265)	0,4 ^C (6/1265)	1,1 ^{AB} (15/1265)	0,3 ^A (5/1265)

^{A,B,C} Letras diferentes dentro da coluna indicam significância ($P < 0,05$),

Normal, Sem áreas de descompactação; DB, descompactação na base; DMB, descompactação na metade basal; DEC, descompactação eixo central; DT, descompactação total; DD, descompactação dispersa; DA, descompactação na região apical,

Tabela 4, Efeito do tipo de descompactação da cromatina sobre os parâmetros morfométricos (média ± e,p,m) da cabeça do espermatozoide bovino,

	A (µm ²)	P (µm)	L (µm)	C (µm)	L/C	E	FF	F0	F1	F2	SLL	SAP
Normal (n=5857)	44,86 ^A ± 0,09	21,76 ^A ± 0,02	4,45 ^A ± 0,005	7,94 ^A ± 0,008	0,5616 ^A ± 0,0005	0,2817 ^A ± 0,0004	0,9479 ^A ± 0,0006	3516,9 ^A ± 9,03	443,5 ^A ± 2,56	360,2 ^A ± 2,25	0,9701 ^A ± 0,0001	0,9289 ^A ± 0,0004
DB (n=437)	44,92 ^A ± 0,33	21,90 ^A ± 0,09	4,41 ^A ± 0,02	8,03 ^B ± 0,03	0,5498 ^B ± 0,001	0,2913 ^B ± 0,001	0,9465 ^A ± 0,002	3668,4 ^B ± 30,60	393,1 ^B ± 8,11	344,2 ^{AB} ± 8,04	0,9666 ^{BC} ± 0,0009	0,9347 ^B ± 0,001
DMB (n=58)	45,65 ^A ± 1,23	21,81 ^A ± 0,32	4,57 ^{AB} ± 0,07	7,92 ^{AB} ± 0,10	0,5775 ^{CE} ± 0,006	0,2689 ^{CE} ± 0,003	0,9570 ^{AB} ± 0,008	3343,3 ^{AC} ± 92,57	398,1 ^{AB} ± 18,71	356,5 ^{ABC} ± 22,53	0,9643 ^{BCD} ± 0,001	0,9373 ^{AB} ± 0,002
DEC (n=412)	45,61 ^A ± 0,52	21,86 ^A ± 0,14	4,55 ^B ± 0,02	7,95 ^{AB} ± 0,05	0,5753 ^C ± 0,002	0,2709 ^C ± 0,002	0,9600 ^B ± 0,002	3431,8 ^C ± 52,08	407,6 ^B ± 11,72	355,8 ^{AC} ± 8,90	0,9653 ^{BD} ± 0,0008	0,9337 ^B ± 0,001
DT (n=97)	35,30 ^B ± 0,73	18,73 ^B ± 0,21	4,13 ^C ± 0,05	6,71 ^C ± 0,07	0,6190 ^D ± 0,006	0,2371 ^D ± 0,004	0,9514 ^{AB} ± 0,003	2236,6 ^D ± 72,65	250,8 ^C ± 13,08	308,5 ^B ± 14,45	0,9704 ^{AC} ± 0,001	0,9504 ^C ± 0,002
DD (n=118)	49,51 ^C ± 0,78	22,92 ^C ± 0,21	4,83 ^D ± 0,05	8,23 ^D ± 0,05	0,5862 ^E ± 0,004	0,2618 ^E ± 0,003	0,9809 ^C ± 0,008	3551,1 ^{ABC} ± 55,90	438,5 ^{AB} ± 19,98	397,3 ^C ± 16,84	0,9619 ^D ± 0,001	0,9357 ^{AB} ± 0,002
DA (n=31)	44,32 ^A ± 1,50	21,64 ^A ± 0,42	4,46 ^{AB} ± 0,07	7,89 ^{ABD} ± 0,16	0,5668 ^{ABCE} ± 0,005	0,2771 ^{ABCE} ± 0,004	0,9551 ^{ABC} ± 0,005	3465,4 ^{ABC} ± 190,22	442,1 ^{AB} ± 34,44	372,3 ^{ABC} ± 24,67	0,9634 ^{ABD} ± 0,003	0,9310 ^{ABC} ± 0,004

A,B,C,D,E Letras diferentes dentro da coluna indicam significância (P < 0,05),

A, área; P, perímetro; L, largura; C, comprimento; L/C, razão largura comprimento; E, elipsidade; FF, fator forma; F0, Fourier 0; F1, Fourier 1; F2, Fourier 2; SLL, simetria latero-lateral; SAP, simetria anterior-posterior,

Normal, sem áreas de descompactação; DB, descompactação na base; DMB, descompactação na metade basal; DEC, descompactação no eixo central;

DT, descompactação total; DD, descompactação dispersa; DA, descompactação na região apical,

6. DISCUSSÃO

Durante a maturação espermática o DNA é fortemente empacotado para protegê-lo até o momento da fertilização (WARD, 2009). Dessa forma, a integridade do genoma paterno está associada ao sucesso reprodutivo que envolve a fertilização e o desenvolvimento embrionário (LUCIO et al., 2016). Neste sentido, estudos que possibilitem identificar o padrão de compactação da cromatina ao longo do trato reprodutivo e suas implicações em possíveis anomalias espermáticas são de grande relevância para o entendimento dos mecanismos associados a fertilidade masculina. Este é o primeiro estudo em bovinos que avaliou o processo de compactação da cromatina durante a maturação espermática. Além disso, regiões de descompactação da cromatina e sua frequência de distribuição foram identificadas em diferentes regiões do trato reprodutivo e correlacionadas com parâmetros morfométricos da cabeça do espermatozoide.

Neste estudo, os espermatozoides do túbulo seminífero apresentaram menor área, perímetro, largura, comprimento, elipsidade, e harmônicas Fourier (F0, F1 e F2) quando comparados aos do epidídimo e ducto deferente. Além disso, a área e o Fourier F0 aumentaram à medida em que os espermatozoides migravam ao longo do trato reprodutivo (sentido tubúlo seminífero - ducto deferente). A descompactação e heterogeneidade da cromatina foram maiores no túbulo seminífero e decresceram no epidídimo e ducto deferente. Durante a espermatogênese o DNA espermático é compactado por meio da substituição das histonas por protaminas (BALHORN et al. 2011). Como a cromatina é o principal constituinte da cabeça espermática, alterações durante o seu processo de compactação podem interferir nas características morfométricas da cabeça (OSTERMEIER et al., 2001; LANGE-CONSIGLIO et al., 2010; ENCISO et al., 2011; MANGIARINI et al., 2013). Neste sentido, a associação da compactação cromatínica com morfometria da cabeça espermática foram reportados previamente em humanos (GOLAN, 1996), bovinos (BELETTI et al., 2005, SILVA et. al, 2008; HIDALGO et. al, 2009; NAGY et al., 2013), equinos (PHETUDOMSINSUK et al., 2008; MORELL et al., 2012) e suínos (GADEA, 2005). Os achados observados no presente estudo possibilitaram o monitoramento das características morfométricas (A, P, L, E, F0, F1, F2) e da cromatina (descompactação e heterogeneidade) e sugere que existe uma relação inversa entre estes parâmetros durante a maturação espermática, ou seja, espermatozoides mais imaturos possuem cromatina mais frouxa e heterogênea e possuem menor área, perímetro, largura, elipsidade e harmônicas de Fourier. A princípio isso pode parecer incoerente, pois espermatozoides com cromatina frouxo deveriam ser maiores. No entanto, a

análise realizada no presente trabalho é bidimensional (dimensões X e Y), não avaliando a dimensão Z (profundidade). Desta forma,

A análise de componentes principais permitiu reduzir os diversos parâmetros morfométricos analisados em fatores (Fator 1 e 2) que explicam a variância total de um conjunto de dados (MARTINEZ-PASTOR, 2005). No geral, a área, perímetro, largura, comprimento, e Fourier 0 contribuíram dentro do Fator 1, enquanto a razão largura/comprimento e elipsidade contribuíram para o Fator 2. A descompactação e heterogeneidade da cromatina contribuíram dentro do Fator 1 no epidídimo (cabeça e cauda) e no Fator 2 no túbulo seminífero. Alterações nos parâmetros morfométricos primários (A, P, L e C) e harmônicas Fourier (F0, F1 e F2) comprometeram a fertilização *in vitro* (referencia). Além disso, a descompactação e heterogeneidade de cromatina já foram associados com reduzidas taxas de produção de blastocisto (LÚCIO et al 2016) e observadas em maior proporção em amostras de sêmen de touros subfêrteis (SOUZA et al 2018). A utilização de análises multivariadas possibilitou a identificação acurada de parâmetros morfométricos que contribuíram significativamente dentro dos Fatores extraídos. No geral, A, P, L, C e F0 foram responsáveis por aproximadamente 36% das alterações morfométricas da cabeça espermática, enquanto a descompactação e heterogeneidade contribuíram aproximadamente 23% dentro do Fator 2. Portanto, essas variáveis podem ser eletivas em abordagens laboratoriais para análise de sêmen com intuito de associar parâmetros morfométricos e fertilidade.

Ao se analisar os tipos de descompactação da cromatina de acordo com a localização na cabeça, observou-se que os espermatozoides apresentaram um mecanismo ordenado de compactação durante a maturação espermática. Inicialmente, no túbulo seminífero e cabeça do epidídimo, os espermatozoides apresentaram maior proporção de descompactação total e no eixo central. Em seguida, no corpo e cauda do epidídimo e ducto deferente observou-se maior frequência de descompactação na base da cabeça. Baseado nestes resultados é possível deduzir que a compactação da cromatina espermática inicia-se durante a espermiogênese, mas após a espermição (liberação dos espermatozoides na luz do túbulo seminífero) o processo continua de forma ordenada intensificando inicialmente a compactação nas bordas laterais, logo após, na região apical, depois na central e finalmente na região basal da cabeça (FIGURA 6). Além disso, dentre as alterações avaliadas, a maioria (~80%) estava localizada na base. Em outro trabalho, touros férteis e subfêrteis apresentaram proporção semelhante de espermatozoides com alterações de cromatina na base quando avaliados pelo azul de toluidina (SOUZA et al 2018). A maior proporção de alteração na base pode ser justificada por diferentes mecanismos: (1) na região basal, onde está localizado o ânulo nuclear, as

sequências de DNA não são organizadas por toroides e, dessa forma, apresentam menor grau de compactação e estabilidade e maior sensibilidade a alterações durante a maturação espermiática (WARD, COFFEY, 1989; BELETTI et al., 2004); (2) no epitélio seminífero, a região basal está mais distante da junção entre a espermatíde e a célula de Sertoli, a qual tem papel importante sobre a condensação da cromatina (BETTEGOWDA, e WILKINSON, 2010). Isso explicaria o fato dessa região ser a última a realizar o processo de compactação da cromatina.

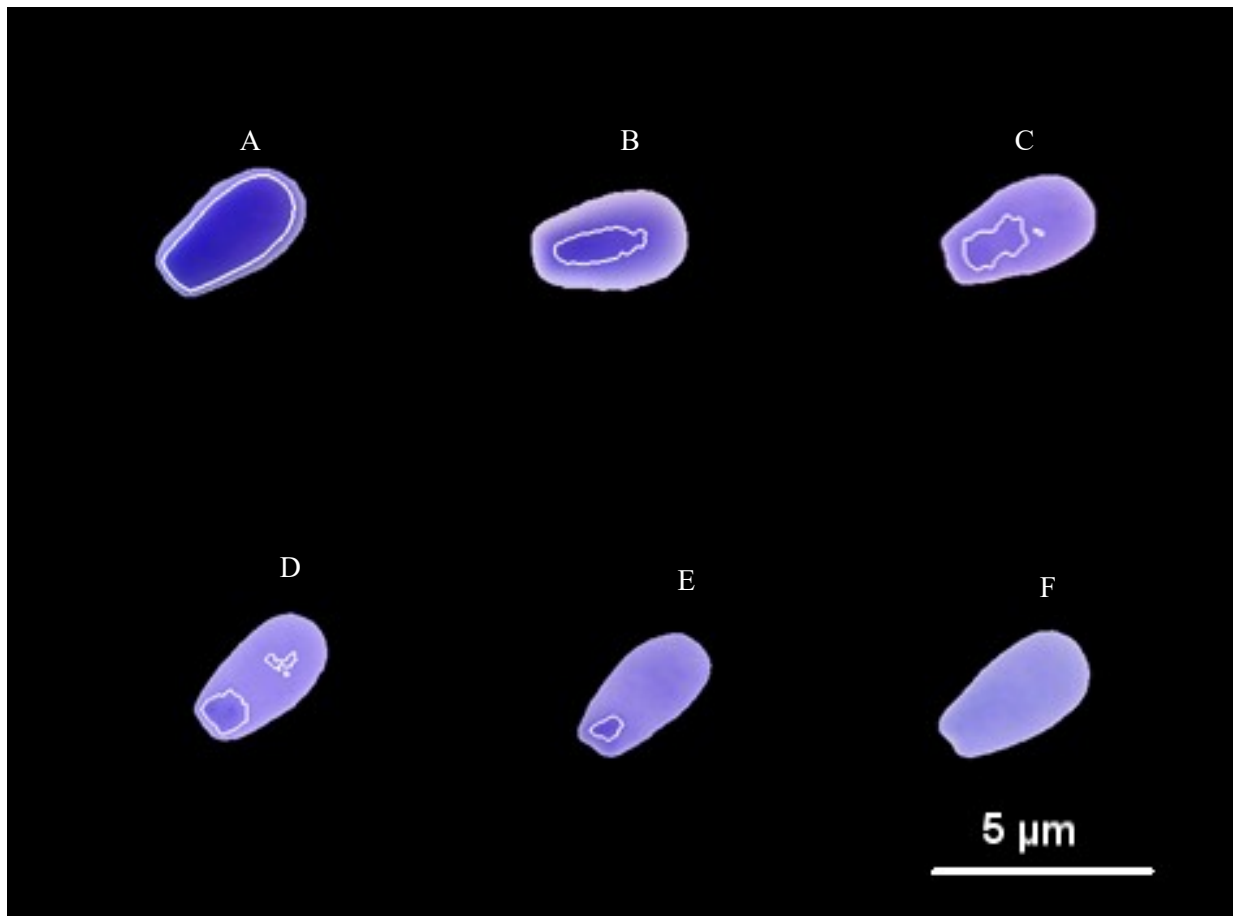


Figura 6, ordem de compactação da cromatina; (A) cromatina totalmente descompactada; (B), cromatina compactada nas bordas; (C), cromatina compactada nas bordas e região apical; (D), cromatina compactada na região central, bordas e apical; (E), cromatina descompactação apenas na base; (F), cromatina totalmente compactada.

Sabemos ainda que diversos fatores patológicos influenciam o mecanismo de compactação. Por exemplo, o aumento da temperatura acelera a passagem desses espermatozoides no epidídimo (GULFAM, 2012; BEDFORD, 1994), assim o processo de

maturação é afetado. No presente trabalho verificou-se a importância da maturação epididimária na compactação cromatínica, justificando o aumento das alterações cromatínicas espermáticas em animais submetidos ao estresse térmico testicular (LUCIO et al., 2016).

Este estudo demonstrou pela primeira vez a influência do tipo de descompactação da cromatina sobre os parâmetros morfométricos. Espermatozoides com descompactação total apresentaram menor A, P, L, e C, enquanto o inverso foi observado nos espermatozoides com descompactação dispersa. Prévio estudo com felinos (ALVES et al., 2018), demonstrou o aumento da área da cabeça do espermatozoide durante o processo de maturação epididimária, dessa forma espermatozoides com descompactação total possuem menor área diferindo daqueles com descompactação dispersa (menor área). A descompactação e a heterogeneidade vão diminuindo durante o processo de maturação, ou seja, dos túbulos seminíferos até o ducto deferente. Conforme já discutido, espermatozoides localizados no túbulo seminífero apresentam pouca compactação, deixando a célula com tendência a ser mais esféricas. Dessa forma, ao se analisar em duas dimensões apresenta uma área menor. Ao contrário, espermatozoides que passaram pelo processo de compactação possuem uma conformação mais plana (achatada), conseqüentemente, possui maior área (BELETTI et al., 2005).

Os resultados do presente trabalho mostram que mesmo após a maturação epididimária ainda existem espermatozoides com alterações de cromatina, pois no canal deferente 85,7% dos espermatozoides são normais, mas 6,7 % apresentam descompactação na base e 0,4% ainda apresenta descompactação total. Faz-se necessário novos estudos para determinar se esta quantidade destes tipos de alterações pode prejudicar a fertilidade do touro.

Ao identificar as áreas descompactadas, classifica-las, observar a frequência com que elas ocorrem nas diferentes regiões do aparelho reprodutor e correlacionar com a influencia na morfologia da cabeça do espermatozoide, podemos assim compreendermos o mecanismo de compactação da cromatina. A partir daí, com o domínio do processo teremos a capacidade de correlacionar esses parâmetros com a fertilidade de touros.

7. CONCLUSÃO

Ao estudar a descompactação da cromatina em diferentes regiões do aparelho reprodutor masculino, ficou claro que a maturação epididimária é importante para a compactação da cromatina e conseqüentemente, para a morfologia final dos espermatozoides.

REFERÊNCIAS

AMANN, R. P. **Physiology and endocrinology**. In: Equine reproduction. Pennsylvania: Lea, Febiger. Cap. 77, p. 658-688, 1993

ALVES, I. P. et al. Evaluation of sperm head dimensions and chromatin integrity of epididymal sperm from domestic cats using the toluidine blue technique. **Animal reproduction science**, v. 197, p. 33-39, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.001>

AUSTIN, C. R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Australian journal of biological sciences**, v. 4, n. 4, p. 581-596, 1951.

<https://doi.org/10.1071/BI9510581>

AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C.; EINARSSON, S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 767-778, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00170-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00170-3)

BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **The Journal of cell biology**, v. 93, n. 2, p. 298-305, 1982.

<https://doi.org/10.1083/jcb.93.2.298>

BALHORN, R.; BREWER, L.; CORZETT, M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: Analysis of toroid stability using single DNA molecules. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 56, n. S2, p. 230-234, 2000.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200006\)56:2+%3C230::AID-MRD3%3E3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200006)56:2+%3C230::AID-MRD3%3E3.0.CO;2-V)

BALHORN, R. Sperm Chromatin: an overview. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. Sperm Chromatin: **Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**, USA:Springer; 2011. cap. 1 p. 3-18.

https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9_1

BANKS, W. J. Sistema reprodutor masculino. **Histologia Veterinária Aplicada. Sao Paulo: Manole**, p. 546-563, 1992.

BARTH, AD, Oko RJ. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. First edition. Ames: Iowa State University Press; 1989.

BEDFORD, J. M. The status and the state of the human epididymis. **Human Reproduction**, v. 9, n. 11, p. 2187-2199, 1994.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138416>

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Rev Brasil Reproduction Animal**, v. 37, p. 92-96, 2013.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F. A systematic approach to multispecies sperm morphometric characterization. **Analytical and quantitative cytology and histology**, v. 25, n. 2, p. 97-107, 2003.

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 morphology scienci**, v. 22, n. 2, p. 85-90, 2005.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v. 62, n. 3-4, p. 398-402, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.016>

BELETTI, M. E.; MELLO, M.L.S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Genetics**. v. 19, n.1, p.97-103, 1996.

BETTEEGOWDA A, WILKINSON MF. Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis. **Philos Trans Soc Lond B Biology Sci** 2010;365:1637–51.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0196>

CAMPOS, M. N. G.; JACOMINI, J. O.; SAMPAIO, G. S. L.; PINTO, D. A.; ALVES, B. G.; LEMOS, M. S.; BELETTI, M. E. **Chromatin condensation and morphometry of the bovine sperm head after in vitro sperm selection and capacitation**. *Journal of Applied Animal Research*, v. 41, n.1, p. 87-92, 2013

<https://doi.org/10.1080/09712119.2012.738227>

CHACUR, M. G. M.; ARAÚJO, M. C.; KRONKA, S. Anatomical, corporal and seminal characteristics of the reproductive system of Canchim breed reproductors at ages from 14 to 48 months. **Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v.9, n.1, p.21-27, 2006.

CHANG, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature**, v. 168, n. 4277, p. 697, 1951.

<https://doi.org/10.1038/168697b0>

CRUZ, R. E. S.; BELETTI, M. E.; TRAVENÇOLO, B. A. N. Using image analysis and processing for morphological characterization of bovine spermatozoa. **In: Proceedings of the X Workshop de Visão Computacional**, Uberlândia- MG., p. 270-274, 2014.

DADOUNE, J.; DEMOULIN, A. Structure and functions of the testis. **Reproduction in mammals and man, Paris, Ellipses**, p. 227-250, 1993.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. **In 'The Physiology of Reproduction'**. 2nd edn.(Eds E. Knobil and JD Neill.) pp. 189–317. 1994.

ENCISO, M. et al. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm

DNA damage. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 23-32, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.034>

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

FRASER, L.; STRZEŹEK, J. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing–thawing?. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 248-257, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.001>

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 431-444, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.023>

GAMA CAMPOS, M. N. et al. Chromatin condensation and morphometry of the bovine sperm head after in vitro sperm selection and capacitation. **Journal of applied animal research**, v. 41, n. 1, p. 87-92, 2013.

<https://doi.org/10.1080/09712119.2012.738227>

GLOVER, T. D.; NICANDER, L. Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 13, p. Suppl 13: 39, 1971.

GOLAN, R. et al. Andrology: Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. **Human reproduction**, v. 11, n. 7, p. 1457-1462, 1996.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019419>

GULFAM Ahmad, et al. **Mild induced testicular and epididymal hyperthermia alters sperm chromatin integrity in men**. Original articles: andrology 2012;97:546–53

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.025>

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7 ed, São Paulo: Manole. 513 p. 2004.

HIDALGO, M.; DORADO, J. Objective assessment of goat sperm head size by computer-assisted sperm morphometry analysis (ASMA). **Small ruminant research**, v. 87, n. 1-3, p. 108-110, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.10.006>

HOLSTEIN, A. F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 107, 2003.

<https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-107>

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 and Biophysical Research Communications*, v.193, n.3, p.1347-1354, 1993.

<https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1773>

JIANG, Man-Xi et al. Motility, progressive motility score and DNA integrity of spermatozoa from cold-preserved mouse cauda epididymis. *Zygote*, v. 25, n. 2, p. 160-167, 2017.

KANAYAMA, C. Y.; BELETTI, M. E. Avaliação computacional da compactação da cromatina e de características morfológicas da cabeça de espermatozoides de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 1, p. 94-99, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000100015>

LANGE-CONSIGLIO, A. et al. Morphometric characteristics and chromatin integrity of spermatozoa in three Italian dog breeds. *Journal of Small Animal Practice*, v. 51, n. 12, p. 624-627, 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.01001.x>

LUCIO, A. C. et al. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. *Theriogenology*, v. 86, n. 4, p. 924-933, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>

MANGIARINI, A. et al. Specific sperm defects are differentially correlated with DNA fragmentation in both normozoospermic and teratozoospermic subjects. *Andrology*, v. 1, n. 6, p. 838-844, 2013

<https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00138.x>

MARTINEZ-PASTOR et al., P. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biology Reproduction* 2005;72:316–27.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.032730>

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

<https://doi.org/10.1007/BF00493438>

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*, v. 139, n. 2, p. 287-301, 2010.

<https://doi.org/10.1530/REP-09-0281>

MORRELL, J. M. et al. Restoration of seminal plasma to stallion spermatozoa selected by colloid centrifugation increases sperm progressive motility but is detrimental to chromatin

integrity. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 345-352, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.009>

MORTIMER, S. T. CASA—practical aspects. **Journal of andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

NAGY, S. et al. Sperm chromatin structure and sperm morphology: Their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. **Theriogenology**, v. 79, n. 8, p. 1153-1161, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.011>

NAVES, C. S. et al. Avaliacao da cromatina espermatica em eqüinos com azul de Toluidina e "Acridine orange. **Bioscience Journal**, v. 20, n. 3, 2004.

O'DONNELL, L. et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine reviews**, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001.

<https://doi.org/10.1210/er.22.3.289>

OLIVA, R.; CASTILLO, J.. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. **Asian journal of andrology**, v. 13, n. 1, p. 24, 2011.

OLIVA, S. U.; RINALDO, P. A; STUMPP, T. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 419-425, 2009.

<https://doi.org/10.1038/aja.2010.65>

OLIVEIRA, . L. Z. et al. Chromatin and morphometry alterations of bovine sperm head after Percoll™ density gradient centrifugation. **Livestock science**, v. 141, n. 2-3, p. 267-271, 2011.

OSTERMEIER, G. C. et al. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 595-603, 2001.

PHETUDOMSINSUK, K. et al. Morphology and head morphometric characters of sperm in Thai native crossbred stallions. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 1, p. 41, 2008.

<https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-41>

RABELO, Rogério Elias et al. Aspectos anatômicos e sua relação com as enfermidades do prepúcio e pênis no touro. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IX, n. 18, 2012.

RAHMAN, M. S.; KWON, W. S.; PANG, M. G. Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa. **Molecular reproduction and development**, v. 84, n. 9, p. 749-759, 2017.

<https://doi.org/10.1002/mrd.22810>

RAZAVI, S. M. et al. Comprehensive functional enrichment analysis of male infertility. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15778, 2017.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-16005-0>

RODRIGUES, A. C. N.; ROCHA, J. V.; BELETTI, M. E. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo Computational analysis of chromatin condensation of rooster spermatozoa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1302-1307, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000600008>

ROOSEN-RUNGE, E. C. **The process of spermatogenesis in animals**. CUP Archive, 1977.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. Washington, WS: Current Conceptions. 1.ed. Pullman, WA , 272p, 1999.

SERRE, V.; ROBAIRE, B. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 2, p. 497-513, 1998.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod58.2.497>

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis: an overview. In: **Sperm Chromatin**. Springer, New York, NY, 2011. p. 19-44.

https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9_2

SILVA, TOMAZ DA R.; BORGES MENDES JÚNIOR, J. O.; BELETTI, M. E. Compactação da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozoides na produção de embriões in vitro utilizando touros zebuínos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 30, n. 4, 2008.

SOUZA, E. T. et al. Sperm chromatin alterations in fertile and subfertile bulls. **Reproductive biology**, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.04.001>

SRINGAM, Sarawut et al. Semen quality and chromatin condensation in domestic cat sperm during passage through the epididymis. **Kasetsart Journal - Nature Science**, v. 45, p. 46-58, 2011.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON, MJ; REECE, WO Dukes: **Fisiologia dos animais domésticos**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 603-614, 1996.

WARD, S. W.; COFFEY, D. S. Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. **Biology of reproduction**, v. 41, n. 2, p. 361-370, 1989.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod41.2.361>

WARD, W. S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 16, n. 1, p. 30-36, 2009.

ZHAO, M. et al. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 21, p. 7243-7255, 2001.

<https://doi.org/10.1128/MCB.21.21.7243-7255.2001>

