

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

STHEFANY GABRIELLY SILVA

**AVALIAÇÃO DA COMPACTAÇÃO DA CROMATINA DOS ESPERMATOZOIDES
DE CAMUNDONGOS DURANTE A PASSAGEM PELO EPIDÍDIMO**

UBERLÂNDIA-MG

2019

STHEFANY GABRIELLY SILVA

**AVALIAÇÃO DA COMPACTAÇÃO DA CROMATINA DO ESPERMATOZOIDES
DE CAMUNDONGOS DURANTE A PASSAGEM PELO EPIDÍDIMO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para obtenção
do título de Bacharel em Biomedicina na
Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Pr. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA-MG

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**AVALIAÇÃO DA COMPACTAÇÃO DA CROMATINA DO ESPERMATOZOIDES
DE CAMUNDONGOS DURANTE A PASSAGEM PELO EPIDÍDIMO**

Uberlândia, 17 de Julho de 2019.

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Prof^ª. Dr^ª. Neide Maria da Silva

Prof^ª. Dr^ª. Bellisa de Freitas Barbosa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus porque sem Ele não teria chegado até aqui.

Agradeço ao meu pai Getúlio por todo apoio, amor e confiança em toda minha vida. Agradeço a minha mãe Luciene por estar sempre ao meu lado, por acreditar que eu poderia ir além e por ter segurado minha mão quando precisei. Agradeço a minha irmã Thifany por sempre me amar e me fazer rir com suas pérolas.

Agradeço ao meu namorado Vinicius por ter permanecido ao meu lado nessa caminhada, por toda paciência e carinho.

Agradeço as minhas amigas Hemily e Karol por ter acreditado em mim, por estarem ao meu lado nos dias mais difíceis e por fazerem esses dias melhores.

Agradeço minha sogra Lilian e minha líder Moara por ter orado por mim desde quando tudo isso não passava de um sonho.

Agradeço ao Grupinho fechado por estarem ao meu lado desde do início, não só nos momentos bons, mas também nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu orientador Marcelo Beletti por todo ensinamento, pela confiança, pelo suporte que permitiu que eu pudesse estar concluindo esse trabalho.

Agradeço também a todas às pessoas que fizeram parte da minha trajetória até aqui e que me ajudaram de alguma forma.

Deleite-se no Senhor, e ele atenderá aos desejos do seu coração. Entregue o seu caminho ao Senhor; confie nele, e ele tudo fará. Salmos 37: 4 e 5

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Demonstração da organização dos túbulos e a posição da rede testicular de rato, cão e macaco*	13
Figura 2: Classificação das alterações cromatínicas*	19
Figura 3: Descompactação percentual da cromatina.	21
Figura 4: Descompactação da cromatina por região do epidídimo, classificada conforme as alterações da figura 1.	22
Figura 5: Heterogeneidade percentual das regiões do epidídimo cabeça, corpo e cauda.	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
1.1. Aparelho reprodutor masculino.....	10
1.2. Espermatogênese.....	10
1.3. Epidídimo.....	11
1.4. Transporte pelo epidídimo	13
1.5. Alterações na cromatina espermática.....	14
1.6. Análise da estrutura da cromatina espermática.....	15
1.7. Métodos de avaliação da cromatina espermática	16
1.8. Metacromasia induzida	16
3. OBJETIVOS	17
1.9. Objetivo Geral.....	17
1.10. Objetivos Específicos.....	17
4. METODOLOGIA	17
1.11. Animais experimentais.....	17
1.12. Obtenção das amostras de espermatozoides	17
1.13. Análises da cromatina espermática	18
1.13.1. Confeção de esfregaços da porção de espermatozoides	18
1.13.2. Análise computacional das imagens.....	18
1.13.3. Segmentação das cabeças dos espermatozoides.....	18
1.13.4. Classificação quanto a descompactação da cromatina	19
1.13.5. Descompactação e heterogeneidade cromatínicas médias	20
1.14. Análises estatística	20
5. RESULTADOS	20
6. . DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO	25
8. ANEXO	26
9. REFERÊNCIAS.....	27

RESUMO\

As alterações na estrutura da cromatina podem ser consideradas um problema quanto a infertilidade ou subfertilidade, essas alterações podem influenciar o desenvolvimento embrionário. Sabe-se que as cromatinas sofrem mudanças durante a espermatogênese, com auxílio da técnica de metacromasia induzida identificou-se que durante a passagem pelo epidídimo a cromatina dos espermatozoides sofre uma significativa condensação e uma diferença de descompactação da cromatina em diferentes regiões do epidídimo. Visto a importância em identificar essa descompactação e classificar as alterações de acordo com a região da cabeça descompactada e a região que se encontra no epidídimo, o trabalho teve como objetivo: avaliar a compactação cromatínica de espermatozoides de camundongo (*Mus musculus*) durante a passagem pelo epidídimo, utilizando-se a análise de imagens obtidas com a metodologia “metacromasia induzida”. Foram coletados o epidídimo de 6 camundongos, os epidídimos foram seccionados em três porções: cabeça, corpo e cauda e, em cada região foram realizadas pequenas incisões e por extravasamento do líquido epididimário foi feita a colheita dos espermatozoides. Foi realizada a fixação dos esfregaços, depois hidrólise ácida e fim corados com Azul de Toluidina. Foram capturadas imagens e microscopia de luz e sua análise foi dividida em 3 etapas: segmentação das cabeças, classificação das alterações cromatinicas e análise quantitativa da descompactação e da heterogeneidade. As alterações cromatinicas foram classificadas em: Base da cabeça descompactada, Descompactação da Região Central da Cabeça, em torno de metade da cabeça descompactada, cabeça totalmente descompactada ou quase totalmente descompactada e cabeça normal. Os resultados obtidos mostraram que a descompactação e a heterogeneidade da cromatina dos espermatozoides de camundongos são decrescentes ao longo do epidídimo.

Palavras chaves: Descompactação. Cromatina. Camundongos. Azul de Toluidina

ABSTRACT

Changes in chromatin structure may be considered a problem with infertility or subfertility, and these changes may influence embryonic development. It is known that chromatin changes during spermatogenesis, with the help of the induced metachromasia technique, identified that during the passage through the epididymis the chromatin of the spermatozooids undergoes a significant condensation and a difference of decompression of the chromatin in different regions of the epididymis. Considering the importance of identifying this decompression and classifying the changes according to the region of the decompressed head and the region that is in the epididymis, the objective of this work was to evaluate the chromatographic compaction of mouse spermatozoa (*Mus musculus*) during the passage through epididymis, using the image analysis obtained with the "metachromasia-induced" methodology. The epididymis of 6 mice were collected, and were divided into three parts: head, body and tail, and in each region small incisions were made and the spermatozoa were collected by extravasation of the epididymal fluid. The smears were fixed, then acid hydrolysed, washed in distilled water and then stained with Toluidine Blue. Images were captured by light microscopy and its analysis was divided into 3 stages: head segmentation, classification of chromatin changes and quantitative analysis of decompression and heterogeneity. Chromatin alterations were classified as: Uncompressed head base, Uncompacted central head region, about half of uncompressed head, totally decompressed or almost completely decompressed head, and normal head. The results showed that decompression and chromatin heterogeneity of mouse spermatozoa are decreasing along the epididymis.

Keywords: Decompression. Chromatin. Mice. Toluidine Blue

1. INTRODUÇÃO

Avanços recentes no tratamento da infertilidade têm utilizado micromanipulação para colocar espermatozoides obtidos do testículo ou na parte superior do epidídimo em ovócito fertilizáveis. O sucesso do tratamento levou a algum desacordo quanto ao se os espermatozoides passam por processos de maturação durante a sua passagem pelo epidídimo (GOLAN *et al.*, 1996). É importante ressaltar se há diferença na utilização de espermatozoides provenientes do epidídimo ou do ducto deferente por conta do grande avanço na reprodução assistida (FILHO; DA SILVA, 2012).

Potenciais mudanças na estrutura da cromatina espermática pode ser particularmente digno de ser considerado um problema quanto a infertilidade ou subfertilidade (UEHARA; YANAGIMACHI, 2005). Alterações na cromatina pode até mesmo serem acompanhadas por alterações epigenéticas e/ou fragmentação de DNA, as quais poderiam influenciar o desenvolvimento embrionário (BELETTI, 2013).

A cromatina dos espermatozoides sofre primeiro mudanças durante a espermatogênese. As histonas que se ligam a DNA em células somáticas e em células germinais, incluindo o estágio de espermatócitos, durante a espermiogênese, ou seja, na fase de espermátides, são substituídas, primeiro por 'proteínas de transição' e depois por protaminas (GREEN *et al.*, 1994). As protaminas, pequenas proteínas básicas contendo muita arginina, ligam-se mais firmemente ao DNA do que as histonas e isso resulta em compactação de cromatina no núcleo do espermatozoide, um processo que é chamado de condensação de cromatina. A rigidez do ajuste entre as proteínas e DNA pode ser avaliado pelo grau de exclusão do corante laranja de acridina, que se liga AO DNA. Este corante produz fluorescência verde quando ligado a ácidos nucleicos de cadeia dupla e fluorescência vermelha com ácido nucleico de cadeia simples (EVENSON *et al.*, 1991). Com esta técnica, foi demonstrado que há uma significativa porção da condensação da cromatina em espermatozoides durante a passagem dos espermatozoides através do epidídimo (YOSSEFI; OSCHRY; LEWIN, 1994).

Outro método para avaliar a compactação da cromatina é a “metacromasia induzida”, que utiliza a coloração de esfregaços de espermatozoides hidrolisados com HCl 4N e posterior coloração com azul de toluidina pH 4,0 (MELLO, 1982). Utilizando análise computacional de imagens obtidas com este método em sêmen de touro, foi possível quantificar a compactação e a heterogeneidade da cromatina de espermatozoide de touro (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005). Utilizando-se metodologia semelhante, identificou a existência de

descompactação em diferentes áreas da cabeça de espermatozoide com alterações cromatínicas, permitindo assim a classificação destas alterações de acordo com a região da cabeça do espermatozoide descompactada (SOUZA *et al.*, 2018).

2. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Aparelho reprodutor masculino

O aparelho reprodutor é formado pelo pênis, glândulas anexas, testículos e ductos excretores (CHACUR; ARAÚJO; KRONKA, 2006). O pênis é o órgão responsável por eliminar a urina e o sêmen durante o coito. A próstata, bulbo uretral e vesícula seminal são as glândulas anexas que são responsáveis pela produção da maior parte do plasma seminal. Os ductos excretores são responsáveis pela capacitação do espermatozoide e seu transporte (RABELO *et al.*, 2012). Os testículos são responsáveis pela produção dos espermatozoides, o ducto deferente possui uma camada muscular que irá conduzir os espermatozoides e o epidídimo tem como função a maturação e armazenamento dos espermatozoides (JIANG *et al.*, 2017).

1.2. Espermatogênese

A espermatogênese é o processo que ocorre nos testículos, as gônadas masculinas, em que cada espermatogônia dará origem a quatro espermatozoides e que ocorre até o final da vida do indivíduo (ROY; MATZUK, 2006).

As espermatogônias que foram formadas durante a vida fetal e estavam dormentes nos túbulos seminíferos, entram em fase de multiplicação na puberdade dando origem a muitas espermatogônias por mitoses sucessivas, que continuam pelo resto da vida (DE ARAÚJO *et al.*, 2007). Os testículos estão organizados em túbulos seminíferos, nos quais os espermatozoides são produzidos. Entre esses tubos existe tecido conjuntivo, onde se encontram as células intersticiais que secretam testosterona. Os túbulos seminíferos são constituídos pelo epitélio germinativo, onde estão as células de Sertoli, responsáveis entre outras funções pela nutrição e pela sustentação das células da linhagem germinativa, ou seja, as que irão gerar os espermatozoides (ROY; MATZUK, 2006).

Após passar pela fase de multiplicação, cada espermatogônia entra na fase de crescimento e dá origem a um espermatócito primário. Estes espermatócitos sofrerão um processo de maturação (prófase I, metáfase I, anáfase I e telófase I) que é finalizado com a

primeira divisão meiótica. Com a primeira divisão meiótica, cada espermatócito primário, que são células diplóides, dá origem a dois espermatócitos secundários. Como esta divisão é reducional cada espermatócito secundário no final do processo será uma célula haploide (n), porém com duas cromátides irmãs (DE ARAÚJO *et al.*, 2007).

Após este processo ocorre a segunda divisão da meiose dando origem às espermátides, que também são células haploides, porém com apenas uma cromátide. Após este processo ocorre a espermiogênese, processo este de diferenciação celular para formação dos gametas masculino. Durante este processo ocorre a formação do acrossomo e cauda (flagelo). Sendo que a localização do acrossomo é na parte anterior da cabeça do espermatozoide, formado pela fusão de vesículas secretadas a partir do complexo de Golgi e a cauda se forma no polo oposto da cabeça (CARRELL, 2012). É também durante a espermiogênese que ocorre a substituição de histonas por protaminas, levando a alta compactação da cromatina (GREEN *et al.*, 1994).

O processo de espermatogênese pode ser dividido em estágios (I – XII, em camundongos) que ocorrem em sincronia à medida que no epitélio seminífero as células germinativas progridem das espermatogônias até espermatócitos e, finalmente, espermátides (HESS; DE FRANÇA, 2009)

1.3. Epidídimo

Quando os espermatozoides são liberados no lúmen do túbulo seminífero (espermição), eles são transportados rapidamente para um ducto coletor comum dentro dos testículos, denominado rete testis ou rede testicular. O espermatozoide então passa por uma rede de ductos eferentes, os quais no rato estão localizados dentro do coxim gorduroso do epidídimo, e estes, por sua vez, conduzem a um único ducto altamente espiralado para formar o epidídimo. Essa estrutura, em grande parte envolvida por uma membrana externa densa sob uma camada de tecido adiposo e intimamente aplicada à superfície do testículo, é dividida em quatro partes principais: o segmento inicial, a cabeça, corpo e cauda. Em ratos, o túbulo epidídimo é de 2,2 a 2,5m de comprimento; em humanos, 600m. O ducto epididimário espiralado leva então a uma porção reta denominada ducto ou canal deferente, que se estende até a uretra (CREASY; CHAPIN, 2013).

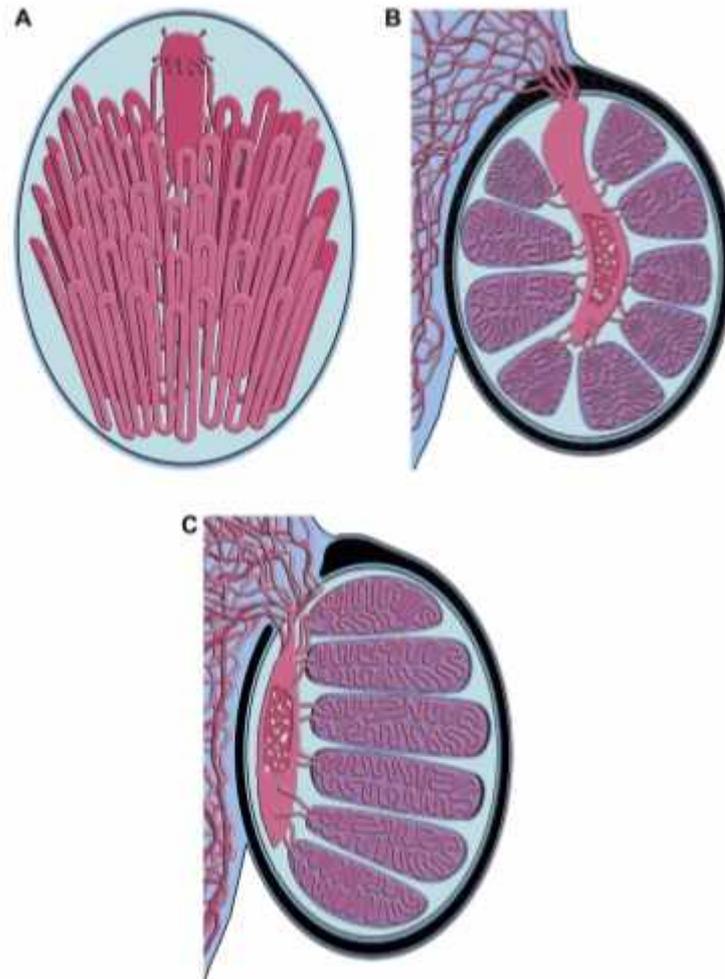
Superficialmente, o epidídimo parece ser um tecido histologicamente simples compreendendo uma série de ductos revestidos por epitélio que transportam espermatozoides do testículo para o ducto deferente. Na realidade, é surpreendentemente complexa, tanto na

diversidade estrutural de seus tipos de células epiteliais quanto no número de funções críticas que realiza na maturação e transporte de espermatozoides (CREASY; CHAPIN, 2013).

As funções do epitélio do epidídimo incluem a síntese e a secreção de uma ampla gama de proteínas e o transporte de íons e pequenas moléculas orgânicas através do epitélio para criar um ambiente luminal ligeiramente básico que é propício para a captação de proteínas nas membranas espermáticas. Assim, o epidídimo fornece o ambiente especializado necessário para a maturação progressiva dos espermatozoides à medida que eles passam do segmento inicial para a cauda do epidídimo. Durante a passagem do esperma através do epidídimo, ocorrem alterações na morfologia e metabolismo dos espermatozoides. O excesso de citoplasma na forma da gotícula citoplasmática residual é eliminado do espermatozoide, e há alterações na estrutura do acrossomo e da parte média e diferentes antígenos de superfície aparecem. Associado a esses eventos está a aquisição da habilidade de fertilizar um oócito (CREASY; CHAPIN, 2013)

A organização dos túbulos seminíferos e a posição da rede testicular varia com a espécie. No rato, o rete é posicionado em uma posição subcapsular no polo cranial do testículo e os túbulos são dispostos circunferencialmente em torno do testículo. Cada extremidade de um túbulo esvazia na rete. Não há septos fibrosos (Figura 1-A). No cão, a ponta está localizada centralmente e sai para uma posição subcapsular, correndo dentro do testículo mediastino fibroso. Os túbulos são dispostos dentro de lóbulos que são separados uns dos outros por septos do tecido conjuntivo (Figura 1-B). No macaco, a ponta está localizada ao longo do aspecto lateral do testículo, adjacente ao epidídimo. Os túbulos são dispostos em um padrão lobular separados por septos fibrosos (Figura 1-C).

Figura 1: Demonstração da organização dos túbulos e a posição da rede testicular de rato, cão e macaco*.



Fonte: CREASY e CHAPIN (2013).

*(A). No rato, o rete é posicionado em uma posição subcapsular no polo cranial do testículo e os túbulos são dispostos circunferencialmente em torno do testículo. Cada extremidade de um túbulo esvazia na rete. Não há septos fibrosos. (B). No cão, a ponta está localizada centralmente e sai para uma posição subcapsular, correndo dentro do testículo mediastino fibroso. Os túbulos são dispostos dentro de lóbulos que são separados uns dos outros por septos do tecido conjuntivo. (C). No macaco, a ponta está localizada ao longo do aspecto lateral do testículo, adjacente ao epidídimo. Os túbulos são dispostos em um padrão lobular separados por septos fibrosos.

1.4. Transporte pelo epidídimo

O ducto epididimário leva a uma porção reta denominada ducto ou canal deferente, que se estende até a uretra. Várias glândulas esvaziam suas secreções nesse ducto. Células musculares lisas circundam o epitélio, as camadas aumentam de espessura até que, no ducto deferente, há um revestimento muscular muito mais espesso. Uma rede de tecido conjuntivo frouxo, consistindo de fibroblastos e colágeno, e contendo capilares e pequenos nervos, separa

as convoluções adjacentes do ducto e separa as convoluções em lóbulos que se juntam para formar o órgão inteiro (CREASY; CHAPIN, 2013).

Quando os espermatozoides deixam os testículos, eles são incapazes de fertilização e são pouco móveis. Eles são transportados para fora do testículo em fluido tubular seminífero que é secretado pela célula de Sertoli. A maior parte do líquido (até 96%) e muitas das proteínas do plasma testicular são reabsorvidas pelos testículos, rete testis, pelos ductos eferentes e pelo segmento inicial do epidídimo. Durante a passagem pelo epidídimo, os espermatozoides são banhados nas secreções das células do epitélio epididimal e, portanto, maduros, adquirem mobilidade progressiva e capacidade de se capacitar e fertilizar um oócito. A maturação envolve o remodelamento extensivo da membrana plasmática do espermatozoide, com a ligação e incorporação de proteínas sintetizadas pelo epitélio epididimal. Uma vez na cauda do epidídimo, os espermatozoides são armazenados por dias (humanos) ou semanas (roedores) antes de serem liberados pela ejaculação através do ducto deferente para a uretra peniana (CREASY; CHAPIN, 2013)

1.5. Alterações na cromatina espermática

Cromatina é um complexo formado por material genético (DNA e RNA), ligados a proteínas, sendo as principais as histonas, presente nas células dos eucariontes. O termo “cromo” significa cor. Por isso a cromatina recebe esse nome, pois fica colorida, corada fortemente ao aplicarmos alguns corantes nas células (TWIGG; IRVINE; AITKEN, 1998). Os espermatozoides, mesmo sendo células eucariontes, possuem cromatina diferente das células somáticas, pois é formada por pequena quantidade de histonas e grande quantidade de protamina, o que leva a sua compactação extrema (GREEN *et al.*, 1994). Há estudos que mostram que o processo de condensação de DNA pode não ser completo, ocasionando uma menor estabilidade nuclear e aumento da susceptibilidade para a desnaturação do complexo DNA-proteína, o que tem sido relacionado com infertilidade em vários animais e no homem. Essa instabilidade nuclear poderia causar danos no DNA, e esses poderiam persistir durante o desenvolvimento embrionário, induzindo apoptose e fragmentação do embrião no início do desenvolvimento ou levando à morte mais tardiamente (BELETTI, 2013; TWIGG; IRVINE; AITKEN, 1998).

De acordo com a intensidade da alteração na cromatina, pode ou não ocorrer interferência na fertilidade do macho de diferentes formas. Espermatozoides com alterações na forma da cabeça, seriam espermatozoides com graves alterações cromatínicas, e

consequentemente alterações na sua hidrodinâmica, levando a uma motilidade imprópria, interferindo no processo de fecundação (BELETTI, 2013; GREEN *et al.*, 1994). Alterações espermáticas menos graves podem não interferir na motilidade e, consequentemente, no processo de fecundação, porém possuiriam danos no DNA que impossibilitariam a união dos pró-núcleos masculino e feminino e inviabilizariam o zigoto. Alterações ainda mais leves poderiam não interferir na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial, mas poderiam interferir em etapas posteriores do desenvolvimento embrionário, o que poderia levar à morte embrionária. Ainda, em situações menos frequentes, a gestação poderia chegar ao fim, mas os neonatos possuiriam alterações genéticas de diversos tipos e intensidades (BELETTI, 2013).

1.6. Análise da estrutura da cromatina espermática

Alguns estudos têm sugerido que a integridade da cromatina espermática é de extrema importância para a fertilidade masculina (LI *et al.*, 2006). Sendo que a estrutura da cromatina do espermatozoide poderá ser medida por uma variedade de métodos, tais como, citometria de fluxo com o tratamento pós ensaio com ácido e coloração dos espermatozoides (PASQUALOTTO, 2007).

Estes testes avaliam o grau de fragmentação de DNA que ocorre após tratamento químico do complexo DNA-cromatina dos espermatozoides e que podem refletir indiretamente a integridade do DNA dos espermatozoides. DNA fragmentado em excesso raramente ocorre em homens férteis, mas pode ser encontrado em 5% dos homens inférteis com qualidade seminal normal e 25% dos homens inférteis com análise seminal alterada. Este teste pode detectar infertilidade que porventura não tenha sido diagnosticada em uma análise seminal de rotina. As causas de fragmentação do DNA podem ser: hiperemia, uso de cigarros, algumas patologias, poluição atmosférica, infecções e varicocele (LI *et al.*, 2006).

Acredita-se que os espermatozoides oriundos de testículo de homens azoospermicos, podem apresentar uma fragmentação do DNA menor quando comparados aos presentes no epidídimo, quando de fato há comprovação de azoospermia obstrutiva. Isso pode ser explicado na liberação das células de Sertoli, quando ocorre uma fragmentação do DNA do espermatozoide. Estudo comprovou que espermatozoides retirados do epidídimo resultam em taxas maiores de gravidez se comparado aos espermatozoides do testículo (PASQUALOTTO. *et al.*, 2005).

Acredita-se também que pacientes com oligozoospermia grave (concentração inferior a 1×10^6 espermatozoides/mL) talvez devam ser submetidos a técnicas de extração ou punção de espermatozoides do testículo e injeção intracitoplasmática de espermatozoides e não usar os

espermatozoides do ejaculado, pela presença de DNA fragmentado nos espermatozoides do ejaculado em maior frequência do que no testículo (LI *et al.*, 2006).

1.7. Métodos de avaliação da cromatina espermática

A análise da estrutura da cromatina do espermatozoide, vem sendo usada para avaliar *in vitro* a susceptibilidade do DNA à desnaturação. Este método consta de um tratamento térmico ou ácido, seguido de coloração com laranja de acridina (LA) e avaliação em citômetro de fluxo (EVENSON, 2016). Por outro lado, falhas no complexo DNA-proteína podem ser investigadas por técnicas mais simples, como por exemplo coloração de esfregaço de sêmen com laranja de acridina (TEJADA *et al.*, 1984) e metacromasia induzida com azul de toluidina (AT)(MELLO, 1982).

1.8. Metacromasia induzida

O método denominado de metacromasia induzida é baseado no tratamento ácido (HCl 4N a 25 °C) seguido de coloração com AT a pH 4,0, na qual há uma larga variedade de tonalidades expressadas conforme a disponibilidade e proximidade de grupos fosfato do DNA não ligados à proteína, aptos a ligarem moléculas do corante. Neste método, devido ao fenômeno da metacromasia, os espermatozoides com cromatina normal (compactada) apresentam coloração variando de verde a azul claro e os com descompactação de cromatina apresentam coloração variando de azul escuro a violeta (magenta) (KANAYAMA, 2010). Por sua vez, o teste com fluorocromo LA é um método citotóxico que permite a diferenciação entre fita dupla e simples do DNA devido às propriedades metacromáticas desse corante (KAMIMURA; JACOMINI; BELETTI, 2010), cujas moléculas se intercalam entre as bases nitrogenadas do DNA nativo não desnaturado (fluorescência verde-amarelada) ou se ligam aos grupos fosfato no DNA desnaturado (fluorescência vermelho-alaranjada)(MELLO, 1982)

A metacromasia induzida é mais barata, pois dispensa o uso de microscopia de fluorescência. Como a avaliação visual de esfregaços de sêmen é de certa forma subjetiva, Beletti *et al.* (2005) desenvolveram software para avaliação de esfregaços corados com AT, utilizando-se imagens digitais capturadas em microscópio de luz acoplado à câmera ligada a microcomputador. Isto possibilitou uma avaliação mais objetiva, permitindo inclusive caracterizar diferentes tipos de alterações das cromatinas (SOUZA *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Objetivou-se com o presente estudo avaliar a compactação cromatínica de espermatozoides de camundongo (*Mus musculus*) durante a passagem pelo epidídimo, utilizando-se a análise de imagens obtidas com a metodologia “metacromasia induzida”.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a descompactação média da cromatina das cabeças dos espermatozoides durante o trânsito pelo epidídimo;
- Avaliar a heterogeneidade média da cromatina das cabeças dos espermatozoides durante o trânsito pelo epidídimo.
- Avaliar a descompactação da cromatina segundo a região da cabeça do espermatozoide durante o trânsito pelo epidídimo;

4. METODOLOGIA

4.3 Animais experimentais

Foram utilizados 6 camundongos machos da linhagem C57BL/6 de 8 semanas de idade, pesando aproximadamente 22 gramas, obtidos da rede de bioterismo de roedores da ufu (REBIR-UFU) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os camundongos foram mantidos em condições livres de patógenos específicos. Segue em anexo o certificado do REBIR-UFU.

4.4 Obtenção das amostras de espermatozoides

Os camundongos foram anestesiados com Cetamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil) e Xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) pela via intraperitoneal e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical para a realização da colheita dos epidídimos. Após a colheita, os epidídimos foram seccionados em três porções: cabeça, corpo e cauda e, nestas regiões foram realizadas pequenas incisões e depois foram suavemente pressionadas para a colheita dos espermatozoides por extravasamento do líquido epididimário (Adaptado de KAABI *et al.*, 2003).

4.5 Análises da cromatina espermática

4.5.1 Confeção de esfregaços da porção de espermatozoides

Os esfregaços foram 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. Estes esfregaços passaram por hidrólise ácida em ácido clorídrico 4N por 5 minutos e lavados em água destilada. Após secagem, os esfregaços foram corados colocando-se uma gota de solução de Azul de Toluidina (AT) 0,025%, em tampão ácido cítrico-fosfato (tampão McIlvaine) pH 4,0. Imediatamente após ser colocado a gota de corante, foi colocada a lamínula sobre a lâmina, retirado o excesso de corante com papel toalha e após 3 minutos foram capturadas imagens em microscopia de luz (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005). Para isso foi utilizado microscópio de luz Leica DM500 acoplado a câmera Leica ICC50 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA), utilizando-se objetiva de 100x (imersão).

4.5.2 Análise computacional das imagens

A análise de imagens computadorizadas foi dividida em três etapas: segmentação das cabeças, classificação das alterações cromatínicas e análise quantitativa da descompactação e heterogeneidade da cromatina. Para a segmentação das cabeças e classificação das alterações cromatínicas segundo sua localização foi utilizado um *software* desenvolvido em ambiente de programação *MATLAB* e executado pelo programa *Octave* (HIRAIWA et al., 2015). Já para avaliação da descompactação e heterogeneidade médias da cromatina foi utilizado *software* desenvolvido em ambiente de programação *SCILAB*.

4.5.3 Segmentação das cabeças dos espermatozoides

As imagens digitais foram primeiramente segmentadas por limiarização (*thresholding*) para a obtenção de uma imagem chamada de máscara. A máscara é uma imagem que possui apenas dois tons de cores, o preto e o 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. Assim, essa máscara permitiu separar cada cabeça de espermatozoide contido nas imagens originalmente capturadas no microscópio. Com isso, é possível determinar o número e valores de pixels e, conseqüentemente, identificar os tipos de alterações da cromatina (CRUZ; BELETTI; TRAVENÇOLO, 2014)

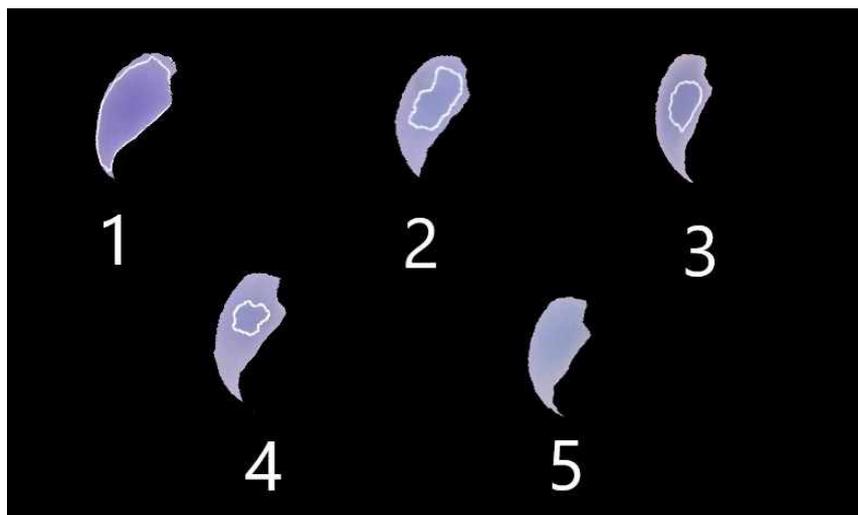
4.5.4 Classificação quanto a descompactação da cromatina

O *software* selecionou automaticamente 6 cabeças com cromatina mais compactada (mais claras) dentre todas as cabeças segmentadas de um mesmo animal. A média de *pixels* dessas 6 cabeças foram consideradas como valor padrão desta amostra e a região que ultrapassou essa média foi delimitada pelo *software* por meio de demarcação de linhas brancas e foi considerada como área de descompactação cromatínica como foi demonstrada na Figura 2. Essas regiões delimitadas são visualmente identificadas por se apresentarem mais escuras (menor intensidade de compactação).

Assim, classes de alterações cromatínicas foram propostas de acordo com a localização da descompactação da cromatina na cabeça do espermatozoide, baseando-se nos trabalhos de Souza *et al*, 2018. Com essa classificação foi possível compreender a distribuição espacial da compactação da cromatina espermática durante o trânsito do espermatozoide de camundongos através do epidídimo, ou seja, se a compactação é homogênea ou se o processo de compactação tem uma sequência específica.

As alterações cromatínicas foram classificadas em: Base da cabeça descompactada, descompactação da Região Central da Cabeça, em torno de metade da cabeça descompactada, cabeça totalmente descompactada ou quase totalmente descompactada e cabeça normal (com ausência de descompactação), ou seja, totalmente compactado.

Figura 2: Classificação das alterações cromatínicas*



Fonte: Autoria própria (2019).

*1). Totalmente descompactada, 2). Metade descompactada, 3). Base descompactada, 4). Região central descompactada e 5). Sem descompactação;

4.5.5 Descompactação e heterogeneidade cromatínicas médias

Para a análise da descompactação e heterogeneidade médias da cromatina, as imagens das cabeças espermáticas primeiramente são transformadas em tons de cinza e o valor médio das cabeças-padrão para essas análises foram realizadas de maneira semelhante ao descrito anteriormente: serão selecionadas automaticamente pelo *software* as 6 cabeças mais claras (mais compactadas) e homogêneas da amostra e a média dos valores de pixel dessas cabeças foi considerada como o valor de referência da coloração normal dos espermatozoides (cabeças-padrão) deste animal. Posteriormente, foi determinada a diferença entre o valor médio de *pixels* das cabeças-padrão e o valor médio de *pixels* de cada cabeça avaliada da amostra, incluindo as cabeças-padrão. Essa diferença foi transformada em porcentagem do valor médio das cabeças padronizadas e caracteriza quantitativamente a intensidade da descompactação da cabeça avaliada, ou seja, expressará em percentual quanto a cabeça em análise é mais descompactada em relação às cabeças-padrão.

O coeficiente de variação dos níveis de cinza de cada cabeça da amostra também foi calculado e foi utilizado como caracterização quantitativa de heterogeneidade da cromatina desta cabeça. O coeficiente de variação determinará em percentual quanto a variação do valor médio de *pixels* (desvio-padrão) de uma determinada cabeça representa da média dos valores de pixels dessa mesma cabeça, ou seja, a variação da intensidade da descompactação na cabeça do espermatozoide (Adaptado de BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005).

4.6 Análises estatística

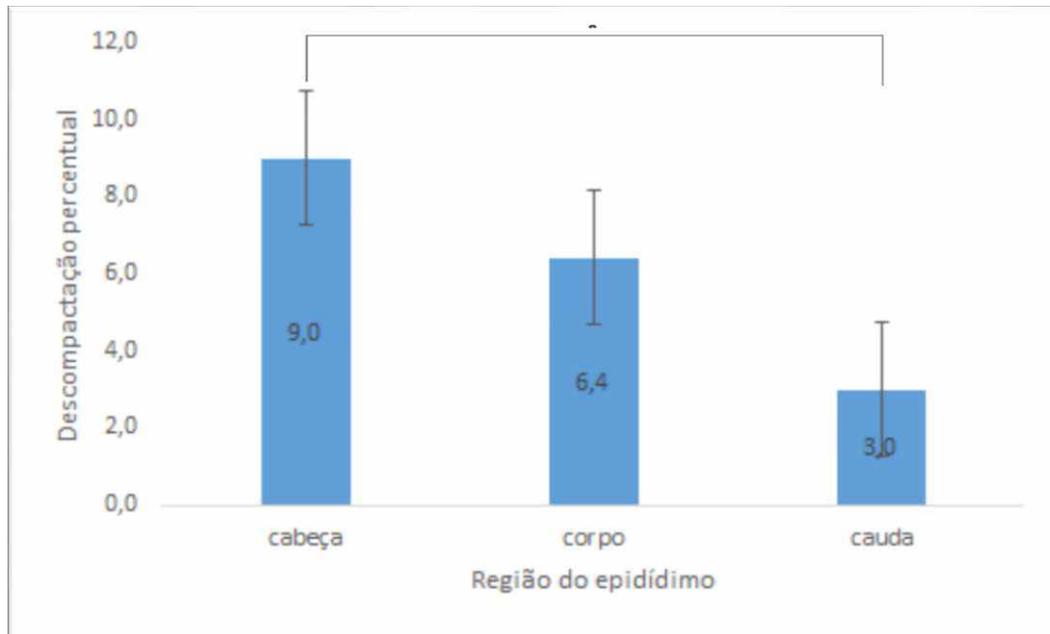
Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados tinham distribuição normal. Uma vez isso confirmado, os dados foram avaliados por teste t pareado, o qual comparou a média das diferenças entre cada região (cabeça, corpo e cauda) de coleta de espermatozoide. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$

5. RESULTADOS

Os espermatozoides que foram coletados de diferentes áreas do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) do camundongo foram analisados em relação aos seguintes parâmetros: descompactação da cromatina (Figura 3), descompactação da cromatina por região do epidídimo (Figura 4) e heterogeneidade da cromatina (Figura 5).

Na figura 3 podemos observar que a descompactação é decrescente quando se compara cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Na cabeça foi de 9,0%, no corpo foi de 6,4 % e na cauda foi de 3,0 %. Havendo diferença significativa quando comparado a cabeça e a cauda ($P \leq 0,05$).

Figura 3: Descompactação percentual da cromatina.

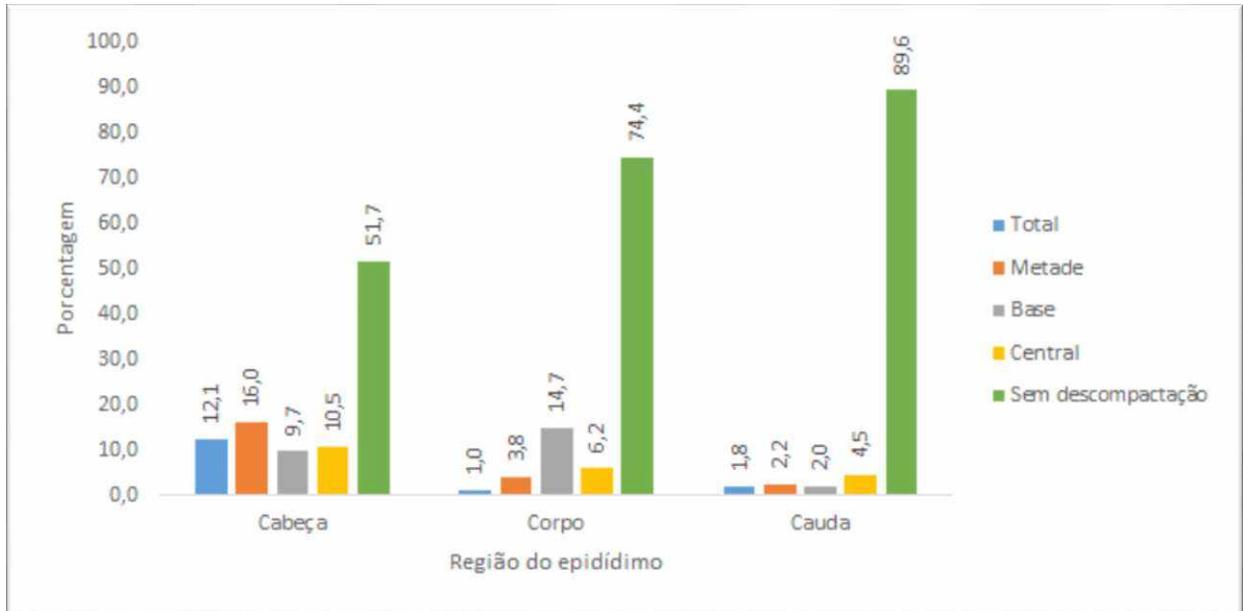


Fonte: Dados da pesquisa.

Valores estatisticamente significantes estão representados pelo símbolo * ($p \leq 0,05$).

Na figura 4, vemos que na região da cabeça 12,1% dos espermatozoides estavam totalmente descompactados, 16% apresentaram metade da região descompactada, 9,7% apresentaram somente a base descompactada, 10,5% apresentaram região central descompactada e 51,7% sem descompactação. Na região do corpo 1,0% dos espermatozoides estavam totalmente descompactados, 3,8% apresentaram metade da região descompactada, 14,7% apresentaram somente a base descompactada, 6,2% apresentaram região central descompactada e 74,4% sem descompactação. Na cauda 1,8% dos espermatozoides estavam totalmente descompactados, 2,2% apresentaram metade da região descompactada, 2,0% apresentaram somente a base descompactada, 4,5% apresentaram região central descompactada e 89,6 sem descompactação.

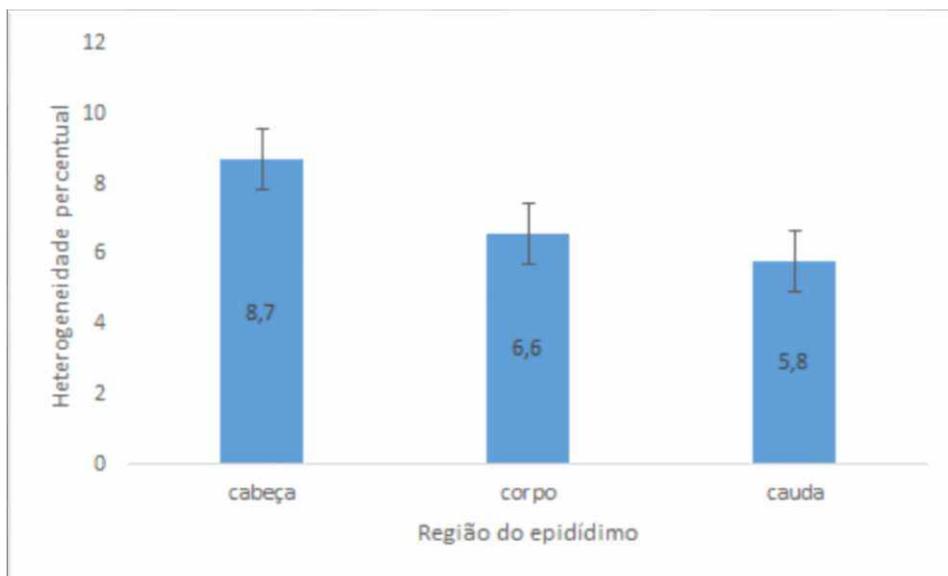
Figura 4: Descompactação da cromatina por região do epidídimo, classificada conforme as alterações da figura 1.



Fonte: Dados da pesquisa.

Na figura 5 podemos observar que a heterogeneidade é decrescente, sendo que a heterogeneidade na cabeça foi de 8,7, no corpo foi de 6,6 e na cauda 5,8. Ou seja, conforme ocorre o processo de maturação a heterogeneidade vai diminuindo.

Figura 5: Heterogeneidade percentual das regiões do epidídimo cabeça, corpo e cauda



Fonte: Dados da pesquisa.

6. DISCUSSÃO

Para que haja proteção do DNA do espermatozoide até o momento de fertilização, o DNA é extremamente empacotado durante a maturação espermática (WARD; COFFEY, 1989). Podemos relacionar com a fertilização e o desenvolvimento embrionário, ou seja, êxito reprodutivo, a integridade do genoma paterno (LUCIO *et al.*, 2016) Um estudo realizado observando o tempo de transito do espermatozoide no epidídimo concluiu que pode haver alterações na capacidade fértil dos espermatozoides. Quando há um atraso no tempo de trânsito do espermatozoide no epidídimo não foi observado alterações, porém quando esse tempo é acelerado a fertilidade fica comprometida. Portanto, tempo que o espermatozoide fica no epidídimo é um processo importante para adquirir capacidade fértil (LIMA, 2013). Outro estudo realizado com medicamento para calvície causou mudanças morfológicas e funcionais do epidídimo e na função espermática, também levando a uma redução nos parâmetros de fertilidade (GARCIA *et al.*, 2012). É sabido que muitas modificações são realizadas no espermatozoide durante sua passagem no epidídimo e provavelmente estas alterações de fertilidade descritas nestes dois trabalhos sejam porque estas modificações não tenham sido satisfatórias durante o trânsito epididimário. Uma das modificações que o espermatozoide sofre durante o trânsito epididimário pode ser o final do processo de compactação iniciado na espermiogênese. Portanto, é de suma importância estudos que possibilitem detalhar o processo de compactação da cromatina ao longo do epidídimo e suas consequências em possíveis anomalias espermáticas, para que haja um maior entendimento dos mecanismos associados a fertilidade masculina.

O presente trabalho demonstrou que a compactação da cromatina se intensifica durante o trânsito epididimário em camundongos. Consequentemente, também seria esperado que a heterogeneidade da cromatina espermática também diminuísse concomitantemente com o aumento da compactação. Isso foi de fato confirmado por este trabalho. Estudo realizado por Martins (2018) com espermatozoides de touros mostrou que a descompactação e a heterogeneidade são decrescentes ao longo do trato reprodutivo, ou seja, quanto mais próximo da cauda do epidídimo mais compactados e menos heterogêneos são as cabeças dos espermatozoides fortalecendo os resultados obtidos no presente estudo (figura 2 e 4). Em outros estudos a descompactação e heterogeneidade da cromatina foram associados com taxas reduzidas de produção de blastocistos (LÚCIO *et al.* 2016) e também em maiores proporções em amostras de sêmen de touros subfêrteis (SOUZA *et al.*, 2018)

No presente trabalho, quando se avaliou a compactação nas diferentes regiões da cabeça do espermatozoide percebeu-se que provavelmente aqueles que estavam totalmente descompactados se tornaram metade descompactado, depois somente a base descompactada, depois somente a região central descompactada e enfim, totalmente compactados (Figura 3). De acordo com os resultados obtidos podemos inferir que a compactação se dá do ápice para a base, da periferia para o centro e depois da região de inserção do flagelo para o centro e finalmente o centro é compactado. Ao analisar os tipos de descompactação da cromatina dos espermatozoides de touro de acordo com a localização ao longo do trato reprodutivo, Martins (2018) inferiu que a compactação da cromatina espermática inicialmente é nas bordas laterais, depois região apical, depois região central e por fim na região basal. Portanto, em camundongos a sequência de compactação da cromatina espermática é diferente da encontrada em touros.

Ao analisar a heterogeneidade e as áreas de descompactação, classificando e observando como elas ocorrem em diferentes regiões do epidídimo, podemos assim melhor compreender o mecanismo de compactação da cromatina em camundongos. Faz se necessários novos estudos para poder correlacionar esses parâmetros com a fertilidade e assim contribuir para o avanço na reprodução assistida.

7. CONCLUSÃO

Ao estudar a descompactação da cromatina e a heterogeneidade durante a passagem pelo epidídimo, ficou claro que a passagem do espermatozoide pelo epidídimo é importante para a compactação cromatínica em espermatozoides de camundongos.

8. ANEXO



Comissão de Ética na Utilização de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da compactação da cromatina espermática durante o trânsito do espermatozoide através do epidídimo de camundongos”, protocolo nº 022/18, sob a responsabilidade de **Marcelo Emílio Beletti** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da

Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE

UBERLÂNDIA, em reunião **04 de Maio de 2018**.

(We certify that the project entitled “Avaliação da compactação da cromatina espermática durante o trânsito do espermatozoide através do epidídimo de camundongos”, protocol 022/18, under the responsibility of Marcelo Emílio Beletti - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of May 04th, 2018).

Vigência do Projeto	Início: 01/06/2018 Término: 31/03/2019
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Mus musculus – camundongo C57BL/6
Número de animais	8
Peso / Idade	22 g / 8 semanas
Sexo	Macho e Fêmea
Origem / Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU (CBEA)
Local onde será mantido o animal:	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU (CBEA)

Uberlândia, 07 de maio de 2018.

9. REFERÊNCIAS

- BELETTI, M. E. Cromatina espermática : quebrando paradigmas. *Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte*, v. 37, n. 2, p. 92-96, 2013.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. DA F.; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric Features and Chromatin Condensation Abnormalities Evaluated By Toluidine Blue Staining in Bull Spermatozoa*. *Braz. J. morphol. Sci*, v. 22, n. 2, p. 85–90, 2005.
- CARRELL, D. T. Epigenetics of the male gamete. *Fertility and Sterility*. [s.l.], v. 97, n. 2, p.267-274, 2012
- CHACUR, M. G. M.; ARAÚJO, M. C.; KRONKA, S. Características Seminais, Corpóreas E Anatômicas Do Aparelho Reprodutor De Reprodutores Da Raça Canchim Aos 14 E 48 Meses De Idade. *Arquivo Ciência Veterinária Zoologia da Unipar*, v. 9, n. 1, p. 21–27, 2006.
- CREASY, D.; CHAPIN, R. Male Reproductive System. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. [S.l.], p. 2493-2598, 2013.
- CRUZ, R. E. S. DA; BELETTI, M. E.; TRAVENÇOLO, B. A. N. Using image analysis and processing for morphological characterization of bovine spermatozoa. *Proceedings of the X Workshop de Visão Computacional*, [s.l.], p. 270–274, 2014.
- DE ARAÚJO, C. H. M. *et al.* Gametogênese: Estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana. *Medicina*. [s.l.], v. 40, n. 4, p. 551-558, 2007
- EVENSON, D. P. *et al.* Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reproductive Toxicology*, v. 5, n. 2, p. 115-125, jan. 1991.
- EVENSON, D. P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, [s.l.], v. 169, p. 56-75, 2016.
- FILHO, A. C. M.; DA SILVA, L. D. M. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. *Acta Veterinaria Brasilica*. [s.l.], v. 6, n. 1, p. 1-8 , 2012

GARCIA, P. V. *et al.* Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. *Fertility and Sterility*, [s.l.], v. 97, n. 6, p. 1444-1451 2012.

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, 1 jul. 1996.

GREEN, G. R. *et al.* Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins. *Molecular Reproduction and Development*, [s.l.], v. 37, n. 3, p. 255-263, 1994.

HESS, R. A.; DE FRANCA, L. R. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. [s.l.], p. 1-15, 2009.

HIRAIWA, S. H. Classificação das alterações cromatínicas de espermatozoides bovinos e sua correlação com a eficiência na produção in vitro de embriões. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

JIANG, M. X. *et al.* Motility, progressive motility score and DNA integrity of spermatozoa from cold-preserved mouse cauda epididymis. *Zygote*, [s.l.], v. 25, n. 2, p. 160-167, 2017.

KAABI, M. *et al.* Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, [s.l.], v. 60, n. 7, p. 1249-1259, 1 out. 2003.

KAMIMURA, C. D. F.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Alterações de cromatina em espermatozoides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado de acridina. *Ciência e Agrotecnologia*, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 212-219, 2010.

KANAYAMA, C. Y. Testicular temperature rise and its influence on compacting chromatin and sperm morphometry in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

LI, Z. *et al.* Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, [s.l.], v. 23, n. 9-10, p. 367-376, 2006.

LIMA, G. D. de A. Fertilidade E Morfofisiologia Epididimária De Ratos Wistar Submetidos a Ingestão De Arsenato E Arsenito De Sódio. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Análises quantitativas e moleculares do Genoma; Biologia das células e dos tecidos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

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*, [s.l.], v. 86, n. 4, p. 924-933, 2016.

MARTINS, Muller Carrara. Avaliação da compactação de cromatina durante a maturação epididimária do espermatozoide de touro. 2018. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

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

PASQUALOTTO, F. F. *et al.* Etiology-specific outcomes of intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients. *Fertility and Sterility*, [s.l.], v. 83, n. 3, p. 606-611, 2005.

PASQUALOTTO, F. F. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, [s.l.], v. 29, n. 2, p. 103-112, 2007.

RABELO, R. E. *et al.* Aspectos anatômicos e sua relação com as enfermidades do prepúcio e pênis no touro. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, [s.l.], v. 9, n. 18, p. 1-24, 2012.

ROY, A.; MATZUK, M. M. Deconstructing mammalian reproduction: using knockouts to define fertility pathways. *Reproduction*, [s.l.], v. 131, n. 2, p.207-219, 2006.

SOUZA, E. T. *et al.* Sperm chromatin alterations in fertile and subfertile bulls. *Reproductive Biology*, v. 18, n. 2, p. 177–181, 2018.

TEJADA, R. I. *et al.* A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertility and Sterility*, [s.l.], v. 42, n. 1, p.87-91, 1984.

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

UEHARA, T.; YANAGIMACHI, R. Behavior of Nuclei of Testicular, Caput and Cauda Epididymal Spermatozoa Injected into Hamster Eggs. *Biology of Reproduction*, [s.l.], v. 16, n. 3, p.315-321, 1 abr. 1977.

WARD, W. S.; COFFEY, D. S. Identification of a Sperm Nuclear A Sperm DNA Anchorl Annulus : *Biology of reproduction*, [s.l.], v. 41, p. 361-370, 1989.

YOSSEFI, S.; OSCHRY, Y.; LEWIN, L. M. Chromatin condensation in hamster sperm: A flow cytometric investigation. *Molecular Reproduction and Development*, [s.l.], v. 37, n. 1, p.93-98,1994.