

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ALEXSANDRA ALVES BEZERRA MARTINS

AVALIAÇÃO DA COMPACTAÇÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA DURANTE O  
TRÂNSITO DO ESPERMATOZOIDE ATRAVÉS DO EPIDÍDIMO DE CAMUNDONGOS

Uberlândia - MG

2019

ALEXSANDRA ALVES BEZERRA MARTINS

AVALIAÇÃO DA COMPACTAÇÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA DURANTE O  
TRÂNSITO DO ESPERMATOZOIDE ATRAVÉS DO EPIDÍDIMO DE CAMUNDONGOS

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

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Uberlândia - MG

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M386 2019	<p>Martins, Alexsandra Alves Bezerra, 1984-</p> <p>Avaliação da compactação da cromatina espermática durante o trânsito do espermatozoide através do epidídimo de camundongos [ recurso eletrônico] / Alexsandra Alves Bezerra Martins. - 2019.</p> <p>Orientador: Marcelo Emílio Beletti.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias.</p> <p>Modo de acesso: Internet.</p> <p>Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2234">http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2234</a></p> <p>Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>I . Veterinária. I. Beletti, Marcelo Emílio, 1964-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 619</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

## ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE Mestrado Acadêmico nº PPGCV/015/2019				
Data:	30 de julho de 2019	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	11:20
Matrícula do Discente:	11712MEV001				
Nome do Discente:	ALEXSANDRA ALVES BEZERRA MARTINS				
Título do Trabalho:	AVALIAÇÃO DA COMPACTAÇÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA DURANTE O TRÂNSITO DO ESPERMATOZOIDE ATRAVÉS DO EPIDÍDIMO DE CAMUNDONGOS				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	FATORES AMBIENTAIS E NUTRICIONAIS QUE AFETAM A EFICIÊNCIA PRODUTIVA E REPRODUTIVA DE ANIMAIS DE INTERESSE ZOOTÉCNICO				

Reuniu-se na Sala 236, Bloco 2B, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Rosiane Nascimento Alves - Faculdade Pitágoras; Ricardo Tomaz da Silva - Faculdade Presidente Antônio Carlos de Uberlândia; Marcelo Emílio Beletti orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. Marcelo Emílio Beletti, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/07/2019, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rosiane Nascimento Alves, Técnico(a) de Laboratório**, em 30/07/2019, às 11:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Tomaz da Silva, Usuário Externo**, em 09/08/2019, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1390047** e o código CRC **7DC5917D**.

*Aos meus pais Alexandre e Ivone, ao meu irmão Alexandre Júnior e ao meu marido Peterson Augusto pelo apoio incondicional nos momentos mais adversos ao longo desta trajetória. Em especial, à minha filha Bárbara, inspiração das minhas batalhas e razão de todas as minhas conquistas.*

*Com amor, dedico!*

## AGRADECIMENTOS

*A **Deus** pela permissão de poder concluir esta etapa importante da minha vida acadêmica.*

*À **Universidade Federal de Uberlândia**, instituição responsável por toda minha formação acadêmica. Com muito carinho e gratidão a chamo de “minha casa”.*

*Ao meu professor e orientador **Dr. Marcelo Emílio Beletti** por ter estado presente em todos os momentos que precisei de auxílio e principalmente, por não ter desistido de mim. Você é um exemplo de dedicação à pesquisa, sobretudo, pelo respeito dispensados aos alunos.*

*À **Dra. Rosiane Nascimento Alves** pelo carinho e disposição ao aceitar o nosso convite. Sua ajuda foi essencial para a conclusão deste trabalho.*

*Ao **Dr. Ricardo Tomaz da Silva** pela consideração ao aceitar prontamente participar desta banca.*

*Ao professor **Dr. José Octávio Jacomini** por todos os ensinamentos em sala de aula. A sua paixão pela Reprodução é contagiante!*

*À **Rede de Biotérios de Roedores da UFU**, que contribuiu para a realização deste trabalho.*

*Ao **laboratório Biologia da Reprodução** onde foi realizado parte dos experimentos com a colaboração das alunas **Luiza e Stefany**.*

*“Prezado Professor:*

*Sou sobrevivente de um campo de concentração.*

*Meus olhos viram o que nenhum homem deveria ver.*

*Câmaras de gás construídas por engenheiros formados.*

*Crianças envenenadas por médicos diplomados.*

*Recém-nascidos mortos por enfermeiras treinadas.*

*Mulheres e bebês fuzilados e queimados por graduados de colégios e universidades.*

*Assim, tenho minhas suspeitas sobre a Educação.*

*Meu pedido é: ajude seus alunos a tornarem-se humanos.*

*Seus esforços nunca deverão produzir monstros treinados ou psicopatas hábeis.*

*Ler, escrever e saber aritmética só são importantes se fizerem nossas crianças mais humanas.”*

*(Texto encontrado após a Segunda Guerra Mundial num campo de concentração nazista).*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Fotomicrografias representativas de cabeças de espermatozoides de camundongos C57BL/6 com diferentes regiões da cabeça pouco compactadas, identificadas pela análise de imagem computacional de esfregaços corados com azul de toluidina. Baixa compactação total (1); Baixa compactação na metade basal (2); Baixa compactação na base (3); Baixa compactação na região central (4), Compactação total (5).....25
- Figura 2.** Porcentagens de espermatozoides, classificados conforme a região da cabeça espermática com baixa compactação da cromatina, encontradas em amostras de sêmen de camundongos C57BL/6 colhidas da cabeça, corpo e cauda do epidídimo e avaliadas por análise de imagem computacional de esfregaços corados com azul de toluidina .....26
- Figura 3.** Descompactação percentual (A) e heterogeneidade percentual (B) médias da cromatina de espermatozoides de camundongos C57BL/6 colhidos das regiões da cabeça, corpo e cauda do epidídimo. \*Diferença estatística significativa entre as regiões experimentais ( $p < 0,05$ ).....27
- Figura 4.** Porcentagens de espermatozoides, classificados conforme os níveis de baixa compactação cromatínica, encontradas em amostras de sêmen de camundongos C57BL/6 colhidas da cabeça e cauda do epidídimo e avaliados pela análise visual de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.....28
- Figura 5.** Eletromicrografia representativa da cabeça de espermatozoide de camundongo C57BL/6 indicando três pontos claros (setas), classificada no nível 1.....29
- Figura 6.** Eletromicrografia representativa da cabeça de espermatozoide de camundongo C57BL/6 indicando uma pequena região clara (seta), classificada no nível 1.....30
- Figura 7.** Eletromicrografia representativa da cabeça de espermatozoide de camundongo C57BL/6 indicando pontos claros (setas) e pequena área mais clara (cabeça de seta), classificada no nível 2. **B:** detalhe de **A**.....31

<b>Figura 8.</b> Eletromicrografia representativa da cabeça de espermatozoide de camundongo C57BL/6 indicando pontos claros (mais de oito pontos claros - setas), classificada no nível 3.....	32
<b>Figura 9.</b> Eletromicrografia representativa da cabeça de espermatozoide de camundongo C57BL/6 indicando uma grande região clara (seta), classificada no nível 4.....	33
<b>Figura 10.</b> Eletromicrografia representativa da cabeça de espermatozoide de camundongo C57BL/6 considerada normal (ausência de pontos e/ou regiões claras na cromatina nuclear).....	34

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
2.1 Espermatogênese.....	12
2.2 Espermatozoide.....	14
2.3 Epidídimo.....	15
2.4 Cromatina espermática.....	16
2.5 Métodos e validação de análise de cromatina espermática.....	18
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	20
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
4.1 Animais experimentais.....	20
4.2 Obtenção das amostras de espermatozoides.....	20
4.3 Análise da cromatina espermática.....	21
4.3.1 Confeção de esfregaços com as amostras de espermatozoides das regiões do epidídimo.....	21
4.3.2 Segmentação das cabeças dos espermatozoides.....	22
4.3.3 Classificação quanto a localização da baixa compactação da cromatina.....	22
4.3.4 Descompactação e heterogeneidade cromatínicas médias.....	22
4.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	23
4.4 Análise estatística.....	24
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>48</b>

## RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado que durante a passagem do espermatozoide através do epidídimo a cromatina espermática sofre a formação de pontes de dissulfureto entre as protaminas, aumentando a compactação do material genético, etapa fundamental para a proteção e manutenção da estabilidade do DNA. O presente estudo tem por objetivo avaliar o processo de compactação da cromatina espermática durante a maturação do espermatozoide no epidídimo de camundongos. Para isso foram colhidos espermatozoides das regiões da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de seis camundongos. Os espermatozoides foram avaliados por análise de imagem computacional de esfregaços corados com azul de toluidina, sendo analisada a distribuição espacial do processo de compactação da cromatina e a descompactação e heterogeneidade cromatínicas médias das cabeças dos espermatozoides. Os espermatozoides também foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão (MET), sendo definidos quatro níveis de baixa compactação cromatínica. A proporção de espermatozoides com alta compactação cromatínica (maduros) foi menor na cabeça quando comparada as demais regiões epididimárias, em ambas as metodologias utilizadas. Além disso, os níveis de baixa compactação na metade basal (BMB) e baixa compactação total (BCT) foram prevalentes nesta região. No corpo, houve o predomínio da baixa compactação na base (BB) e na região central (BRC). Na cauda, todos os níveis de baixa compactação diminuíram consideravelmente, sendo praticamente inexistentes, exceto na região central (BRC), que ainda prevaleceu em pequena quantidade. Baseado nesses dados foi proposta uma sequência do processo de compactação cromatínica no espermatozoide murino. A compactação teria início na extremidade apical em direção a base e das laterais para o centro da cabeça do espermatozoide, compactando-se até próximo da base. Posteriormente, a compactação se daria no sentido da inserção da cauda (base) para o centro e por fim, na região central da cabeça. A análise da descompactação e heterogeneidade médias da cromatina feitas por análise de imagem de esfregaços corados com AT e a realizada por MET demonstraram que o processo de compactação cromatínica do espermatozoide de camundongos iniciado durante a espermiogênese, continua durante o trânsito pelo epidídimo.

**Palavras-chave:** Azul de toluidina, cromatina espermática, C57BL/6, microscopia eletrônica de transmissão.

## ABSTRACT

Several studies have shown that during the passage of the spermatozoid through the epididymis, the spermatid chromatin undergoes the formation of disulfide bridges between the protamines increasing the condensation of the genetic material, a fundamental step for the protection and maintenance of DNA stability. The present study aims to evaluate the process of sperm condensation of chromatin during spermatozoid maturation in the epididymis of mice. For this, spermatozoa were collected from the head, body and tail regions of the epididymis of six mice. These spermatozoa were evaluated by computational image analysis of smears stained with toluidine blue, analyzing the spatial distribution of the condensation of chromatin process and, the mean decondensation and heterogeneity of the sperm heads. Spermatozoa were also evaluated by transmission electron microscopy (TEM), and four levels of non-condensation were defined. The proportion of spermatozoa with high chromatin (mature) condensation was lower in the head when compared to the other epididymal regions, in both methodologies used. In addition, low condensation levels in the basal half (LBH) and the entire length of the head (LCT) were prevalent in this region. In the body, there was a predominance of low condensation of the base (LB) and in the central region (LCR). In the tail, all levels of low condensation decreased considerably, being practically non-existent, except in the central region (LCR), which still were prevalent in small numbers. Based on these data, a sequence of the condensation process in the murine spermatozoa was proposed. The condensation would start at the apical region towards the base and from the lateral sides to the center of the spermatozoa's head, and compaction process would finish near the base. Subsequently, the compaction would occur in the direction of the insertion of the tail (base) to the center and finally, in the central region of the head. The analysis of the means of decondensation and heterogeneity of the chromatin made by image analysis of TB stained smears and the ones which were performed by TEM demonstrated that the process of chromatin compression of mice spermatozoa started during spermiogenesis continues during transit in the epididymis.

**Keywords:** Toluidine blue, sperm chromatin, C57BL/6, transmission electron microscopy.

## 1. INTRODUÇÃO

Embora por décadas se pensasse que os espermatozoides maduros possuíam uma cromatina afuncional, inerte, sem a capacidade de transcrição, recentemente os espermatozoides têm sido reconhecidos como sendo altamente organizados e condutores metabolicamente funcionais do genoma masculino (BELETTI, 2013).

A condensação da cromatina dos espermatozoides é uma etapa essencial da diferenciação que ocorre durante a espermatogênese. Nesse processo entre 90 e 95% das histonas somáticas, em humanos (OLIVA, 2006) são substituídas por protaminas, tornando-se uma estrutura altamente compactada (WARD et al., 1999), denominada toróide de protamina, no qual 50.000 pares de bases de DNA aproximadamente estão firmemente envoltos pelas protaminas, formando uma estrutura em forma de *donut* (rosca) (ALLEN et al., 1992; HUD et al., 1993), essencial para a proteção e manutenção da estabilidade do DNA. Em camundongos, esse percentual pode chegar em 95% (BELLVÉ et al., 1988).

O estudo sobre a integridade da cromatina espermática se tornou mais relevante após a intensificação do uso de biotécnicas reprodutivas como a injeção intracitoplasmática de espermatozoide na produção *in vitro* de embriões (PIVE) (LEWIS e AITKEN, 2005; ERENPREISS et al., 2006; FATEHI et al., 2006).

Além disso, os avanços na área de reprodução assistida utilizando a micromanipulação para colheita de espermatozoides diretamente do testículo ou da cabeça do epidídimo para fertilização de óvulos trouxeram questionamentos em relação aos processos significativos de maturação dos espermatozoides durante sua passagem através do epidídimo (COOPER, 2011). Diversos estudos têm demonstrado que durante a passagem do espermatozoide através do epidídimo, a cromatina espermática sofre a formação de pontes de dissulfureto entre as protaminas, aumentando a condensação do material genético, adquirindo seu estado final altamente compactada (MARUSHIGE e MARUSHIGE, 1978; BALHORN et al., 1984; OLIVA e CASTILLO, 2011).

O espermograma de rotina avalia vigor, motilidade, concentração e morfologia espermática. Contudo, esses parâmetros são insuficientes, pois não analisam a estrutura interna da célula espermática, sobretudo a cromatina (DNA e proteínas específicas), que pode melhor prever o *status* funcional dos espermatozoides, habilidade de fecundação e desenvolvimento embrionário (BELETTI, 2013).

O azul de toluidina (AT) é o corante nuclear de eleição na atualidade para a avaliação de cromatina e morfometria de cabeças de espermatozoides avaliados por microscopia de luz e

processados em sistemas computadorizados (BELETTI et al., 2005; NAVA-TRUJILLO et al., 2012; BELETTI, 2013). No entanto, a análise do espermatozoide em microscopia de luz apresenta limitações, não possibilitando a identificação de determinadas variedades de defeitos morfológicos, incluindo alterações de organelas (MORETTI, COLLODEL, 2012).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) poderia ser utilizada para a avaliação da compactação da cromatina espermática, pois permite a análise ultraestrutural do núcleo do espermatozoide (ZHU, 2018), possibilitando a visualização de vacúolos nucleares e áreas não condensadas (WALTERS et al., 2004).

A proposição deste estudo foi melhor compreender o processo de compactação da cromatina espermática durante o trânsito do espermatozoide murino através do epidídimo, pois falhas na compactação cromatínica podem acarretar alterações da estabilidade do DNA e de sinais epigenéticos e alterar a regulação genética e epigenética do desenvolvimento embrionário (BELETTI, 2013).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Espermatogênese**

O processo de transformação das espermatogônias, células diploides e pouco diferenciadas em espermatozoides, células haploides altamente especializadas é conhecido como espermatogênese (RAHMAN et al., 2011). Esse processo ocorre nos túbulos seminíferos localizados nos testículos dos animais (HAFEZ e HAFEZ, 2004), e em camundongos dura 35 dias (HASCHEK et al., 2013).

Os túbulos seminíferos são formados pelo epitélio germinativo e pelo tecido peritubular (DAVIDOFF et al., 1990). O epitélio germinativo é constituído de populações de células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento, denominadas espermatogônias, espermatócitos primário, secundário e espermátides (BANKS, 1992).

Ainda, no epitélio germinativo, também estão presentes as células de Sertoli, conectadas por firmes junções de membrana, formando a barreira hemato-testicular. Essa barreira separa o epitélio germinativo em um compartimento basal e um apical. Durante a espermatogênese, as células germinativas devem atravessar essa barreira para finalizar a formação do espermatozoide no compartimento apical. Assim, neste compartimento, os

espermatozoides em formação não entram em contato com outras substâncias provenientes da difusão do sangue (HOLSTEIN, 2003).

As espermatogônias são raras, compreendendo apenas 0,03% do total de células germinativas em camundongos (TEGELENBOSCH e DE ROOIJ, 1993). No entanto, numerosas divisões mitóticas amplificadoras transitórias nas espermatogônias progenitoras e diferenciadoras, seguido por duas divisões meióticas dão origem a milhões de espermatozoides a cada dia (PHILLIPS et al., 2010).

Em humanos e camundongos, a maturação das células germinativas do testículo é subdividida em três fases: proliferativa (espermatogônias), meiótica (espermatócitos) e espermiogênica (espermátides), que culminam na liberação de espermatozoides maduros (espermição) (COOKE e SAUNDERS, 2002).

Espermatogônias tipo A são as células fontes, a partir delas vão ocorrer as mitoses (BANKS, 1992). No testículo de roedores, as espermatogônias isoladas, chamadas de  $A_{\text{single}}$  ( $A_s$ ) localizam-se na membrana basal dos túbulos seminíferos (HUCKINS, 1971; OAKBERG, 1971; DE ROOIJ, 1973), e se dividem uma vez a cada três dias (HUCKINS e OAKBERG, 1978; TEGELENBOSCH e DE ROOIJ, 1993).

A divisão mitótica de espermatogônias  $A_s$  origina um par de espermatogônias  $A_{\text{paired}}$  ( $A_{\text{pr}}$ ) que completarão a citocinese para produzir duas novas espermatogônias  $A_s$  (divisão de auto-renovação) ou permanecerão unidas por ponte intracitoplasmática e produzirão uma cadeia de quatro espermatogônias  $A_{\text{aligned}}$  ( $A_{\text{al4}}$ ) alinhadas na próxima divisão (PHILLIPS et al., 2010; DE ROOIJ e GRISWOLD, 2012). A espermatogonia  $A_{\text{aligned}}$  ( $A_{\text{al}}$ ) pode sofrer uma ou mais divisões mitóticas para formar cadeias maiores de 8, 16 ou até 32 espermatogônias.  $A_s$ ,  $A_{\text{pr}}$  e  $A_{\text{al}}$  constituem a população de espermatogônias indiferenciadas que corresponde a 0,3% de células germinativas no testículo de roedores (HUCKINS, 1971; OAKBERG, 1971; PHILLIPS et al., 2010; VALLI et al., 2015).

Clones maiores de espermatogônias  $A_{\text{al}}$  diferenciam-se em espermatogônias  $A_1$ . Entende-se como clone o grupo de células interconectadas que surgem de uma única espermatogônia  $A_s$ . Em roedores, os clones se tornam tão grandes que preenchem segmentos inteiros de túbulos seminíferos. As sucessivas divisões mitóticas posteriores das espermatogônias  $A_1$  dão origem as espermatogônias tipos  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , intermediária e espermatogônia tipo B (TEGELENBOSCH e DE ROOIJ, 1993; THAYER et al., 2001; VALLI et al., 2015).

Após as divisões mitóticas, espermatogônias tipo B iniciam a divisão meiótica. A meiose ocorre com mudanças na conformação da cromatina nuclear. Esses processos estão

relacionados com a condensação e redução do número dos cromossomos, *crossing over* e compactação do DNA espermático. Células em meiose são chamadas de espermátocitos. As que encontram-se na primeira divisão meiótica são chamadas de espermátocitos primários, enquanto as que estão na segunda divisão são chamadas espermátocitos secundários. A divisão dos espermátocitos secundários dará origem à células haploides, denominadas espermátides (HOLSTEIN, 2003).

As espermátides passam por um processo de diferenciação em que estão envolvidos três processos: compactação da cromatina do núcleo, formação de enzimas do acrossoma pelo complexo de Golgi e o desenvolvimento do flagelo com sua implantação no núcleo (HOLSTEIN, 2003). O DNA dos espermatozoides é compactado pela substituição de histonas somáticas (proteínas nucleares básicas) por nucleoproteínas, denominadas protaminas (BLOCH, 1969). As espermátides são capazes de deixar o epitélio germinativo e migrar para o lúmen dos túbulos seminíferos, completando a fase de diferenciação. Esse processo de migração é chamado de espermição (HOLSTEIN, 2003).

Após a formação dos espermatozoides, esses são liberados na luz dos túbulos seminíferos e ao passarem pelo epidídimo sofrem transformações, em especial, a condensação do núcleo por meio de pontes dissulfídicas (BARTH e OKO, 1989). A produção diária de espermatozoides em camundongos é de 54 milhões por grama de parênquima testicular (HASCHEK et al., 2013).

## 2.2 Espermatozoide

Espermatozoides são células haplóides constituídas de cabeça, colo ou corpo, cauda (FLESCH e GADELLA, 2000) e membranas plasmática, acrossomal interna e externa e nuclear (HAFEZ e HAFEZ, 2004). A cabeça do espermatozoide é composta pelo núcleo, acrossoma e pequenas quantidades de estruturas citoesqueléticas e citoplasma (EDDY e O'BRIEN, 1994; FLESCH e GADELLA, 2000). Os núcleos de espermatozoides de camundongos possuem morfologia única, apresentando forma muito distinta e assimétrica, com o ápice agudamente curvado e pontudo, além do entalhe onde se localiza a base do flagelo (AUSIÓ et al., 2014). A forma de foice da cabeça do espermatozoide murino pode estar relacionada com o favorecimento do seu movimento sobre as dobras epiteliais intedigatantes presentes na junção uterotubal após a cópula, pois essa barreira representa o principal obstáculo de acesso do espermatoide ao óvulo (YEUNG et al., 2000). A cauda é constituída por um axonema central, estrutura especializada do citoesqueleto, responsável pela motilidade espermática (MORTIMER, 2000). O

espermatozoide de mamíferos é 10 vezes menor quando comparado à célula somática (MILLER et al., 2010), sendo assim a organização do seu material genético é única e sua cromatina altamente condensada e compactada (SHARMA e AGARWAL, 2011).

A compactação da cromatina espermática garante a integridade do genoma paterno, promove a motilidade do espermatozoide (MILLER et al., 2010; RATHKE et al., 2014) e o protege durante o percurso nos tratos genitais masculino e feminino (OLIVA, 2006; SHARMA e AGARWAL, 2011).

### **2.3 Epidídimo**

O epidídimo é um órgão complexo que desempenha um papel fundamental na maturação e armazenamento dos espermatozoides (BRETON et al., 2016). Consiste em um ducto enovelado e está presente nos mamíferos do sexo masculino (OLIVA et al., 2009), localizando-se ao longo da superfície póstero-lateral do testículo (ROBAIRE e CHAN, 2010) e desemboca na base do ducto deferente (OLIVA et al., 2009). Morfologicamente, o epidídimo pode ser dividido nas regiões: cabeça, corpo e cauda (ROBAIRE e HERMO, 1988). Essa classificação baseia-se no estudo da altura do epitélio, do diâmetro tubular e da variação na frequência dos diferentes tipos celulares (GLOVER e NICANDER 1971).

O processo de compactação da cromatina espermática é completado durante o trânsito do espermatozoide através do epidídimo, quando pontes de dissulfeto e zinco entre as protaminas são estabelecidas, assim como há o término da formação de membranas e outras funcionalidades celulares (OLIVA e CASTILLO, 2011). Este processo de compactação tem início na cabeça do epidídimo seguindo pelo corpo até a cauda, momento em que o espermatozoide passa por alterações morfológicas e bioquímicas resultantes da interação com o microambiente epididimário, adquirindo motilidade progressiva (OLIVA et al., 2009) e potencial fertilizante (ROBAIRE e HERMO, 1988).

Em estudo com epidídimos de ratos, Garret et al., (1990) observaram que os espermatozoides são capazes de estimular a secreção proteica das células do epitélio epididimal, sugerindo que o próprio espermatozoide exerça papel fundamental na composição do fluido epididimário. No entanto, se a espermiogênese estiver defeituosa, o espermatozoide não pode responder adequadamente ao microambiente do epidídimo (COOPER, 2011).

Ainda, 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 também na

remoção de espermatozoides anormais. A cabeça e o corpo do epidídimo relacionam-se mais intimamente à aquisição de motilidade e a cauda está ligada ao armazenamento e eliminação de espermatozoides patológicos (SERRE e ROBAIRE, 1998).

Mesmo após a ejaculação, os espermatozoides de mamíferos não possuem habilidade para fecundar os oócitos, ainda estando móveis e com morfologia madura. A célula espermática precisa passar pelo processo de capacitação, que ocorre no trato reprodutivo feminino, para só então apresentarem a capacidade de fecundar (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951).

## 2.4 Cromatina espermática

A condensação do núcleo da célula espermática representa um importante evento durante a espermatogênese. A compactação do ácido desoxirribonucléico (DNA) em mamíferos ocorre quando proteínas nucleares básicas denominadas histonas, ricas em lisina, são substituídas em parte ou totalmente, por protaminas, proteínas específicas de espermatozoides, que apresentam caráter mais básico devido sua abundância em arginina e cisteína oxidada (KANIPPAYOOR et al., 2013), cujo papel é reorganizar o DNA, formando uma estrutura altamente condensada, a cromatina (WARD et al., 1999). Camundongos possuem protamina 1 (P<sub>1</sub>) e protamina 2 (P<sub>2</sub>) (BALHORN, 1982; AUSIÓ et al., 2014).

As histonas são substituídas gradualmente por proteínas de transição, que por sua vez são substituídas pelas protaminas (MARUSHIGE e MARUSHIGE, 1975; FUENTES-MASCORRO et al., 2000), todavia, atualmente já se sabe que a permanência de histonas no núcleo espermático não implica necessariamente em um erro no processo de compactação cromatínica (JOHNSON et al., 2011; CARREL, 2012; AUSIÓ et al., 2014).

Existem regiões em que as histonas variantes são mantidas em pequenas proporções, sendo importantes sítios de sinalização epigenética, podendo estar relacionadas com a ativação de genes, inclusive genes *imprinted* paternos (BALHORN, 2011; JOHNSON et al., 2011; CARREL, 2012). Ainda, conforme Gineitis et al., (2000) e Zalenskaya et al., (2000) as histonas podem estar associadas aos telômeros, estruturas constituídas por fileiras repetitivas de proteínas e DNA não codificante, e aos primeiros eventos do espermatozoide que respondem aos sinais do ovócito, resultando na formação do pro-núcleo masculino.

O processo de condensação da cromatina espermática inicia-se no sentido da região apical para a caudal e cada protamina está ligada a aproximadamente 50.000 pares de base de DNA formando estruturas denominadas toróides (*donut*) (BALHORN, 1982; OLIVA et al., 2009). Este processo de compactação cromatínica exige que inicialmente as fitas de DNA

sofram quebras pela ação da enzima topoisomerase II beta, para que sejam reorganizadas junto às protaminas. Ao término da protaminação, o DNA deve ser reparado, uma vez que compactado perde a capacidade de reparação e se torna quiescente (JENNINGS e POWELL, 1995; WARD, 2011). Outro nível de arranjo da cromatina é a organização estrutural do DNA em domínios no formato de alças (WARD et al., 1989; KRAMER e KRAWETZ, 1996).

Posteriormente foi proposto o modelo *donut-alça* para a estrutura da cromatina espermática, sugerindo que ambos os níveis organizacionais são relacionados (SOTOLONGO et al., 2003), assim entre os toróides de protamina existiriam alças de DNA que fixariam a cromatina à matriz nuclear em regiões de anexação da matriz (MARs), corroborando a existência de matriz nuclear espermática, ainda que sua composição e função não sejam completamente conhecidas (BELETTI et. al., 2004; DADOUNE, 2009; JOHNSON et. al., 2011; CARREL, 2012). Além disso, essas alças teriam ainda regiões denominadas *DNase-sensitive-toroid-linker*, provavelmente relacionadas a fragmentação de DNA danificado evitando que seja transferido para o embrião durante a fertilização. As argininas das protaminas carregadas positivamente neutralizam os grupamentos fosfato carregados negativamente e evita que haja repulsão entre as fitas de DNA, permitindo uma organização linear como uma estrutura lamelar para compactação no menor volume possível (BALHORN, 1982).

Além de protaminas e histonas espermáticas específicas, a cromatina possui proteínas potencialmente ativas, incluindo alguns fatores de transcrição (PITTOGGI et al., 2001). A cromatina pode também ter uma organização específica. Alguns telômeros (ZALENSKAYA et al., 2000) e centrômeros (YARON et al., 1998) parecem se localizar consistentemente em determinadas áreas do núcleo espermático. Ward e Coffey (1989) descrevem a presença do ânulo nuclear na cabeça do espermatozoide, sendo um componente da matriz nuclear com estrutura proteica de forma circular, no qual o DNA permanece ancorado mesmo após a descompactação. O ânulo encaixa-se na base da cabeça do espermatozoide e todos os cromossomos se ligam nele em algum ponto.

A maturação do espermatozoide no epidídimo determina o estágio final da organização da cromatina, envolvendo perda de água, reticulação de protamina pela formação de ligações dissulfureto e a redução do volume dos núcleos espermáticos, juntamente com restrição completa da capacidade para a replicação e transcrição do DNA (JENNINGS e POWELL, 1995). A fragmentação de cromatina e nível de condensação podem levar a diminuição do potencial de fertilização do espermatozoide (PUGLISI et al., 2012; SELLEM et al., 2015).

Espermatozoides que apresentam graves alterações cromatínicas podem apresentar alterações na conformação da cabeça e, conseqüentemente, na sua hidrodinâmica, interferindo

diretamente na motilidade e no processo de fecundação. Alterações menos graves podem até não interferir na motilidade, mas os danos no DNA impediriam 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, podem comprometer as etapas posteriores do desenvolvimento embrionário. Ainda, embora menos frequente, a gestação pode até chegar a termo, porém os neonatos apresentariam alterações genéticas de diversos tipos (BELETTI, 2013).

## **2.5 Métodos e validação de análise de cromatina espermática**

A análise da estrutura da cromatina espermática (*Sperm Chromatin Structure Assay* - SCSA) é um dos métodos mais utilizados no mundo para avaliar a susceptibilidade do DNA à desnaturação. Considerado padrão ouro, baseia-se no exame da fluorescência de espermatozoides corados com alaranjado de acridina (AA) que, quando submetidos ao citômetro de fluxo são quantificados com fluorescência verde e vermelha, que seriam, respectivamente, espermatozoides com cromatina normal e alterada (EVENSON et al., 1980). No entanto, essa técnica não permite a análise morfológica e morfométrica concomitantes do espermatozoide, uma vez que a cromatina é avaliada por citômetro de fluxo e a morfologia é avaliada em esfregaço de sêmen.

Mello (1982) desenvolveu o método da “metacromasia induzida” para avaliação da cromatina espermática, utilizando azul de toluidina (AT), um corante catiônico que exibe fenômeno metacromático, ou seja, alteração na cor induzida pela ressonância de elétrons entre as moléculas do corante. Nesse método é avaliada a capacidade de moléculas do corante ligarem-se aos grupos fosfatos do DNA, o que está intimamente relacionado com a compactação do DNA. O pH 4,0 garante que outros sítios (ânions) não sejam ionizados. Os espermatozoides normais se coram em verde, mas aqueles com anomalias no complexo DNA-proteína se coram em violeta, posto que na cromatina normal de espermatozoides, a maioria dos grupos fosfatos está bloqueada por protaminas, e conseqüentemente, poucas moléculas do corante se ligam ao DNA, resultando em uma coloração de verde a azul claro, não ocorrendo, portanto, o fenômeno da metacromasia. Já nos espermatozoides com cromatina pouco compactada, haveriam mais ligações com as moléculas do corante, acarretando a ressonância de elétrons entre as moléculas, resultando em uma coloração de azul escuro a magenta. No entanto, somente alterações cromatínicas muito intensas seriam identificadas. Assim, a sensibilidade desse processo pode ser potencializada pela hidrólise antes da coloração de acordo

com o seguinte protocolo: tratamento ácido (HCL 4N a 25°C, 15 a 20 minutos) seguido de coloração com azul de toluidina (pH 4,0). Essa técnica permite avaliação cromatínica e morfológica concomitantes do espermatozoide, e apesar de mais lento, possui baixo custo comparado ao SCSA.

Como a avaliação visual de esfregaços de sêmen possui certo grau de subjetividade, para tornar o método mais objetivo, aumentando a sensibilidade e a repetibilidade entre examinadores, Beletti et. al., (2005) desenvolveram *software* para a análise de esfregaços corados com AT utilizando imagens digitais capturadas em microscópio de luz acoplado à câmera ligada a microcomputador, que é capaz de realizar a morfometria da cabeça do espermatozoide e identificar alterações de cromatina espermática em sêmen de mamíferos que não seriam observadas pela análise visual utilizada no espermograma de rotina (HIRAIWA et al, 2015; LUCIO et al., 2016; KIPPER et al., 2017).

Outras técnicas também são empregadas para identificação de alterações na cromatina em esfregaços de espermatozoides: coloração por AA sem o uso do citômetro de fluxo (TEJADA et al.; 1984), coloração com azul de anilina (ERENPREISS et al., 2001; HAMMADEH et al., 2001), técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*) (MARTINS et al., 2007), teste de dispersão de cromatina espermática e Esperma-Sus-Halomax (ALKIMN et al., 2013).

A microscopia eletrônica de transmissão permite a análise ultraestrutural do núcleo espermático, possibilitando identificar anormalidades das organelas (ZHU, 2018) bem como vacúolos nucleares em áreas não condensadas (WALTERS et al., 2004), que não podem ser visualizados em microscopia de contraste de fase (KHALIFA et al., 2008) ou por coloração com azul de toluidina (BELETTI e MELLO, 1996), mostrando-se um método bastante apropriado para a avaliação da compactação de cromatina de espermatozoide.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o processo de compactação da cromatina espermática durante o trânsito do espermatozoide através do epidídimo de camundongos.

### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Avaliar a distribuição espacial do processo de compactação da cromatina espermática durante o trânsito do espermatozoide através do epidídimo.

3.2.2 Avaliar a compactação média da cromatina das cabeças dos espermatozoides durante o trânsito através do epidídimo.

3.2.3 Avaliar a heterogeneidade média da cromatina das cabeças dos espermatozoides durante o trânsito através do epidídimo.

3.2.4 Avaliar a compactação da cromatina espermática por MET durante o trânsito do espermatozoide através do epidídimo.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, sob protocolo de registro CEUA/UFU 022/18 (Anexo A). Os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos da Sigma (Sto Louis MO, USA).

### **4.1 Animais experimentais**

Foram utilizados seis camundongos da linhagem C57BL/6 machos de 8 semanas de idade, pesando aproximadamente 22 gramas, provenientes da Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR/UFU). Os camundongos foram mantidos em condições livres de patógenos específicos.

### **4.2 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 colheita bilateral dos epidídimos. Após a colheita, os epidídimos foram seccionados em três porções: cabeça, corpo e cauda e nestas regiões foram realizadas pequenas incisões e, posteriormente foram suavemente pressionadas

para a colheita dos espermatozoides por extravasamento do líquido epididimário (KAABI et al., 2003).

### 4.3 Análise da cromatina espermática

#### 4.3.1 Confeção de esfregaços com as amostras de espermatozoides das regiões do epidídimo

Todos 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 foram 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 foi colocada a lamínula sobre a lâmina, e após 3 minutos foram capturadas imagens digitais totalizando pelo menos 100 espermatozoides por lâmina. Para a captura das imagens foi utilizado microscópio de luz Leica DM500 acoplado a câmera Leica ICC50 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA), em objetiva de 100x (imersão).

As análises de imagens computadorizadas foram divididas em três etapas: segmentação das cabeças, determinação das regiões de baixa compactação cromatínica em cada cabeça e análise quantitativa da compactação e heterogeneidade cromatínicas médias de cada cabeça. Para a segmentação das cabeças e determinação dos níveis de baixa compactação cromatínica 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 baixa compactação e heterogeneidade médias da cromatina foi utilizado *software* desenvolvido em ambiente de programação *SCILAB* (BELETTI et al., 2005).

#### 4.3.2 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 binária (i.e., uma imagem que possui apenas dois tons de cores, no caso o preto e o branco) que, quando pareada 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 contida nas imagens originalmente capturadas no microscópio.

#### 4.3.3 Classificação quanto a localização da baixa compactação da cromatina

O *software* selecionou automaticamente 6 cabeças com maior intensidade de compactação (mais claras) dentre todas as cabeças segmentadas de um mesmo animal. A média de *pixels* dessas 6 cabeças foi considerada como valor padrão desta amostra e a região que ficou abaixo desta média foi delimitada pelo *software* por meio de demarcação de linhas brancas e foi determinada como área de baixa compactação cromatínica. Essas regiões delimitadas são visualmente identificadas por se apresentarem mais escuras (menor intensidade de compactação).

Assim, níveis de baixa compactação cromatínica foram propostos de acordo com a localização de áreas pouco compactadas na cabeça do espermatozoide, baseado nos trabalhos de Beletti et al. (2004) e Souza et al, (2018). Em síntese, os níveis de baixa compactação cromatínica foram definidos em: (1) Baixa compactação total (BCT), a cabeça como um todo encontra-se pouco compactada; (2) Baixa compactação na metade basal (BMB), além do terço basal, atinge também até dois terços da cabeça; (3) Baixa compactação na base (BB), atinge no máximo o terço basal da cabeça; e (4) Baixa compactação na região central (BRC), ocorre no centro sem atingir as laterais da cabeça. O espermatozoide normal (N) foi caracterizado pela ausência de áreas pouco compactadas, portanto, considerado totalmente compactado (Figura 1). Todas as avaliações foram realizadas por um único examinador.

#### 4.3.4 Descompactação e heterogeneidade cromatínicas médias

Para a análise da descompactação (Des.) e heterogeneidade (Het) médias da cromatina as imagens das cabeças espermáticas foram inicialmente transformadas em tons de cinza e o valor médio das cabeças-padrão para essas análises foi realizado de maneira semelhante ao descrito anteriormente, tal como foram selecionadas automaticamente pelo *software* as 6 cabeças mais claras (mais compactadas) e homogêneas da amostra e a média dos valores de *pixels* 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 caracterizou quantitativamente a intensidade da descompactação (Des.) da cabeça avaliada, ou seja, determinou em percentual quanto a cabeça em análise é menos compactada em relação as cabeças-padrão.

O coeficiente de variação dos níveis de cinza de cada cabeça da amostra também foi calculado e caracterizou quantitativamente a heterogeneidade da cromatina da cabeça avaliada (Het). O coeficiente de variação determinou 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 de compactação na cabeça do espermatozoide (BELETTI et al., 2005).

#### 4.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Após a colheita dos espermatozoides, uma parcela de cada amostra foi colocada em um microtubo de fundo cônico de 2 mL, contendo 500 µL de solução de glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato (PBS) a 0,1 M e pH 7,4. Posteriormente foi realizada centrifugação do microtubo em microcentrífuga a 70 x g por 5 minutos, seguida de descarte do sobrenadante. Com a finalidade de retirar resíduos de glutaraldeído, por três vezes consecutivas foi adicionado ao *pellet* 1 mL de PBS, com posterior homogeneização, centrifugação por 5 minutos e descarte do sobrenadante. Após a etapa de lavagem foi adicionado 500 µL de solução de tetróxido de ósmio a 1%. Após 30 minutos, o microtubo foi então submetido à centrifugação a 70 x g durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e posteriormente, para remoção do excesso de tetróxido ósmio. Ao *pellet* de células foi então adicionado ágar 3% a 50°C e misturado de forma a introduzir o ágar entre as células, mas mantendo-as no fundo do microtubo. Este foi levado à geladeira (4°C) até a solidificação do ágar.

Ao retirar o material incluído em ágar do microtubo, este foi partido em fragmentos de 1 mm<sup>3</sup>. Os fragmentos foram colocados em frascos de vidro e desidratados em banhos de 5 minutos com solução de concentrações crescentes de álcool (50, 70, 80, 90 e 95%) e depois três banhos de 10 minutos cada em álcool 100%.

Descartado o álcool da última etapa da desidratação, foi adicionado solução contendo 1 porção de álcool para 1 porção de resina Epon EMS (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, UK) e o frasco de vidro foi tampado, permanecendo assim por 12 horas. Após este período, os frascos foram destampados e colocados em estufa à temperatura de 37°C por 4 horas. Então, a solução 1:1 de álcool e resina foi retirada e uma nova solução pura de resina Epon foi adicionada ao frasco. Estes foram novamente colocados em estufa à temperatura de 37°C por

mais 4 horas. Em seguida a resina foi novamente retirada dos frascos e cada fragmento do material foi colocado na cavidade de forma apropriada e identificado. Foi adicionado nova solução de resina Epon até completar as cavidades da forma e esta foi colocada em estufa à temperatura de 60°C por pelo menos 72 horas.

Após solidificação (polimerização) na estufa, os blocos foram retirados das formas e o material foi cortado com ultramicrotomo Reichert-Jung (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA). Os cortes, entre 60 e 90 nm de espessura foram colocados em telas de cobre e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo conforme descrito por Bozzola e Russel (1998).

Os cortes foram avaliados em microscópio eletrônico de transmissão HITACHI HT7700 (HITACHI, Japão) do Centro de Microscopia Avançada da UFU.

A avaliação de cromatina espermática por microscopia eletrônica de transmissão permite a visualização de áreas não compactadas como pontos ou regiões menos eletrodensas devido a menor concentração de DNA pela baixa compactação da cromatina do espermatozoide (ENCISO et al., 2011).

Deste modo, também foram propostos níveis de baixa compactação da cromatina dos espermatozoides conforme alterado de Alves et al. (2016): (1) Presença de até três pontos claros ou uma pequena região clara; (2) Presença de quatro a oito pontos claros ou duas pequenas regiões claras; (3) Presença de mais de oito pontos claros ou mais de três pequenas regiões claras; (4) Grande região clara; (5) Pelo menos 50% da área nuclear clara. O espermatozoide normal (N) foi caracterizado pela ausência de pontos e/ou regiões claras na cromatina (Figuras 5 a 10). Quando coexistiram dois ou mais níveis de baixa compactação cromatínica em uma mesma cabeça, considerou-se o nível mais severo.

Foram avaliadas 1586 cabeças de espermatozoides colhidas das regiões da cabeça (611) e cauda (975) do epidídimo. Todas as avaliações foram realizadas por um único examinador.

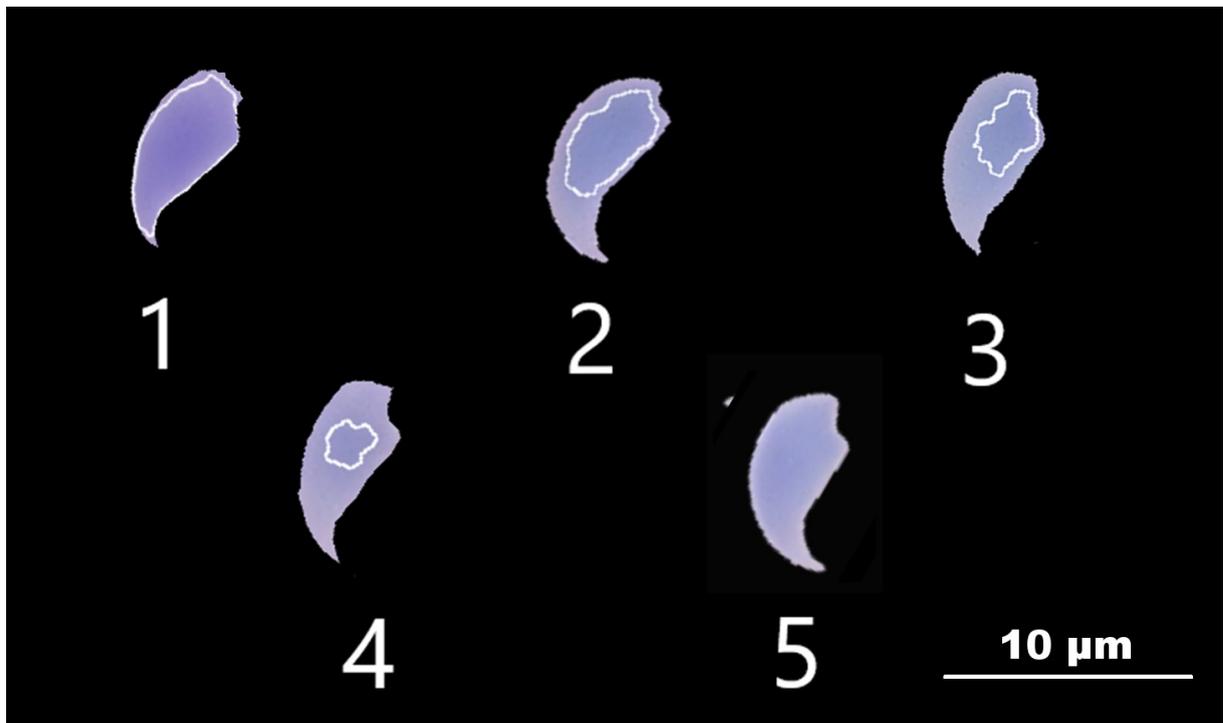
#### **4.4 Análise estatística**

Foi verificada a distribuição normal das amostras pelo teste Kolmogorov Smirnov. Posteriormente, as mensurações dos parâmetros de descompactação e heterogeneidade cromatínicas, assim como dos níveis de baixa compactação pela análise computacional dos esfregaços corados com AT foram realizadas por meio do teste t pareado, pois os dados seguiram distribuição normal. Para a mensuração dos níveis de baixa compactação cromatínica observados por MET foi utilizado o teste Wilcoxon pareado, uma vez que os dados não

apresentaram distribuição normal. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Action/Excel.

## 5. RESULTADOS

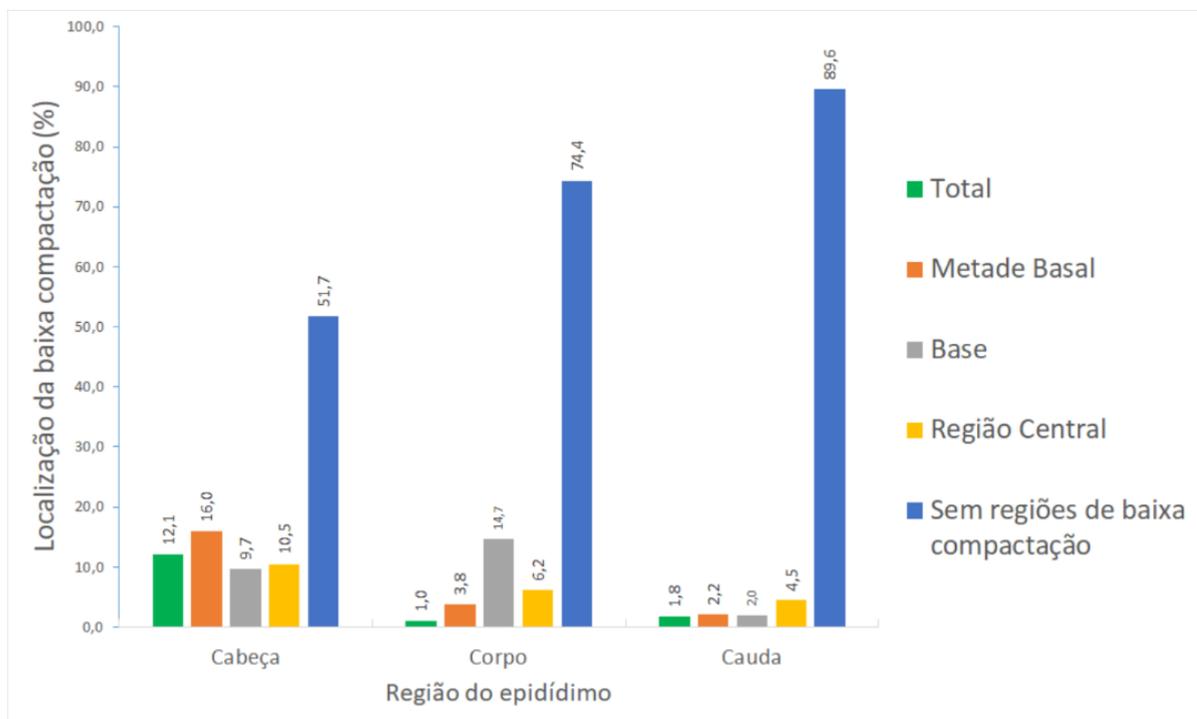
Os níveis de baixa compactação da cromatina espermática foram estabelecidos de acordo com a localização de áreas pouco compactadas na cabeça do espermatozoide e, identificados por meio da análise computacional dos esfregaços corados com AT, uma vez que esta técnica permite a análise morfológica e morfométrica concomitantes das estruturas (Figura 1).



**Figura 1.** Fotomicrografias representativas de cabeças de espermatozoides de camundongos C57BL/6 com diferentes regiões da cabeça pouco compactadas, identificadas pela análise de imagem computacional de esfregaços corados com azul de toluidina. Baixa compactação total (1); Baixa compactação na metade basal (2); Baixa compactação na base (3); Baixa compactação na região central (4), Compactação total (5).

As porcentagens de espermatozoides, classificados conforme a região da cabeça espermática com baixa compactação da cromatina, encontradas em amostras de sêmen de camundongos C57BL/6 colhidas da cabeça, corpo e cauda do epidídimo e avaliadas por análise de imagem computacional de esfregaços corados com azul de toluidina estão demonstradas na

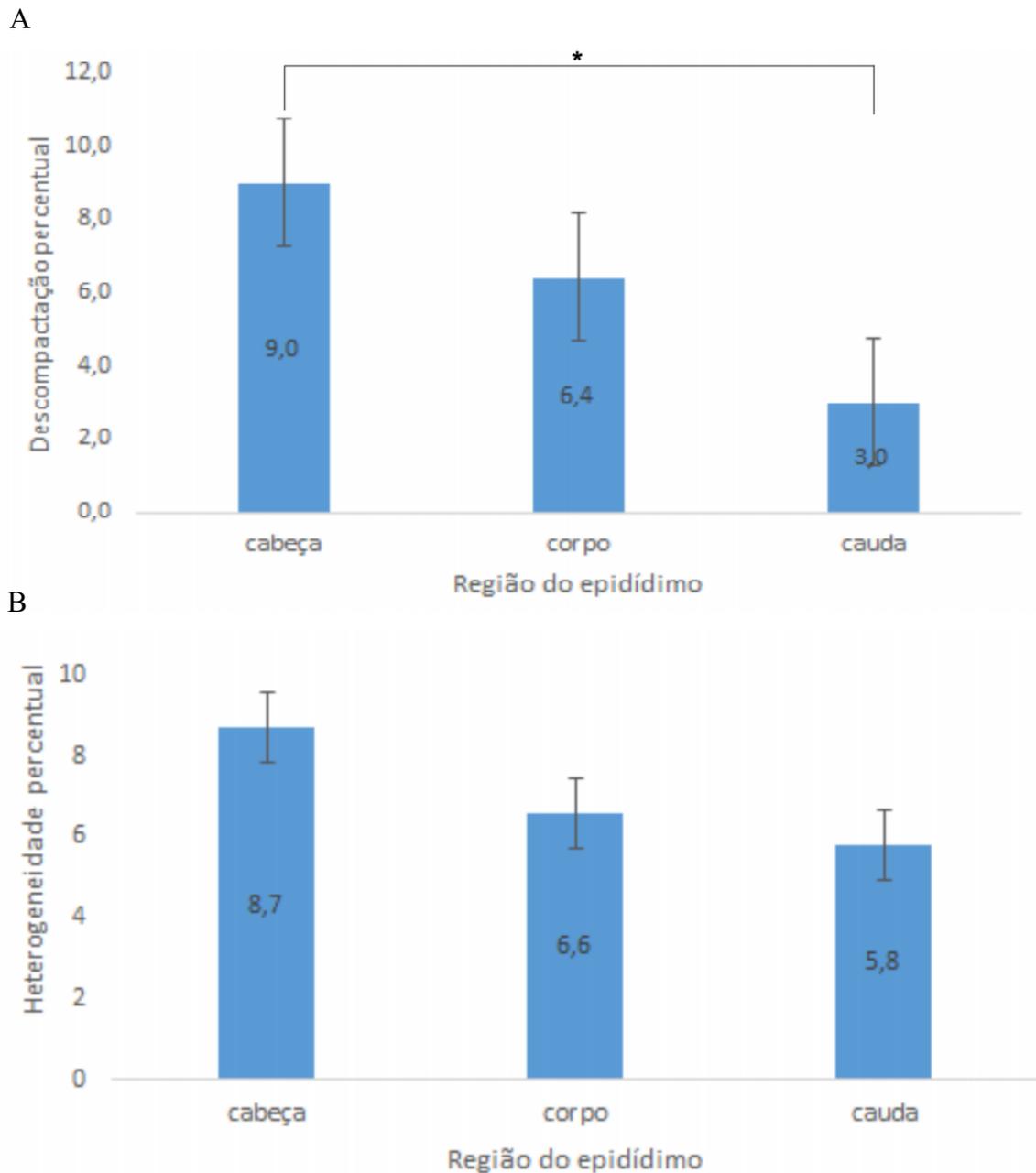
Figura 2. Observou-se na porção da cabeça do epidídimo que mais de 50% dos espermatozoides são normais (totalmente compactados) e que esse percentual foi crescente no corpo e cauda respectivamente. Além disso, os níveis de baixa compactação na metade basal (BMB) (16%) e baixa compactação total (BCT) (12,1%) foram prevalentes nesta região. No corpo nota-se que os níveis de baixa compactação na metade basal (BMB) e baixa compactação total (BCT) reduziram, predominando-se nessa região a baixa compactação na base (BB) (14,7%) e na região central (BRC) (6,2%). Na porção da cauda, verificou-se que todos os níveis de baixa compactação diminuíram consideravelmente, sendo praticamente inexistentes, exceto na região central (BRC), que ainda prevaleceu em pequena quantidade (4,5%). Não houve diferença estatística significativa entre as regiões experimentais.



**Figura 2.** Percentagens de espermatozoides, classificados conforme a região da cabeça espermática com baixa compactação da cromatina, encontradas em amostras de sêmen de camundongos C57BL/6 colhidas da cabeça, corpo e cauda do epidídimo e avaliadas por análise de imagem computacional de esfregaços corados com azul de toluidina.

As análises de descompactação percentual e heterogeneidade percentual cromatínicas médias estão demonstradas na Figura 3, e mostraram que ambos parâmetros reduziram ao longo do processo de maturação do espermatozoide no epidídimo, isto é, a descompactação e heterogeneidade foram maiores na na cabeça do epidídimo em relação as demais porções avaliadas. Observou-se ainda, que houve diferença significativa da descompactação entre os

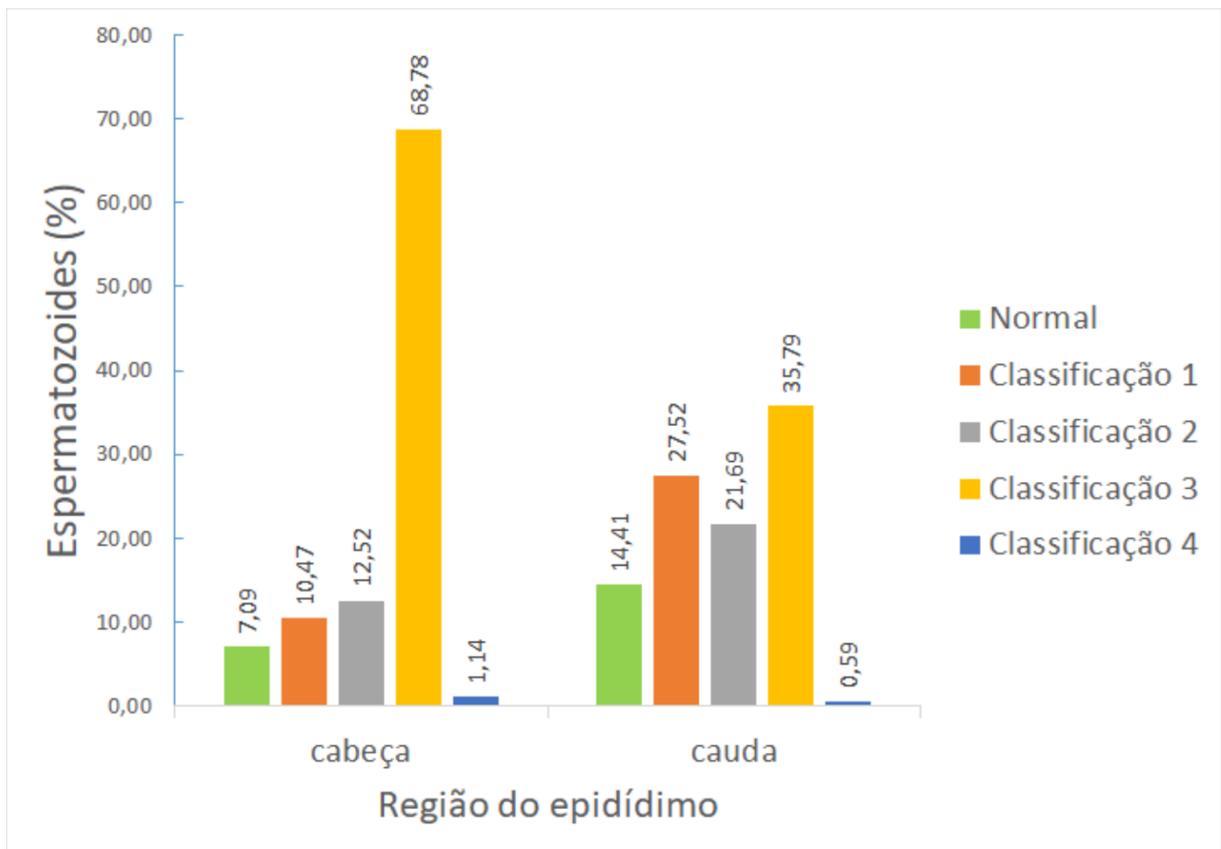
espermatozoides colhidos da cabeça e cauda, e que embora para o parâmetro heterogeneidade as regiões experimentais não se diferiram estatisticamente, notou-se que os espermatozoides provenientes da cabeça foram mais heterogêneos quando comparados aos da cauda do epidídimo.



**Figura 3.** Descompactação percentual (A) e heterogeneidade percentual (B) médias da cromatina de espermatozoides de camundongos C57BL/6 colhidos das regiões da cabeça, corpo e cauda do epidídimo. \*Diferença estatística significativa entre as regiões experimentais ( $p < 0,05$ ).

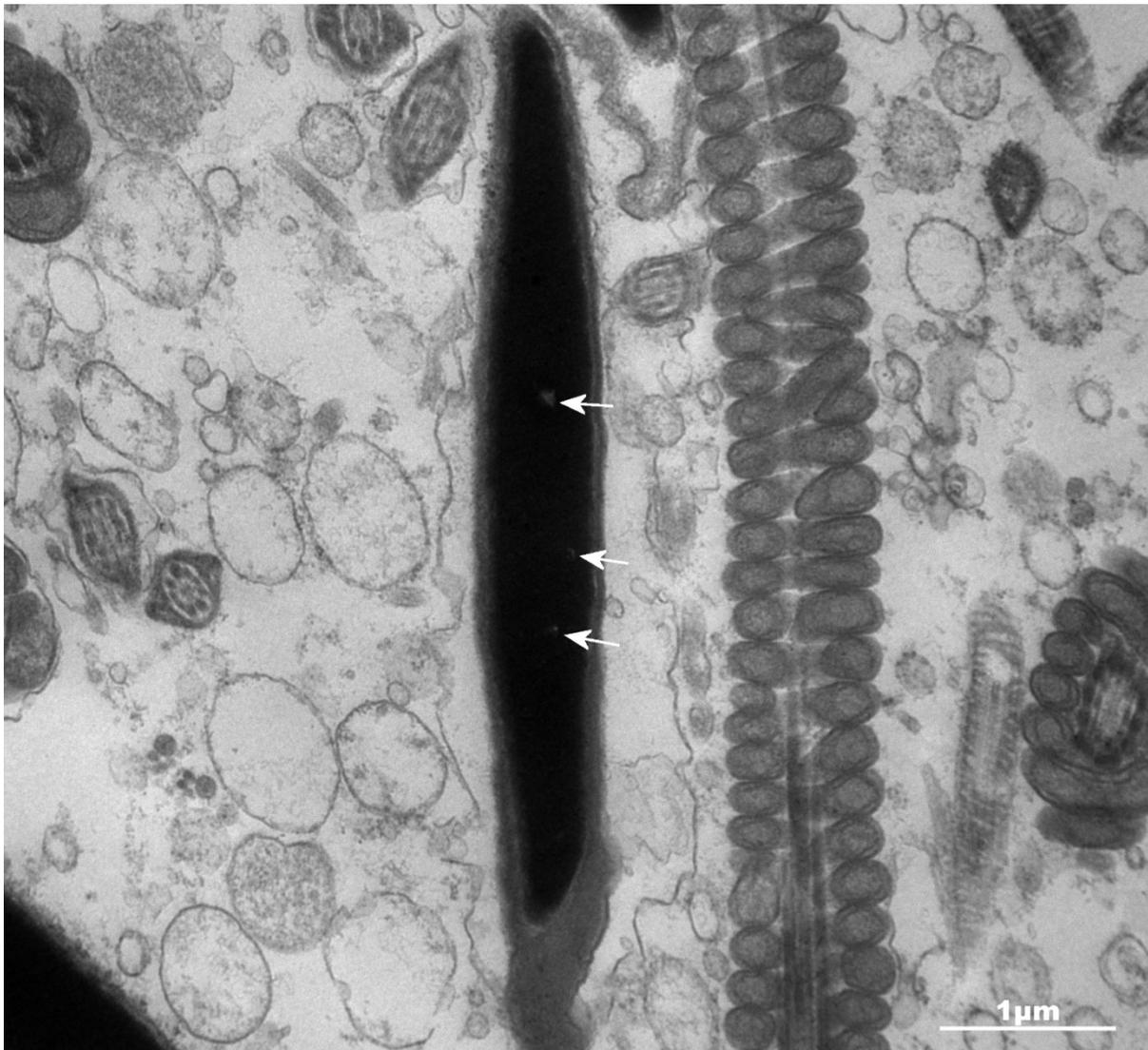
Na análise visual ultraestrutural das cabeças de espermatozoides, a presença de pontos claros e/ou áreas claras nessas estruturas foram avaliados, quantificados e posteriormente

determinados os níveis de baixa compactação cromatínica (Figura 4). Percebeu-se na região da cabeça do epidídimo que a classificação 3 foi mais frequente e o número de espermatozoides normais (ausência de pontos e/ou regiões claras na cromatina nuclear) foi menor quando comparado na região da cauda. Além disso, no segmento da cauda notou-se um aumento das alterações mais brandas (classificações 1 e 2) e redução das alterações severas (classificações 3 e 4). Não houve diferença estatística significativa entre as regiões experimentais.

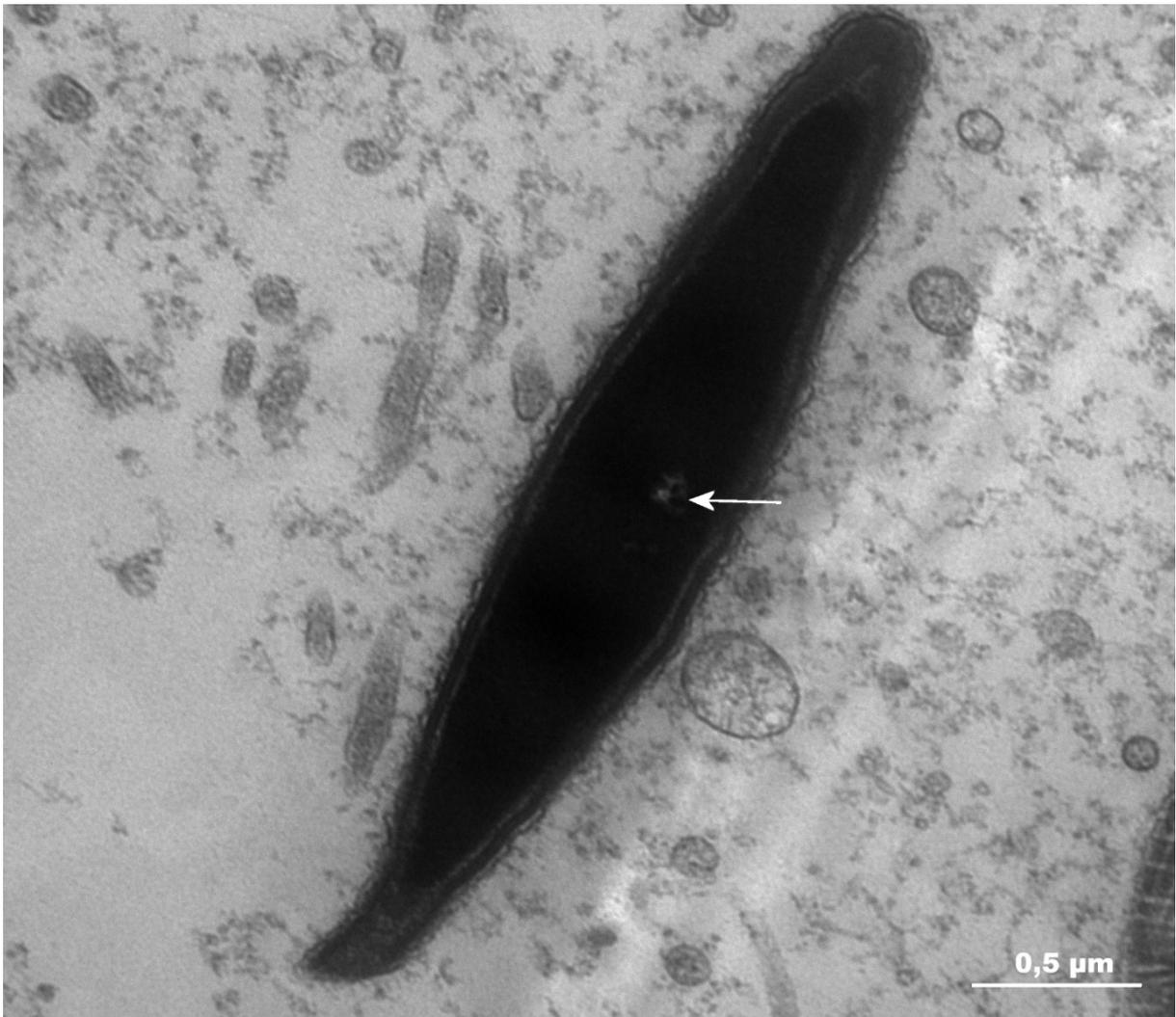


**Figura 4.** Porcentagens de espermatozoides, classificados conforme os níveis de baixa compactação cromatínica, encontradas em amostras de sêmen de camundongos C57BL/6 colhidas da cabeça e cauda do epidídimo e avaliados pela análise visual de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.

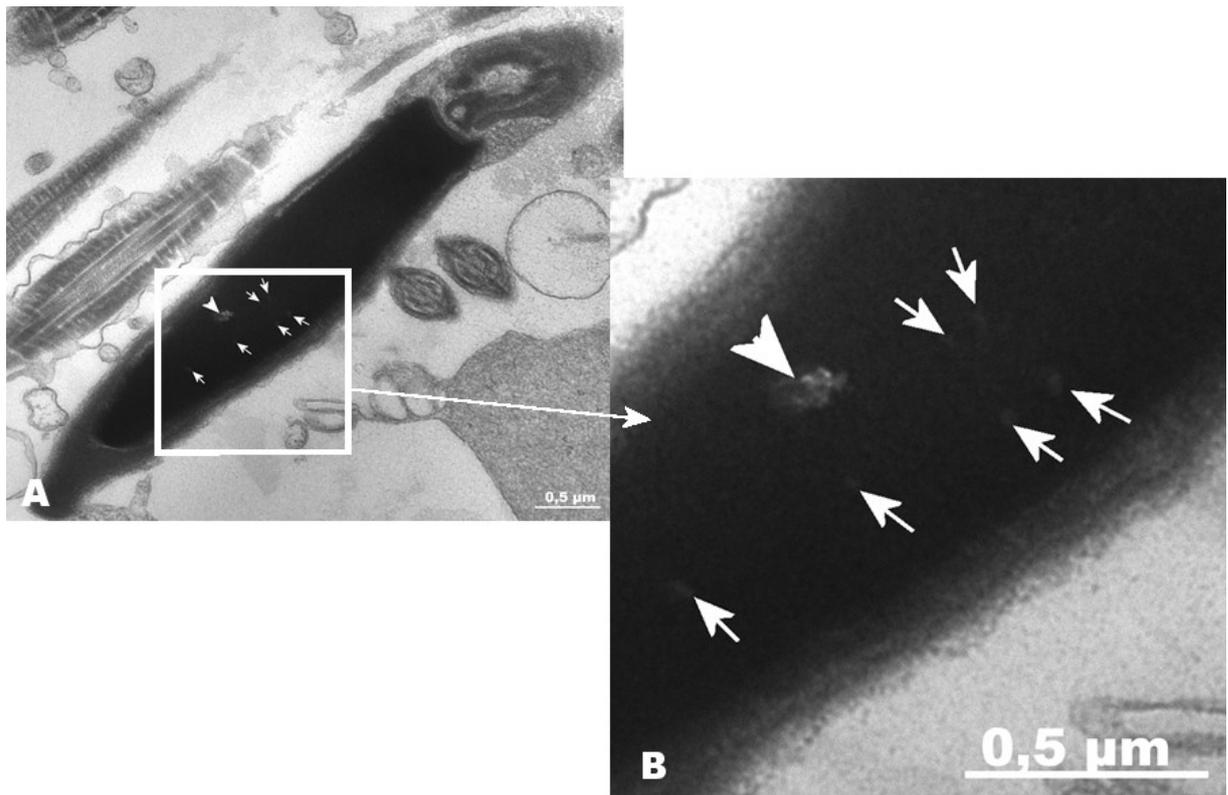
As figuras 5 a 10 representam os níveis de baixa compactação da cromatina espermática observados pela avaliação ultraestrutural.



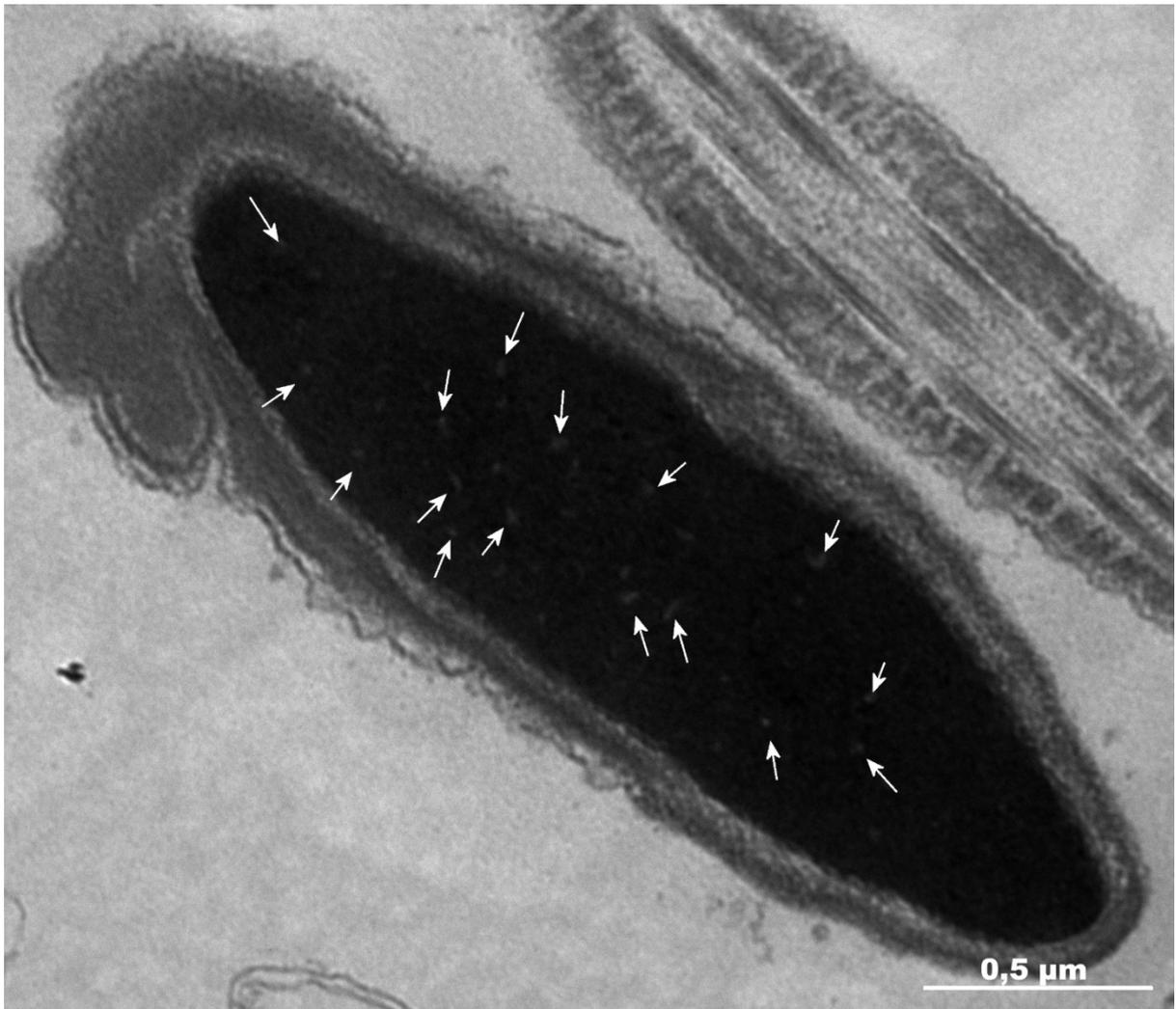
**Figura 5.** Eletromicrografia representativa da cabeça de espermatozoide de camundongo C57BL/6 indicando três pontos claros (setas), classificada no nível 1.



**Figura 6.** Eletromicrografia representativa da cabeça de espermatozoide de camundongo C57BL/6 indicando uma pequena região clara (seta), classificada no nível 1.



**Figura 7.** Eletromicrografia representativa da cabeça de espermatozoide de camundongo C57BL/6 indicando pontos claros (setas) e pequena área mais clara (cabeça de seta), classificada no nível 2. **B:** detalhe de A.



**Figura 8.** Eletromicrografia representativa da cabeça de espermatozoide de camundongo C57BL/6 indicando pontos claros (mais de oito pontos claros - setas), classificada no nível 3.



**Figura 9.** Eletromicrografia representativa da cabeça de espermatozoide de camundongo C57BL/6 indicando uma grande região clara (seta), classificada no nível 4.



**Figura 10.** Eletromicrografia representativa da cabeça de espermatozoide de camundongo C57BL/6 considerada normal (ausência de pontos e/ou regiões claras na cromatina nuclear).

## 6. DISCUSSÃO

A cromatina espermática sofre a formação de pontes dissulfídicas entre as protaminas durante o trânsito pelo epidídimo, aumentando a compactação do material genético (GOLAN, 1996), o que garante a entrega de uma sequência genômica de DNA paterno intacta ao oócito (AITKEN et al., 2009).

Neste estudo, observou-se ao avaliar os níveis de baixa compactação cromatínica de acordo com a sua localização na cabeça, que o espermatozoide murino apresenta uma sequência espacial ordenada de compactação durante a maturação espermática. Inicialmente, os níveis de baixa compactação na metade basal (BMB) e baixa compactação total (BCT) foram prevalentes nos espermatozoides da região da cabeça do epidídimo. No corpo, houve o predomínio da baixa compactação na base (BB) e na região central (BRC). Na porção da cauda, todos os níveis de baixa compactação diminuíram consideravelmente, sendo praticamente inexistentes, exceto na região central (BRC), que ainda prevaleceu em pequena quantidade. Deste modo, sugere-se que a compactação da cromatina espermática em murinos teria início na extremidade apical em direção a base e das laterais para o centro da cabeça do espermatozoide, compactando-se até próximo da base. Posteriormente, a compactação se daria no sentido da inserção da cauda (base) para o centro e por fim, na região central da cabeça (Figura 1). Esses resultados são semelhantes aos de estudos anteriores que descreveram o padrão ordenado de estabilização da cromatina espermática de camundongos que, segundo Calvin e Bedford (1971) e Krzanowska (1982) o sentido de compactação observado por coloração com AT seria do ápice para a parte distal da cabeça do espermatozoide. Ainda, nesse sentido, Fenic et al., (2004) relataram que a cromatina em murinos é altamente condensada da periferia para o centro e do ápice para a base do núcleo espermático. Martins (2018) por meio de análise digital de esfregaços de sêmen corados com AT descreveu sequência semelhante ao sugerido no presente trabalho para espermatozoides de touro, diferindo que em touros a última região a ser compactada seria a base e não o centro. Essa diferença possivelmente relaciona-se a dessemelhança da morfologia da cabeça dos espermatozoides dessas espécies.

Kempinas et al., (1998) e Garcia et al., (2012) observaram em ratos que o atraso no tempo de trânsito epididimário não altera a capacidade fértil dos espermatozoides, no entanto, quando este tempo é acelerado houve o comprometimento da fertilidade, pois o tempo disponível dos processos requeridos para a aquisição da capacidade fértil restou diminuído. O tempo de trânsito em ratos é de 8 dias (ROBB et al., 1978; FRANÇA et al., 2005).

Nesse sentido, o tempo de aquisição da capacidade de fertilização dos espermatozoides varia entre as espécies de mamíferos, entretanto, quase todos os espermatozoides isolados da porção proximal da cauda do epidídimo têm capacidade de fertilização (ROBAIRE e HERMO, 1988), sugerindo que os microambientes da cabeça e do corpo do epidídimo desempenham mecanismos importantes na maturação dos espermatozoides.

Noda et al., (2019) relataram que nove genes, que são abundantemente expressos em epidídimos e conservados entre várias espécies de mamíferos (Pate1, Pate2, Pate3, Clpsl2, Epp13, Rnase13, Gm1110, Glb112 e Glb113) são dispensáveis para a maturação e fecundidade masculina em camundongos, visto que observaram no referido estudo que fêmeas acasaladas com machos *knockout* apresentaram um número compatível de filhotes quando comparado aos machos controles. Diante disso, acredita-se que o processo de compactação da cromatina espermática durante o trânsito no epidídimo independe da expressão de genes epididimários específicos e que a participação do epidídimo nesse processo provavelmente esteja relacionada a manutenção de um ambiente luminal ácido e com baixo teor de bicarbonato, favorecendo o desenvolvimento de motilidade progressiva e da maturação do espermatozoide (BROWNE et al., 2016).

Observou-se também neste trabalho, que a proporção de espermatozoides com alta compactação cromatínica (maduros) foi menor na cabeça quando comparada às demais regiões epididimárias, em ambas as metodologias utilizadas, demonstrando um processo contínuo de compactação da cromatina durante o trânsito pelo epidídimo. Pérez-Cerezales et al., (2012) relataram resultados semelhantes em espermatozoides de camundongos em diferentes estágios maturacionais pelas metodologias SCSA e Ensaio Cometa Neutro, apresentando maior fragmentação do DNA e menor compactação cromatínica na região da cabeça do epidídimo quando comparados a cauda. Krzanowska (1982) demonstrou por meio de coloração por AT que durante a maturação epididimária, os espermatozoides murinos das regiões do corpo e cauda do epidídimo são mais compactados quando confrontados aos da porção da cabeça.

A avaliação da cromatina por MET poderia ter maior sensibilidade para identificar regiões menos compactadas. No entanto, possui o viés de avaliar apenas um corte da cabeça, ou seja, avalia apenas parte da cabeça, portanto, pode ser que a parte avaliada apresente alta compactação e a região anterior ou posterior ao corte possuam áreas pouco compactadas. Um grande número de cabeças avaliadas poderia minimizar este viés. Provavelmente foi o que ocorreu neste estudo, pois a análise da descompactação e heterogeneidade médias da cromatina feitas por análise de imagem de esfregaços corados com AT e a realizada por MET demonstraram que ambos os parâmetros diminuíram ao longo do processo de maturação

espermática, ou seja, o processo de compactação cromatínica do espermatozoide de camundongos iniciado durante a espermiogênese, permanece no epidídimo. Assim, acredita-se que exista uma relação inversa entre a compactação e heterogeneidade cromatínicas durante a maturação epididimária, isto é, espermatozoides imaturos possuem cromatina mais frouxa e heterogênea (MARTINS, 2018). Já nos espermatozoides maduros de camundongos, a cromatina espermática é uniformemente e densamente compactada (AUSIÓ et al., 2014) e as ligações dissulfídicas estariam distribuídas de forma homogênea (CALVIN e BEDFORD, 1971).

Compreender o processo de compactação da cromatina espermática durante o trânsito do espermatozoide através do epidídimo permitiria avanços nas áreas de reprodução assistida e produção *in vitro* de embriões, assim como elucidaria parte dos episódios de subfertilidade, uma vez que alterações nesse processo estão associadas a problemas de fertilidade em mamíferos.

## 7. CONCLUSÃO

O estudo dos níveis de baixa compactação da cromatina espermática durante o trânsito do espermatozoide murino através do epidídimo demonstrou que o processo de compactação cromatínica do espermatozoide iniciado durante a espermiogênese, continua no epidídimo, e que esse processo teria início na extremidade apical em direção a base e das laterais para o centro da cabeça do espermatozoide, compactando-se até próximo da base; posteriormente, a compactação se daria no sentido da inserção da cauda (base) para o centro e por fim, na região central da cabeça.

## REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J, DE IULIIS, G.N; MCLACHLAN, R.I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. **International Journal of Andrology**, v.32, p.46–56, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x>
- ALKMIN, D.V.; MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax, **Theriogenology**, v.79, n.9, p.1294- 300, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.026>
- ALLEN, M.J.; HUD, N.V.; BALOOCH, M.; TENCH, R.J.; SIEKHAUS, W.J; BALHORN, R. Tip-radius-induced artifacts in AFM images of protamine-complexed DNA fibers. **Ultramicroscopy**, v.42-44, p.1095-1100, 1992. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(92\)90408-C](https://doi.org/10.1016/0304-3991(92)90408-C)
- ALVES, P. H. M. 2016. Correlação entre alterações nucleares de espermatozoides de touro identificados por microscopia eletrônica de transmissão e a eficiência na produção *in vitro* de embriões. 47f. Dissertação (Livre Docência) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.
- AUSIÓ, J.; GONZÁLEZ-ROMERO, R.; WOODCOCK, C.L. Comparative structure of vertebrate sperm chromatin. **Journal of Structural Biology**, v.188, p.142-155, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.09.004>
- AUSTIN, C. R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Australian Journal of Biological Sciences - Elsevier**, 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. **Journal of Cell Biology**, v.93, p.298-305, 1982. <https://doi.org/10.1083/jcb.93.2.298>
- BALHORN, R.; WESTON, S.; THOMAS, C.; WYROBEK, A.J. DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. **Experimental Cell Research**, v.150, n.2, p.298-308, 1984. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(84\)90572-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(84)90572-X)
- 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](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9_1)
- BANKS, W.J. Sistema reprodutor masculino. In: BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. São Paulo: Manole, p.546-564, 1992.

- BARTH, A.D.; OKO, R.J. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. First edition. Ames: **Iowa State University Press**, 1989.
- 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, p.97-103, 1996.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry**, v.79, n.1, p.17-23, 2004. <https://doi.org/10.1080/10520290410001700774>
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v.22, n.2, p.85-90, 2005.
- BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.2, p.92-96, 2013.
- BELLVÉ, A.R.; MCKAY, DJ.; RENAUX, B.S.; DIXON, G.H. Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2. Amino acid sequence of P2. **Biochemistry**, v.27, p.2890–2897, 1988. <https://doi.org/10.1021/bi00408a034>
- BLOCH, D.P. A catalog of sperm histones. **Genetics**, v.61, n.1, p.93-111, 1969.
- BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. *Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists*. 2nd ed. Sudbury: Jones and Barlett Learnig, p.670, 1998.
- BRETON, S.; RUAN, Y.C.; PARK, Y.J.; KIM, B. Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. **Asian Journal of Andrology**, v.18, n.1, p.3-9, 2016. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.165946>
- BROWNE, J.A.; YANG, R.; LEIR, S.H.; EGGNER, S.E.; HARRIS, A. Expression profiles of human epididymis epithelial cells reveal the functional diversity of caput, corpus and cauda regions. **Molecular Human Reproduction**, v.22, n.2, p.69-82, 2016. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav066>
- CALVIN, H.I.; BEDFORD, J.M. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v.13, p.65-75, 1971.
- CARREL, D. T. Epigenetics of the male gamete. **Fertility and Sterility**, v.97, n.2, p.267-274, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.036>
- 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>
- COOKE, H.J; SAUNDERS, P.T. Mouse models of male infertility. **Nature Reviews Genetics**, v.3, n.10, p.790-801, 2002. <https://doi.org/10.1038/nrg911>

- COOPER, T.G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v.13, n.1, p.130-138, 2011. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.97>
- DADOUNE, J. P. Spermatozoal RNAs: What About Their Functions? **Microscopy Research and Technique**, v.72, n.8, p.536–551, 2009. <https://doi.org/10.1002/jemt.20697>
- DAVIDOFF, M. S.; BREUCKER, H.; HOLSTEIN, A. F.; SEIDEL, K. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. **Cell and Tissue Research**, v. 262, n.2, p.253-261, 1990. <https://doi.org/10.1007/BF00309880>
- DE ROOIJ, D.G. Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. I. Normal situation. **Cell Tissue Kinet**, v.6, p.281-287, 1973. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1973.tb01617.x>
- DE ROOIJ, D.G.; GRISWOLD, M.D. Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. **Journal of Andrology**, v.33, p.1085-1095, 2012. <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016832>
- 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.; CISALE, H.; JOHNSTON, S.D.; SARASA, J.; FERNANDEZ, J.L.; GOSÁLVEZ, J. 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>
- ERENPREISS, J.; BARS, J.; LIPATNIKOVA, V.; EREMPREISA, J.; ZALKALNS, J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. **Asian Journal of Andrology**, v.22, n.1, p.45-53, 2001.
- ERENPREISS, J.; SPANO, M.; EREMPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWEREMAN, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, v.8, p.11-29, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00112.x>
- EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, Washington, v. 210, n. 4474, p.1131-1133, 1980. <https://doi.org/10.1126/science.7444440>
- FATEHI, A.N.; BEVERS, M.M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, v.27, p.176-188, 2006. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04152>
- FENIC, I.; SONNACK, V.; FAILING, K.; BERGMANN, M.; STEGER, K. In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. **Journal of Andrology**, v.25, n.5, p.811-818, 2004. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02859.x>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6)

FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v.63, n.2, p. 300- 318, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.014>

FUENTES-MASCORRO, G.; VERGARA-ONOFRE, M.; MERCADO, E.; HERNÁNDEZ PÉREZ, O.; ROSADO, A. Participation of DNA structure on sperm chromatin organization. **Archives of Andrology**, v.45, p.61-71, 2000. <https://doi.org/10.1080/014850100410033>

GARRETT, J.E.; GARRETT, S.H.; DOUGLASS, J. A spermatozoa-associated factor regulates proenkephalin gene expression in the rat epididymis. **Molecular Endocrinology**, v.4, n.1, p.108-118, 1990. <https://doi.org/10.1210/mend-4-1-108>

GINEITIS, A.A.; ZALENSKAYA, I.A.; YAU, P.M.; BRADBURY, E.M.; ZALENSKY, A.O. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. **Journal of Cell Biology**, v.151, n.7, p.1591-1598, 2000. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.7.1591>

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.; COOPER, T.G.; OSCHRY, Y.; OBERPENNING, F.; SCHULZE, H.; et al. Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. **Human Reproduction**, v.11, p.1457–1462, 1996. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019419>

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

HAMMADEH, M.E.; ZEGINIADOV, T.; ROSENBAUM, P.; GEORG, T.; SCHMIDT, W.; STREHLER, E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. **Archives of Andrology**, v.46, n.2, p.99-104, 2001. <https://doi.org/10.1080/01485010117363>

HASCHEK, W.M.; ROUSSEAU, C.G.; WALLIG, M.A. **Handbook of Toxicologic Pathology**. Academic Press, Table 59.2, 2512p. 2013.

HIRAIWA, S. H. 2015. Classificação das alterações cromatínicas de espermatozoides bovinos e sua correlação com a eficiência na produção *in vitro* de embriões. 71f. Dissertação (Livre Docência) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

HOLSTEIN, A.F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.107, 2003. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-107>

HUCKINS, C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. **The Anatomical Record**, v.169, n.3, p.533-557, 1971. <https://doi.org/10.1002/ar.1091690306>

HUCKINS, C.; OAKBERG, E.F. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. II. The irradiated testes. **The Anatomical Record**, v.192, p.529-542, 1978. <https://doi.org/10.1002/ar.1091920407>

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>

JENNINGS, C.; POWELL, D. Genome organization in the murine sperm nucleus. **Zygote** v.3, p.123-131, 1995. <https://doi.org/10.1017/S0967199400002495>

JOHNSON, G. D.; LALANCETTE, C.; LINNEMANN, A. K.; LEDUC, F.; BOISSONNEAULT, G.; KRAWETZ, S. A. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. **Reproduction**, v.141, n.1, p.21-36, 2011. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0322>

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered postmortem. **Theriogenology**, v.60, p.1249-1259, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00139-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00139-0)

KANIPPAYOOR, R.L.; ALPERN, J.H.; MOEHRING, A.J. Protamines and spermatogenesis in *Drosophila* and *Homo sapiens*: a comparative analysis. **Spermatogenesis**, v.3, 2013. <https://doi.org/10.4161/spmg.24376>

KEMPINAS, W.G; SUAREZ, JD; ROBERTS, N.L; STRADER, L; FERRELL, J; GOLDMAN, J.M; et al. Rat epididymal sperm quantity, quality and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. **Biology of Reproduction**, v.59, p.890-896, 1998. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.4.890>

KHALIFA, T. A.; REKKAS, C. A.; LYMBEROPOULOS, A. G.; SIOGA, A.; DIMITRIADIS, I.; PAPANIKOLAOU, T. H. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.104, n.2-4, p.143-63, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.019>

KIPPER, B.H.; TREVIZAN, J.T.; CARREIRA, J.T.; CARVALHO, I.R.; MINGOTI, G.Z.; BELETTI, M.E.; PERRI, S.H.V.; FRANCISCATO, D.A.; PIERUCCI, J.C.; KOIVISTO, M. B. Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. **Theriogenology**, v.87, p.154-160, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.017>

KRAMER, J. A.; KRAWETZ, S. A. Nuclear matrix interactions within the sperm genome. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.11619-11622, 1996. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.20.11619>

KRZANOWSKA, H. Toluidine blue staining reveals changes in chromatin stabilization of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v.64, p.97-121, 1982. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0640097>

LEWIS, S.E.M; AITKEN, R.J. DNA damage to spermatozoa has impact on fertilization and pregnancy. **Cell Tissue Research**, v.322, p.33-41, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-1097-5>

LUCIO, A. C.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; MARTINS, M. C.; BRAGA, L. S.; MIGLIO, L.; ALVES, B. G.; SILVA, T. H.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. **Theriogenology**, p.1-10, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>

MARTINS, C.F.; DODE, M.N.; BAO, S.N.; RUMPF, R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. **Genetics and Molecular Research**, v.15, p.94-104, 2007.

MARTINS, M. C.. **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.

MARUSHIGE, Y.; MARUSHIGE, K. Enzymatic unpacking of bul sperm chromatin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.403, n.1, p.180-191, 1975. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(75\)90020-0](https://doi.org/10.1016/0005-2744(75)90020-0)

MARUSHIGE, Y.; MARUSHIGE, K. Dispersion of mammalian sperm chromatin during fertilization: an in vitro study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.519, n.1, p.1-22, 1978. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(78\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0005-2787(78)90058-8)

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, 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>

MORETTI, E.; COLLODEL, G. Electron microscopy in the study of human sperm pathologies. **Science and Technology**, 2012.

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

NAVA-TRUJILLO, H.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, A.; QUINTERO-MORENO, A. Integridad de la cromatina y forma de la cabeza del espermatozoide de toro: evaluación simultánea con la tinción de azul de toluidina. **Revista Científica**, v.22, n.3, p.211-216, 2012.

NODA, T.; SAKURAI, N.; NOZAWA, K.; KOBAYASHI, S.; DEVLIN, D.J.; MATZUK, M.M.; IKAWA, M. Nine genes abundantly expressed in the epididymis are not essential for male fecundity in mice. **Andrology**, p.1-10, 2019. <https://doi.org/10.1111/andr.12621>

OAKBERG, E.F. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. **The Anatomical Record**, v.169, p.515-531, 1971. <https://doi.org/10.1002/ar.1091690305>

OLIVA, R. Protamines and male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 13, n. 4, p. 417-435, 2006. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>

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.

OLIVA, R.; CASTILLO, J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. **Asian journal of Andrology**, v.13, n.1, p.24, 2011. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.65>

PÉREZ-CEREZALES, S.; MIRANDA, A.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Comparison of four methods to evaluate sperm DNA integrity between mouse caput and cauda epididymidis. **Asian Journal of Andrology**, v.14, n.2, p.335-337, 2012. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.119>

PHILLIPS, B.T.; GASSEI, K.; ORWIG, K.E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci*, v.365, p.1663-1678, 2010. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0026>

PITTOGGI, C.; MAGNANO, A.R.; SCIAMANNA, I.; GIORDANO, R.; LORENZINI, R.; SPADAFORA, C. Specific localization of transcription factors in the chromatin of mouse mature spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.60, p.97-106, 2001. <https://doi.org/10.1002/mrd.1066>

PUGLISI, R.; POZZI, A.; FOGGIO, L.; SPANO, M.; ELEUTERI, P.; GROLLINO, M. G.; BONGIONI, G.; GALLI, A. The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo. **Animal Reproduction Science**, n.132, p.17-28, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.04.006>

RAHMAN, M. B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T.; MAES, D.; HOOGEWIJS, M.; FRIJTERS, A.; NOORDMAN, J.; GRANADOS, A.; DERNELLE, E.; SHAMSUDDIN, M.; PARRISH, J.J.; VAN SOOM, A. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v.76, n.7, p.1246-1257, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.031>

RATHKE, C.; BAARENDS, W.M.; AWE, S.; RENKAWITZ-POHL, R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1839, n.3, p.155-168, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.08.004>

ROBAIRE, B.; HERMO, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: **The Physiology of Reproduction** (eds E Knobil & JD Neill, pp. 999-1080. Raven Press, New York, 1988.

ROBAIRE, B.; CHAN, P. What does the epididymis do and how does it do it? In: Hinton BT, editor. **Handbook of Andrology**. 2nd ed. Lawrence: Allen Press; p. 10-5, 2010.

ROBB, G.W.; AMMAN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of reproduction and fertility**, v.54, p.103-107, 1978. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540103>

SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M. L.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E. P. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict

fertility of bovine sêmen. **Theriogenology**, n.84, v.9, p.1447-1454, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.035>

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

SOTOLONGO, B.; LINO, E.; WARD, W.S. Ability of Hamster Spermatozoa to Digest Their Own DNA. **Biology of Reproduction**, v.69, n.6, p.2029-2035, 2003. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.020594>

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.

TEGELENBOSCH, R.A.; De ROOIJ, D.G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research* v.290, p.193-200, 1993. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90159-D](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90159-D)

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**. v.42, n.1, p.87-91, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)47963-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)47963-X)

THAYER, K.A.; RUHLEN, R.L.; HOWDESHELL, K.L.; BUCHANAN, D.L.; COOKE, P.S.; PREZIOSI, D.; WELSHONS, W.V.; HASEMAN, J.; VOM SAAL, F.S. Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17 $\alpha$ -ethinyl oestradiol. **Human Reproduction**, v.16, p.988-996, 2001. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.988>

VALLI, H.; PHILLIPS, B.T.; GASSEI, K.; NAGANO, M.C.; ORWIG, K.E. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis. In: Plant, T.M., Zeleznik, A.J. (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, p. 595-635, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00015-6>

WALTERS, A.H.; EYESTONE, W.E.; SAACKE, R.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. **Journal of Andrology**, v.25, n.4, p.554-563, 2004. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02826.x>

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

WARD, W.S. Regulating DNA Supercoiling: Sperm Points the Way. **Biology of Reproduction**, v.84, p.841-843, 2011. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.090951>

YARON, Y. KRAMER, J.A.; GYL, K.; EBRAHIM, S.A; EVANS, M.I.; JOHSON, M.P.; KRAWETZ, S.A. Centromere sequences localize to the nuclear halo of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.21, p.13-18, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1998.00085.x>

YEUNG, C.H.; WAGENFELD, A.; NIESCHLAG, E.; COOPER, TG. The cause of infertility of male *c-ros* tyrosine kinase receptor knockout mice. **Biology of Reproduction**, v. 63, p.612-618, 2000. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.2.612>

ZALENSKAYA, I.A.; BRADBURY, E.M.; ZALENSKY, A.O. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.279, n.1, p.213-218, 2000. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3917>

ZHU, W.J. Transmission electron microscopy analysis of the origin and incidence of sperm intranuclear cytoplasmic retention in fertile and teratozoospermia men. **Andrology**, v.6, p.317-324, 2018. <https://doi.org/10.1111/andr.12469>



Universidade Federal de Uberlândia  
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## ANEXO A

Certificado de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia.

### 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.

**Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão**  
Coordenador da CEUA/UFU