

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
ESTRUTURAL APLICADAS

ROMUALDO MORANDI FILHO

ANÁLISE DA ESTRUTURA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA
CROMATINA NUCLEAR ESPERMÁTICA DE BOVINOS.

Uberlândia, MG, Março de 2013

ROMUALDO MORANDI FILHO

ANÁLISE DA ESTRUTURA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA
CROMATINA NUCLEAR ESPERMÁTICA DE BOVINOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia. Como requisito para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti.

Uberlândia, MG, março de 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M829a

2013 Morandi Filho, Romualdo, 1988-
Análise da estrutura e identificação de proteínas da cromatina
nuclear espermática de bovinos / Romualdo Morandi Filho. -- 2013.

62 f : il.

Orientador: Fabio de Oliveira.
Coorientador: Marcelo Emilio Beletti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Progra-ma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Bovino - Espermatozóides - Teses. 3. Cromatina -
Teses. I. Oliveira, Fabio de. II. Beletti, Marcelo Emilio. III. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

***Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha mulher Lara e meu filho Levi.
Vocês são a fonte da minha persistência.***

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Fábio de Oliveira e Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti, que acreditaram no meu trabalho e que sempre estiveram a disposição para me ajudar e aconselhar mesmo nos momentos mais turbulentos.

Aos amigos Moline Severino Lemos, Elisson Terencio Souza e demais colegas de laboratório por toda a ajuda prestada.

E a Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais, cujo qual sem o fomento fornecido este trabalho não se realizaria.

A ciência fez de nós deuses antes mesmo de merecermos ser homens.
(Jean Rostand)

RESUMO

A cromatina espermática bovina é uma estrutura específica, complexa, e que ainda não foi completamente elucidada. O presente estudo teve como objetivo purificar esta estrutura e avaliar sua composição, bem como analisar sua morfologia. A purificação da cromatina foi realizada através da remoção das membranas celulares, incluindo envoltório nuclear, seguido de uma descondensação da cromatina resultante. Sua composição molecular foi analisada pelas técnicas biofísicas de eletroforese, cromatografia líquida de alta performance e espectrofotometria de massa. Já sua morfologia foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram uma composição proteica rica em variantes de histonas H2B, queratinas, bem como uma transcriptase reversa e uma nucleoporina de 50kDa. As micrografias mostraram uma estrutura que aparenta ser uma lâmina nuclear e as fibras de matriz, e estruturas toroidais interligadas com esta malha de fibras de forma mais concentrada nas proximidades da lâmina, além de uma estrutura em forma de bastão no centro do eixo maior da cabeça espermática que esta vinculada a estas fibras de matriz e aos toróides semelhantemente à lâmina nuclear.

Palavras-chave: Cromatina, Espermatozóide, Bovino.

ABSTRACT

The sperm nuclear chromatin structure is a specific, complex, and that has not been fully elucidated. This study aimed to isolate this structure and evaluate its composition, as well as analyze their morphology. Purification of chromatin was performed by removing the cell membrane and nuclear envelope followed by a decondensation of resulting chromatin. Its molecular composition was analyzed by biophysical techniques of electrophoresis, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. And its morphology was analyzed by transmission electron microscopy. The results showed a protein composition rich in variants of histone H2B, keratin, and a reverse transcriptase and a nucleoporin of 50 kDa. The micrographs showed a structure that looks like a nuclear lamina and nuclear matrix fibers, a toroidal structures intertwined with this mesh of fibers in a more concentrated near the nuclear lamina, and a rod-shaped structure at the center of major axis of the head sperm that bound to the fibers and the matrix toroids similarly to the nuclear lamina.

Keywords: Chromatin, Sperm, Bovine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

anti-RT – anti transcriptase reversa

CAD - dihidroorotase

cAMP – adenosine monofosfato ciclica

CPAS – sistema computacional de análise proteomica

CRE - elemento de resposta a cAMP

CREB - proteínas de ação trans aumentadoras e ligadoras

CRE-box – sequência com elementos responsivos a catabolitos

CREM - proteínas moduladoras de CRE

DNA - ácido desoxirribonucleic

DNase – desoxiribonuclease

DTT - 1,4-ditiotreitol

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FSH - hormônio foliculo estimulante

GC – sequência guanina-citosina.

GTPase – hidrolase de guanosina trifosfato

HPLC - cromatografia liquida de alta performance

ICSI - injeção intracitoplasmática de espermatozoides

ilhas GpC – regiões de sequência: guanina, ligação fosfodiester e citosina

kDa – kilodalton

LC-MS/MS - cromatografia liquida acoplada a espectrometria de massa concatenada

LINC – vinculador de nucleoesqueleto e citoesqueleto

MARS - regiões de anexação da matriz

PSCBt – proteínas solúveis da cromatina espermática de *Bos taurus*

P1 – protamina 1

P2 – protamina 2

Ran – proteína nuclear relacionada a Ras

RNA – ácido ribonucleico

RNAse – ribonuclease

SDS – dodecil-sulfato de sodio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

SMRGT - transferência reversa de gene mediada pelo espermatozoide

SRPK1 - proteína Kinase 1 específica de Serina/Arginina

TATA-box – sequência 5'-TATAAA-3' promotora de genes.

TBP - proteína de ligação ao TATA

TCA - ácido tricloroacético

TOP2B - topoisomerasas IIB

TP – proteína de transição

TP1 - proteína de transição 1

TP2 - proteína de transição 2

LISTA DE IMAGENS

Figura 1: Eletroforese em gel de poliacrilamida corado com prata do material resultante do processo de extração de cromatina – Pag. 32

Figura 2: Cromatografia de material passado em coluna Superdex G75 obtido no processo de extração de cromatina – Pag. 34

Figura 3: Cromatografia de material passado em coluna de Fase Reversa obtido do pico numero 10 resultante do HPLC Superdex G75 – Pag. 35

Figura 4: Cromatografia de material passado em coluna de Fase Reversa obtido do pico numero 11 resultante do HPLC Superdex G75 – Pag. 36

Figura 5: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 39

Figura 6: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 40

Figura 7: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 41

Figura 8: Eletromicrografia em aumento de 30.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 42

Figura 9: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 43

Figura 10: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 44

Figura 11: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 45

Figura 12: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 46

Figura 13: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 47

Figura 14: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 48

Figura 15: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 49

Figura 16: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 50

Figura 17: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 51

Figura 18: Eletromicrografia em aumento de 50.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada – Pag. 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de variantes protéicas encontradas pelo sequenciador LC-MS/MS – Pag 36.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Revisão de literatura.....	14
2.1. A espermatogênese.....	14
2.2. Formação da cabeça espermática.....	14
2.3. A estrutura da matriz espermática e matriz nuclear.....	16
2.4. Proteínas da cromatina espermática.....	17
2.4.1. Histonas.....	17
2.4.2. Proteínas de transição.....	18
2.4.3. Protaminas.....	19
2.5. Expressão gênica das nucleoproteínas durante a espermatogênese nos mamíferos...	21
2.6. Atividade nuclear no espermatozoide maduro de mamíferos.....	23
2.7. Relação entre a cromatina espermática para a fertilização e sobrevivência embrionária.....	24
3. Materiais e Métodos.....	26
3.1. Sêmen.....	26
3.2. Pré-processamento do sêmen.....	26
3.3. Separação das cabeças dos espermatozoides.....	26
3.4. Extração da cromatina e matriz nuclear.....	27
3.5. Eletroforese de Policrialamida com Duodecil-Sulfato de Sódio 14% (SDS-PAGE)	27
3.6. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).....	28
3.6.1. Cromatografia de exclusão molecular.....	28
3.6.2. Cromatografia de fase reversa.....	28
3.7. Sequenciamento parcial por LC-MS/MS.....	29
3.8. Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	30
4. Resultados e Discussão.....	31
5. Conclusões.....	54
6. Referências Bibliográficas.....	55

1. Introdução

O núcleo do espermatozoide é haplóide e sua cromatina é intensamente condensada, pois durante a espermiogênese dos mamíferos, as histonas somáticas, proteínas nucleares básicas, são substituídas em parte ou totalmente por nucleoproteínas específicas dos espermatozoides, denominadas protaminas, as quais são ricas em arginina e cisteína oxidada (BLOCH, 1969). Sequências de DNA (20 a 50 kb) são firmemente enroladas pelas protaminas, formando estruturas em forma de anéis sigmoidais ou toroides, reconhecidas como unidades básicas da cromatina espermática (HUD et al., 1993). Há algumas décadas, acreditava-se na inexistência de matriz nuclear espermática e que a presença de histonas no núcleo seria um erro no processo de compactação cromatínica, o que poderia interferir na fertilidade do macho. Hoje, sabe-se que entre as estruturas toroidais, existem algumas poucas regiões contendo sequências de nucleossomos, as quais estão, geralmente, anexadas a uma matriz nuclear.

Estudos têm sugerido que a matriz nuclear dos espermatozoides possui papel crucial na regulação do DNA depois da fertilização, controlando fragmentação e degradação do DNA antes e depois da fertilização, e a replicação do DNA paterno depois da fertilização. Este dois processos estão intimamente ligados e provavelmente interferem no desenvolvimento do zigoto. A ideia de que a matriz nuclear é necessária para a replicação do DNA, apoia a sugestão de que ela contribua com parte da composição do pronúcleo masculino, no zigoto recém fertilizado. Apesar do baixo número de pesquisas sobre a matriz nuclear de espermatozoides de touro, Beletti et al (2004) observaram que as alterações na cromatina de espermatozoides bovinos ocorrem principalmente em regiões análogas onde o DNA se liga a matriz nuclear em espermatozoides humanos, ou seja, no eixo central e na base da cabeça. A participação da matriz nuclear espermática na formação do pronúcleo paterno e conseqüentemente na fertilização e desenvolvimento do embrião e a localização da maioria das alterações da cromatina espermática, sugerem que a matriz nuclear e sua associação com o DNA merecem maior atenção nas pesquisas sobre alterações da cromatina espermática.

No entanto, pouco se sabe sobre a localização e caracterização da matriz nuclear de espermatozoides de touro, bem como sua composição química, o que evidência a necessidade de mais trabalhos para um maior entendimento da matriz e sua relação com as demais estruturas com quais ela está associada, bem como uma maior elucidação dos processos em que ela está envolvida.

Com este trabalho objetivou-se analisar a estrutura e a composição da cromatina do espermatozóide de *Bos taurus*.

2. Revisão de Literatura

2.1. A espermatogênese

A espermatogênese é um processo dividido em dois estágios, denominados espermatocitogênese e espermiogênese. Estes processos, transformam uma espermatogônia diplóide em um espermatozoide haplóide com um núcleo condensado, um acrossoma e um flagelo. A espermatocitogênese consiste de divisões mitóticas das espermatogônias e a subsequente manutenção das mesmas (SENGER, 1993). Após essa fase, as espermatogônias entram no processo de meiose para formar os espermatócitos primários e os subsequentes espermatócitos secundários após a primeira divisão meiotica, que por sua vez se diferenciam em espermátides ao final da meiose (DADOUNE, 2003).

Na espermiogênese, ocorre o remodelamento da espermátide em espermatozoide. Neste processo, o núcleo se torna transcricionalmente inativo e a maior parte do citoplasma é eliminado da espermátide em forma de uma vesícula residual (SAKKAS et al. 2002). As espermátides, durante a espermiogênese, podem ser classificadas em três categorias: espermátides primárias, com núcleo redondo, espermátides secundárias, já em processo de alongamento e condensação do núcleo e espermátides terciárias, com núcleo já condensado (DADOUNE, 2003).

2.2. Formação da cabeça espermática.

A formação da cabeça espermática ocorre durante a espermiogênese no estágio final da espermatogênese. Nesta etapa, a espermátide sofre complexas mudanças que a levam a se tornar uma célula de morfologia bastante específica. Por este motivo, cada espécie tem sua forma nuclear espermática própria. O espermatozoide em muitos mamíferos, incluindo os bovinos, tem uma cabeça espermática espatulada (YANAGIMACHI, 1981). O acrossoma, lâmina subacrossomal, a manchete e a lâmina nuclear podem ter papel correlato importante na determinação do formato do núcleo. (RUSSELL et al., 1991).

A ligação entre o acrossoma e o núcleo parece ter uma implicação no remodelamento nuclear. O complexo de Golgi é a fonte das vesículas próacrossomais transportadas pelos microtúbulos e por actinas filamentosas até o acroplaxoma, onde elas se fundem e formam o acrossoma. O acroplaxoma é uma placa de citoesqueleto contendo actina filamentosa e queratina 5 similar ao envoltório nuclear, exceto por um anel marginal. Este anel é ancorado em um raso entalhe do envoltório nuclear por uma estrutura parecida com um desmossomo, que consiste de duas placas densas: uma acrossomal ligada a membrana mais interna do acrossoma e uma nuclear ligada ao envoltório nuclear. O acroplaxoma é preso no núcleo espermático por um complexo LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) específico da espermiogênese, estendendo da lâmina nuclear densa subjacente e ligado à actina filamentosa. O acroplaxoma é responsável por ancorar e fundir as vesículas proacrossomais ao longo de sua placa, para formar a primeira vesícula acrossomal e depois o acrossoma. Também é responsável por modular através da actina filamentosa e da queratina 5 as forças de tração originadas dos arcos de actina filamentosa das células de Sertoli alongando a cabeça espermática. O ancoramento do acroplaxoma no núcleo espermático não se desfaz com tratamento usando Triton X100. Actina filamentosa e queratina 5 também são encontrados na manchete. (KIERSENBAUM, 2003)

A manchete é uma estrutura temporária que consiste de um anel perinuclear com microtúbulos inseridos. O anel perinuclear da manchete se liga na região mais caudal do anel marginal do acroplaxoma, logo após as estruturas análogas aos desmossomos do anel marginal do acroplaxoma começarem a se organizar. Um sulco circular marca os limites entre a sobreposição do anel marginal do acrossoma e o anel perinuclear da manchete. Este sulco marca o ponto onde chegam os arcos de filamentos de actina das células de Sertoli. A manchete é localizada próxima ao maquinário GTPásico da Ran, uma proteína envolvida no transporte nucleocitoplasmático e na regulação da montagem de microtúbulos ligados ao núcleo (KIERSEMBAUM, 2002).

Uma grande redução no volume nuclear resulta no empacotamento do excesso de envoltório nuclear no chamado envoltório nuclear redundante dos espermatozoides de vários mamíferos. Entretanto, o termo “envoltório nuclear redundante” surgiu originalmente devido o desconhecimento de sua função. Sua presença na região de pescoço do espermatozoide maduro gerou inúmeras especulações de que ele tem um papel na fertilização, onde o envoltório nuclear redundante poderia ser reincorporado no núcleo espermático durante a formação do prónucleo masculino (FAWCETT; ITO, 1965). Ho e Suarez (2003) propuseram que uma porção do envoltório nuclear redundante nos espermatozoides maduros regula a

hiperativação da motilidade, servindo como um depósito de cálcio intracelular.

Durante a condensação nuclear da espermatíde, as histonas são gradualmente trocadas por proteínas de transição (TP) e, então, protaminas. Entretanto, o desligamento de muitas proteínas e os eventos de degradação são executados no núcleo espermático e no citoplasma. Proteassomas e proteínas poliubiquitinadas, marcados para serem degradadas, são localizados em uma região não condensada do núcleo cercada por envoltório nuclear redundante. Os produtos da degradação proteica são supostamente transportados ao citoplasma da região do pescoço do espermatozoide através de poros nucleares, e podem se tornar parte do corpo residual ou da gota citoplasmática que é removida da cauda espermática durante o final da maturação no epididimo. Durante a condensação nuclear e sua reformatação, os poros nucleares são movidos até o envoltório nuclear redundante na região caudal do núcleo, porém, ainda, não se sabe ao certo como ocorre este processo (HARAGUCHI et al., 2007).

2.3. A estrutura da cromatina espermática e matriz nuclear.

Nas espermatídes iniciais, a cromatina de seus núcleos arredondados consistem de um complexo de proteínas Histonas ligadas ao DNA, formando os chamados nucleossomos (EVENSON, 1999a). Os nucleossomos se mantêm ligados ao DNA formando a chamada estrutura de “cordão-de-contas” devido ao DNA enovelado nos octâmeros de histonas (WOLFFE, 2001). Ao longo da espermiogênese, esta estrutura desaparece e dá lugar a fibras mais finas, que se agregam até formar uma massa homogênea resultante da combinação do DNA com protaminas (DADOUNE, 2003).

Essas mudanças morfológicas do núcleo se devem as mudanças na organização da cromatina espermática, onde histonas são removidas do DNA das espermatídes e substituídas por proteínas de transição, que por sua vez são substituídas por protaminas, que são as proteínas finais responsáveis pela condensação e estabilização da cromatina (ZHAO, 2001). As protaminas interagem com o DNA formando estruturas toroidais (também conhecidas como “Doughnuts”) que variam de 50-100nm (ALLEN, 1993), que são um enovelamento do DNA em torno das protaminas. Cada toróide contém em torno de 50kb de DNA. Ao final da espermiogênese podem haver mais de 50.000 estruturas toroidais empacotadas no núcleo espermático (BALHORN et al., 2000).

Além de protaminas e histonas espermáticas específicas, tem sido demonstrado que a cromatina contém proteínas potencialmente ativas incluindo alguns fatores de transcrição (PITTOGGI et al., 2001).

Apesar do aumento do número de trabalhos sobre a matriz nuclear espermática, sua composição ainda não está totalmente descrita. Contudo, há sugestões de que alguns de seus componentes sejam actina, miosina, citoqueratinas e spectrina (OCAMPO et al., 2005), e evidências de sintetase carbamil fosfato glutamino dependente, transcarbamilase aspartato, dihidroorotase (CAD) (CARREY et al., 2002; OCAMPO et al., 2005), transcriptase reversa (GIORDANO et al., 2000) e também topoisomerasas IIB (TOP2B) (SHAMAN et al., 2006).

A cromatina nuclear apresenta regiões hipersensitivas a nuclease, e que têm sido descritas como próximas as regiões de matriz ligadas aos domínios de alça no DNA espermático humano, da mesma forma que a cromatina das células somáticas potencializadas à transcrição (COCKERILL; GARRARD, 1986; CHANG et al., 1995). Foi proposto que a fração nuclease hipersensitiva mantém uma estrutura nucleossomal clássica. Ela liga cada toróide e os anexa à matriz nuclear (SOTOLONGO et al., 2003), sendo a enzima responsável por esta anexação seja a TOP2B (SHAMAN et al., 2006).

A cromatina parece ter também uma organização específica para telômeros (ZALENSKAYA et al., 2000) e centrômeros (YARON et al., 1998), pois estes parecem se localizar consistentemente em áreas específicas do núcleo espermático. Hibridização in situ de fluorescência por imunofluorescência indireta mostrou que as localizações de uma variação de histona H2B coincidem,, em sua maioria, com regiões de DNA telomérico (GINEITIS et al., 2000).

Um modelo proposto para a organização da estrutura da cromatina espermática, sugere que ambos os níveis organizacionais (toróides e alças) estão relacionados. Desta forma, cada domínio de alça do DNA é condensado em um único toróide de protamina, que por sua vez são fixados à matriz proteica em regiões denominadas de “Regiões de anexação da matriz” (MARS) (SOTOLONGO et al., 2003).

2.4. Proteínas da cromatina nuclear.

2.4.1. Histonas

As espermátides iniciais, assim como as células somáticas, possuem as variantes H1, H2A, H2B, H3 e H4. As variantes de Histonas de células germinativas são abundantes nas células das linhagens espermáticas, porém pobres nas células somáticas. Existem também variantes exclusivas do testículo e células espermáticas (VAN ROIJEN, 1998).

A acetilação e ubiquitinação das histonas facilitam a transformação da cromatina espermática de uma estrutura nucleossomal para uma estrutura nucleoprotamínica durante a espermiogênese (DADOUNE, 2003). Estudos com immunoblotting e imunofluorescência mostraram que um alto nível de acetilação da H4 ocorre nas espermátides quando começa o processo de remoção das histonas. A acetilação de lisinas específicas no domínio N-terminal da H4 reduz sua afinidade pelo DNA, e dessa forma, relaxa a cromatina, permitindo interações entre o DNA com outras proteínas espermáticas nucleares mais básicas, resultando na substituição das Histonas (MCCARREY, 1998).

A atividade geral do sistema da ubiquitina é maior durante a espermiogênese, provavelmente por relação com o desarranjo massivo das proteínas nucleares e citoplasmáticas que ocorrem com as espermátides em processo de maturação (BAREENDS, 1999). A ubiquitinação das histonas podem ser relacionadas com a remoção das histonas da cromatina, visto que um aumento da quantidade de histonas ubiquitinadas tem sido observadas em espermátides em alongamento (BAREENDS, 1999).

A persistência de histonas tem sido relacionadas com um déficit da protaminação, por isso tem sido sugerido que a permanência de histonas não é um evento normal e resulta em uma estrutura imprópria e em uma alteração da estabilidade da cromatina espermática. Porém, devido a localização destas histonas tem sido sugerido que elas funcionam marcando genes que são preferencialmente ativados durante o desenvolvimento embrionário (EVENSON, 1999b).

2.4.2. Proteínas de transição

Durante a condensação do núcleo espermático, várias proteínas de transição (também denominadas proteínas intermediárias) são sintetizadas antes da deposição de protaminas.

Existem alguns eventos que ocorrem nesta fase da espermiogênese como: a transformação da cromatina nucleossomal em uma cromatina de fibra fina, a iniciação da condensação da cromatina e a cessação da transcrição. Acredita-se que as proteínas de transição estejam relacionadas nestes processos (KUNDU; RAO, 1996).

Embora, apenas as proteínas de transição 1 e 2 serem mais elucidadas é conhecido a presença de pelo menos quatro tipos de proteínas de transição em bovinos (KREMLING, 1989). Estas proteínas são um grupo heterogêneo de proteínas ligadoras de DNA que são mais básicas que as histonas e menos básicas que as protaminas.

A proteína de transição 1 (TP1) é uma pequena proteína de 54 aminoácidos rica em

histidina, arginina, lisina e serina. Apesar da grande similaridade estrutural entre as sequências conhecidas de mamíferos, apenas a TP1 de suínos, bovinos e caprinos contem cisteína. Os resíduos de aminoácidos básicos são distribuídos em intervalos regulares ao longo da TP1, e acreditasse que sejam para se ligar o DNA por alinhamento longitudinal ao longo do sulco maior do DNA (COLE; KISTLER, 1987). A TP1 parece também facilitar o reparo de quebras nas fitas de DNA pela neutralização da estrutura de fosfodiéster do DNA e trazendo as pontas mais próximas, permitindo uma ligase reparar a quebra (KIERSZEMBAUM, 2001).

A proteína de transição 2 é uma metaloproteína maior que a TP1. Ela contem entre 117-138 aminoácidos dependendo da espécie, e é rica em serina e prolina e contém cisteína (COLE; KISTLER, 1987). A proteína de transição 2 tem melhor efeito estabilizante e condensador de DNA do que a proteína de transição 1 e está relacionada com o início da condensação da cromatina antes da produção das protaminas. Por ser uma metaloproteína com zinco, ela condensa o DNA de uma maneira zinco-dependente, mostrando uma preferência por sequências de DNA ricas em GC (KUNDU; RAO, 1996). No genoma eucariótico, as sequências ricas em GC melhor caracterizadas são as ilhas GpC, que são associadas a domínios 5' e 3' que por sua vez são promotores de genes. Estas regiões ricas em GpC, quando metiladas, inibem completamente sua complexação com a proteína de transição 2. Isto leva a crer que o estado de metilação das ilhas GpC, no DNA espermático, tem uma função regulatória importante nas ligações TP2-DNA e que talvez a organização das ligações de TP2-DNA possa ditar uma certa ordem na protaminação do DNA. Alguns autores sugerem que, imediatamente após sua síntese, a proteína de transição 2 é fosforilada, inibindo temporariamente a propriedade de condensação do domínio C-terminal. Isto permite que ela se difunda pela cromatina facilitando sua ligação do módulo de zinco nas sequências de ilhas CpG. Sua subsequente desfosforilação desencadeia o início da condensação (MEETEI et al., 2002).

2.4.3. Protaminas

Todos os mamíferos eutérios possuem genes para dois tipos de protaminas, as protaminas P1 e P2, porém somente uma porção deles expressam a protamina 2. Na maioria dos mamíferos, os genes que codificam as protaminas 1 e 2 e a proteína de transição 2 estão localizados no mesmo cromossomo e são agrupados e estruturados em um grande domínio metilado na cromatina das espermátides iniciais (CHOI et al., 1997). Nos suínos e bovinos, a

ausência de protamina 2 foi atribuída a uma mutação com o gene responsável por sua transcrição (MAIER et al., 1990).

A protamina 1 de bovino é uma proteína de baixo peso molecular, rica em arginina e cisteína contendo aproximadamente 50 aminoácidos, sendo sua sequência ARYRCCLTHSGSRCRRRRRRRCRRRRRRRFGRRRRRRVCCRRYTVIRCTRQ, que pode ser dividida em três domínios estruturais diferentes. Uma região N-terminal caracterizada pela sequência ARYRCC e pela presença de serina e treonina na posição 8 e serina nas posições 10 e 12 que podem ser regiões fosforiladas (BALHORN, 1982). Uma região central rica em arginina, que funciona como sítio de ligação para a complexação com o DNA. Uma região C-terminal mais variável em diferentes espécies e que contém a maior parte dos resíduos hidrofóbicos das protaminas. Segundo Wouters-Tyrou (1991) as protaminas P1, através de seus resíduos de cisteína também podem se ligar ao zinco.

Existem dois processos mediadores da condensação da cromatina espermática, sendo um processo, a fosforilação e desfosforilação dos resíduos de serina, e um pouco menos, de treonina da protamina (MAYER, 1981), e o outro processo, a formação de ligações entre resíduos de cisteína característicos da protaminas de mamíferos (BALHORN 1991, WARD; COFFEY, 1991).

Logo após a síntese, ao longo do final da espermiogênese, e durante o período de transporte ao núcleo, as protaminas são altamente fosforiladas. Uma proteína Kinase 1 específica de Serina/Arginina (SRPK1), que é altamente expressa em todas as células germinativas, exceto nos espermatozoides maduros, age fosforilando a Protamina 1 (PAPOUTSOPOULOU, 1999). A fosforilação da protamina é um processo rápido que facilita a correta ligação destas proteínas no DNA, enquanto a desfosforilação tardia é associada com um aumento na condensação da cromatina (OLIVA; DIXON, 1991). Entretanto, formas fosforiladas de protaminas persistem no núcleo espermático de diversas espécies, provavelmente por uma relação a um processo de desfosforilação completo. Formas fosforiladas de protamina P1 ainda são presentes em sêmen ejaculado de touro (PIRHONEN et al., 1994).

A eficiência da formação de pontes de dissulfeto intermoleculares depende do posicionamento e da ligação das protaminas ao DNA, que é dependente de processos de fosforilação e desfosforilação (BALHORN et al., 1984). A estabilidade da cromatina é determinada pelo número de pontes de dissulfeto formadas entre os grupos tiol das cadeias de protaminas adjacentes. Uma selenoproteína de 34kDa, presente apenas no núcleo espermático age como uma peroxidase de tiol da protamina, e parece ser necessária para os cruzamentos

entre os grupos tiol de proteínas adjacentes durante a maturação espermática (PFEIFER et al., 2001). A avaliação do número de pontes de dissulfeto em protaminas de espermátides maduras e de espermatozoides epididimais mostrou que a estabilização da cromatina começa nos testículos e continua durante a passagem até o epididimo. Os sulfetos de hidrogênio da cisteína no espermatozoide testicular são oxidados progressivamente conforme o espermatozoide migra ao longo do epididimo (BREWER et al., 2002). A quantidade de pontes de dissulfeto entre as protaminas no espermatozoide ejaculado são críticas no processo de descondensação que se segue após o processo de fertilização. Sendo a fertilização e o tempo que ela demora dependente do número de pontes de dissulfeto no núcleo do espermatozoide (LOVE; KENNEY, 1999).

A cromatina espermática é a forma mais compactada em que o DNA pode se encontrar, pelo menos seis vezes mais condensado que no DNA dos cromossomos mitóticos. O DNA é organizado em domínios de laços anexados a matriz nuclear. A união do DNA a matriz nuclear e suas interações com as protaminas compoe estruturas toroidais individuais chamadas também de Laços de DNA “Doughtnuts” (WARD; COFFEY, 1991).

A protamina se liga ao DNA longitudinalmente. O segmento central, rico em poliargininas das protaminas P1 se encaixam no sulco menor do DNA, cruzando e neutralizando o arcabouço de fosfodiester. Já os resíduos amino terminais e carboxil da protamina participam na formação das interações hidrofóbicas e ligações de dissulfeto inter e intra protamínicas (BALHORN et al., 1984).

A condensação e estabilidade da cromatina espermática depende das interligações entre protaminas bem como sua ligação com o DNA. Portanto um núcleo espermático rígido pode ser necessário para seu transporte eficiente no trato reprodutivo feminino e para a penetração do aparato que acompanha o ovócito. Acreditava-se que esta estabilização também compensa o fato da ausência de enzimas de reparo de DNA, permitindo um transporte mais seguro do genoma masculino (MATSUDA et al., 1985). Todavia, Shaman (2006) mostrou a presença de tais enzimas de reparação de DNA, como a Topoisomerase IIB (SHAMAN et al., 2006).

2.5. Expressão gênica das nucleoproteínas durante a espermatogênese nos mamíferos.

A expressão sequencial de nucleoproteínas espermáticas durante a espermatogênese é dependente de ambas as regulações transcricionais e traducionais. Genes expressos durante a espermatogênese codificam proteínas necessárias para processos e atividades específicas das

células germinativas. A regulação intrínseca da expressão gênica na espermatogênese ocorre em três níveis: transcricional, traducional e pos-traducional. Genes para proteínas de transição e protaminas são expressas nas espermátides iniciais. O RNA mensageiro para estas proteínas, é acumulado como partículas de ribonucleoproteínas em um estado inativo no citoplasma por vários dias antes de serem traduzidos nas espermátides em processo de alongamento e condensação (EDDY, 2002).

A síntese e armazenamento de RNA mensageiro algum tempo antes da tradução é necessário, já que a transcrição global cessa assim que as histonas são substituídas por proteínas de transição. Isto tem consequências para a expressão gênica ao longo da espermiogênese já que todos os eventos de expressão gênica, seguidos da substituição das histonas, dependem dos processos pós-transcricionais. Portanto, o armazenamento de RNA mensageiro e ativação traducional exercem funções na expressão de várias proteínas de espermátide e espermatozoides que são sintetizadas nos estágios mais tardios da maturação da célula germinativa (KIMMINS, 2004).

Existem dois tipos primários de regulação transcricional: a metilação; e os fatores de transcrição que se ligam ao TATA-box, ao CRE-box ou outra sequência específica de DNA nas regiões promotoras de nucleoproteínas (STEGER, 1999). Apenas as citosinas dos dinucleotídeos 5'-CpG-3' são encontrados metilados nas células de mamíferos, e acredita-se que a metilação da mesma tenha função de redução ou inativação da transcrição de um gene, enquanto a desmetilação tem a função de aumentar ou ativar a transcrição de um gene (STEGER, 1999). Entretanto, essa relação de metilação de DNA e inativação ou ativação de genes especificamente expressados em células espermáticas ainda não é clara. Em camundongos, os genes da Protamina 1 e Proteína de transição 2, localizados no cromossomo 16, são totalmente metilados quando estão ativos para a transcrição. O oposto ocorre com o gene da Proteína de transição 1, que se mostra desmetilado durante a atividade do gene (CHOI et al, 1997).

Alguns fatores de transcrição atuantes em células germinativas estão envolvidos na regulação de numerosos genes expressos em diversos tecidos. O TATA-Box, um dos elementos de atuação cis (intramolecular) mais bem descritos em genes eucariotos, está presente em todos os genes de protamina já descritos. A sequência TATA encontra-se dentro da região -32 a -28 do começo da transcrição (OLIVA; DIXON, 1990). O TATA-box executa uma função importante na iniciação da transcrição através da ligação de fatores de transcrição na região promotora. Tanto os componentes da RNA polimerase II e a proteína de ligação ao TATA (TBP) tem sido encontrados acumulados nas espermátides iniciais de roedores,

enquanto a concentração total de RNA aumenta nos testículos. A alta expressão do gene da proteína de ligação ao TATA implica no recrutamento de pelo menos dois promotores maiores específicos de testículo (SCHMIDT, 1997).

O segundo elemento de atuação cis nos genes da proteína de transição e da protamina, o elemento de resposta a cAMP (CRE), é considerado essencial para atividade biológica das proteínas de ação trans aumentadoras e ligadoras (CREBs). O elemento CRE corresponde a sequência palindrômica TGACG presente na posição -57 à -48 nos genes codificadores de proteínas de transição e protaminas (OLIVA; DIXON, 1991). Entre os membros da família das proteínas CREB, as proteínas moduladoras de CRE (CREM) são altamente expressas nas células de testículos de roedores. O gene codificador da CREM é notável pela sua especificidade celular, que pode gerar repressores ou ativadores de transcrição induzida por cAMP. Apesar do envolvimento do hormônio gonadotrófico FSH na alteração de repressores CREM para ativadores CREM em células espermáticas ainda não ter sido confirmado, tem se mostrado que a alteração genética na sinalização do receptor FSH nas células de Sertoli induzem a uma inadequada condensação da cromatina (KRISHNAMURTHY, 2000).

2.6. Atividade nuclear no espermatozoide maduro de mamíferos.

O estado inerte devido à alta condensação do espermatozoide parece entrar em conflito com a descoberta da presença de nucleases (MAIONE, 1997), topoisomerase IIB (SHAMAN, 2006) e polimerases incluindo as DNA, RNA polimerases e transcriptase reversa em espermatozoides maduros (HECHT, 1974).

Experimentos tem identificado nucleases espermáticas endogenas que são induzidas a responder à interação com moléculas de DNA exógeno, ou que são ativadas depois de prolongado tempo de incubação de células espermáticas em meio de fertilização (MAIONE, 1997). A cromatina espermática liberada após quebra com nuclease endogena, trata-se de um componente nucleohistona, que apesar de não se tratar de um octamero de histonas tradicional, apresenta organização nucleossomal com características típicas de cromatina ativa, sensível a nuclease, e altamente rica em DNA retroposon não metilado de várias famílias. Sugerindo que essas regiões sensíveis a nuclease são alvos preferenciais para a integração de sequências exogenas. Uma nuclease Mn^{2+}/Ca^{2+} ativa que digere DNA em fragmentos de ~50kb foi encontrada em espermatozoides de hamster, camundongo e humano (SOTOLONGO, 2005).

A atividade de nuclease no espermatozoide se parece como a atividade dos primeiros

estágios de apoptose em células somáticas que são acompanhadas por quebra de DNA, mediada por ativação da topoisomerase II em fragmentos de 50kb (SOLOVYAN, 2002). De fato, a fragmentação do DNA no espermatozoide tem mostrado ser mediada por uma topoisomerase IIB associada à matriz nuclear interagindo com uma nuclease Mn^{2+}/Ca^{2+} (SHAMAN, 2006). Coerentemente, outros achados têm mostrado que quebras mediadas por topoisomerase II no espermatozoide causa uma degradação específica do DNA pronuclear paterno em ovócitos fertilizados e que este processo é acompanhado da iniciação da síntese de DNA no zigoto (YAMAUCHI, 2007).

Já foi descrito a atividade DNA-polimerásica em espermatozoides bovinos (Hecht 1974). RNA-polimerase também foi observada em espermatozoide de ejaculado bovino (HETCH; WILLIAMS, 1978). Apesar da aparente ausência de necessidade para atividade de DNA e RNA polimerases no espermatozoide maduro, tem sido suposto que estas enzimas tem função durante a fertilização ou embriogênese (KRAMER; KRAWETZ, 1997).

Entretanto, novos trabalhos têm trazido novas teorias sobre a capacidade transcricional do espermatozoide. Evidências mostram que moléculas exogenas de DNA e RNA são interconvertíveis pelo espermatozoide em humanos, trazendo a tona que talvez a Transcriptase Reversa tenha funções no espermatozoide maduro (SPADAFORA, 2008). Microscopia eletrônica de imuno-marcação com ouro, usando anticorpo anti-RT, mostrou que moléculas de transcriptase reversa são estáveis quando ligadas a matriz nuclear (GIORDANO, 2000). Quando espermatozoides epididimais maduros são encubados com moléculas de RNA exógenos, a transcriptase reversa endógena do espermatozoide retrotranscreve cópias de DNA codificador que podem ser transferidos ao zigoto durante a fertilização in vitro (GIORDANO, 2000). Este processo espontâneo tem sido bem recentemente nomeado de “transferência reversa de gene mediada pelo espermatozoide” (SMRGT) (SPADAFORA, 2008).

A capacidade das células espermáticas de integrar moléculas exogenas de DNA e RNA indica que a maquinaria normalmente inativa de transcrição espermática pode ser ativada sobre certas condições (HETCH; WILLIAMS, 1978). É plausível que as regiões da cromatina espermática sensíveis a DNase refletem um potencial transcricional para genes específicos envolvidos no início da embriogênese. Entretanto, mais trabalhos são necessários para maiores conclusões (HETCH; WILLIAMS, 1978).

2.7. Relação entre a cromatina espermática para a fertilização e sobrevivência embrionária.

Atualmente, existe um conjunto de evidências que suportam a idéia de que a integridade da cromatina espermática é importante não apenas para a fertilização mas também para o desenvolvimento embrionário normal (WARD, 2010). Espermatozoides ejaculados com comprometimento da integridade do DNA, indiferentemente do nível de dano do DNA, parece ter a capacidade de fertilizar ovócitos na mesma proporção de espermatozoides normais. Entretanto, a extensão do dano do DNA é relacionado a falha ou mal desenvolvimento embrionário, esta informação nos leva a sugerir que o ovócito tem a capacidade de reparar alguns danos pré-existentes no DNA espermático até um certo limiar, e a partir deste limiar, as capacidade reparativas dos ovócitos se tornam inadequadas o que causa uma falha no desenvolvimento embrionário (AHMADI; NG, 1999).

Acredita-se que mudanças na arquitetura altamente organizada da cromatina espermática influencia a iniciação e regulação da expressão genica paternal em embriões iniciais. O dano na cromatina espermática é associado com uma descondensação anormal dos padrões da cromatina e um longo intervalo até a iniciação da formação do pró-núcleo após fertilização. Uma modificação sutil das proteínas nucleares espermáticas por tratamento com dithiothreitol na presença de um detergente iônico impossibilitou o núcleo espermático de poder participar da embriogênese, sugerindo que uma modificação dos componentes proteicos foi responsável pela falha na formação do zigoto (WARD, 2010).

A habilidade da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) de passar pelos anexos ovocitários para a penetração espermática facilitou o sucesso do uso de sêmen de machos com oligozoospermia severa, teratozoospermia, azoospermia e espermatozoides imóveis (ENGEL et al., 1996). Entretanto, alguns estudos tem mostrado que uma qualidade espermática debilitada, uma característica dos pacientes usuários de ICSI, levou a uma menor porcentagem de embriões que chegaram a fase de blastocisto, baixa qualidade dos blastocistos, e um aumento nas taxas de falha da gravidez (SHOUKIR et al., 1998).

Trabalhos tem mostrado evidências de uma associação entre a presença de dano no DNA espermático em humanos com um baixo nível dos parametros convencionais de espermograma (IRVINE, 2000). Contudo, um baixo índice de fragmentação de DNA não confere por si só uma garantia de fertilidade normal (EVENSON, 1999 b). A análise de qualquer único parâmetro do sêmen não nos dá uma alta predição da fertilidade. Já amostras de espermatozoides com estrutura cromatínica sadia, mas com outras anormalidades e sem motilidade adequada, provavelmente tenha uma baixa fertilidade ou infertilidade associada. Portanto, uma combinação dos parametros convencionais e o estado da cromatina podem ser

mensurados para melhor predizer a fertilidade masculina (EVENSON, 1999 b).

Este trabalho teve como objetivo analisar a ultraestrutura da cromatina espermática de touro, padronizar uma metodologia de extração de proteínas da cromatina, inclusive da matriz nuclear, e identificar por meio de sequenciamento parcial, proteínas que compõe este complexo.

3. Materiais e Métodos

Foram utilizadas palhetas de sêmen de *Bos taurus* de raça zebuina diluídos em crioprotetor tris-gema e criopreservados em nitrogênio líquido, obtidas por eletroejaculador na fazenda do glória, na Universidade Federal de Uberlândia.

3.2. Lavagem do sêmen

O sêmen de oito palhetas de 0,5 mL foi colocado, ainda congelado, em tubos de fundo cônico de 15mL contendo 8mL de tampão 50mM Tris-HCl 7.5pH, 1mM EDTA. Após o descongelamento e a homogeneização, o frasco foi centrifugado a 750 x g por 15 minutos a 4°C, seguido de remoção do sobrenadante. O pellet foi ressuspensionado em 8 mL do mesmo tampão, homogeneizado e novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido três vezes.

3.3. Separação das cabeças dos espermatozoides

Após a terceira centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em 1,5 mL do mesmo tampão, e sonificado em gelo por 17 minutos com pulsos de 30 segundos e intervalos de 15 segundos. Posteriormente o material foi centrifugado a 1000 X g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado, e adicionou-se 2 mL de tampão 50mM Tris-HCl e Sacarose 1,1 M, 7.5pH no material. Parte deste material foi diluído em 1:100 em água destilada para contagem em câmara de Neubauer para aferir a concentração das cabeças na amostra, e posterior acerto da concentração para 1×10^7 cabeças/mL usando-se tampão 50mM Tris-HCl e Sacarose 1,1 M, 7.5pH.

As cabeças foram isoladas das caudas usando ultracentrifugação a 75.600 X g por 45 minutos a 4°C, em um gradiente que consistia de 2mL de cloreto de cério (CsCl) a 2,82M no fundo de um tubo de 12 mL para ultra-centrífuga, sobreposto por 4mL de sacarose 2,2M e recoberto por 2 mL de amostra em tampão 50mM Tris-HCl e Sacarose 1,1 M, 7.5pH. Após a

centrifugação, o sobrenadante contendo as caudas foi retirado cuidadosamente por pipetagem e o sedimento de fundo resuspendido com tampão Tris 25mM. A amostra foi lavada três vezes por centrifugação a 1000 X g por 30 minutos a 4°C em tampão Tris 25mM para se retirar o excesso de CsCl.

3.4. Extração da cromatina e matriz nuclear

A extração da cromatina e matriz nucleares seguiram a metodologia adaptada de Bernard Robaire et. al. 2007. As cabeças isoladas foram resuspendidas em 500µL de solução contendo 1% SDS, 50mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA, e 5µL de coquetel inibidor de protease e agitadas com Vortex por 10 minutos em temperatura ambiente. Este tratamento tem função de remover o acrossoma e todas as membranas, deixando o núcleo condensado e ligado ao envoltório nuclear e alguns resquícios de material perinuclear.

As amostras foram lavadas três vezes por centrifugação a 1.100 x g por 30 minutos a 4 °C com 1,5 mL de 50mM Tris-HCl, pH 7,5. Após a última lavagem, o material foi resuspendido em 500 µL de tampão de descondensação que consiste de 40mM 1,4-ditiotreitol (DTT), 0,25M (NH₄)₂S₄, 25mM Tris-Hcl, pH 7,5, e 5µL de coquetel inibidor de protease e permaneceu por 40 minutos em temperatura ambiente. Foi, então, adicionado 4000U de Desoxiribonuclease I livre de RNase e homogeneizado por 60 minutos sob Vortex em temperatura ambiente.

Para purificação das proteínas foi usado o método de precipitação por ácido tricloroacético (TCA). Para isso, foi adicionado um volume igual ao da amostra de ácido tricloroacético a 20%. A amostra diluída foi encubada a 4°C por 60 minutos, centrifugada a 4°C por 30 minutos a 750 X g, o sobrenadante foi descartado e adicionado 2 mL de acetona gelada. Após homogeneização, o material foi incubado a -20°C por uma noite e centrifugado a 4°C por 30 minutos a 750 x G. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco em estufa a 32°C por 24 horas. Em seguida o pellet foi resuspendido em 0.1 mL de 0,1M de NaOH. As amostras foram congeladas, liofilizadas e guardadas em congelador até sua análise.

3.5. Eletroforese de Policriialamida com Duodecil-Sulfato de Sódio 14% (SDS-PAGE).

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, com agentes desnaturantes, foi realizada conforme a técnica descrita por LAEMMLI (1970). Foi utilizado um gel de

empilhamento a 5 % em pH 6,8 contendo 0,125 M de Tris-HCl e 0,1 % de SDS e um gel de separação a 14 % em pH 8,8 e 0,1 % de SDS, mantendo a relação acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m).

Amostras contendo de 50 µg de proteínas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8; contendo 10 % (m/v) b-mercaptoetanol, 10 % (v/v) de glicerol; 0,2 % de SDS e 0,001 % de azul de bromofenol como corante. As proteínas foram completamente dissociadas por imersão da amostra durante 3 a 5 minutos em água fervente. Foram aplicados no gel cerca de 9 µL de amostra, sendo também aplicados padrões de massa molecular dissolvidos no mesmo tampão. Os padrões de massas moleculares utilizados foram: soroalbumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36.000), tripsinogênio (24.000), e α-lactoalbumina (14.400), numa concentração de 3,5 mg/ml. O tampão do eletrodo continha Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M e SDS 0,1 % (m/v) em pH 8,3.

A eletroforese foi realizada com uma corrente constante de 20 mA até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel (cerca de 100 minutos). As proteínas foram coradas por 15 minutos numa solução de Coomassie Blue R-250 a 0,2 % (m/v) dissolvidas em água: metanol: ácido acético (4:5:1 v/v) e descoradas em água: etanol: ácido acético (6:3:1 v/v).

A mobilidade eletroforética relativa de cada padrão foi determinada em centímetros e a curva padrão para a determinação da massa molecular aparente foi traçada relacionando os logaritmos dos valores da massa molecular dos padrões com as distâncias de migração.

3.6. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).

3.6.1. Cromatografia de exclusão molecular

O extrato de proteínas de cromatina espermática de *Bos taurus* (PSCBt) foi submetido a uma coluna de purificação em resina de exclusão molecular HiPrep™ 1/60 Superdex G-75 em sistema HPLC - ÄKTApurifier™ 10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia). A coluna foi equilibrada e as amostras eluídas em tamão bicarbonato de amônio 0,05M, pH=7,8. As frações, contendo 2,0mL cada, foram coletadas em um fluxo de 30,0mL/hora. A absorbância de cada fração foi acompanhada em absorbância a 280nm.

3.6.2. Cromatografia de fase reversa

Os dois primeiros picos, obtidos a partir da cromatografia de exclusão molecular foram submetidos à cromatografia em fase reversa em sistema HPLC - ÄKTApurifier™ 10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia). A amostra foi centrifugada a 10000xg por 15min para retirada de partículas insolúveis e aplicada à coluna, previamente equilibrada com o eluente A (0,1% de TFA em água Milli-Q®) a 23°C. As proteínas foram eluídas da coluna usando-se gradiente linear contínuo do eluente B (0,1% TFA em ACN de 0 a 100%). O fluxo foi de 2mL/min; as proteínas foram detectadas pela absorbância a 280 nm e o material eluído foi coletado em coletor automático- modelo ÄKTA Frac-950, Amersham-Pharmacia (Upsala, Suécia).

3.7. Sequenciamento parcial por LC-MS/MS.

A amostra liofilizada (9,3 mg) foi diluída no tampão ureia 8M, Tris 100 mM, pH 8.8., na concentração final de 10 mg/mL e aproximadamente 25 µg de proteína foi utilizada para análise por espectrometria de massas avançada. Na alíquota de 25 µg foi adicionado o tampão ureia 8M, Tris 100 mM, pH 8.8., num volume final de 20 µL, e 25 µg de ditioneína (10µg/µL, volume = 2,5 µL) para a redução das pontes de dissulfeto das proteínas. Após a incubação por 2 horas a temperatura ambiente, a amostra foi alíquotada com 75 µg de Iodoacetamida (10 µg/µL, volume = 7,5 µL) por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro.

A amostra foi diluída 5 vezes (150 µL) com solução de bicarbonato de amônio 0,1M. A amostra foi, então, incubada com 10 µL de tripsina diluída a 0,2 µg/µL em bicarbonato de amônio 0,1 M. A digestão foi realizada a 37°C, durante o final de semana. A digestão foi parada com 1 µL de ácido fórmico 100%, foi realizado a técnica de Zip Tip e a amostra foi seca em speed vac.

Como etapa final do preparo das amostras, foram removidos sais e contaminantes não peptídicos através de Solid-Phase Extraction, utilizando-se coluna OASIS – Waters. O condicionamento da coluna foi realizado com 1mL de acetonitrila e o equilíbrio com 1 mL de solução aquosa de ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 5%. A amostra foi diluída para 1 mL com a solução de equilíbrio e aplicada em coluna de exclusão molecular. Após lavagem com 1mL de solução de equilíbrio, a eluição dos peptídeos foi realizada com 500 mL de solução de 70% acetonitrila/ 30% água/ 0,1% ácido fórmico. As amostras coletadas foram em seguida secas em speed vac.

As amostras digeridas foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo LTQ-

ORBITRAP (Thermo-Finnigan) acoplado a um sistema de cromatografia de nanoflow (LC-MS/MS). Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo “Computational Proteomics Analysis System – CPAS”. Os peptídeos identificados que atingiram o critério mínimo de qualidade (peptideprophet score <0.7) foram considerados como de alta confiabilidade. Para as buscas, foi utilizada uma combinação dos bancos de dados Humano do International Protein Index (IPI v. 3.87) e bovino.

3.8. Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Para a análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão, as cabeças de espermatozoide foram descondensadas. Para isso, foi utilizado sêmen pré-processado conforme protocolo descrito no subcapítulo 2.2. deste capítulo. O sêmen foi centrifugado a 750 X g por 15 minutos a 4°C e resuspenso em 1,5 mL de tampão Tris-HCl 25mM, DTT 40mM e 0.5% de Triton X-100. A suspensão foi agitada em Vortex por 10 minutos e centrifugada a 750 X g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi removido.

O pellet formado por sêmen com cabeças descondensadas foi fixado em 1,5mL de glutaraldeído 2% por 10 minutos. O material foi centrifugado por 10 minutos a 750 X g a 4°C, e o sobrenadante foi retirado. Posteriormente a amostra foi lavada três vezes com solução PBS 1X com centrifugação 100 X g a 25°C por 10 minutos cada lavagem.

Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 0,5 mL de Agar 5% a 45 °C nos tubos de alíquota contendo a amostra e foram colocados em estufa a 37°C por 24 horas. Após o endurecimento do Agar, este foi removido do tubo e dividido em fragmentos de aproximadamente 1 mm³.

Posteriormente foi executado o processo de pós-fixação, que consistiu em colocar os fragmentos em 2 mL de solução de Ósmio 1% por uma hora.

O material foi então desidratado usando-se banhos de 5 minutos de acetona em diferentes concentrações na seguinte sequência: 50%, 70%, 80%, 85%, 90% e três vezes de 100%.

Após a desidratação foi realizada a impregnação com resina Epon e acetona 1:1 por 12 horas em frasco lacrado e depois por mais quatro horas em frasco aberto em estufa a 37°C. Posteriormente, foi retirada a solução de resina Epon e acetona e adicionada 1 mL de resina pura. Após quatro horas em estufa a 37°C, o material foi retirado do frasco e emblocado em resina pura, sendo mantido em estufa por três dias a 60°C.

Após polimerização da resina, foram obtidos cortes de 60 nm de espessura por

ultramicrografia, os quais foram colocados em telas de cobre de 200 mesh para microscopia eletrônica, contrastados por chumbo e uranila e avaliados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Em 109, acoplado com sistema de captura de imagem digital Megaview 5.0.

4. Resultados e Discussão

O presente trabalho propõe avaliar a cromatina espermática de touro *Bos taurus*, seja do ponto de vista estrutural ou de seu conteúdo proteico. Apesar da importância econômica na reprodução da espécie *Bos taurus*, e por consequência do estudo da cromatina espermática do mesmo, ainda é baixo o número de trabalhos que tem a estrutura da cromatina espermática bovina como objeto de estudo. Por esse motivo, os resultados deste trabalho muitas vezes são cruzados e discutidos com resultados de ensaios realizados com outras espécies, como por exemplo humanos e roedores.

Inicialmente, as proteínas solúveis de cromatina de *Bos taurus* (PSCBt), foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida corado com prata. Nossos resultados mostraram a presença de pelo menos cinco bandas distintas, conforme apresentado na figura 1.

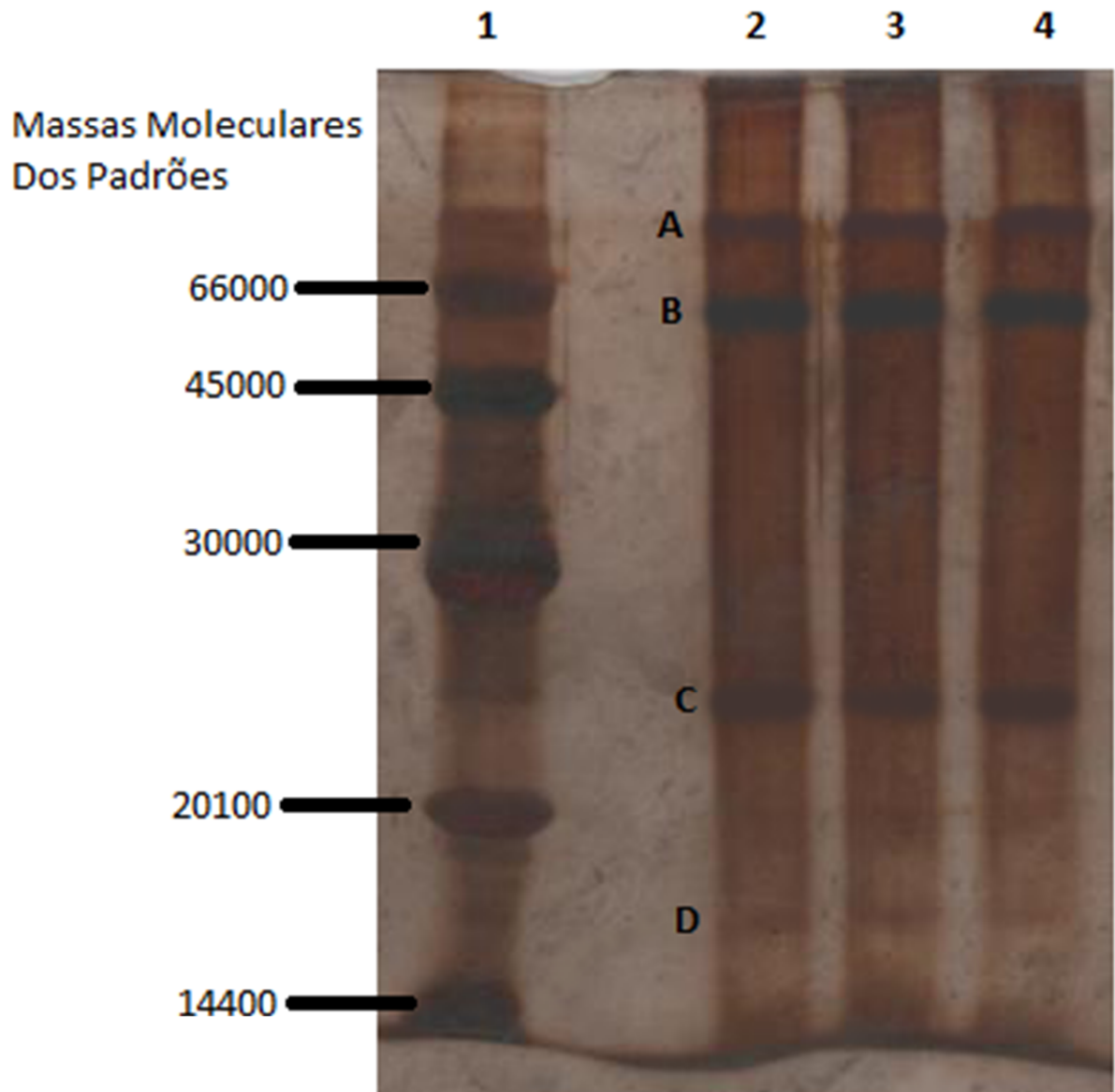


Figura 1: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes do PSCBt. Linhas: (1) Padrão de peso molecular LMW (Low Molecular Weight): albumina bovina (66kDa), ovoalbumina (45kDa), anidrase carbonica (30kDa), inibidor de tripsina (20.1kDa), lactoalbumina (14.4kDa); (2, 3 e 4) PSCBt - 20 µg.

Marcado em A se apresenta uma banda de peso de aproximadamente 90kDa, provavelmente uma proteína de cromatina ainda não descrita na literatura ou uma proteína externa à matriz nuclear contaminante. A banda B referente provavelmente as queratinas 2, 5, 9 e 10 de pesos proximos a 62kDa. A banda marcada com o C provavelmente se referem a DNase utilizada na extração de peso molecular 31kDa. E a banda D provavelmente se refere

a histona H2B tipo 1-N de 19kDa. As outras demais proteínas de peso molecular abaixo de 14kDa ficaram compactadas no front do gel impedindo sua visualização.

Ao comparar o perfil de bandas conseguidas com o SDS-PAGE com as descritas em outros trabalhos aparentemente as proteínas da banda marcada na figura como D são provavelmente histonas do tipo H2B, que têm sido elucidada como possuindo importante função participando de um complexo de ancoramento das regiões teloméricas dos cromossomos na cromatina espermática, sendo que estes complexos mantem estrutura semelhante a nucleossomos (GINEITIS, 2000).

Apesar da proteína mais abundante na cromatina espermática ser a protamina, esta não foi indentificada no gel de eletroforese, provavelmente devido ao fato de que o SDS, por ser um detergente ionico, acaba solubilizando e removendo as protaminas junto com as membranas lipídicas do espermatozóide durante o processo de extração do PSCBt, e mesmo as protaminas resquiciais presentes no gel, acabam por estar presentes na linha de massa do final do gel, o que impossibilita sua localização no mesmo, este processo de solubilização da protamina pelo SDS já foi descrito anteriormente por Ward (2013).

A quantidade reduzida de proteínas que apareceram nas técnicas utilizadas neste trabalho para a avaliação das proteínas da cromatina espermática de touro, provavelmente se deve ao fato da relativa perda de alguns tipos proteicos e a drástica redução do volume total de amostra ao longo do extenuante processo de extração, o que explica em parte a presença de poucas bandas no gel de eletroforese SDS-PAGE.

Na tentativa de melhor identificar os polipeptídeos presentes no PSCBt foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex G75um (Sistema de cromatografia em HPLC ÄKTApurifier-10). Esta coluna de cromatografia separa as moléculas por exclusão molecular, esta técnica se vale dos diferentes tamanhos de proteínas contidas na amostra para sua separação. A matriz da coluna consiste em um material hidratado e poroso, sendo estes poros de tamanho controlado. Portanto, as proteínas maiores não penetram nos poros da matriz, sendo eluídas mais rapidamente. Em contrapartida as proteínas menores, que acabam por penetrar pelos poros, são eluídas mais tardiamente.

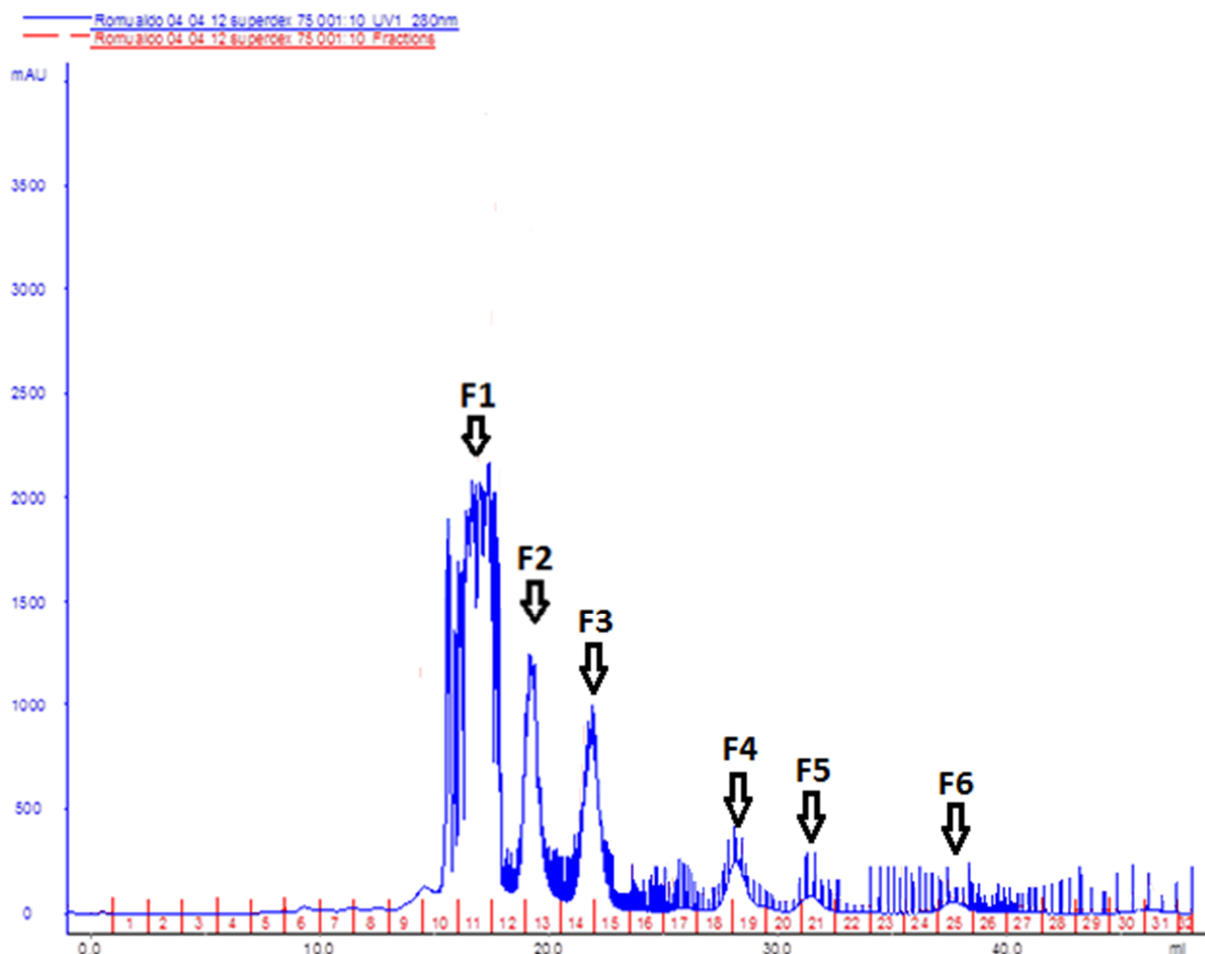


Figura 2: Cromatografia em resina Superdex G75 do PSCBt em sistema HPLC ÄKTApurifier™ 10. As proteínas foram eluídas em tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH=7,8 com fluxo de 30ml/hora.

A partir do resultado obtido com a figura 2 foram feitas HPLCs em coluna de Fase Reversa as frações F1 e F2 foram escolhidas por terem uma concentração aparentemente maior. Os HPLCs em fase reversa das frações F1 e F2 geraram respectivamente as cromatografias das figuras 3 e 4. O princípio da cromatografia em fase reversa consiste em utilizar as diferentes características de hidrofobia das moléculas da amostra, variando entre um meio hidrofóbico (matriz cromatografica ou fase estacionária) e um meio hidrofílico (eluente ou fase móvel) de polaridade variada. A fase estacionária é composta de longas cadeias hidrocarbônicas ligadas numa matriz de sílica, onde as proteínas se adsorvem variavelmente. As proteínas da amostra adsorvidas na coluna em condições aquosas são eluídas por uma mistura de solvente aquoso e orgânico, com um gradiente crescente de solvente orgânico, de maneira a deslocar as proteínas seletivamente para a fase móvel.

As frações F1 e F2 foram escolhidas neste trabalho por apresentarem picos de maior absorbância em 280 nm. Isso sugere que estas frações apresentam uma elevada concentração protéica. A assimetria da fração F1 sugere que a amostra não está pura ou que várias proteínas estão presentes.

Curiosamente, a cromatografia da fração F1 apresentou somente dois picos sobrepostos (fig. 3). Isso demonstra que a fração F1 é composta, provavelmente, por duas proteínas. Similarmente, a fração F2 também apresentou um único pico (fig. 4), e uma marcação nas frações anteriores a este pico, semelhantes a picos de absorbância que se tratam de um artefato de técnica por entrada de ar no sistema do HPLC

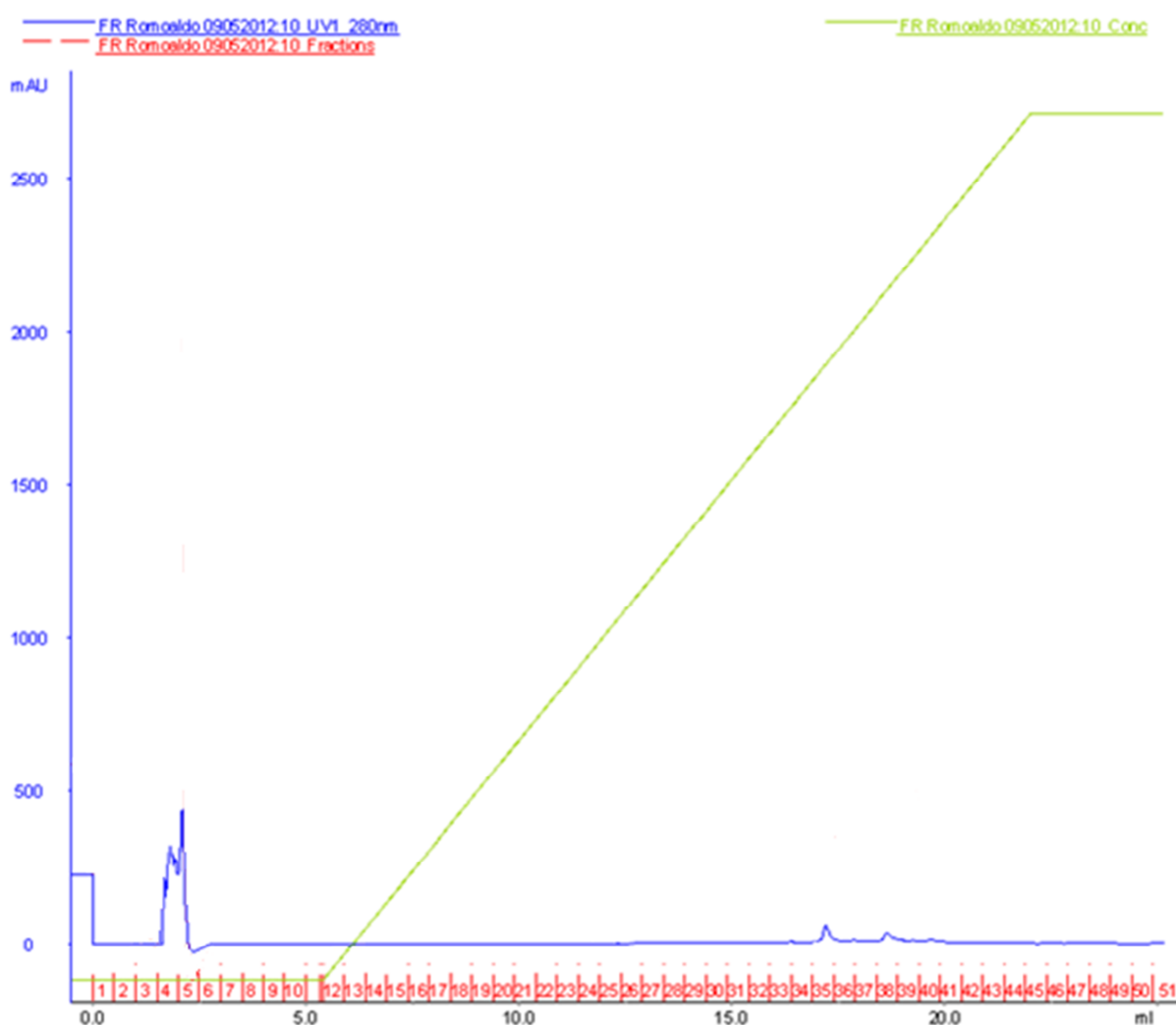


Figura 3: Cromatografia da Fase Reversa obtido da fração F1 resultante do HPLC Superdex G75 anterior. As proteínas foram eluidas com 0,1% TFA em ACN de 0 a 100% e fluxo de 2ml/min.

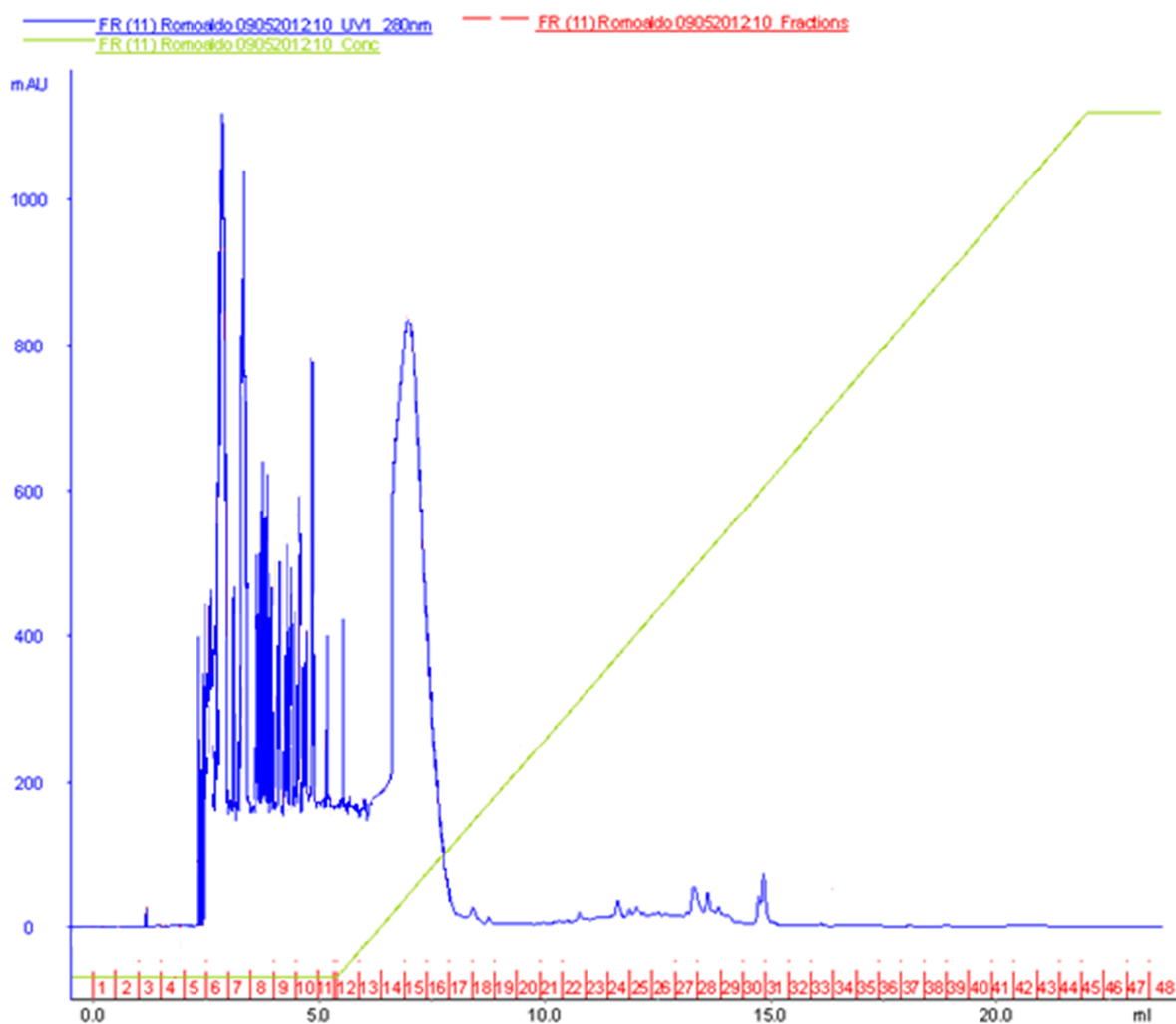


Figura 4: Cromatografia do material passado em coluna de Fase Reversa obtido da fração F2 resultante do HPLC Superdex G75 anterior.

Todas as frações obtidas nas duas cromatografias em coluna de fase reversa, foram corridas em eletroforeses em gel de poliacrilamida, porém nenhuma banda significativa foi revelada. Isto se dá provavelmente, pois, apesar da aparente concentração elevada de proteínas nos picos das cromatografias de fase reversa, há pouca concentração de proteína final purificada, que provavelmente são ricas em anéis aromáticos mascarando o resultado.

Dando continuidade na busca por um melhor entendimento das proteínas envolvidas partiu-se, então, para a técnica de espectrofotometria de massa. Esta técnica consegue identificação proteínas mesmo em concentrações ínfimas. A partir das técnicas utilizadas de purificação foram encontradas uma série de proteínas de interessante correlação com a literatura atual.

As amostras que foram parcialmente sequenciadas e comparadas com o banco de dados, resultaram na lista dos seguintes peptídeos conhecidos mostrados na tabela 1.

Tabela 1: Lista de variantes protéicas encontradas pelo sequenciador:

Variantes Protéicas Encontradas	Pesos Moleculares (Da)
Histona H2B tipo 1-O	13906
Histona H2B tipo 1-K	13875
Histona H2B tipo 2-E	13920
Histona H2B tipo 1-L	13952
Histona H2B tipo 1	13934
Histona H2B tipo 1-D	13936
Histona H2B tipo 3-B	13908
Histona H2B tipo 1-B	13950
Histona H2B tipo 1-H	13892
Histona H2B tipo 2-F	13920
Histona H2B tipo 1-K	13890
Histona H2B tipo F-S	13944
Histona H2B tipo 1-J	13904
Histona H2B tipo 1-M	13989
Histona H2B tipo 1-N	19003
Histona H2B tipo 2-F isoforma b	14841
Similar ao cluster de histona 3, H2bb	14942
Similar ao cluster de histona 1, H2bd	13920
Similar ao cluster de histona 1, H2bg	13906
Similar ao cluster de histona 1, H2bk	13936
Similar ao cluster de histona 1, H2bj	13980
Queratina 18	47964
Queratina 2	65865
Queratina 5	62378
Queratina 9	62064
Queratina 10	58827
Queratina 1	69038
Transcriptase Reversa	55067
Nucleoporina de 50kDa	50144
Inibidor de tripsina pancreatica	10902
Desoxiribonuclease 1 (DNase 1)	31345
Quimiotripsinogenio B	25755
Precursor de Tripsina	24409

Foram encontradas inúmeras variantes de histona H2B o que provavelmente esta relacionado com as regiões teloméricas ligadas à matriz nuclear, que são regiões de perfil nucleossomal ricas em H2B, essas regiões ficam localizadas na periferia do nucleo espermático onde ocorre o ancoramento destas na lâmina proteinácea da matriz nuclear,

adjacente ao envoltório nuclear (ZALENSKAYA et al. 2000; GINEITIS et al., 2000, DE LARA 1993)

Foi encontrado também alguns tipos de queratina. A queratina 5 identificada provavelmente é a mesma identificada juntamente com a actina filamentosa nos processos de formação do acroplaxoma, do ancoramento da manchete, e da modulação das forças de tração que as células de Sertoli geram no alongamento da cabeça espermática na espermiogênese (KIERSENBAUM, 2003). A queratina 5 faz também o ancoramento do acrossoma na lamina nuclear subjacente ao envoltório nuclear (KIERSENBAUM, 2004).

A queratina 9, uma das proteínas encontradas, é um componente do anel perinuclear da manchete encontrada em espermátides em desenvolvimento, e tem função de ancorar a manchete na região de pescoço do espermatozóide (RIVKIN et al., 2005). Porém este anel persistindo no espermatozóide maduro é possível que ele se associe a outro anel proteico que existe na mesma região, o anulus nuclear que é um sitio de ancoramento para DNA (WARD; COFFEY, 1989) que não se desfaz no tratamento de descondensação da cromatina (FARRINGTON, 1991). Mas ao contrário da lâmina proteinácea da matriz nuclear, o DNA ligado a este anel não tem relação com regiões teloméricas (DE LARA, 1993).

Foi identificado também a queratina 10, um heterotetramero composto de queratinas tipo I e II. Pouco se sabe sobre a função desta queratina no espermatozóide, mas em um ensaio onde se analisou biopsias de testículos de homens com espermatogênese comprometida, concluiu-se uma relação de distúrbios na expressão de Queratina 10 com alterações na espermatogênese (ADLY; HUSSEIN, 2011).

Além das Histonas também foram encontrados outros tipos proteicos. Uma delas é a Transcriptase Reversa, que no espermatozóide ela está presa na matriz nuclear espermática, este dado vem corroborar com a teoria de que o núcleo não é transcricionalmente inativo. E/ou que a presença de maquinário de transcrição paterno também seja necessário no início do desenvolvimento embrionário (GIORDANO et al., 2000).

Outra proteína encontrada foi uma Nucleoporina de 50kDa, filamentosa intermembranica e que faz parte do complexo do nucleoporo, estes nucleoporos são arrastados durante o desenvolvimento espermático para a parte posterior do núcleo na região de envoltório nuclear redundante (HARAGUCHI, 2007). Esta transposição local-específica é possivelmente executada pela lâmina nuclear adjacente, e devido ao fato desta nucleoporina ter resistido à remoção do envoltório nuclear ela provavelmente está ancorada na lâmina e pode ter relação com o ancoramento dos poros nucleares.

As proteínas Inibidor de tripsina pancreática, Desoxiribonuclease 1 (DNase 1), Quimiotripsinogenio B e Precursor de Tripsina são substâncias utilizadas na extração da cromatina nuclear.

A análise por microscopia eletrônica de transmissão das cabeças de espermatozoides com núcleo descondensado pelo tratamento com detergente e DTT, gerou eletromicrografias que mostram estruturas circulares eletrodensas de aproximadamente $50,85 \pm 6,71 \text{ nm}$ (Figuras: 5 à 17). Muitas vezes a região central destas estruturas aparece menos eletrodensa (Figuras: 6, 7 e 10). Frequentemente as estruturas circulares foram observadas interligadas por uma malha fina semelhante a uma rede (Figuras: 1 à 17). Esta malha filamentosa também interliga as estruturas circulares a um arcabouço periférico, eletrodenso, com formato semelhante à silhueta da cabeça do espermatozoide (Figuras 1 à 18). Nas cabeças mais descondensadas as estruturas esféricas se acumulam principalmente próximo ao arcabouço periférico. Em algumas poucas eletromicrografias foi observado uma estrutura eletrodensa em forma de bastão posicionada centralmente no eixo longitudinal e que aparenta ter um alto nível de interação com a malha filamentosa circundante e com as estruturas circulares, semelhante à interação do arcabouço eletrondenso com a malha e as estruturas circulares, porém este bastão não apresenta continuidade com o arcabouço (Figuras 12 e 13).