

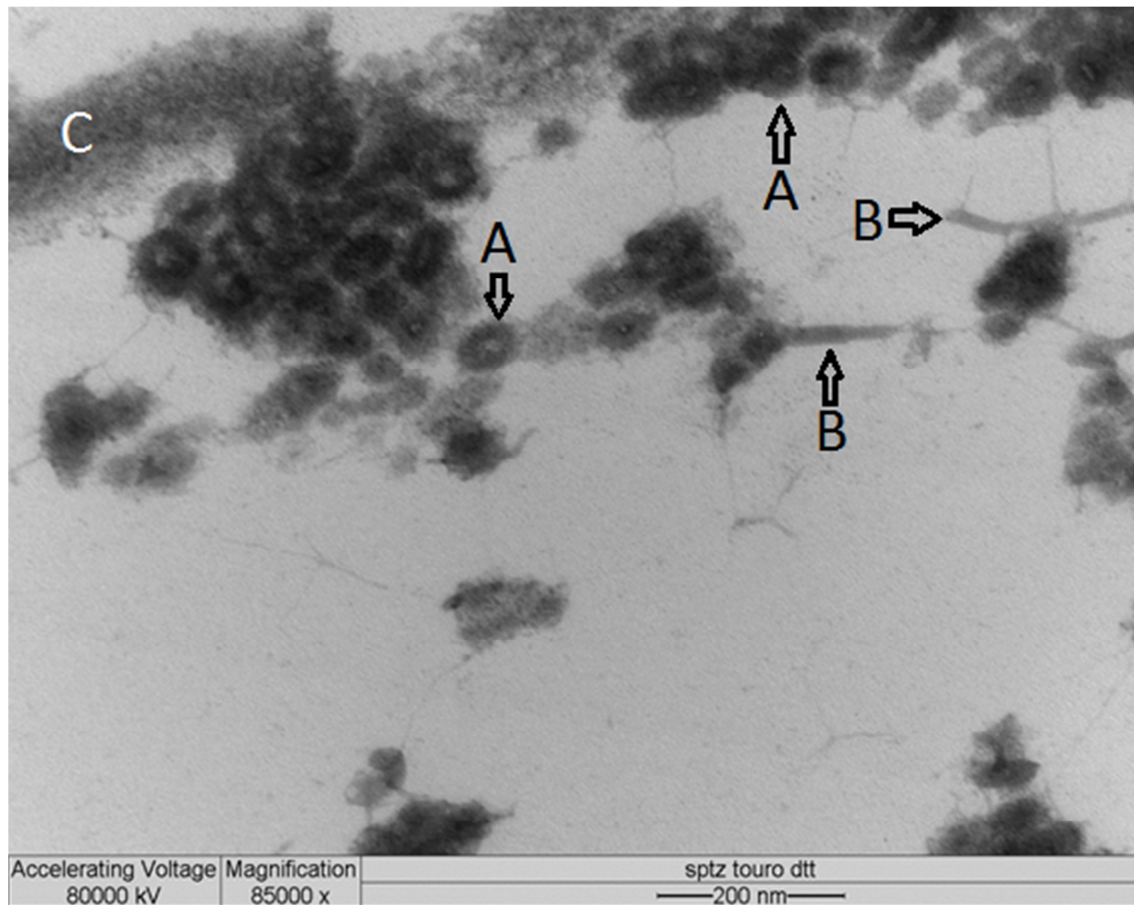


Figura 17: Eletromicrografia em aumento de 85.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada, apresentando estruturas toroidais (A), malha filamentosa circundante (B) e arcabouço eletrondenso (C).

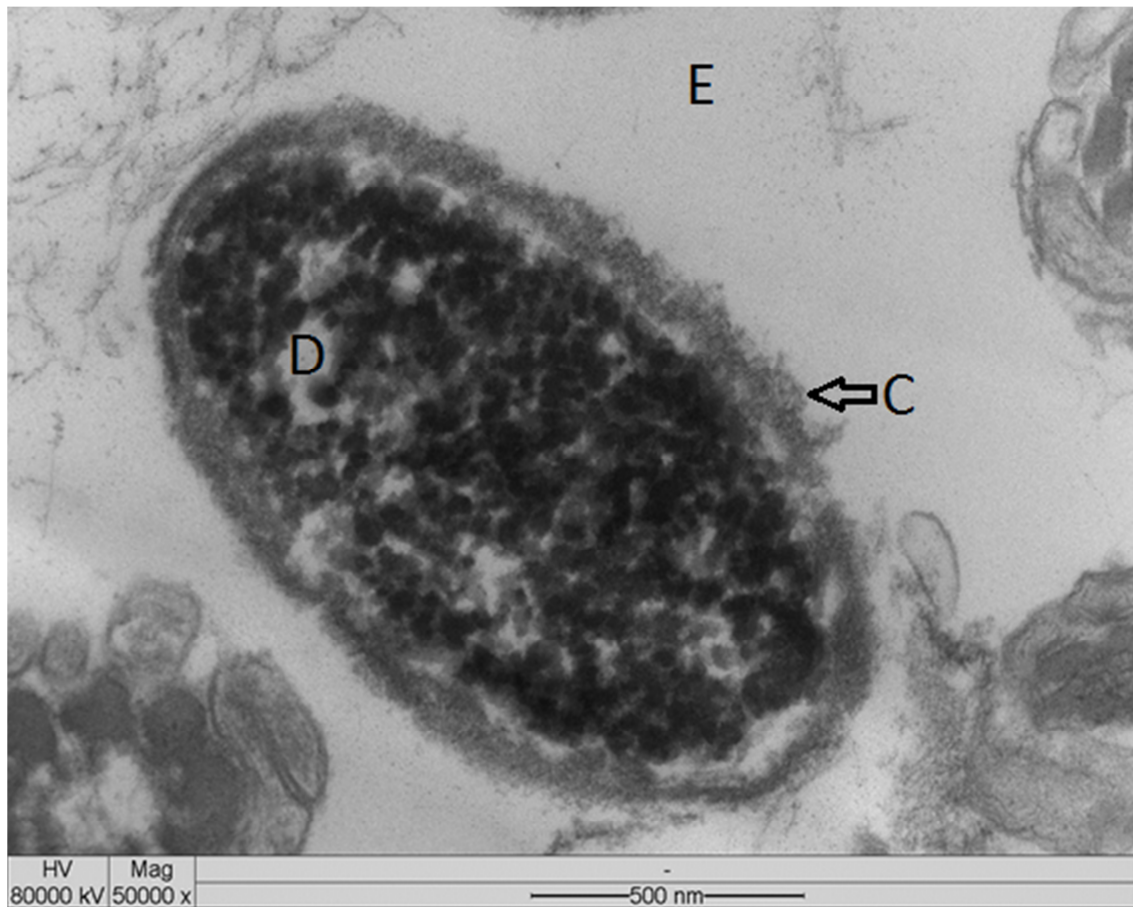


Figura 18: Eletromicrografia em aumento de 50.000 vezes de espermatozóide de touro com cromatina descondensada em corte transversal, apresentando uma região nuclear interna rica em estruturas toroidais (D), arcabouço eletrondenso (C) e região extracelular.

A estrutura básica de organização da cromatina espermática parece ser regida pelas pontes de dissulfeto cruzadas entre as protaminas. Através da padronização da concentração de DTT que foi usada no presente trabalho, foi alcançada uma concentração que descondensou a cromatina nuclear espermática até o que parece ser a estrutura chamada de toróide ou “doughnuts”, que mostrou-se ter em média 50 nm de diâmetro; outros trabalhos mostraram a localização destas regiões de ligação de pontes de dissulfeto entre as protaminas, e também que elas podem ser desfeitas de forma específica a partir de diferentes concentrações de DTT (BALHORN et. al., 1991), e estas estruturas encontradas denominadas toróides se assemelham ao modelo proposto atualmente (WARD, 1993).

Os modelos atuais de estrutura cromatínica de espermatozoides sugerem a existência de regiões de ligação à matriz nuclear (MARs), que nada mais são do que regiões de DNA que se ligam a pontos específicos da matriz nuclear (SOTOLONGO et. al., 2003). No

presente trabalho observou-se que os toróides se mostram intimamente ligados a uma rede de fibras que claramente está mais concentrada nos locais com maior quantidade das estruturas toroidais. As estruturas visualizadas nas eletromicrografias contendo a rede de fibras de matriz ligada aos toróides, são as regiões hipersensíveis a nuclease que mantiveram a estrutura nucleossomal (SOTOLONGO et al., 2003) e que tem a função de ligar os toróides à matriz nuclear (SOTOLONGO et al. 2003; COCKERILL; GARRARD, 1986; CHANG et al., 1995). Portanto, estas ligações toroide-rede de fibras é a expressão morfológica das MARs.

As regiões teloméricas dos cromossomos parecem se organizar em regiões específicas do núcleo espermático (ZALENSKAYA et al., 2000), e as regiões teloméricas coincidem com as regiões de H2B (GINEITIS et al., 2000). Esta linha de raciocínio parece concordar com a proposição de Ward e Coffey (1991) de que o DNA é ancorado na matriz nuclear sendo as regiões mais próximas à ancoragem provavelmente contendo genes ativos, enquanto as alças de DNA livres são inativas. Portanto, provavelmente as regiões vistas nas eletromicrografias que ligam os toróides à matriz nuclear (MARs) sejam regiões teloméricas ligadas a H2B.

O arcabouço eletrodenso periférico com formato aproximado a da cabeça espermática encontrado provavelmente seja a porção da matriz nuclear que recebe o nome de lâmina nuclear, já identificada em outros trabalhos (KIERSENBAUM et al., 2004). No entanto, não foram identificadas as proteínas típicas desta estrutura (Laminas).

6. Conclusão

A metodologia de extração da cromatina espermática bovina utilizando SDS, DTT e DNase se mostrou eficiente. Os resultados obtidos indicam que a ultraestrutura proteica resultante da extração da cromatina espermática de touro consiste de: uma lâmina nuclear densa que mantém parcialmente o formato da cabeça do espermatozóide, uma malha de matriz nuclear circundante a esta lâmina nuclear, e os toróides. Esta malha de matriz nuclear interliga as estruturas toroidais à lâmina nuclear, e uma estrutura em forma de bastão de densidade semelhante à da lâmina nuclear.

Por fim, os resultados do sequenciamento parcial das proteínas da cromatina espermática mostraram que esta tem em sua constituição uma grande variedade de histonas H2B, concordando com a teoria de que esta histona residual forma uma região nucleossomal onde se localiza as regiões teloméricas dos cromossomos. Foi encontrado vários tipos de queratinas, mostrando a importância funcional e estrutural desta família de proteínas para a cromatina nuclear. Foi achada uma transcriptase reversa o que promove a ideia de que a cromatina espermática bovina madura não seja inerte. Encontrou-se também uma nucleoporina de 50kDa, o que indica uma provável função da lâmina nuclear como sítio de ancoramento para os nucleoporos na lâmina nuclear durante sua migração na cabeça espermática que ocorre durante a espermatogênese.

6. Referências Bibliográficas

- AHMADI A.; NG S.C. Developmental capacity of damaged spermatozoa. **Hum Reprod.** Sep;14(9):2279-85. 1999.
- ALLEN M.J.; LEE C; LEE J.D.; POGANY G.C.; BALOOCH M.; SIEKHAUS W.J.; BALHORN R. Atomic force microscopy of mammalian sperm chromatin. **Chromosoma** 102:623–630. 1993.
- BAARENDS W.M., HOOGERBRUGGE J.W.; ROEST H.P.; OOMS M.; VREEBURG J.; HOEIJMAKERS H.J.H.; GROOTEGOED J.A. Histone Ubiquitination and Chromatin Remodeling in Mouse Spermatogenesis. **Developmental Biology** 207, 322–333. 1999.
- BALHORN R.; CORZETT M.; MAZRIMAS J.; WATKINS B. Identification of bull protamine disulfides. **Biochemistry.** Jan 8;30(1):175-81. 1991.
- BALHORN R.; WESTON S.; THOMAS C.; WYROBEK A.J. DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. **Exp Cell Res.** Feb;150(2):298-308. 1984.
- BALHORN, R. A Model for the Structure of Chromatin in Mammalian Sperm. **The Journal Of Cell Biology** May;90:298-305 1982.
- BALHORN, R.; BREWER, L.; CORZETT, M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroidal stability using single DNA molecules. **Mol. Reprod. Develop.** 56, 230–234. 2000.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry.** 79, 17-23, 2004.
- BLOCH D.P. A catalog of sperm histones. **Genetics.** 61(1):Suppl:93-111. 1969.
- BREWER, L.; CORZETT, M.; BALHORN, R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. **J. Biol. Chem.** 41, 38895–38900. 2002.
- CARREY E.A.; DIETZ C.; GLUBB D.M.; LOFFLER M.; LUCOCQ J.M; WATSON P.F. Detection and location of the enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in mammalian spermatozoa. **Reproduction** 123 757–768. 2002.

CHANG C.F.; LAU E.L.; LIN B.Y. Stimulation of spermatogenesis or of sex reversal according to the dose of exogenous estradiol-17 beta in juvenile males of protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. **Gen Comp Endocrinol**. Dec;100(3):355-67. 1995.

CHOI Y.C.; AIZAWA A.; HECHT N.B. Genomic analysis of the mouse protamine 1, protamine 2, and transition protein 2 gene cluster reveals hypermethylation in expressing cells. **Mamm Genome** 8:317–323. 1997.

CHOI, Y.C.; AIZAWA, A.; HECHT, N.B. Genomic analysis of the mouse protamine 1, protamine 2 and transition protein 2 gene cluster reveals hypermethylation in expressing cells. **Mammal. Gen.** 8, 317–323. 1997.

COCKERILL P.N.; GARRARD W.T. Chromosomal loop anchorage sites appear to be evolutionarily conserved. **FEBS Lett**. Aug 11;204(1):5-7. 1986.

COLE, K.D.; KISTLER, W.S. Nuclear transition protein 2 (TP2) of mammalian spermatids has a very basic carboxyl terminal domain. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 147, 437–442. 1987.

DADOUNE, J.P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. **Micros. Res. Tech.** 61, 56–75. 2003.

EDDY, E.M. Male germ cell gene expression. **Recent Prog. Horm. Res.** 57, 103–128. 2002.

ENGEL W.; MURPHY D.; SCHMID M. Are there genetic risks associated with microassisted reproduction? **Hum Reprod**. Nov;11(11):2359-70. 1996.

EVENSON, D.P. Alterations and damage of sperm chromatin structure and early embryonic failure. In: Jannsen, R., Mortimer, D. (Eds.), *Towards Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond*. **Parthenon Publishing Group Ltd.**, New York, pp. 313–329. 1999b.

EVENSON, D.P. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. **Reprod. Fert. Develop.** 11, 1–15. 1999a.

FAWCETT D.W.; ITO S. The fine structure of bat spermatozoa. **Am J Anat.** May;116:567-609. 1965.

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. **J Cell Biol.** Dec 25;151(7):1591-8. 2000.

GIORDANO R.; MAGNANO A.R.; ZACCAGNINI G.; PITTOGGI C.; MOSCUFO N.; LORENZINI R.; SPADAFORA C. Reverse transcriptase activity in mature spermatozoa of mouse. **J Cell Biol.** Mar 20;148(6):1107-13. 2000.

HARAGUCHI C.M.; MABUCHI T.; HIRATA S.; SHODA T.; TOKUMOTO T.; HOSHI K.; YOKOTA S.; Possible function of caudal nuclear pocket: degradation of nucleoproteins by ubiquitin-proteasome system in rat spermatids and human sperm. **J Histochem Cytochem.** Jun;55(6):585-95. 2007.

HECHT N.B. A DNA polymerase isolated from bovine spermatozoa. **J Reprod Fertil.** Dec;41(2):345-54. 1974.

HECHT N.B.; WILLIAMS J.L. Synthesis of RNA by separated heads and tails from bovine spermatozoa. **Biol Reprod.** Oct;19(3):573-9. 1978.

HO H.C.; SUAREZ S.S. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. **Biol Reprod.** May;68(5):1590-6. 2003.

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. **Biochem Biophys Res Commun.** Jun 30;193(3):1347-54. 1993.

IRVINE D.S. Male reproductive health: cause for concern? **Andrologia.** Sep;32(4-5):195-208. 2000.

KIERSZENBAUM A.L.; GIL M.; RIVKIN E.; TRES L.L. Ran, a GTP-binding protein involved in nucleocytoplasmic transport and microtubule nucleation, relocates from the manchette to the centrosome region during rat spermiogenesis. **Mol Reprod Dev.** Sep;63(1):131-40. 2002.

KIERSZENBAUM A.L.; RIVKIN E.; TRES L.L. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. **Mol Biol Cell**. 2003 Nov;14(11):4628-40. Epub 2003 Aug 7.

KIERSZENBAUM, A.L. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. **Mol. Reprod. Develop.** 58, 357–358. 2001.

KIERSZENBAUM A.L., TRES L.L. RIVKIN E., KANG-DECKER N., VAN DEURSEN J.M.A. The acroplaxome is the docking site of golgi-derived myosin va/rab27a/b containing proacrosomal vesicles in wild-type and hrb mutant mouse spermatids. **Biology of Reproduction** 70, 1400–1410. 2004.

KIMMINS, S., KOTAJA, N., DAVIDSON, I., SASSONE-CORSI, P. Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. **Reproduction** 128, 5–12. 2004.

KRAMER J.A.; KRAWETZ S.A. RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. **Mol Hum Reprod**. Jun;3(6):473-8. 1997.

KREMLING, H.; LUERSSEN, H.; ADHAM, I.M.; KLEMM, U.; TSAOUSIDOU, S.; ENGEL, W. Nucleotide sequences and expression of cDNA clones for boar and bull transition protein 1 and its evolutionary conservation in mammals. **Differentiation** 40, 184–190. 1989.

KRISHNAMURTHY H.; DANILOVICH N.; MORALES C.R.; SAIRAM M.R. Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. **Biol Reprod** 62:1146–1159. 2000.

KUNDU, T.K.; RAO, M.R. Zinc dependent recognition of a human CpG island sequence by the mammalian spermatidal protein TP2. **Biochemistry** 35, 15626–15632. 1996.

LOVE, C.C.; KENNEY, R. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. **Biol. Reprod.** 60, 15–620. 1999.

MAIER, W.M.; NUSSBAUM, G.; DOMENJOUR, L.; KLEMM, U.; ENGE, W. The lack of protamine 2 (P2) in boar and bull spermatozoa is due to mutations within the P2 gene. **Nucleic Acids Res.** 18, 1249–1254. 1990.

MAIONE B.; PITTOGGI C.; ACHENE L.; LORENZINI R.; SPADAFORA C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. **DNA Cell Biol.** Sep;16(9):1087-97. 1997.

MATSUDA Y.; YAMADA T.; TOBARI I. Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized in vitro after irradiation. I. Chromosome aberrations induced in sperm after X-irradiation. **Mutat Res** 148:113–117. 1985.

MAYER J.F JR.; CHANG T.S.; ZIRKIN B.R. Spermatogenesis in the mouse 2. Amino acid incorporation into basic nucleoproteins of mouse spermatids and spermatozoa. **Biol Reprod.** Dec;25(5):1041-51. 1981.

MCCARREY J.R. Spermatogenesis as a model system for developmental analysis of regulatory mechanisms associated with tissue-specific gene expression. **Semin Cell Dev Biol.** Aug;9(4):459-66. 1998.

MEETEI, A.R.; ULLAS, K.S.; VASUPRADHA, V.; RAO, M.R.S. Involvement of protein kinase A in the phosphorylation of spermatidal protein TP2 and its effect on DNA condensation. **Biochemistry** 41, 185–195. 2002.

OCAMPO J.; MONDRAGÓN R.; ROA-ESPITIA A.L.; CHIQUETE-FÉLIX N.; SALGADO Z.O.; MÚJICA A. Actin, myosin, cytokeratins and spectrin are components of the guinea pig sperm nuclear matrix. **Tissue Cell.** Aug;37(4):293-308. 2005.

OLIVA R.; DIXON G.H. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol** 40:25–94. 1991.

OLIVA, R.; DIXON, G.H. Vertebrate protamine genes and the histone to protamine replacement reaction. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.** 40, 25–94. 1990.

PAPOUTSOPOULOU S.; NIKOLAKAKI E.; CHALEPAKIS G.; KRUFTH V.; CHEVAILLIER P.; GIANNAKOUIROS T. SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. **Nucleic Acids Res** 27:2972–2980. 1999.

PFEIFER H.; CONRAD M.; ROETHLEIN D.; KYRIAKOPOULOS A.; BRIELMEIER M.; BORNKAMM G.W.; BEHNE D. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme

necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. **FASEB J** 15:1236–1238. 2001.

PIRHONEN A.; LINNALA-KANKKUNEN A.; MAENPAA P.H. Identification of phosphoserine residues in protamines from mature mammalian spermatozoa. **Biol Reprod** 50:981–986. 1994.

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. **Mol Reprod Dev.** Sep;60(1):97-106. 2001.

RUSSELL L.D.; RUSSELL J.A.; MACGREGOR G.R.; MEISTRICH M.L. Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents. **Am J Anat** 192:97–120. 1991.

SAKKAS, D.; MOFFATT, O.; MANICARDI, G.C.; MARIETHOZ, E.; TAROZZI, N.; BIZZARO, D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. **Biol. Reprod.** 66, 1061–1067. 2002.

SCHMIDT E.E.; SCHIBLER U. Developmental testis-specific regulation of mRNA levels and mRNA translational efficiencies for TATA-binding protein mRNA isoforms. **Dev Biol** 184:138–149. 1997.

SENGER P.L. Site of semen deposition and its effect on fertility and **sperm** retention: a review. **Reprod Fertil Dev.** 5(6):659-63. 1993.

SHAMAN J.A.; PRISZTOKA R.; WARD WS. Topoisomerase IIB and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner. **Biol Reprod.** Nov;75(5):741-8. 2006.

SHOUKIR Y.; CHARDONNENS D.; CAMPANA A.; SAKKAS D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? **Hum Reprod.** Jun;13(6):1632-7. 1998.

SOLOVYAN V.T.; BEZVENYUK Z.A.; SALMINEN A.; AUSTIN C.A.; COURTNEY M.J. The role of topoisomerase II in the excision of DNA loop domains during apoptosis. **J Biol Chem.** Jun 14;277(24):21458-67. 2002.

SOTOLONGO B.; HUANG T.T.; ISENBERGER E.; WARD W.S. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. **Journal of Andrology** 26 272–280. 2005.

SOTOLONGO B.; LINO E.; WARD W.S. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. **Biol Reprod.** Dec;69(6):2029-35. 2003.

SPADAFORA C. Sperm-mediated 'reverse' gene transfer: a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information. **Hum Reprod.** Apr;23(4):735-40. 2008.

STEGER, K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. **Anat. Embryol.** 199, 471–487. 1999.

VAN ROIJEN H.J.; OOMS M.P.; SPAARGAREN M.C.; BAARENDIS W.M.; WEBER R.F.; GROOTEGOED J.A.; VREEBURG J.T. Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. **Hum Reprod.** Jun;13(6):1559-66. 1998.

WARD W.S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. **Mol Hum Reprod.** Jan;16(1):30-6. 2010.

WARD W.S.; COFFEY D.S. Isolation of sperm nuclear Annulus: A sperm DNA anchor. **Biol Reprod.** 41, 361-370. 1989.

WARD W.S.; COFFEY D.S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biol Reprod.** Apr;44(4):569-74. 1991.

WARD W.D. Isolation of Sperm Nuclei and Nuclear Matrices from the Mouse, and other rodents. **Methods Mol Biol.** 927: 437–444. 2013.

WOLFFE, A.P. Transcriptional regulation in the context of chromatin structure. **Essays Biochem.** 37, 45–57. 2001.

WOUTERS-TYROU D.; MARTINAGE A.; CHEVAILLIER P.; SAUTIÈRE P. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. **Biochimie.** Feb;80(2):117-28. 1998.

YAMAUCHI Y.; SHAMAN J.A.; WARD W.S. Topoisomerase II-mediated breaks in spermatozoa cause the specific degradation of paternal DNA in fertilized oocytes. **Biol Reprod.** Apr;76(4):666-72. 2007.

YANAGIMACHI R. Mechanisms of fertilization in mammals. In: Mastroianni L, Biggers JD, editors. Fertilization and embryonic development in vitro. **New York: Plenum Press.** p 81–182. 1981.

YARON Y.; KRAMER J.A.; GYI K.; EBRAHIM S.A.; EVANS M.I.; JOHNSON M.P.; KRAWETZ S.A. Centromere sequences localize to the nuclear halo of human spermatozoa. **Int J Androl.** Feb;21(1):13-8. 1998.

ZALENSKAYA I.A.; BRADBURY E.M.; ZALENSKY A.O. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. **Biochem Biophys Res Commun.** Dec 9;279(1):213-8. 2000.

ZHAO, M.; SHIRLEY, C.R.; YU, Y.E.; MOHAPATRA, B.; ZHANG, Y.; UNNI, E.; DENG, J.M.; ARANGO, N.A.; TERRY, N.H.A.; WEIL, M.M.; RUSSELL, L.D.; BEHRINGER, R.R.; MEISTRICH, M.L. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. **Mol. Cell. Biol.** 21, 7243–7255. 2001.

DE LARA J., WYDNER K.L., HYLAND K.M., WARD W.S. Fluorescent in situ hybridization of the telomere repeat sequence in hamster sperm nuclear structures. **J Cell Biochem.** 53(3):213-21. 1993.

RIVKIN E., EDDY E.M., WILLIS W.D., GOULDING E.H., SUGANUMA R., YANAGIMACHI R., KIERSZENBAUM A.L. Sperm tail abnormalities in mutant mice with neo(r) gene insertion into an intron of the keratin 9 gene. **Mol Reprod Dev.** 72(2):259-71. 2005.