



Cromatina espermática: quebrando paradigmas

Sperm chromatin: breaking paradigms

M.E. Beletti

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Correspondência: mebeletti@ufu.br

Resumo

Há algumas décadas, pensava-se que espermatozoides maduros possuísem uma cromatina não funcional, inerte, sem a capacidade de transcrição. Acreditava-se que a matriz nuclear não existisse 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 se sabe que, entre as estruturas toroidais, unidades básicas da cromatina espermática altamente compactada, há algumas poucas regiões que contêm sequências de nucleossomos, e estas geralmente estão anexadas a uma matriz nuclear proteica. Os espermatozoides possuem cromatina altamente organizada e são condutores metabolicamente funcionais do genoma masculino, carregando RNAs de diferentes tipos, os quais, tanto quanto os nucleossomos, são importantes sinalizadores epigenéticos paternos e, logo, influenciam o desenvolvimento embrionário inicial. Portanto, alterações cromatínicas podem não somente interferir no processo de fecundação, como principalmente no desenvolvimento embrionário, o que reforça a necessidade da análise da cromatina na avaliação de reprodutores machos.

Palavras-chave: cromatina, epigenética, espermatozoide, matriz nuclear.

Abstract

Decades ago, it was thought that spermatozoa had a chromatin nonfunctional, inert, without the ability to transcription. It was believed in the absence of nuclear matrix and the presence of the core histones would be an error in the chromatin packaging, which could interfere with male fertility. Today we know that between the toroidal structures, basic units of highly compacted sperm chromatin, there are a few regions containing nucleosome sequences, these usually being attached to a nuclear protein matrix. The sperm chromatin is highly organized and is metabolically functional carrier of male genome, carrying different RNA types, which, along with the nucleosomes are important paternal epigenetic signaling, and influencing early embryonic development. Therefore, chromatin alterations not only interfere with the fertilization process, but also influence the embryonic development, which reinforces the need for chromatin analysis in the evaluation of breeding males.

Keywords: chromatin, epigenetic, nuclear matrix, spermatozoon.

Introdução

O espermatozoide dos mamíferos tem dois componentes principais, a cabeça e a cauda ou flagelo. A cabeça consiste do acrossoma, o núcleo e, em menor quantidade, estruturas citoesqueléticas e citoplasma. O núcleo é haploide, contendo somente um membro de cada par cromossômico, e a cromatina se torna altamente condensada durante a última fase da espermatogênese (Eddy, 2006). Durante a espermiogênese dos mamíferos, as histonas somáticas, proteínas nucleares básicas, seriam substituídas, em parte ou totalmente, por nucleoproteínas específicas dos espermatozoides, denominadas protaminas ou proteínas queratinosas, as quais possuem um caráter mais básico, ricas em arginina e cisteína oxidada (Bloch, 1969). Estudos mostraram que a permanência de histonas somáticas ou a ocorrência de anormalidades nas protaminas poderiam levar à formação de distúrbios de condensação da cromatina (complexo DNA-proteína) dos espermatozoides, a qual se torna frouxa com repercussões sobre a fertilidade (Gredhill, 1966; Evenson et al., 1980; Mello, 1982).

Há algumas décadas, pensava-se que espermatozoides maduros possuísem uma cromatina não funcional, inerte, sem a capacidade de transcrição. Acreditava-se que a matriz nuclear compoendo a cromatina espermática não existisse e que a presença de histonas no núcleo espermático seria um erro no processo de compactação cromatínica. Ao contrário das células somáticas, em que a unidade básica da cromatina é o nucleossomo, composto de um octâmero de histonas envolto por aproximadamente 150 pares de bases (pb) de DNA, a unidade básica da cromatina de espermatozoides de mamíferos seria o toroide de protamina (Hud et al., 1993), no qual aproximadamente 50.000 pb de DNA são firmemente enrolados pelas protaminas, formando uma estrutura em forma de “donut” (rosca) ou toroide. Tal constituição seria importante na proteção e manutenção da



estabilidade do DNA, bem como permitiria que todo esse DNA a ser transportado pelo espermatozoide ocupasse um volume muito menor do que se estivesse na forma de nucleossomos (Balhorn, 1982).

Alterações na cromatina espermática

Existe evidência de que esse processo de condensação de DNA pode estar incompleto, resultando em menor estabilidade nuclear e aumento da susceptibilidade para desnaturação do complexo DNA-proteína, o que tem sido associado com infertilidade em vários animais e no homem. Essa instabilidade nuclear levaria a danos no DNA, os quais poderiam persistir durante o desenvolvimento embrionário, induzindo apoptose e fragmentação do embrião no início do desenvolvimento ou levando à morte mais tardiamente (Twiggy et al., 1998).

Touros que apresentam espermatozoides com morfologia, motilidade e enzimas normais podem vir a se comportar como subfêrteis. Mesmo animais comprovadamente férteis podem apresentar intervalos de subfertilidade inexplicáveis. Verificou-se que, na maioria das vezes, isso é devido a alterações na compactação da cromatina dos espermatozoides (Beletti e Mello, 1996).

Foi por meio da reação de Feulgen que Gledhill (1966) diferenciou pela primeira vez espermatozoides com complexo DNA-proteína anômalo em touros subfêrteis. Inicialmente a maior intensidade de coloração nas cabeças desses espermatozoides foi admitida como sendo um maior conteúdo de DNA. No entanto, com a utilização de microespectrofotometria de ultravioleta, verificou-se que essa diferença na resposta à reação de Feulgen era consequência de uma alteração na cinética hidrolítica do DNA (depurinação mais rápida), devido a alterações no complexo DNA-proteína, tornando-o mais frouxo e mais sensível à hidrólise. Assim, os espermatozoides com cromatina mais frouxa se coram mais intensamente quando utilizada a reação de Feulgen.

Atualmente, grande número de metodologias é utilizado para identificação de alterações na estabilidade da cromatina espermática. Um dos métodos mais usados é a análise da estrutura da cromatina espermática (sperm chromatin structure assay - SCSA), que utiliza laranja de acridina para avaliar a suscetibilidade do DNA à desnaturação (Evenson et al., 1980). Os espermatozoides são submetidos a leve tratamento ácido, corados com laranja de acridina e avaliados em citômetro de fluxo. Por meio dos gráficos gerados no citômetro de fluxo é possível quantificar os espermatozoides com fluorescência verde e vermelha, que seriam, respectivamente, espermatozoides com cromatina normal e alterada.

Mello (1982) desenvolveu um método para avaliação da cromatina com o uso do azul de toluidina, um corante catiônico que exhibe fenômeno metacromático, isto é, 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 diretamente relacionado com a compactação do DNA. É importante que a solução de azul de toluidina esteja em pH 4,0, pois garante que apenas os fosfatos estejam ionizados, e não outros possíveis sítios (ânions) de ligação do corante. Os espermatozoides normais se coram em verde, mas aqueles com anomalias na compactação da cromatina se coram em violeta. Isto se deve ao fato de que, na cromatina normal de espermatozoides, a maioria dos grupos fosfatos está bloqueada por protaminas, consequentemente poucas moléculas do corante se ligam ao DNA e, assim, não ocorre o fenômeno da metacromasia, resultando em uma coloração de verde a azul claro. Já naqueles espermatozoides com cromatina pouco compactada, haveria mais ligações com as moléculas do corante, o que permitiria a ressonância de elétrons entre as moléculas, resultando numa coloração de azul escuro a magenta. Porém, somente alterações cromatínicas muito intensas seriam identificadas por esse método. A sensibilidade desse processo pode ser aumentada pela hidrólise ácida antes da coloração. Assim, espermatozoides normais, que são caracterizados por cromatina altamente compactada, são pouco afetados pela hidrólise e, consequentemente, continuam corando-se em azul claro. Por outro lado, espermatozoides com cromatina espermática com alterações leves, identificados como normal sem a hidrólise, têm as protaminas parcialmente extraídas, o que possibilita ligações das moléculas do corante com os grupos fosfatos do DNA, fazendo com que esses espermatozoides passem a se corar como anômalos. Mesmo com o tratamento ácido prévio, a avaliação de alterações da cromatina espermática continua possuindo um caráter subjetivo, podendo ocorrer variações entre examinadores. Para minimizar a subjetividade, Beletti et al. (2004, 2005) utilizaram análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina, previamente tratados com HCl 4N. Desta forma, as cores são diferenciadas pelos seus valores de *pixels*, o que diminui a subjetividade e possibilita a graduação das alterações. Além de diminuir a subjetividade, essa metodologia permite uma avaliação concomitante da morfometria e da cromatina de cada espermatozoide, a fim de que se possa correlacionar essas duas características (Beletti et al., 2005; Silva et al., 2008; Kanayama e Beletti, 2011). Com o uso dessa metodologia, Beletti et al. (2004) demonstraram a existência de diversos tipos de alterações de cromatina, com variações na localização e na intensidade de descompactação. Tais autores sugeriram uma relação da localização dessas alterações com a matriz nuclear. Esses tipos de alterações podem possuir diferentes etiologias e consequências sobre a fertilidade do macho.

Beletti e Mello (1996), ao estudarem touros que apresentavam alta porcentagem de espermatozoides com patologia de cabeça (touros subfêrteis), observaram que alguns desses animais apresentavam frequência de espermatozoides com complexo DNA-proteína anômalo semelhante ao de touros altamente férteis. Assim,



embora o achado de níveis mais elevados de metacromasia induzida se associe à subfertilidade, nem toda situação de subfertilidade é caracterizada pela presença de núcleos com essa propriedade citoquímica.

Em bovinos, Dobrinski e Barth (1993) mostraram que reprodutores considerados de baixa fertilidade possuíam altas taxas de espermatozoides com DNA danificado. Os autores observaram uma estreita relação entre o número de patologias espermáticas e o número de espermatozoides com DNA danificado. Já Watson (2000) apontou os espermatozoides apresentando DNA danificado como uma das causas responsáveis pelo insucesso na inseminação artificial.

Tais alterações na cromatina poderiam interferir na fertilidade do macho de diferentes formas, dependendo da intensidade da alteração. Espermatozoides com graves alterações cromatínicas teriam alterações na forma da cabeça e, portanto, na sua hidrodinâmica, o que levaria a uma motilidade inadequada, interferindo diretamente no processo de fecundação. Outras alterações espermáticas menos graves poderiam não interferir na motilidade e, conseqüentemente, no processo de fecundação, porém possuiriam danos no DNA que impossibilitariam a união dos pró-núcleos masculino e feminino e, por conseguinte, inviabilizariam o zigoto. Alterações ainda mais leves poderiam não interferir na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial, mas poderiam interferir em etapas posteriores do desenvolvimento embrionário, o que poderia levar à morte embrionária com conseqüente reabsorção fetal ou aborto. Ainda, em situações menos frequentes, a gestação poderia chegar a termo, mas os neonatos possuiriam alterações genéticas de diversos tipos e intensidades.

Por meio de microscopia eletrônica de transmissão, nos laboratórios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, foi verificada alta correlação negativa entre alterações na compactação da cromatina espermática de perus e taxa de eclosão dos ovos. Contudo, não foi obtida correlação significativa entre essas alterações e a taxa de fertilidade dos mesmos ovos, avaliada aos cinco dias de incubação (Araújo, 2013; UFU; informação pessoal). Ficou assim demonstrado que as alterações na compactação cromatínica identificadas por microscopia eletrônica de transmissão pouco ou nada interferem no processo de fecundação. No entanto, quando espermatozoides portadores dessa alteração fecundam o ovo, provavelmente levarão à morte o embrião durante o seu desenvolvimento.

Quebrando paradigmas

Apesar de esses métodos e conceitos até agora descritos serem compatíveis com os resultados e as observações da maioria das pesquisas, ainda existiam vários pontos a serem esclarecidos. Seria a cromatina espermática totalmente inerte? Não existe realmente matriz nuclear espermática? A presença de histonas constitui erro no processo de compactação da cromatina?

Recentemente, os espermatozoides têm sido reconhecidos como sendo altamente organizados e condutores metabolicamente funcionais do genoma masculino. Além da já conhecida unidade básica da cromatina de espermatozoides de mamíferos, o toroide de protamina, outro nível de arranjo da cromatina é a organização estrutural do DNA em domínios no formato de alças de 20 a 50kb (Ward et al., 1989; Kramer e Krawetz, 1996). Foi proposto o modelo “*donut*-alça” para a estrutura da cromatina espermática, o que sugere que ambos os níveis organizacionais são relacionados (Sotolongo et al., 2003). Nesse modelo, cada domínio em forma de alça do DNA é condensado em um único toroide de protamina. Esses domínios em forma de alça estariam fixados à matriz nuclear proteica em locais denominados de regiões de anexação da matriz (MARs). Portanto, hoje praticamente é aceita a existência de matriz nuclear espermática. Enquanto a composição da matriz nuclear não é completamente conhecida, há evidências de que alguns de seus componentes sejam topoisomerases IIB (Shaman et al., 2006), actina, miosina, citoqueratinas e espectrina (Ocampo et al., 2005), possivelmente carbamil fosfato sintetase glutamina-dependente, aspartato transcarbamilase, dihidroorotase (CAD; Carrey et al., 2002; Ocampo et al., 2005) e transcriptase reversa (Giordano et al., 2000). A fração de nuclease hipersensitiva, que provavelmente se liga a uma estrutura típica nucleossomal, liga cada toroide e anexa as alças à matriz nuclear (Sotolongo et al., 2003), potencialmente por meio da topoisomerase IIB (Shaman et al., 2006). As regiões sensitivas à nuclease têm sido descritas próximas às regiões de matriz, associadas aos domínios das alças no DNA espermático humano, o que é similar à cromatina potencializada à transcrição nas células somáticas (Chang et al., 1995). Estes são indícios de que talvez o DNA espermático não seja tão inerte quanto se pensava. Da mesma forma, sabe-se que o núcleo espermático, além de possuir transcriptase reversa, também possui vários tipos de RNAs não codificantes, provavelmente produzidos durante a espermatogênese. Apesar de as funções desses RNAs ainda serem desconhecidas, especula-se que estes seriam importantes no controle gênico no desenvolvimento embrionário inicial e na epigenética (Dadoune, 2009; Johnson et al., 2011; Carrel, 2012).

Outra recente e importante mudança de conceito é que a existência de histonas no núcleo espermático não se caracteriza necessariamente como um erro na compactação cromatínica. Na realidade, intercaladas entre as estruturas toroidais da cromatina espermática, existem regiões contendo sequências de nucleossomos, geralmente contendo DNA hipometilado. Tais regiões provavelmente possuem importante função no desenvolvimento embrionário inicial e na herança epigenética paterna. De fato, há algum tempo escreve-se sobre a importância da epigenética e dos denominados “*imprints*” paternos. No entanto, a existência apenas de



estruturas toroidais limitaria as sinalizações epigenéticas às alterações no DNA, tais como metilação e acetilação. A existência de regiões contendo nucleossomos, mesmo que em pequena quantidade, porém com localização estratégica, amplia sobremaneira as possibilidades de sinalizações epigenéticas paternas, já que as histonas são importantes sítios de sinalização epigenética (Johnson et al., 2011; Carrel, 2012).

Esses novos conceitos podem auxiliar e mesmo alterar as interpretações das avaliações da cromatina espermática. Os métodos que avaliam a fragmentação do DNA (Tunel, cometa, dispersão da cromatina espermática; Kadirvel et al., 2012; Karoui et al., 2012) apenas identificariam alterações mais intensas no DNA. Já aqueles que avaliam a compactação ou *status* da cromatina (azul de toluidina, SCSA; Fortes et al., 2012; Oliveira et al., 2012) provavelmente também seriam influenciadas por alterações epigenéticas. Desta forma, a frequente correlação entre alterações cromatínicas identificadas por esses métodos e a morte embrionária precoce podem não ser necessariamente causadas por fragmentação do DNA, mas por alterações epigenéticas.

Conclusões

Intercaladas entre as estruturas toroidais da cromatina espermática, existem algumas poucas regiões contendo sequências de nucleossomos, estrategicamente localizadas, que geralmente estão anexadas à matriz nuclear. Tais regiões são importantes na sinalização epigenética paterna. Assim como as regiões de cromatina contendo nucleossomos, RNAs não codificadores encontrados no núcleo espermático parecem ser importantes no desenvolvimento embrionário inicial. Portanto, os espermatozoides possuem cromatina altamente organizada e são condutores metabolicamente funcionais do genoma masculino.

Tais conceitos reforçam a necessidade da avaliação da cromatina espermática não somente quanto à fragmentação do DNA, mas também quanto a alterações epigenéticas, muitas das quais podem ser identificadas ao se avaliar a compactação da cromatina.

Referências

- Balhorn R.** A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol*, v.93, p.298-305, 1982.
- Beletti ME, Costa LF, Guardieiro MM.** Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz J Morphol Sci*, v.22, p.85-90, 2005.
- Beletti ME, Costa LF, Viana MP.** A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. *Biotech Histochem*, v.79, p.17-23, 2004.
- Beletti ME, Mello MLS.** Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. *Braz J Genet*, v.19, p.97-103, 1996.
- Bloch DP.** A catalog of sperm histones. *Genetics*, v.61, suppl., p.93-111, 1969.
- Carrel DT.** Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril*, v.97, p.267-274, 2012.
- Carrey EA, Dietz C, Glubb DM, Loffler M, Lucocq JM, Watson PF.** Detection and location of the enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in mammalian spermatozoa. *Reproduction*, v.123, p.757-768, 2002.
- Chang KS, Fan YH, Andreeff M, Liu J, Mu ZM.** The PML gene encodes a phosphoprotein associated with the nuclear matrix. *Blood*, v.85, p.3646-3653, 1995.
- Dadoue JP.** Spermatozoal RNAs: What About Their Functions? *Microsc Res Tech*, v.72, p.536-551, 2009.
- Dobrinski I, Barth AD.** Abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *Rev Bras Reprod Anim*, supl.4, p.15-23, 1993.
- Eddy EM.** The spermatozoon. In: Neill JD. (Ed.). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. New York: Elsevier, 2006. v.1, p.3-54.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR.** Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, v.210, p.1131-1133, 1980.
- Fortes MRS, Holroyd RG, Reverter A, Venus BK, Satake N, Boe-Hansen GB.** The integrity of sperm chromatin in young tropical composite bulls. *Theriogenology*, v.78, p.326-333, 2012.
- Giordano R, Magnano AR, Zaccagnini G, Pittoggi C, Moscufo N, Lorenzini R, Spadafora C.** Reverse transcriptase activity in mature spermatozoa of mouse. *J Cell Biol*, v.148, p.1107-1113, 2000.
- Gledhill BL.** Studies on the DNA content, dry mass and optical even of morphologically normal and abnormal bull spermatozoa heads. *Acta Vet Scand*, v.7, p.1-20, 1966.
- Hud NV, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R.** Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, v.193, p.1347-1354, 1993.
- Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK, Leduc F, Boissonneault G, Krawetz SA.** The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction*, v.141, p.21-36, 2011.
- Kadirvel G, Periasamy S, Kumar S.** Effect of Cryopreservation on Apoptotic-like Events and its Relationship with Cryocapacitation of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Sperm. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.143-150, 2012.



- Kanayama CY, Beletti ME.** Avaliação computacional da compactação da cromatina e de características morfológicas da cabeça de espermatozoides de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.63, p.94-99, 2011.
- Karoui S, Diaz C, Gonzalez-Marin C, Amenabar ME, Serrano M, Ugarte E, Gosalvez J, Roy R, Lopez-Fernandez C.** Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility? *J Anim Sci*, v.90, p.2437-2449, 2012
- Kramer JA, Krawetz SA.** Nuclear matrix interactions within the sperm genome. *J Biol Chem*, v.271, p.11619-11622, 1996.
- Mello MLS.** Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry*, v. 74, p.387-392, 1982.
- Ocampo J, Mondragon R, Roa-Espitia AL, Chiquete-Felix N, Salgado ZO, Mujica A.** Actin, myosin, cytokeratins and spectrin are components of the guinea pig sperm nuclear matrix. *Tissue Cell*, v.37, p.293-308, 2005.
- Oliveira LZ, Arruda RP, Andrade AFC, Santos RM, Beletti ME, Peres RFG, Martins JPN, Hossepian de Lima VFM.** Effect of sequence of insemination after simultaneous thawing of multiple semen straws on conception rate to timed AI in suckled multiparous Nelore cows. *Theriogenology*, v.78, p.1800-1813, 2012.
- Shaman JA, Prisztoka R, Ward WS.** Topoisomerase IIB and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner. *Biol Reprod*, v.75, p.741-774, 2006.
- Silva RT, Mendes Júnior JOB, Beletti ME.** Compactação da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozoides na produção de embriões in vitro utilizando touros zebuínos. *Acta Sci Anim Sci*, v.30, p.473-478, 2008
- Sotolongo B, Lino E, Ward WS.** Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod*, v.69, p. 2029-2035, 2003.
- Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ.** Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, v.13, p.1864-1871, 1998.
- Ward WS, Partin AW, Coffey DS.** DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma*, v.98, p.153-159, 1989.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.481-492, 2000.
-