

Evidências moleculares espermáticas associadas à fertilidade do macho

Molecular evidence in sperm associated with male fertility

Thais Rose dos Santos Hamilton¹

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, UNESP

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV UNESP

*E-mail: thais.hamilton@unesp.br

Resumo

A fertilidade do macho é um fenômeno multifatorial e envolve a interação de fatores estruturais, funcionais e moleculares do espermatozoide. Avaliações seminais convencionais apresentam limitações na predição do potencial fértil masculino, especialmente no contexto das biotecnologias reprodutivas. Nesse cenário, características moleculares espermáticas têm sido associadas à fertilidade. A organização da cromatina espermática promove compactação do DNA e proteção do material genético, alterações nesse processo comprometem a integridade do DNA espermático e impactam o desenvolvimento embrionário inicial. Adicionalmente, regiões com menor compactação da cromatina podem envolver modulação da expressão gênica após a fecundação. Ainda, a presença de RNAs espermáticos, especialmente microRNAs, tem ampliado a compreensão da contribuição paterna para o desenvolvimento embrionário, pois atuam na modulação da expressão gênica de eventos iniciais do desenvolvimento, sendo associados à fertilidade. Assim, a integração entre organização da cromatina, integridade do DNA e conteúdo molecular do espermatozoide representa uma abordagem promissora para compreender a fertilidade do macho e aprimorar biotecnologias reprodutivas.

Palavras-chave: análise funcional, cromatina espermática, DNA espermático, miRNA, reprodução masculina.

Abstract

Male fertility is a multifactorial trait aspect involving the interaction of structural, functional and molecular sperm characteristics. Conventional semen analysis has limited predictive value for fertility, particularly in assisted reproductive technologies. Sperm molecular features have been associated with fertility potential. Sperm chromatin organization leads to high DNA compaction and protection. Damage in this process may compromise DNA integrity and early embryo development. Additionally, less condensed chromatin regions may be associated with post-fertilization gene regulation. The presence of sperm RNAs, especially microRNAs, has expanded the knowledge about paternal contributions to embryo development. The microRNAs regulate gene expression and have been associated with fertility by influence in early developmental events. Therefore, the integration between chromatin organization, DNA integrity, and sperm molecular content represents an important approach to better understand male fertility and improve reproductive biotechnologies.

Keywords: sperm function, sperm chromatin, sperm DNA, miRNA, male reproduction.

Introdução

O potencial de fertilidade do macho resulta da interação entre fatores físicos, endócrinos e genéticos que determinam a produção de espermatozoides funcionalmente competentes. No entanto, mesmo com os avanços nas técnicas de avaliação seminal, cerca de 30% dos casos de infertilidade permanecem sem diagnóstico conclusivo quando baseados apenas em avaliações convencionais, evidenciando limitações dessas abordagens. Em sistemas de produção *in vitro* de embriões, essa limitação torna-se ainda mais evidente, uma vez que indivíduos com características semelhantes, geneticamente e fenotipicamente, podem apresentar desempenhos reprodutivos distintos, sugerindo a influência de fatores não detectados pelas avaliações tradicionais (Alomar et al., 2008). Nesse contexto, a compreensão da biologia do espermatozoide tem sido ampliada, passando de uma visão restrita à entrega do material genético para um papel mais abrangente, que inclui a transferência de componentes moleculares, como proteínas, mRNA e microRNAs, essenciais para a fecundação e para o desenvolvimento embrionário inicial

(Gannon et al., 2014; Jenkins e Carrell, 2012). Portanto, a competência espermática depende não apenas da integridade estrutural, mas também da organização molecular e funcional de seus componentes, refletindo diretamente o potencial fértil do macho (Assumpção e Hamilton, 2025).

Organização da cromatina espermática e integridade do DNA

O espermatozoide maduro apresenta uma estrutura da cromatina altamente compacta e estável (Ward e Coffey, 1991). Essa organização do núcleo espermático resulta de intensas modificações estruturais e bioquímicas ocorridas durante a espermiogênese. Durante esse processo, as histonas são hiperacetiladas e os nucleossomos dissociados sendo progressivamente substituídas por proteínas de transição (TNP1 e TNP2) nas espermátides (Balhorn, 2007), e posteriormente por protaminas (Carrell et al., 2007). As protaminas são nucleoproteínas altamente básicas, ricas em arginina e resíduos de cisteína (Vilfan et al., 2004) que se ligam ao DNA, formando nucleoprotaminas, o que resulta em um estado de cromatina extremamente condensado e transcricionalmente inerte (Wouters-Tyrou et al., 1998).

A compactação promovida pelas protaminas, denominada protaminação, reduz o volume nuclear em até oito vezes, o que facilita o deslocamento do espermatozoide no trato reprodutivo feminino e contribui para a proteção do material genético durante a fecundação (Oliva, 2006). Nesse sentido, a integridade do DNA espermático é um importante indicador da qualidade seminal, diretamente associada ao potencial de fertilidade (Larson-Cook et al., 2003).

As protaminas podem ser classificadas, principalmente, em protamina 1 (PRM1) e protamina 2 (PRM2), sendo a proporção entre elas variada entre as espécies de mamíferos (Balhorn et al., 2007; Hamilton et al., 2019), o que pode comprometer a compactação da cromatina e aumentar a suscetibilidade aos danos no DNA (Nagaki et al., 2022).

Embora espermatozoides com DNA fragmentado possam fecundar o oócito, danos extensos reduzem a qualidade embrionária, comprometem o desenvolvimento e aumentam as anormalidades genéticas (Fatehi et al., 2006; Tamburrino et al., 2012).

De forma geral, três mecanismos são descritos para explicar as anormalidades na cromatina espermática e os danos no DNA: 1. Danos no protaminação, 2. Apoptose e 3. Estresse oxidativo. Esses mecanismos não são mutuamente exclusivos e, frequentemente, atuam de forma combinada na determinação da integridade do DNA espermático (Berenguer et al., 2008).

Mecanismos associados às anormalidades da cromatina e dano no DNA espermático

A primeira hipótese envolve alterações na protaminação que resultam em cromatina menos compacta e estruturalmente instável, que aumenta a vulnerabilidade do DNA espermático à ação de agentes endógenos e exógenos, como nucleases, espécies reativas e agentes mutagênicos (Sotolongo et al., 2005; Nagaki et al., 2022). A segunda hipótese envolve a apoptose, um processo fisiológico de morte celular programada essencial para a manutenção da homeostase tecidual, desempenha papel importante na eliminação de células germinativas defeituosas e no controle da proporção entre células germinativas e células de Sertoli (Shukla et al., 2012). No entanto, quando esse processo é incompleto ou abortivo, células com danos no DNA podem escapar dos mecanismos de controle e serem liberadas no ejaculado. A terceira hipótese envolve o estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do sistema reprodutivo masculino. A presença de espermatozoides imaturos, com excesso de citoplasma residual aumenta a produção de EROs, favorecendo processos de peroxidação lipídica e danos ao DNA (Agarwal et al., 2003). Embora a produção de EROs em níveis controlados seja fisiologicamente importante, como nos processos de hiperativação espermática e reação acrossômica (Aitken e Baker, 2006), o excesso de EROs está diretamente relacionado à redução da qualidade seminal e da fertilidade. Essas condições reforçam o caráter multifatorial dos danos ao DNA espermático.

Apreciações funcionais do núcleo espermático

A avaliação da funcionalidade do núcleo espermático constitui uma abordagem essencial para compreender a competência funcional do espermatozoide. O uso de sondas fluorescentes (fluorocromos) tem se destacado como uma ferramenta altamente sensível para a análise de compartimentos subcelulares específicos (Celeghini et al., 2007). A avaliação funcional espermática por sondas fluorescentes apresenta forte correlação com o potencial reprodutivo masculino (Siqueira et al., 2025).

Danos ao DNA espermático não necessariamente se refletem em alterações nos atributos

espermáticos clássicos, como motilidade ou integridade de membrana (Hamilton et al., 2016a; Hamilton et al., 2018). Dessa forma, espermatozoides com DNA fragmentado podem manter capacidade fecundante, porém comprometem eventos subsequentes, como o desenvolvimento embrionário inicial e a implantação (Fatehi et al., 2006). Nesse sentido, a identificação de danos na cromatina espermática torna-se fundamental para uma avaliação mais precisa da fertilidade.

Dentre as técnicas disponíveis, o teste de suscetibilidade da cromatina espermática (SCSA) é amplamente utilizado e baseia-se no uso do fluorocromo laranja de acridina (Evenson e Jost, 2000; Hamilton e Assumpção, 2020). Outra abordagem é o ensaio Cometa alcalino, que possibilita a detecção de quebras de fita simples de DNA na célula (Donnelly et al., 2000), geralmente categorizada em diferentes níveis de intensidade (Hamilton et al., 2018; Hamilton e Assumpção, 2020).

Evidências experimentais têm demonstrado a associação entre danos à cromatina espermática e estresse oxidativo. Em estudos conduzidos com ovinos, foi observado que condições de estresse oxidativo, induzidas por insulação testicular, resultam em aumento da suscetibilidade à fragmentação do DNA em espermatozoides (Hamilton et al., 2016b; Hamilton et al., 2018). Diferenças entre raças bovinas também têm sido descritas, como menor suscetibilidade à fragmentação de DNA em touros Nelore em comparação a Angus, sugerindo possíveis adaptações fisiológicas distintas (Nagaki et al., 2025).

Além da avaliação qualitativa e quantitativa dos danos ao DNA espermático, a verificação de falhas de protaminação na cromatina espermática também é relevante, e pode ser investigada por meio do uso do fluorocromo Cromomicina A3 (CMA3), que compete com as protaminas pelos sítios de ligação no DNA (Bianchi et al., 1996; Hamilton e Assumpção, 2020). A proporção entre PRM1 e PRM2 varia entre espécies e está associada à fertilidade, alterações nessa relação têm sido associadas a alterações morfológicas espermáticas e infertilidade (Mengual et al., 2003; Aoki et al., 2006). Em bovinos, a deficiência de protaminação pode não estar diretamente associada ao aumento da fragmentação de DNA (Castro et al., 2018), mas pode refletir um estado de cromatina mais permissivo, potencialmente relacionado à regulação gênica embrionária. De forma consistente, estudos recentes demonstraram maior proporção de células com deficiência de protaminação em touros Nelore quando comparados a Angus (Nagaki et al., 2025).

Apesar de indicar boa relação com a integridade da cromatina espermática, a avaliação da falha de protaminação é uma forma de avaliação indireta às protaminas. Nesse sentido, abordagens moleculares mais específicas têm sido empregadas para quantificar a expressão gênica e proteica. A expressão gênica das protaminas pode ser realizada por PCR em tempo real (qPCR) absoluto baseado em curvas padrão obtidas a partir de clones plasmidiais contendo os genes de interesse (Hamilton et al., 2016b; 2018; 2019). Essa abordagem permite estimar o número de cópias dos transcritos e comparar diretamente os níveis de expressão entre amostras.

Por meio dessa metodologia, foi demonstrado que espermatozoides bovinos apresentam maior expressão gênica da PRM1 em relação à PRM2, o que pode estar associado ao elevado grau de compactação da cromatina nessa espécie (Hamilton et al., 2019). Além disso, diferenças raciais também têm sido observadas, com touros Nelore apresentando maiores níveis de expressão dessas protaminas em comparação a Angus, o que se correlaciona com menor susceptibilidade à fragmentação do DNA (Nagaki et al., 2025). Ademais, ejaculados bovinos com baixa motilidade apresentam menor expressão de PRM1, evidenciando a relação entre protaminação e qualidade espermática (Ganguly et al., 2013). Em condições de estresse oxidativo, como observado em ovinos submetidos a insulação testicular, não foram detectadas alterações significativas na expressão gênica de PRM1 e PRM2, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos na resposta ao dano oxidativo (Hamilton et al., 2016a; 2018). A análise direta das proteínas protaminas, por meio de técnicas de eletroforese e Western blot, também tem sido proposta como uma abordagem robusta para avaliar a organização da cromatina espermática. Essa metodologia foi validada para a espécie bovina, considerando suas particularidades estruturais e moleculares (Hamilton e Simões, 2021).

Os resultados disponíveis indicam que a compactação da cromatina espermática reflete respostas adaptativas a condições ambientais e fisiológicas. No entanto, não explica as diferenças de fertilidade observadas entre os indivíduos. Nesse cenário, fatores adicionais, particularmente de natureza epigenética, emergem como componentes fundamentais na regulação da competência reprodutiva.

Regulação epigenética espermática

Além da função estrutural, a organização da cromatina espermática possui implicações diretas na regulação gênica após a fecundação. Embora a substituição das histonas por protaminas resulte em um estado altamente condensado do DNA, uma fração do genoma espermático, estimada entre 5 e 15%,

permanece associada a histonas, especialmente em regiões promotoras de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário (Balder et al., 2024). Essas regiões são frequentemente enriquecidas com modificações pós-traducionais, como acetilação e metilação, que podem influenciar a ativação gênica nos estágios iniciais do desenvolvimento, sendo um veículo de informação epigenética. A regulação epigenética no espermatozoide ainda envolve a metilação do DNA no estabelecimento de padrões de imprinting embrionário (Krawetz, 2005; Nagaki et al., 2022). Esses mecanismos não atuam de forma isolada, mas integram uma rede regulatória dinâmica, onde modificações de histonas podem influenciar a metilação do DNA, enquanto RNAs não codificadores modulam ambos os processos. Nesse contexto, tem-se proposto que a herança epigenética paterna pode ocorrer por meio desses componentes, permitindo a transmissão de informações ambientais entre gerações (Chen et al., 2017; Sharma et al., 2016).

Essa perspectiva amplia o entendimento clássico do papel do espermatozoide, anteriormente limitado à entrega do genoma paterno. Atualmente, reconhece-se que o gameta masculino contribui com um conjunto complexo de moléculas regulatórias, incluindo proteínas, padrões específicos de metilação do DNA, histonas remanescentes e diferentes classes de RNAs, que atuam de forma coordenada durante a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial (Gannon et al., 2014; Jenkins e Carrell, 2012).

Durante a espermatogênese, RNAs mensageiros (mRNAs) são sintetizados e armazenados para utilização em etapas subsequentes da diferenciação celular e fecundação (Rando, 2012). Evidências sugerem que esses transcritos podem participar da regulação dos eventos iniciais do desenvolvimento embrionário (Sendler et al., 2013). Além de mRNAs, também são descritos os RNAs não codificadores, como os microRNAs (miRNAs), siRNAs, piRNAs, RNAs longos (lncRNAs), que exercem funções regulatórias fundamentais na expressão gênica (Hale et al., 2014).

Os miRNAs têm recebido destaque crescente devido à sua capacidade de modular a expressão gênica em nível pós-transcricional. A biogênese dos miRNAs envolve múltiplas etapas e resulta em uma molécula de aproximadamente 22 nucleotídeos que atua principalmente por ligação complementar ao mRNA alvo promovendo repressão da tradução ou degradação do transcrito (Chen et al., 2017). Os miRNAs estão envolvidos na regulação de diversos processos biológicos (Cheng et al., 2005), além disso, um único miRNA regula múltiplos alvos. Apesar dos avanços, ainda existem lacunas importantes na compreensão do papel funcional dos miRNAs espermáticos. Um dos principais desafios consiste em diferenciar associações observacionais de relações causais. Nesse sentido, estudos funcionais, como a microinjeção de miRNAs em zigotos, têm se mostrado abordagens robustas para investigar seus efeitos diretos. A modulação do perfil de miRNAs pode resultar em alterações significativas no desenvolvimento embrionário, entretanto, a ausência de efeitos em experimentos de inibição sugere a existência de redundância funcional, nos quais diferentes miRNAs podem compensar mutuamente suas funções (Fischer et al., 2015).

Os miRNAs em espermatozoides têm sido considerados importantes mediadores da contribuição parental para o fenótipo da progênie (Chen et al., 2017). Diversos estudos têm buscado associar o perfil de miRNAs espermáticos à fertilidade em bovinos. Em touros, análises comparativas entre indivíduos de alta e baixa fertilidade demonstraram diferenças na abundância de miRNAs (Govindaraju et al., 2012), sendo a maior expressão de determinados miRNAs observada em animais de baixa fertilidade, sugerindo possível efeito inibitório sobre genes envolvidos na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial. Entretanto, a extrapolação desses achados para sistemas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) deve ser realizada com cautela, uma vez que touros com desempenho semelhante em condições de campo podem apresentar respostas bastante distintas em sistemas *in vitro* (Alomar et al., 2008; Rodríguez-Lozano et al., 2014). Estudos recentes têm avançado na identificação de miRNAs associados especificamente à competência embrionária na PIVE. A análise da expressão de miRNAs espermáticos em touros com diferentes desempenhos na PIVE permitiu identificar microRNAs exclusivos em animais com alta PIVE (Hamilton et al., 2021). Experimentos funcionais demonstraram que a microinjeção desses miRNAs em zigotos oriundos de touros de baixa fertilidade na PIVE resultou em aumento significativo nas taxas de clivagem e formação de blastocistos (Hamilton et al., 2023). Ainda, análises funcionais indicaram que esses miRNAs estão envolvidos na modulação de genes relacionados à remodelação da cromatina, como a histona desacetilase (HDAC1). Essa condição promoveria um estado de cromatina mais acessível e favoreceria a transcrição gênica durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (Hamilton et al., 2023). Esses efeitos também foram acompanhados por aumento na razão trofocotoderma:massa celular interna nos embriões, sugerindo impacto tanto no desenvolvimento embrionário quanto extraembrionário (Hamilton et al., 2025).

Atualmente, abordagens baseadas em ciências ômicas tem ampliado a capacidade de caracterização funcional dos espermatozoides. A integração dessas ferramentas com análises funcionais representa um avanço importante na identificação de biomarcadores confiáveis e na compreensão dos

mecanismos que determinam a fertilidade masculina.

Considerações finais

A fertilidade do macho deve ser compreendida como um fenômeno multifatorial que ultrapassa as limitações das avaliações seminais convencionais (Giacone et al., 2019). A integração entre organização da cromatina, integridade do DNA e mecanismos epigenéticos evidencia que o espermatozoide não é apenas um vetor genético, mas um mensageiro de informações regulatórias essenciais ao desenvolvimento embrionário. Os miRNAs espermáticos emergem como importantes moduladores da expressão gênica, com potencial aplicação como biomarcadores de fertilidade e ferramentas para o aprimoramento das biotecnologias reprodutivas (Alves et al., 2017; Bahmyari et al., 2024). Assim, a avaliação do potencial reprodutivo do macho deve ser compreendida de forma integrada, considerando estrutura celular, componentes moleculares e epigenéticos que influenciam diretamente a competência do espermatozoide. Desta forma será possível utilizar estratégias mais precisas na seleção de reprodutores e otimizar a eficiência reprodutiva do macho.

Referências

- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA.** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, v.79, p.829–843, 2003.
- Aitken JR, Baker M.** Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol.*, v. 16, p.66-69, 2006.
- Alomar M, Tasiaux H, Remacle S, George F, Paul D, Donnay I.** Kinetics of fertilization and development and sex ratio of bovine embryos produced in vitro with bull sperm of different fertility. *Anim Reprod Sci*, v.107, p.48–61, 2008.
- Alves MB, Celeghini ECC, Belleannee C.** From sperm motility to sperm-borne microRNA signatures: new approaches to predict male fertility potential. *Front Cell Dev Biol*, v.5, p.109, 2017.
- Aoki VW, Lihua L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Perterson CM, Carrell DT.** Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril*, v.86, p.1208-1415, 2006.
- Assumpção MEOA, Hamilton TRS.** New approaches in bovine spermatozoa evaluation and their relationship with male fertility. *Animal Reproduction Science*, v. 272, p. 107656, 2025.
- Bahmyari S, Khatami SH, Taghvimi S, Arablouydareh SR, Taheri-Anganeh M, Berenji HG, Farazmand T, Fard ES, Solati A, Movahedpour A, Ghasemi.** MicroRNAs in male fertility. *DNA Cell Biol*, v. 43, p. 108-124, 2024.
- Balder P, Jones C, Coward K, Yeste M.** Sperm chromatin: evaluation, epigenetic signatures and relevance for embryo development and assisted reproductive technology outcomes. *European Journal of Cell Biology*, v. 103, p. 151429, 2024.
- Balhorn R.** The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*, v.8, p.227, 2007.
- Berenguer JG, Pelegrini PC, López-Fernandez C, Fernandez JL, Calonge RN.** Fragmentación Del ADN espermático. *Revista Internacional de Andrologia*, v. 6, n. 3, p. 193–209, 2008.
- Carrell DT, Emery BR, Hammoud S.** Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction update*, v. 13, n. 3, p. 1-15, 2007.
- Castro LS, Siqueira AFP, Hamilton TRS, Mendes CM, Visintin JA, Assumpção MEOD.** Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility. *Theriogenology*, v. 107, p. 142-148, 2018.
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF.** Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim.*, v. 42, p. 479-488, 2007.
- Chen X, Li X, Guo J, Zhang P, Zeng W.** The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis. *J Anim Sci Biotechnol*, v. 8, p. 1-8, 2017.
- Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP.** Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucl Acids Res.*, v. 33, p. 1290-1297, 2005.
- Donnelly ET, Connell M, McClure N, Lewis SEM.** Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod.*, v. 15, n.7, p. 1552-1561, 2000.
- Evenson DP, Jost LK.** Sperm chromatin structure assay for DNA integrity. *Methods Cell Sci*, v.22, p.169–189, 2000.

- Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BA, Colenbrander B, Gadella BM.** DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl.*, v. 27, n. 2, p. 176–188, 2006.
- Fischer S, Handrick R, Aschrafi A, Otte K.** Unveiling the principle of microRNA-mediated redundancy in cellular pathway regulation. *RNA Biol*, v. 31, p. 238-247, 2015.
- Ganguly I, Gaur GK, Kumar S, Mandal DK, Kumar M, Singh U, Kumar S, Sharma A.** Differential expression of protamine 1 and 2 genes in mature spermatozoa of normal and motility impaired semen producing crossbred Frieswal (HF x Sahiwal) bulls. *Res Vet Sci*, v. 94, n.2, p. 256–262, 2013.
- Gannon JR, Emery BR, Jenkins TG, Carrell DT.** The sperm epigenome: implications for the embryo. *Adv Exp Med Biol*, v.791, p.53–66, 2014.
- Giacone F, Cannarella R, Mongioi L, Alamo A, Condorelli R, Calogero AE, Vignera SL.** Epigenetics of male fertility: effects on assisted reproductive techniques. *World J Mens Health*, v. 37, p. 148-156, 2019.
- Govindaraju A, Uzun A, Robertson L, Atli MO, Kaya A, Topper E, Crate EA, Padbury J, Perkins A, Memili E.** Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. *Reprod Bio Endocrinol*, v. 10, p. 1-10, 2012.
- Hale BJ, Yang C X, Ross JW.** Small RNA regulation of reproductive function. *Mol Reprod Develop*, v. 81, p. 148-159, 2014.
- Hamilton TRS, Assumpção MEOA.** Sperm DNA fragmentation: causes and identification. *Zygote*, v. 28, p. 1-8, 2020.
- Hamilton TRS, Simoes R, Mendes CM, Goissis MD, Nakajima, E, Martins EAL, Visintin JA, Assumpção MEOA.** Detection of protamine 2 in bovine spermatozoa and testicles. *Andrology*, v. 7, p. 373-381, 2019.
- Hamilton TRS, Siqueira AFP, Castro LS, Mendes CM, Delgado JC, Assis PM, Mesquita LP, Maiorka PC, Nichi M, Goissis MD, Visintin JA, Assumpção MEOA.** Effect of heat stress on sperm DNA: Protamine Assessment in ram spermatozoa and testicle. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, p.1-14, 2018.
- Hamilton TRS, Castro LS, Delgado JC, Assis PM, Siqueira AFP, Mendes CM, Goissis MD, Muiño-Blanco T, Cebrián-Perez JA, Nichi M, Visintin JA, Assumpção MEOA.** Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. *Reproduction*, v. 151, p. 379-390, 2016a.
- Hamilton TRS, Mendes CM, Castro LS, Assis PM, Siqueira AFP, Delgado JC, Goissis MD, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, Nichi M, Visintin JA, Assumpção MEOA.** Evaluation of lasting effects of heat stress on sperm profile and oxidative status of ram semen and epididymal sperm. *Oxi Med Cell Longev*, v. 2016, p. 1687657, 2016b.
- Hamilton TRS, Mendes CM, Silveira JC, Goissis MD, Assumpção MEOA.** Delivery of exogenous sperm microRNAs increases cleavage rates and changes gene expression in embryos, leading to an increment on blastocyst and development rates in low in vitro production fertility bulls. *Reprod Fertil Dev*, v. 35 (2), p. 155-156, 2023.
- Hamilton TRS, Mendes CM, Goissis MD, Silveira JC, Assumpção MEOA.** Increased expression of microRNAs in sperm of Nellore Bulls with high in vitro fertility. *Reprod Fertil Dev*, v. 33 (2), p. 157-157, 2021.
- Hamilton TRS, Mendes CM, Stábile LA, Luedke FE, Silveira JC, Goissis MD, Assumpção MEOA.** Delivery of exogenous sperm microRNAs does not restore embryo quality in low IVP fertility bulls, while their inhibition compromises ICM Cells in high IVP fertility bulls. *Anim Reprod*, v. 22 (3), p. 138, 2025.
- Hamilton TRS, Simoes R.** An improved acetic acid-urea polyacrylamide electrophoresis method to evaluate bovine sperm protamines. *Ani Reprod Sci*, v. 56, p. 1050-1056, 2021.
- Jenkins TG, Carrell DT.** The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. *Reproduction*, v. 143, p. 727-734, 2012.
- Krawetz SA.** Paternal contributions: new insights and future challenges. *Nat Ver Genet.*, v. 6, p. 633-642, 2005.
- Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP.** Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*, v. 80, n. 4, p. 895-902, 2003.
- Mengual L, Ballezá JL, Ascaso C, Oliva R.** Marked differences in protamine content and P1/p2 ratios in sperm cells from Percoll fractions between patients and controls. *J Androl*, v.24, p.438-447, 2003.
- Nagaki CAP, Hamilton TRS, Assumpção MEOA.** What is known so far about bull sperm protamination: a review. *Anim Reprod*, v. 19, p. e20210109, 2022.
- Nagaki CAP, Hamilton TRS, Camila MM, Assumpção MEOA.** Comparative study of sperm protamine

- gene expression and chromatin integrity in Nellore and Angus Bulls. *Reprod Biol*, v. 25, p. 1011051, 2025.
- Oliva R.** Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*, v.12, p.417–435, 2006.
- Rando OJ.** Daddy issues: paternal effects on phenotype. *Cell*, v. 151, p.702–8, 2012.
- Rodriguez-Lozano I, Ávalos-Rodríguez A, Castillo-Juárez H, Borderas-Tordesillas F, Roa-Vidal JJ, Rosales-Torres AM.** Percentage of ubiquitinated spermatozoa does not correlate with fertilizing capacity of thawed bovine semen. *Reprod Domest Anim*, v. 49, p. 27-31, 2014.
- Sendler E, Johnson GD, Mao S, Goodrich RJ, Diamond MP, Hauser R, Krawtz SA.** Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization. *Nucl Acids Res*, v. 41, p. 4104–4117, 2013.
- Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S.** Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Elite Ed)*, v. 1, n. 4, p. 746–754, 2012.
- Siqueira AFP, Castro LS, Hamilton TRS, Castiglioni VC, Bicudo LC, Almeida TG, Mingoti RD, Mendes CM, Leite R, Losano JDA, Nichi M, Assumpção MEOA.** Individual effect of bull prevails over sperm characteristics in predictive models. *Biomolecules*, v. 16, p. 581-597, 2026.
- Sotolongo B, Huang TTF, Isenberger E, Ward S.** An endogenous nuclease in hamster, mouse and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl*, v. 26, n. 2, p. 272-280, 2005.
- Tamburrino L, Marchiani S, Montoya S, Marino FE, Natali I, Cambi M, Forti G, Baldi E, Muratori M.** Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl*, v. 14, n. 1, p. 24-31, 2012.
- Vilfan ID, Conwell CC, Hud NV.** Formation of native like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *J Biol Chem*, v.279, n. 19, p.20088–20095, 2004.
- Ward WS, Coffey DS.** DNA organization in spermatozoa. *Biol Reprod*, v.44, p.569–574, 1991.
- Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevaillier P, Sautière P.** Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie*, v. 80, n. 2, p. 117–128, 1998.
-