

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/6049
IB/80236

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1984

50832

Este exemplar corresponde
à Redacção final da Tese
defendida pela Sra. Maria
José Lima da Silva
e aprovada pela Comissão
Julgadora.

12.12.84

[Assinatura]

STABILIDADE À HIDRÓLISE ÁCIDA DE ALGUNS
DIFERENTES COMPLEXOS DNA - PROTEÍNA
DE ESPERMATOZOÍDES

Maria José Lima da Silva

MARIA JOSÉ LIMA DA SILVA

LABILIDADE A HIDRÓLISE ÁCIDA DE ALGUNS
DIFERENTES COMPLEXOS DNA - PROTEÍNA
DE ESPERMATOZÓIDES

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção
do título de Doutor em Ciências
na área de Genética.

Prof.^a Dr.^a Maria Luíza Silveira Mello
Orientadora

Câmpinas - SP

- 1984 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Classif. <i>T</i>
ator <i>Si 381</i>
Ex.
Combo BCI <i>6049/IB</i>
<i>608</i>

1 of 80236
ref 6049

A José Carlos e Ana Paula
com todo carinho

DEDICO.

A Dr.^a Maria Luíza Silveira Mello

Ao exemplo de pesquisadora e
pessoa humana, meu
sincero reconhecimento

AGRADECIMENTOS

- À Prof.^a Dr.^a Maria Luíza Silveira Mello, pela dedicação, orientação segura e constante estímulo na realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, por ter me dado a primeira oportunidade, participando com sua experiência para minha formação científica. Pelas sugestões e interesse que dispensou a esse trabalho, deixo aqui minha gratidão.
- À Prof.^a Dr.^a Hebe Myrina Laghi de Souza, pela orientação no programa das disciplinas cursadas na pós-graduação; pela presteza e facilidades concedidas para o uso do laboratório climatizado do Departamento de Genética; pela atenção que dispensou à leitura do manuscrito desta tese, bem como pelas sugestões apresentadas e sobretudo pela amizade dispensada, sou muito grata.
- Aos Profs. Drs. Luís Carlos Gomes Simões, Zuleice V. Silveira Tarelho, Yoko Bomura Rosato e Renato Bonatelli, pela atenção que dispensaram à leitura do manuscrito desta tese, bem como pelas sugestões apresentadas.
- Ao Dr. Amilton Ferreira, pela ajuda na coleta de gafanhotos.
- Ao Dr. José Chaud Neto pelo auxílio na obtenção dos espermatozoides de abelha.
- À Propec, Comércio e Representações Ltda., pelo fornecimento de ampolas de sêmen de touro.

- À Base Marinha da Universidade de São Paulo cediada em Ubatuba, litoral norte do estado de São Paulo, na pessoa do Dr. Pierre Charles G. Montouchet, por ter permitido o uso do laboratório para a preparação das lâminas de ouriço-do-mar.
- À SUCEN, Superintendência de Controle de Endemias, na pessoa do Sr. Antenor Nascimento Ferraz Filho, pelo envio dos barbeiros.
- Ao Dr. José Antonio Cordeiro, pela colaboração prestada na análise estatística dos dados.
- Ao Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas onde o presente trabalho foi realizado.
- A Universidade Federal da Paraíba, pelas facilidades concedidas.
- À Sr.^a Ana Gagliardi, bibliotecária chefe do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pela dedicação e valiosa colaboração prestada na correção das referências bibliográficas.
- Ao técnico de laboratório, Mário Bianchi, pela presteza e ajuda dispensada durante a realização deste trabalho.
- Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas, pela amizade e colaboração.

- Ao meu esposo, José Carlos da Silva, pelo incentivo, compa
nheirismo, paciência e compreensão demonstrada.

- Aos meus pais, e à minha irmã, pelo interesse e incentivo
com que sempre me acompanharam.

- A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realizaç
ão deste trabalho.

O presente trabalho pôde ser realizado graças à doa
ção de equipamentos pela FAPESP, ao Departamento de Biolog
ia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP na pessoados
Profs. Drs. Benedicto de Campos Vidal e Maria Luíza Silveira
Mello.

ÍNDICE

	Página
1 . INTRODUÇÃO.....	01
2 . OBJETIVOS.....	11
3 . MATERIAL.....	12
4 . MÉTODOS.....	13
4.1. Obtenção dos espermatozóides e preparo de lâminas.....	13
4.2. Fixação dos preparados e Reação de Feulgen	14
4.3. Citofotometria.....	15
4.4. Curvas de hidrólise.....	15
4.5. Análise estatística.....	15
5 . RESULTADOS.....	16
5.1. Espermatozóides de <i>Bos taurus</i>	16
5.2. Espermatozóides de <i>Pichroplus bergi</i>	31
5.3. Espermatozóides de <i>Triatoma infestans</i>	38
5.4. Espermatozóides de <i>Lytechinus variegatus</i> ..	44
5.5. Espermatozóides de <i>Apis mellifera</i>	50
5.6. Cinética de hidrólise comparada.....	56
6 . DISCUSSÃO.....	60
6.1. Cinética de hidrólise de Feulgen, proteí- nas nucleares e efeito de fixação.....	60
6.1.1. Fatores determinantes de depurina- ção diferencial do DNA em espermato- zóides.....	62
6.1.2. Solubilização do ácido apurínico...	68
6.2. Confiabilidade na metodologia de medida...	70
7 . CONCLUSÕES.....	72

8	. RESUMO.....	74
9	. SUMMARY.....	76
10	. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1 - INTRODUÇÃO

A reação de Feulgen é o procedimento citoquímico mais conhecido e utilizado para determinações quantitativas de DNA, dada a sua alta especificidade e sua razoável estequiometria (revisão em MELLO & VIDAL, 1978). Basicamente, envolve duas etapas, sendo a primeira uma hidrólise ácida que remove do DNA preferencialmente as purinas, "liberando" a função aldeídica dos açúcares desoxirribose aos quais se achavam ligadas, e conseqüentemente produzindo um ácido apurínico (FEULGEN & ROSSENBECK, 1924; DI STEPHANO, 1948; OVEREND & STACEY, 1949). Numa segunda etapa, os aldeídos "liberados" pela hidrólise ácida vão reagir com o reativo de Schiff que é um leucoderivado da fucsina básica, com afinidade por grupos aldeído. O grupo cromofórico é então restaurado, na molécula do leucoderivado formando-se, portanto, um produto corado.

Durante a hidrólise ácida, o número de grupamentos aldeídicos do DNA, coráveis pela reação de Feulgen, aumenta até um máximo e então diminui, pois com a subsequente despolimerização do ácido apurínico perdem-se grupos aldeídos potencialmente capazes de se ligarem às moléculas do reativo de Schiff. Esta cinética de hidrólise pode ser estudada "in situ", computando-se os valores Feulgen - DNA em diferentes tempos de hidrólise e construindo-se as chamadas curvas de hidrólise de Feulgen. Estas, apresentam uma porção ascendente, que corresponde à eliminação gradual de purinas do DNA (depuração) e um ramo descendente, que corresponde à remoção de pirimidinas e desoxirribose, despolimerização e solubilização do ácido apurínico.

Vem sendo demonstrado mais recentemente que a reação de Feulgen se presta não só para quantificações de DNA, mas também para fornecer informações sobre o complexo DNA-proteína presente na cromatina de vários tipos celulares em vários estados de diferenciação, uma vez que uma cinética diferencial de hidrólise pode ser exibida nesses casos (AGRELL & BERGQVIST, 1962, 1967; BRACHET & PREUMONT, 1966; BACHMANN, 1968; BRACHET et alii, 1968; NOESKE, 1969; VAUGHN & LOCY, 1969; ALVAREZ, 1970; MITTERMAYER et alii, 1971; RASCH & RASCH, 1973; KJELLSTRAND & ANDERSSON, 1975a, b; ANDERSSON & KJELLSTRAND, 1975; MELLO, 1979; MELLO & VIDAL, 1980). As proteínas associadas ao DNA o tornariam diferentemente suscetível à hidrólise ácida.

Variações no perfil das curvas de hidrólise foram encontradas em células embrionárias em fases precoces comparadas a células diferenciadas de *Rana temporaria* (AGRELL & BERGQVIST, 1962). Neste caso três máximos foram detectados para as células em fases precoces e apenas um para células diferenciadas, o que foi atribuído a variações em ligações do DNA a outras macromoléculas nucleares. Tal tipo de achado foi posteriormente confirmado em outras espécies (AGRELL & BERGQVIST, 1967; BRACHET & PREUMONT, 1966; BRACHET et alii, 1968 e ALVAREZ, 1970).

Quando se estuda a cinética de hidrólise de heterocromatina e eucromatina em separado, observam-se padrões diferentes de labilidade das mesmas. MELLO (1976, 1979), estudando regiões heterocromáticas e eucromáticas de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, verificou que a eucromatina era menos estável à hidrólise ácida que a heterocromatina. Variações no perfil das curvas de hidrólise se fazem presentes na porção descendente da curva e, portanto, se acham

relacionadas com o padrão de despolimerização do ácido apurínico. Estas diferenças parecem ser induzidas por alguma variação no tipo e/ou quantidade de proteínas não histônicas associadas ao ácido apurínico dessas cromatinas, uma vez que nessa fase de hidrólise histonas reativas ao fast green alcalino, já não se achavam mais presentes, enquanto foram detectadas proteínas reativas ao fast green a pH 2,7. De certa forma os achados de MELLO estão de acordo com dados de MITTERMAYER et alii (1971), embora estes últimos tenham considerado hetero e eucromatina no sentido estritamente morfológico de condensação cromatínica. Também em regiões cromatínicas de cromossomos politênicos, que diferem em complexos DNA-proteína, têm sido demonstrados diferentes padrões de cinética hidrolítica de Feulgen, especialmente no que se refere à fase de solubilização do ácido apurínico (MELLO & VIDAL, 1980).

Os núcleos a serem submetidos à reação de Feulgen são expostos primeiramente à fixação, e uma vez que ela atua sobre o complexo DNP, o emprego de fixadores diferentes pode vir a preservar diferentemente o componente protéico do mesmo. Conseqüentemente, dependendo do fixador utilizado, o tempo de hidrólise a partir do qual ocorre a depuração e a despolimerização também pode variar. Assim, são encontrados diferentes perfis de curvas de hidrólise em função da fixação (BAUER, 1932; HILLARY, 1939; DI STEPHANO, 1948; SWIFT, 1955; KASTEN, 1956; DEITCH et alii, 1967 e 1968; BÖHM, 1968; BÖHM & SPRENGER, 1968; BACHMANN, 1968; GREENWOOD & BERLYN, 1968; MITTERMAYER et alii, 1971; KJELLSTRAND & LAMM, 1976; MELLO, 1976, 1979; MELLO & ZANARDI, 1976a e b). MELLO (1976), estudando núcleos somáticos do mesmo tipo fixados em etanol - ácido acético e formol a 10%, verificou que os valores Feulgen - DNA máximos eram atingidos primeiramente

pelos núcleos fixados em etanol - ácido acético, e a seguir por aqueles fixados em formol. A explicação é dada pelo fato de que uma dissociação mais rápida das proteínas complexadas ao DNA em núcleos somáticos é promovida pela fixação em etanol - ácido acético, enquanto o formol preserva melhor essas proteínas (DICK & JOHNS, 1967; SUMMER et alii, 1973; BRODY, 1974; RETIEF & RUCHEL, 1977; FRASCHINI et alii, 1981).

Também têm sido encontrados diferentes perfis de curvas de hidrólise em espermatozoides de algumas diferentes espécies (SALISBURY et alii, 1961, 1964; GLEDHILL et alii, 1966; MELLO & ZANARDI, 1976a; ANDERSSON & KJELLSTRAND, 1975; KJELLSTRAND & ANDERSSON, 1975a, b; KJELLSTRAND & LAMN, 1976). Em material fixado com formol a 2%, a depuração (ramo ascendente da curva de hidrólise) é bastante rápida para espermatozoides de salmão e truta, enquanto espermatozoides de touro apresentam uma depuração lenta. Também a despolimerização do ácido apurínico (ramo descendente da curva de hidrólise) é lenta neste último caso. Para espermatozoides de salmão a despolimerização é mais rápida (KJELLSTRAND & ANDERSSON, 1975a).

É conhecida a variação em tipos de proteínas básicas associadas ao DNA de espermatozoides ao longo da escala evolutiva animal. Histonas do tipo somáticas são substituídas ou sofrem adição de outras durante os últimos estágios da espermiogênese, dando lugar no espermatozoide ao aparecimento de protamina (salmão, truta, tubarão) ou uma histona rica em arginina e cistina (mamíferos, por exemplo: touro, rato, coelho, camundongo e carneiro), rica em arginina (grilo, gafanhoto, anfíbios, alguns moluscos) ou ainda rica em lisina (abelha, ouriço-do-mar, pepino-do-mar) BLOCH & HEW, 1960; SALISBURY et alii, 1961, 1964; BLOCH & BRACK, 1964;

GLEDHILL, 1966; GLEDHILL et alii, 1966; CLAYPOOL & BLOCH, 1967; SUBIRANA & PALAU, 1968; BLOCH, 1969; PALAU et alii, 1969; COELINGH et alii, 1969, 1972; PHELAN et alii, 1972; McMASTER-KAYE & KAYE, 1973, 1976; SUBIRANA et alii, 1973, 1981; TESSIER & PALLOTTA, 1973; KAYE & McMASTER-KAYE, 1974; MARUSHIGE & MARUSHIGE, 1974; KJELLSTRAND & ANDERSSON, 1975a, b; LOIR & LANNEAU, 1975, 1978; PUWARAVUTIPANICH & PANYIM, 1975; CALVIM & BEDFORD, 1976; ROCHA & CORNUDELLA, 1976; GOLDEBERG et alii, 1977; KAYE & MOSS, 1978; COLON & SUBIRANA, 1979, 1981; AVRAMOVA et alii, 1980, 1983; KHARCHENKO & NALIVAEVA, 1980; TONIOLO, 1980; GUSSE & CHEVAILLIER, 1980a, 1981; GIANCOTTI et alii, 1981a, b; POGANY et alii, 1981; SAVIC et alii, 1981; TSANEV & AVRAMOVA, 1981; RAO et alii, 1982; MUNÓZ-GUERRA et alii, 1982; USCHEWA et alii, 1982; AUSIÓ & SUBIRANA, 1982; AZORÍN et alii, 1983. Dos animais citados, os que sofrem adição são os seguintes: grilo, pepino-do-mar e algumas espécies de ouriço-do-mar.

Algumas variações ocorrem mesmo dentro de um grupo, como no caso de peixes. Em *Carassius auratus*, as histonas somáticas não são substituídas durante a espermiogênese (MUNÓZ-GUERRA et alii, 1982); em outras espécies como no linguado, mais um grupo de proteínas básicas com alto peso molecular (110.000 daltons) se faz presente nos espermatozóides (KENNEDY & DAVIES, 1980, 1982). No peixe cartilaginoso *Hydrolagus colliei*, no início da espermiogênese, encontra-se uma histona somática, que no final do estágio de espermatíde é substituída por uma protamina, dando lugar finalmente no espermatozóide a uma histona rica em arginina (BOLS & KASINSKY, 1976).

Histonas somáticas são as histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4 que se acham associadas ao DNA em núcleos de células

somáticas. Em eritrócitos nucleados durante o processo de eritropoiése a histona H1 é gradualmente substituída por H5 (SINCLAIR & BRASCH, 1975). Conforme demonstrado por PIMENTEL (1983), a histona H5 se dispõe de maneira orientada em relação aos filamentos de desoxirribonucleoproteína, além de apresentar alta capacidade de agregar ordenadamente as moléculas de DNA. No entanto, pouco se sabe sobre a substituição das histonas somáticas por uma proteína "germinativa" em espermatozóides, embora várias hipóteses fossem levantadas (BLOCH, 1969). A protamina, pelo seu alto teor em arginina, pequeno tamanho da molécula, sua estrutura primária e secundária, promove uma complexação mais íntima com o DNA, ligando-se ordenadamente aos grupamentos fosfatos do DNA a ponto de aumentar suas características anisotrópicas (VIDAL, 1979).

Variações na estrutura da cromatina em espermatozóides com diferentes complexos DNA - proteína têm sido demonstradas através de digestão enzimática da fibra cromatínica seguida por análise ao microscópio eletrônico (SPADAFORA et alii, 1976; KEICHLINE & WASSARMAN, 1977, 1979; EVENSON et alii, 1978; KIERSZENBAUM & TRES, 1978; CORNUDELLA & ROCHA, 1979, GUSSE & CHEVAILLIER, 1980a, b; McMASTER-KAYE & KAYE, 1980; POGANY et alii, 1981; SAVIC, 1981; SUBIRANA et alii, 1981; GIANCOTTI et alii, 1981b; BALHORN, 1982; SABHON et alii, 1982; TSANEV & AVRAMOVA, 1983; AZORÍN et alii, 1983).

Em núcleos somáticos de eucariotos, a cromatina apresenta-se formada por unidades repetitivas denominadas nucleossomos, constituídos por um octâmero de histonas H2A, H2B, H3 e H4 em volta do qual liga-se um segmento de DNA com 200 pares de bases. A molécula de H1 liga-se no nucleossomo de tal forma que as regiões terminais da mesma se situem so-

bre o segmento de DNA que emerge do "core" nucleossômico. Parte do DNA dos nucleossomos constitui o ligador ou espaçador cujo comprimento é variável. O termo "core" nucleossômico é atribuído a um octâmero de histonas H2A, H2B, H3 e H4, associado a 146 pares de bases do DNA, perfazendo 1 volta e 3/4 em torno deste octâmero (revisão em KORNBERG & KLUG, 1981; LEWIN, 1983).

Segundo alguns pesquisadores, a cromatina de espermatozoides de mamíferos não exibe estrutura nucleossômica típica (EVENSON et alii, 1978; POGANY et alii, 1981; SOBHON et alii, 1982). De acordo com SOBHON et alii (1982), a cromatina de espermatozoides humanos, analisada ao microscópio eletrônico após tratamento com nuclease microcócica e NaCl 2M, apresenta-se formada por 2 tipos de cordões em forma de zig-zag, com espessuras de 330 a 420 Å e 650 - 1200 Å. Ao contrário do observado por estes autores GUSSE & CHEVAILLIER (1980b) detectaram a presença de nucleossomos em espermatozoides de truta, tubarão, touro e em humanos. Atribuem esta visualização ao uso de reagentes redutores e alquilantes que facilitariam a solubilização e ruptura de frações da cromatina portadoras de proteína rica em cistina. BALHORN (1982), estudando a cromatina de espermatozoides de mamíferos, descreveu o lugar e o modo de ligação do DNA com as protaminas e propôs um modelo em que o segmento da poliarginina central da molécula de protamina ligar-se-ia ao menor sulco ("minor groove") do DNA, (de certa forma em consonância com proposição de DU PRAW, 1968). Contudo, segundo o modelo de BALHORN (1982), que propôs ligações inter-protamina, várias pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas seriam responsáveis por um posicionamento de regiões C - e N - terminais de moléculas consecutivas dessa proteína, adjacentes

uma à outra, possibilitando a formação de uma ponte dissulfeto adicional entre a cauda C - terminal de uma protamina e a cauda N - terminal de outra. Tal arranjo provocaria um complexo neutro e insolúvel da cromatina, tornando-a invulnerável à maioria das influências externas. Esse arranjo, explicaria talvez a dificuldade encontrada pelos pesquisadores na descondensação da fibra cromatínica e conseqüentemente na observação de estruturas nucleossômicas. TSANEV & AVRAMOVA (1983), verificaram a presença de estruturas "não protamínicas" em espermatozóides de truta, que resistiram a tratamentos com detergentes e altas concentrações de sais de uréia, constituindo corpos granulares em forma de anel aos quais o DNA se liga.

KIERSZENBAUM & TRES (1978) estudando a espermiogênese de *Acheta domesticus* (grilo) verificaram a presença de nucleossomos no 1º estágio da espermiogênese e que da metade até o final da mesma, estas estruturas não eram mais visualizadas dando lugar a fibras lisas e mais espessas, propondo para isso um modelo dessa transformação. Atribuem ao processo a substituição de histonas somáticas por histonas ricas em arginina. McMASTER-KAYE & KAYE (1980), no mesmo material verificaram que do início até a metade da espermiogênese estruturas nucleossômicas são visíveis, porém, no estágio final de espermátide a cromatina perde estas estruturas nucleossômicas, embora as histonas somáticas ainda estejam presentes. Admitem, ao contrário de KIERSZENBAUM & TRES (1978) que as histonas que estavam organizadas em nucleossomos durante os primeiros estágios da espermiogênese, se incorporaram em diferentes espécies de complexos DNP durante os últimos estágios dando origem à fibras lisas e espessas.

Em espécies cuja proteína é rica em lisina tem-se

observado estruturas nucleossômicas. Porém, nas espécies de ouriço-do-mar estudadas, observou-se um DNA com 240, 250, 260 e 239 pares de bases, respectivamente para *Arbacia lixula*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Arbacia punctulata*, *Lytechinus pictus*. Essas variações ocorrem no "DNA ligador", uma vez que para todas as espécies estudadas o DNA do nucleóide é constante: 140 pares de bases. Atribuem-se essas variações ao tipo de histona presente nesses espermatozóides (SPADAFORA et alii, 1976; KEICHLINE & WASSARMAN, 1977, 1979; GIANCOTTI et alii, 1981a, b; SAVIC, 1981). SUBIRANA et alii (1981) encontraram em pepino-do-mar (*Holothuria tubulosa*) estruturas em forma de "superbead" com uma fibra de 30 nm de diâmetro e mais tarde confirmada por AZORÍN et alii (1983) que demonstraram a presença nesses espermatozóides das 5 histonas tipo somáticas mais uma histona H1 específica para os espermatozóides e uma proteína básica ($\phi 0$) com composição de aminoácidos e estrutura semelhante a região carbóxi-terminal de H1. Isso faz com que $\phi 0$ se associe a H1 estabilizando a associação dos nucleossomos em fibras de 30 nm de diâmetro.

Dependendo do tipo de histona "germinativa" associada ao DNA nos espermatozóides estudados, a organização da cromatina se torna, portanto, estruturalmente variável.

É de se esperar, pois, com base nos dados acima relatados que a cinética de hidrólise de Feulgen varie em espermatozóides, em função dos tipos de proteína associados ao seu DNA, produzindo diferentes respostas à reação de Feulgen. Por outro lado, uma vez que este tipo celular é usado com freqüência como padrão haplóide de conteúdo de DNA, é importante que se esclareçam alterações nos perfis de cinética de hidrólise e tempo de depuração máxima em espermatozóides com diferenças no tipo de complexos DNA - proteína. Além dis

so, este tipo celular é um modelo ideal para se pesquisar a influência de diferentes proteínas sobre as propriedades físicas do complexo DNA - proteína.

2. OBJETIVOS

Com base nos dados existentes na literatura no que se refere a diferenças em composição de proteína(s) associada(s) ao DNA em espermatozoides, pretende-se neste trabalho:

- Estudar a cinética de hidrólise de Feulgen de espermatozoides de algumas diferentes espécies cujo tipo de proteína nuclear associada ao DNA é especialmente rica em arginina e cistina (touro) (SALISBURY et alii, 1961, 1964; GLEDHILL, 1966; GLEDHILL et alii, 1966; COELINGH et alii, 1969, 1972 e MARUSHIGE & MARUSHIGE, 1974); rica em arginina (gafanhoto e "barbeiro") (BLOCH & BRACK, 1964; CLAYPOOL & BLOCH 1967; BLOCH, 1969; TESSIER & PALLOTA, 1973; McMASTER KAYE & KAYE, 1973, 1976; KAYE & McMASTER-KAYE, 1974; KAYE & MOSS, 1978; MELLO, 1982) ou ainda rica em lisina (ouriço-do-mar e abelha) (SUBIRANA & PALAU, 1968; PALAU et alii, 1969; BLOCH, 1971; OZAKI, 1971; SAVIC et alii, 1981; GIANCOTTI et alii, 1981a, b).
- Uma vez que a fixação altera a cinética de hidrólise os mesmos espermatozoides terão a cinética de hidrólise estabelecida após o uso de diferentes fixadores.
- Esperando que alterações no complexo DNP possam ocorrer em espermatozoides com anomalias morfológicas, serão determinados os perfis de hidrólise para estes tipos de núcleos comparados aos de espermatozoides normais, em sêmen de touro.

BLOCH, D.P. - Comunicação pessoal, 1971.

MELLO, MARIA LUÍZA S. - Comunicação pessoal, 1982

3 - MATERIAL

Foram utilizados espermatozóides das seguintes espécies animais :

- 3.1. Touro - ampolas de sêmen de *Bos taurus* utilizadas para inseminação artificial (LWpHG Plato e AdvLO 6519) cedidas pela Propec - Campinas (SP).
- 3.2. Gafanhotos da espécie *Pichroplus bergi* provenientes do Horto Florestal de Rio Claro (SP).
- 3.3. Barbeiros adultos da espécie *Triatoma infestans* cedidos pela SUCEN (Superintendência do Controle de Endemias) de Moji-Guaçu (SP).
- 3.4. Ouriço-do-mar da espécie *Lytechinus variegatus* coletados no litoral do Estado de São Paulo em Ubatuba, na base Norte do Laboratório de Biologia Marinha da USP.
- 3.5. Abelhas (*Apis mellifera*) obtidas do apiário da UNESP - Rio Claro (SP).

4 - MÉTODOS

4.1. Obtenção dos espermatozóides e preparo de lâminas

4.1.1. As ampolas de sêmen de touro, foram mantidas congeladas em nitrogênio até o momento de preparo das lâminas. Foram então descongeladas à temperatura ambiente e com esse material preparados os esfregaços, os quais foram a seguir fixados.

4.1.2. Os espermatozóides de gafanhoto foram obtidos dos testículos removidos dos adultos e então esmagados entre lâmina e lamínula numa gota de fixador. As lamínulas foram retiradas congelando-se o preparado em nitrogênio líquido.

4.1.3. Os espermatozóides de barbeiro foram obtidos a partir de um homogeneizado de testículos com o uso do homogeneizador de Dounce. Com esse material foram preparados esfregaços imediatamente fixados.

4.1.4. Os espermatozóides de ouriço-do-mar foram obtidos através da aplicação de cloreto de potássio (KCl) 0,5M pela Lanterna de Aristóteles na cavidade do corpo dos animais. Imediatamente procedeu-se à preparação de esfregaços do sêmen, os quais foram a seguir fixados.

4.1.5. Os espermatozóides foram coletados dos zangões através de uma micro-agulha utilizada

para inseminação artificial. Pequenas gotas de sêmen foram então pingadas em lâminas, imediatamente após o que se efetuou o esfregaço e a fixação do preparado.

4.2. Fixação dos preparados e Reação de Feulgen

De todos os materiais prepararam-se lâminas fixadas em dois tipos de soluções:

1. Formol a 2% tamponado a pH 6,8 por 15 minutos, seguido de banho em água corrente por 10 horas.
2. Etanol - ácido acético (3:1) durante 1 minuto, seguido de banho rápido em etanol a 70%. Após a fixação as lâminas foram estocadas a seco.

Reação de Feulgen - os preparados foram submetidos à hidrólise em HCl 4N a 25°C nos seguintes tempos: 10 min., 20 min., 30 min., 1 h., 2 h., 4 h., 6 h. e 10 h. Para espermatozoides de gafanoto fixados em etanol - ácido acético utilizou-se também hidrólise por 2 e 5 min. Essas condições de hidrólise foram utilizadas, uma vez que não se trata de núcleos somáticos com cromatina frouxa, os quais pediriam uma hidrólise suave e longa com HCl 0,1M a 37°C (BÖHM, 1968). O material hidrolisado foi rapidamente lavado em água destilada e deixado 40 min. no reativo de Schiff, preparado segundo LILLIE (1954), à temperatura ambiente. Logo após os preparados foram lavados em 3 banhos de água sulfurosa e um banho de água destilada. As lâminas foram desidratadas e montadas em bálsamo do Canadá ($n = 1,54$).

4.3. Citofotometria

Os valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias, foram obtidos usando-se um citofotômetro de varredura automática Zeiss acoplado a um computador microdata. As condições de trabalho foram : objetiva 100/1,25; optovar 2, diâmetro do diafragma de medida 0,1 mm; condensador Zeiss LD - Epiplan 16/0,30; passo de varredura 0,5 μm x 0,5 μm (eixos X e Y), comprimento de onda (λ) = 570 nm. Os movimentos de varredura foram predominantemente monodirecionais.

4.4. Curvas de hidrólise

Com os valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias obtidos para cada tempo de hidrólise para os diferentes materiais submetidos aos dois tipos de fixação, foram construídas as curvas de hidrólise. O perfil das diferentes curvas foi comparado entre si.

4.5. Análise estatística

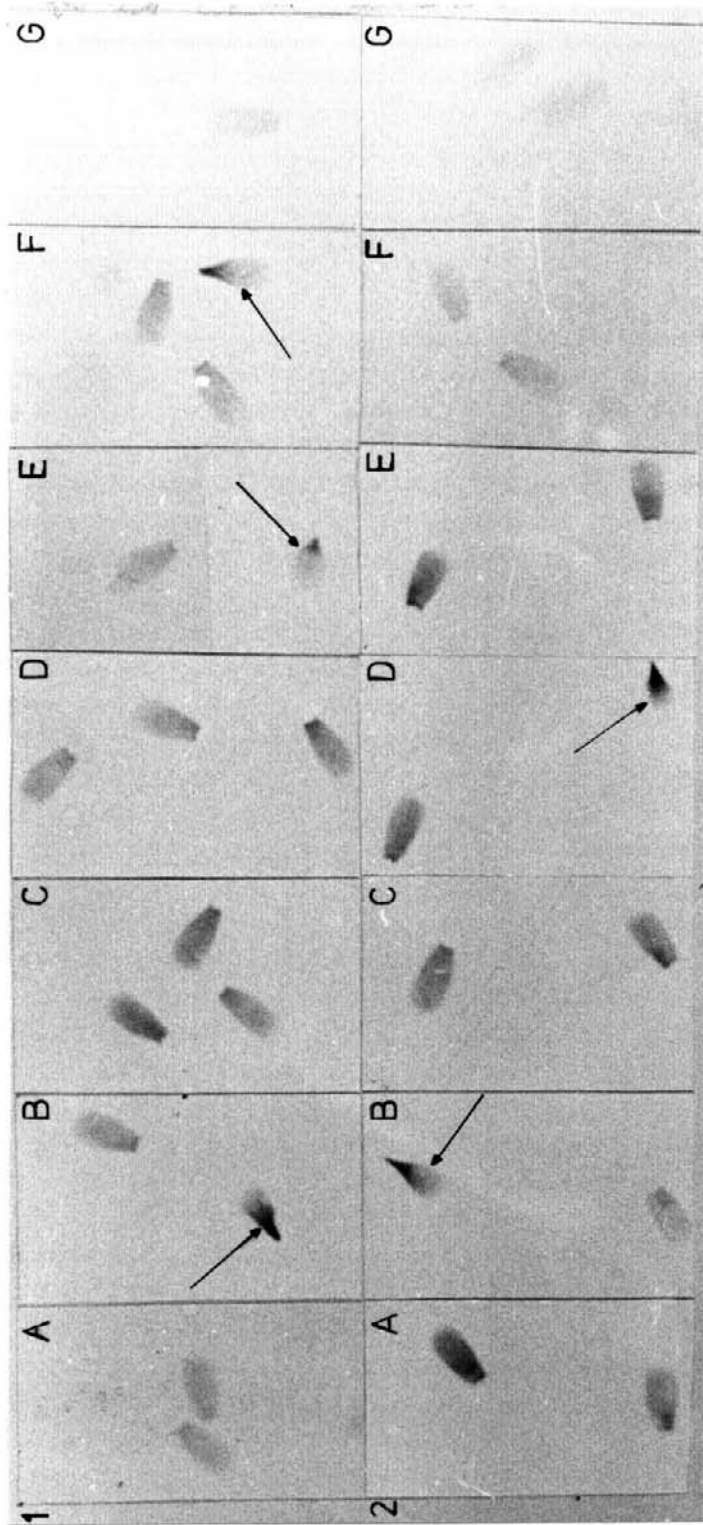
Para cada tempo de hidrólise dos diferentes materiais submetidos aos dois tipos de fixadores, foram calculados o desvio padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança; quando necessário efetuou-se o teste t, de Student (PIMENTEL GOMES, 1976).

5 - RESULTADOS

5.1. Espermatozoides de *Bos taurus* (touro)

O aspecto morfológico dos espermatozoides de touro fixados em formol e submetidos à reação de Feulgen, após diferentes tempos de hidrólise, é mostrado na figura 1. Os espermatozoides fixados em etanol-ácido acético aparecem na figura 2. Em meio à população de espermatozoides morfológica_{mente} normais foram encontrados alguns espermatozoides com forma de cabeça anômala ("pera") (Fig. 1:B, E, F; Fig. 2:B e D). Mesmo visualmente observaram-se variações na resposta à reação de Feulgen à medida em que aumenta o tempo de hidrólise.

Valores Feulgen - DNA foram obtidos em unidades arbitrárias e percentuais, para 20 espermatozoides morfológica_{mente} normais em cada tempo de hidrólise, e são mostrados nas tabelas I e III. Obteve-se também uma amostra (n = 5) de espermatozoides com morfologia de cabeça anômala ("pera"), cujos valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias e percentuais são apresentados nas tabelas II e III. Para os tempos de hidrólise de 6 horas (formol) e 10 horas (etanol-ácido acético e formol) não foram computados valores Feulgen - DNA para espermatozoides morfológica_{mente} anômalos, dada a dificuldade visual em detectá-los.



Figs. 1 e 2 Espermatozoides de *B. taenium* submetidos à reação de Feulgen, com os tempos de hidrólise de 10 min. (A), 20 min. (B), 30 min. (C), 1 hora (D), 2 h. (E), 4 h. (F) e 6 h. (G). As figs. 1 e 2 mostram células fixadas em formol e etanol - ácido acético, respectivamente. Observa-se variações na resposta à reação com o aumento do tempo de hidrólise. Espermatozoides morfologicamente anômalos, com cabeça em forma de "pera", aparecem indicados na seta. Aumento: 3.500 X; $\lambda = 546 \text{ nm}$.

Tabela I - Valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias para espermatozoides morfologicamente normais de touro, após diferentes tempos de hidrólise e variando-se o fixador (n = 20)

Fixador	Tempos de Hidrólise	Valores Feulgen - DNA			
		$\bar{X} \pm S$	C.V. (%)	I.C.	
				L.S.	L.I.
Etanol-Ácido Acético	10 min.	21,19 ± 1,85	8,72	22,05	20,32
	20 min.	24,25 ± 1,50	6,21	24,96	23,55
	30 min.	28,04 ± 1,49	5,30	28,74	27,35
	1 h.	30,90 ± 1,76	5,69	31,72	30,07
	2 h.	29,23 ± 1,11	3,81	29,75	28,71
	4 h.	18,52 ± 1,44	7,80	19,50	17,54
	6 h.	10,39 ± 1,37	13,17	11,03	9,75
	10 h.	5,73 ± 1,22	21,35	6,30	5,15
Formol	10 min.	19,37 ± 1,00	5,18	20,32	18,91
	20 min.	22,56 ± 1,29	5,71	23,16	21,95
	30 min.	27,33 ± 2,50	9,15	28,50	26,16
	1 h.	23,32 ± 2,17	9,31	24,34	22,31
	2 h.	24,47 ± 2,62	10,71	25,70	23,24
	4 h.	17,61 ± 1,58	8,99	18,35	16,86
	6 h.	12,17 ± 1,57	12,94	12,91	11,44
	10 h.	5,58 ± 1,33	23,89	6,21	4,96

\bar{X} = média aritmética

S = desvio padrão

C.V. = coeficiente de variação

I.C. = intervalo de confiança

L.S. = limite superior

L.I. = limite inferior

Tabela II - Valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias para espermatozoides morfologicamente anormais ("pera") de touro, após diferentes tempos de hidrólise e variando-se o fixador (n = 5)

Fixador	Tempos de Hidrólise	Valores Feulgen - DNA			
		$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	L.S.	L.I.
Etanol-Ácido Acético	10 min.	19,09 ± 2,35	12,31	21,55	16,62
	20 min.	26,12 ± 1,19	4,55	27,60	24,64
	30 min.	28,47 ± 2,23	7,83	30,79	26,14
	1 h.	28,34 ± 3,89	13,72	33,17	23,50
	2 h.	26,91 ± 6,57	24,41	33,80	20,02
	4 h.	17,30 ± 1,72	9,94	19,44	15,16
	6 h.	8,45 ± 1,28	15,15	10,04	6,86
Formol	10 min.	17,29 ± 2,17	12,55	19,98	14,59
	20 min.	19,75 ± 3,16	16,00	23,68	15,82
	30 min.	27,67 ± 1,72	6,22	29,81	25,53
	1 h.	25,68 ± 4,64	18,07	31,45	19,91
	2 h.	21,84 ± 1,46	6,68	23,65	20,02
	4 h.	17,60 ± 1,65	9,38	19,65	15,55

\bar{X} = média aritmética

S = desvio padrão

C.V. = coeficiente de variação

I.C. = intervalo de confiança

L.S. = limite superior

L.I. = limite inferior

Tabela III - Valores Feulgen - DNA percentuais, relativos ao máximo de depuração, em espermatozoides de touro, após diferente fixação.

Fixador	Tempos de Hidrólise	Valores Feulgen-DNA percentuais (%)	
		espermatozoides normais	espermatozoides anômalos ("pera")
Etanol-Ácido Acético	10 min.	68,58	67,05
	20 min.	78,48	91,74
	30 min.	90,74	100
	1 h.	100	99,54
	2 h.	94,59	94,52
	4 h.	59,93	60,72
	6 h.	33,62	29,68
	10 h.	18,53	—
Formol	10 min.	70,87	62,48
	20 min.	82,51	71,37
	30 min.	100	100
	1 h.	85,33	92,81
	2 h.	89,53	78,93
	4 h.	64,43	63,61
	6 h.	44,53	—
	10 h.	20,43	—

Com esses dados foram construídas curvas de hidrólise (Figs. 3 - 10) de cuja análise depreende-se que:

- A cinética de hidrólise varia de acordo com o fixador empregado, tanto para os espermatozoides normais quanto para os anômalos em forma (Figs. 3, 4, 5 e 6);
- O máximo de depuração é alcançado mais rapidamente (30 min.) para ambos os tipos de espermatozoides, após a fixação do material em formol (Figs 7 e 8); em material fixado em etanol - ácido acético tal máximo é obtido com 1 hora de hidrólise para espermatozoides morfológicamente normais e com 30 minutos para os anômalos, indicando para os últimos uma maior labilidade à hidrólise ácida (Figs. 9 e 10);
- Os valores Feulgen - DNA mais elevados foram obtidos em células fixadas em etanol - ácido acético tanto para forma normal quanto para a anômala, conforme os dados das tabelas I e II (Figs. 3 e 4);
- Espermatozoides normais quando fixados em etanol-ácido acético apresentam valores Feulgen - DNA máximos mais elevados que os anômalos em forma. No entanto, essa diferença não é estatisticamente significativa ($t_{obs} = 2,626 < t_{0,01} = 2,807$; G.L. = 23). Já em material fixado em formol não se nota tal tipo de diferença;
- A existência de um pico ou ombro secundário (fig. 5) para as células fixadas em formol num tempo de hidrólise de 2 horas não é estatisticamente significativa ($t_{obs} = 1,512 < t_{0,01} = 2,704$; G.L. = 38).
- A solubilização do ácido apurínico, representada atra

vês da porção descendente das curvas de hidrólise, é aparentemente mais rápida para os espermatozoides fixados em etanol - ácido acético, principalmente se considerarmos um tempo longo de hidrólise como 6 h. (figs. 5 e 10). Isto pode ser demonstrado estatisticamente através de um teste t ($t_{obs} = 3,820 > t_{0,01} = 2,704$; G.L. = 38).

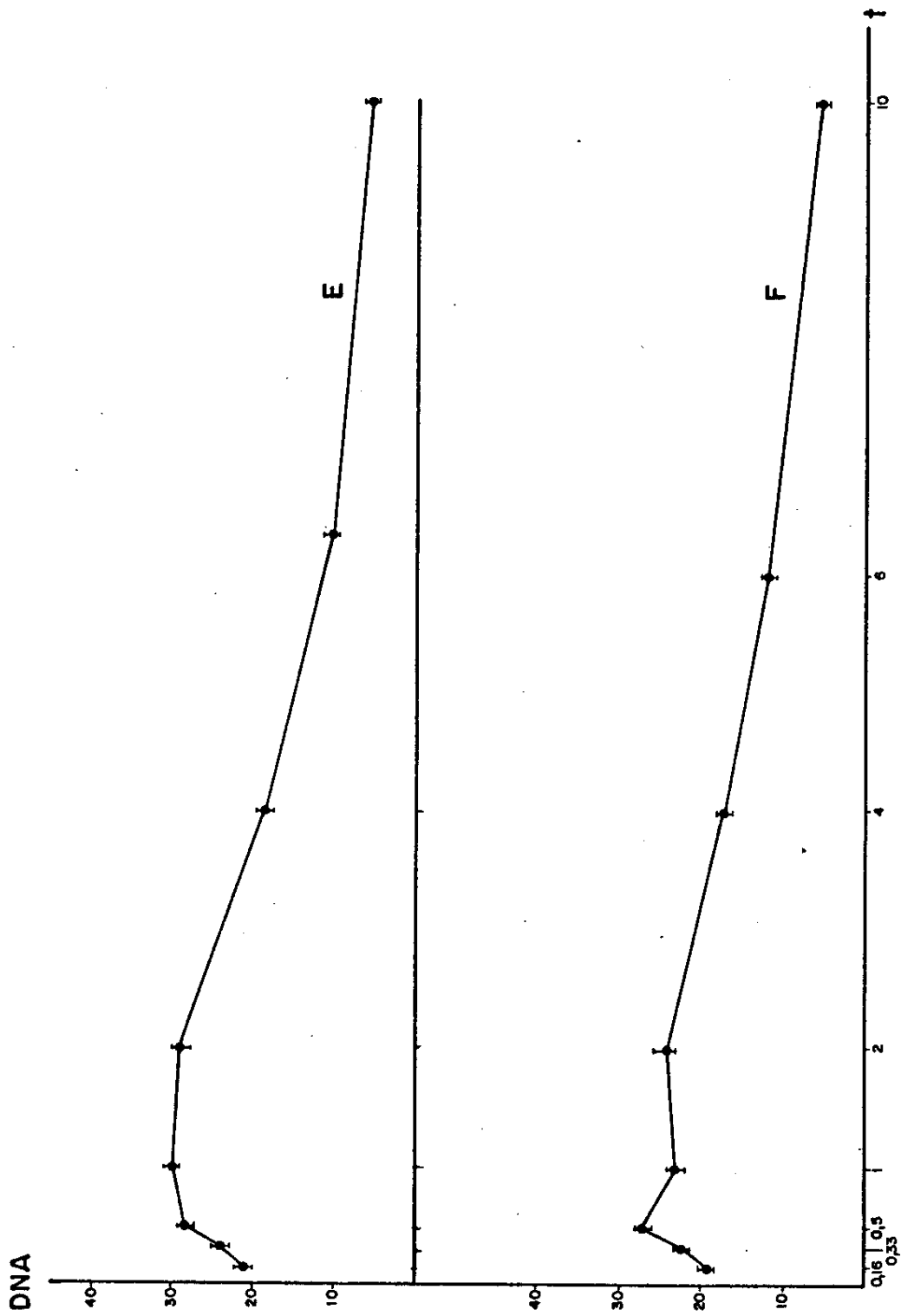


Fig. 3 Curvas de hidrólise para espermatozoides morfológicamente normais de *B. taeniorhynchus* após fixação em etanol - ácido acético (E), formol (F). Cada ponto da curva é uma média aritmética de valores de 20 núcleos. As linhas verticais representam os limites de confiança. Na abcissa estão os tempos de hidrólise em horas e na ordenada os valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias.

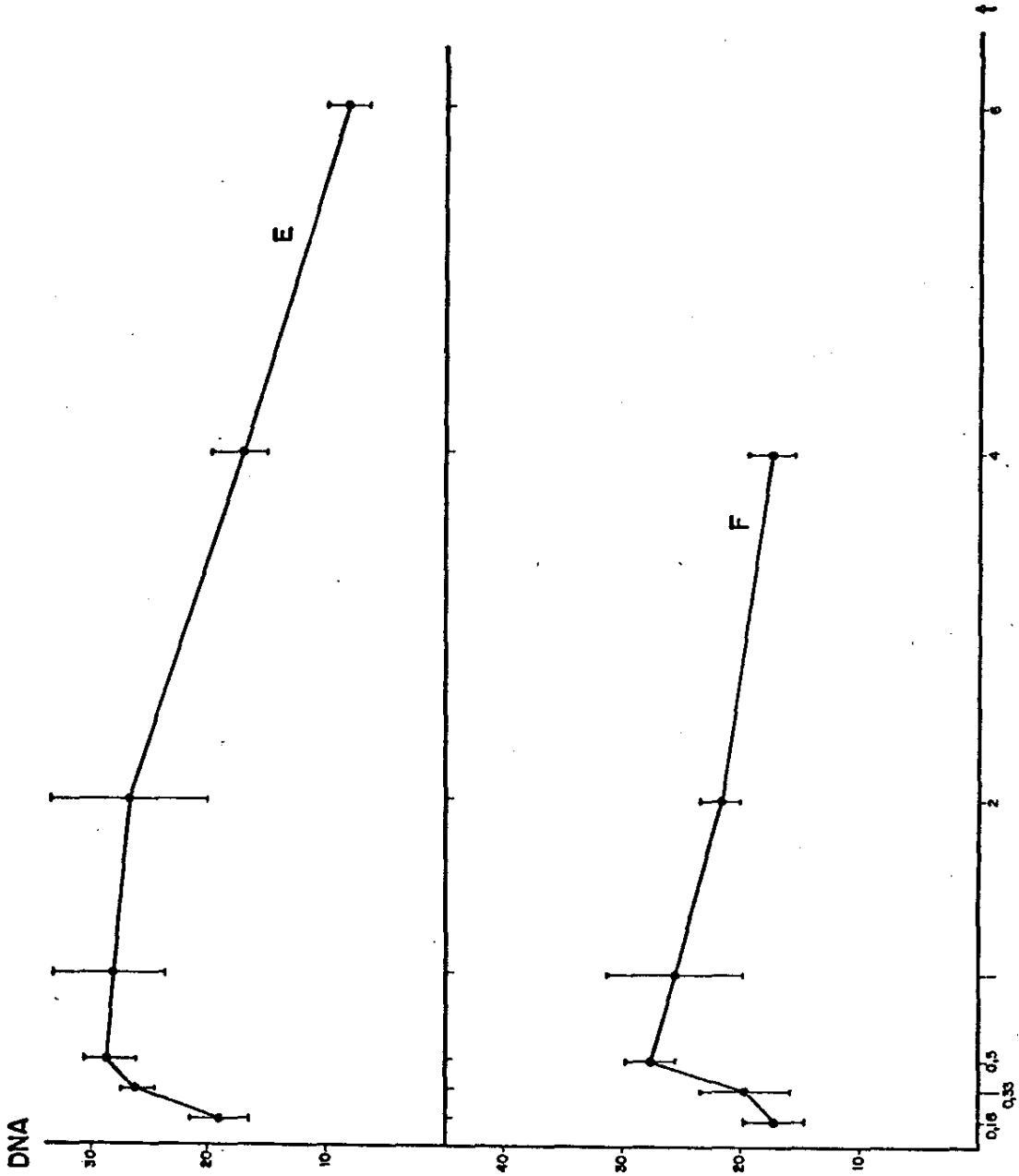


Fig. 4 . Curvas de hidrólise para espermatozoides morfológicamente anômalos ("pera") de *B. taurus*, variando-se a fixação. Cada ponto da curva é uma média aritmética de valores de 5 núcleos. As linhas verticais representam os limites de confiança mostrados na tabela II. Na ordenada estão os valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias e na abcissa estão os tempos de hidrólise em horas.

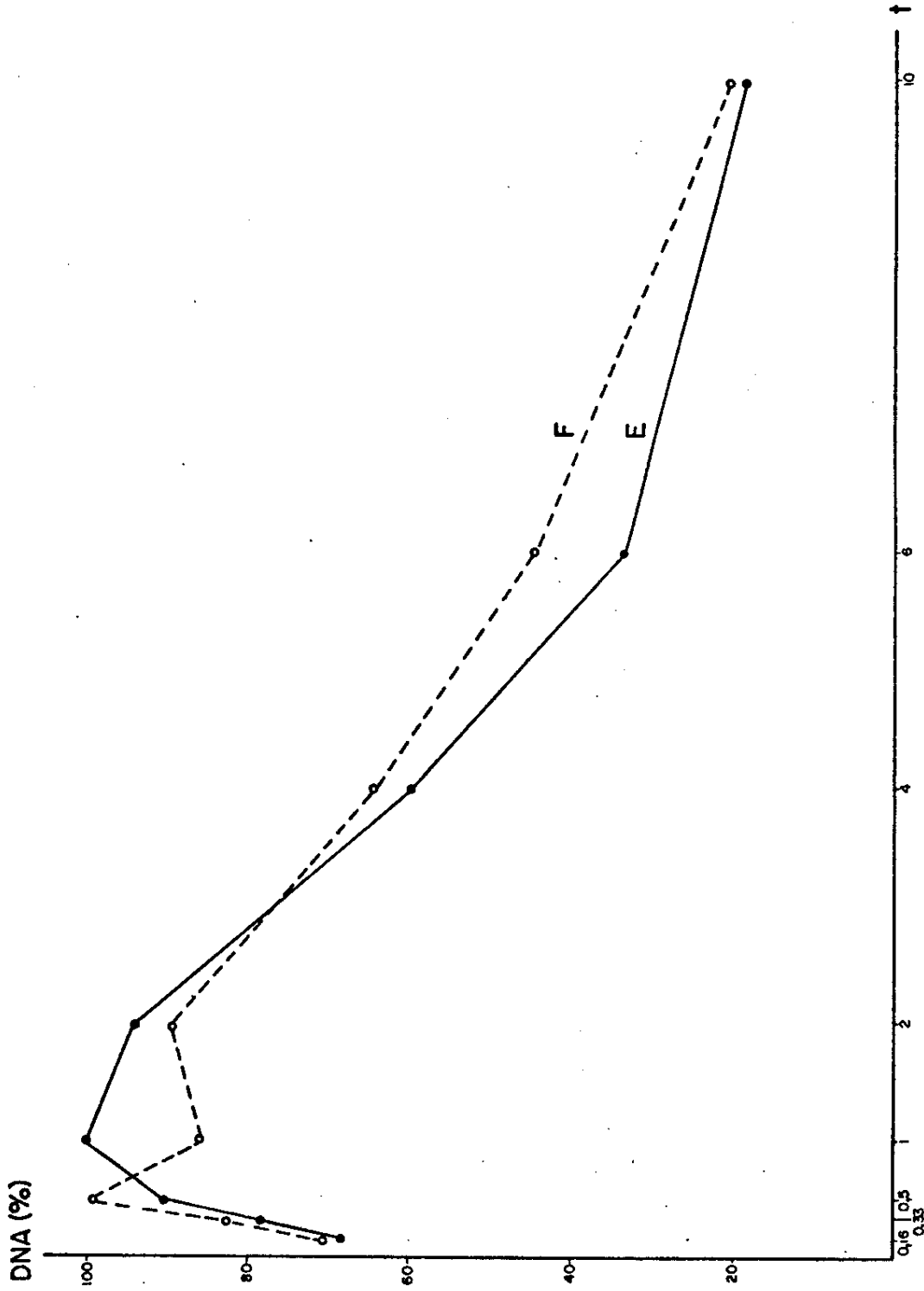


Fig. 5 Curvas de hidrólise para espermatozoides morfológicamente normais de *B. taenius*, construídas com os valores percentuais citados na tabela III. A linha contínua representa resultados para os núcleos fixados em etanol - ácido acético e a pontilhada os resultados para o material fixado em formol. Na abscissa estão os tempos de hidrólise em horas e na ordenada os valores Feulgen - DNA em unidades percentuais.

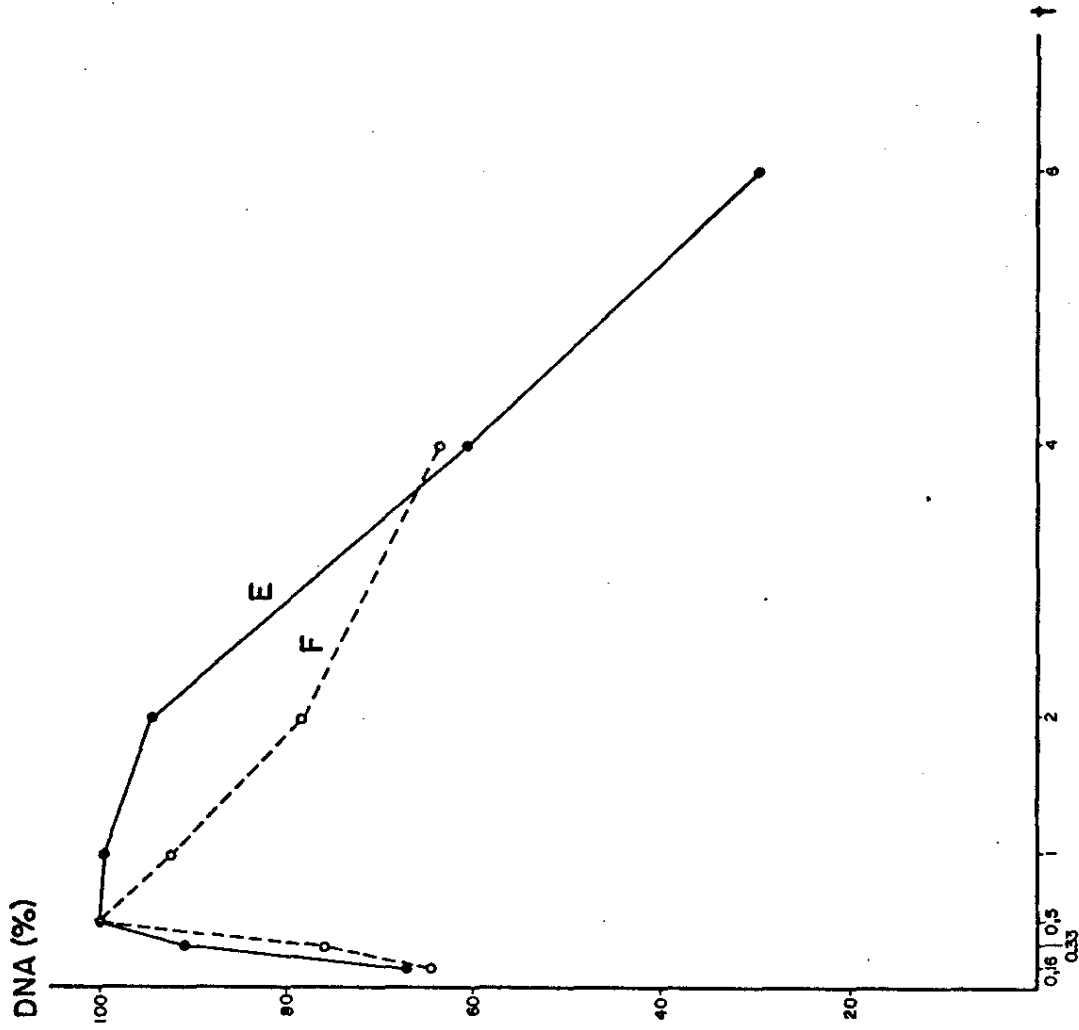


Fig. 6 . Curvas de hidrólise construídas com os valores Feulgen - DNA em unidades percentuais para núcleos morfológicamente anormais de *B. taurus*. Na abscissa estão os tempos de hidrólise em horas e na ordenada os valores Feulgen - DNA em unidades percentuais. E = etanol - ácido acético; F = formol.

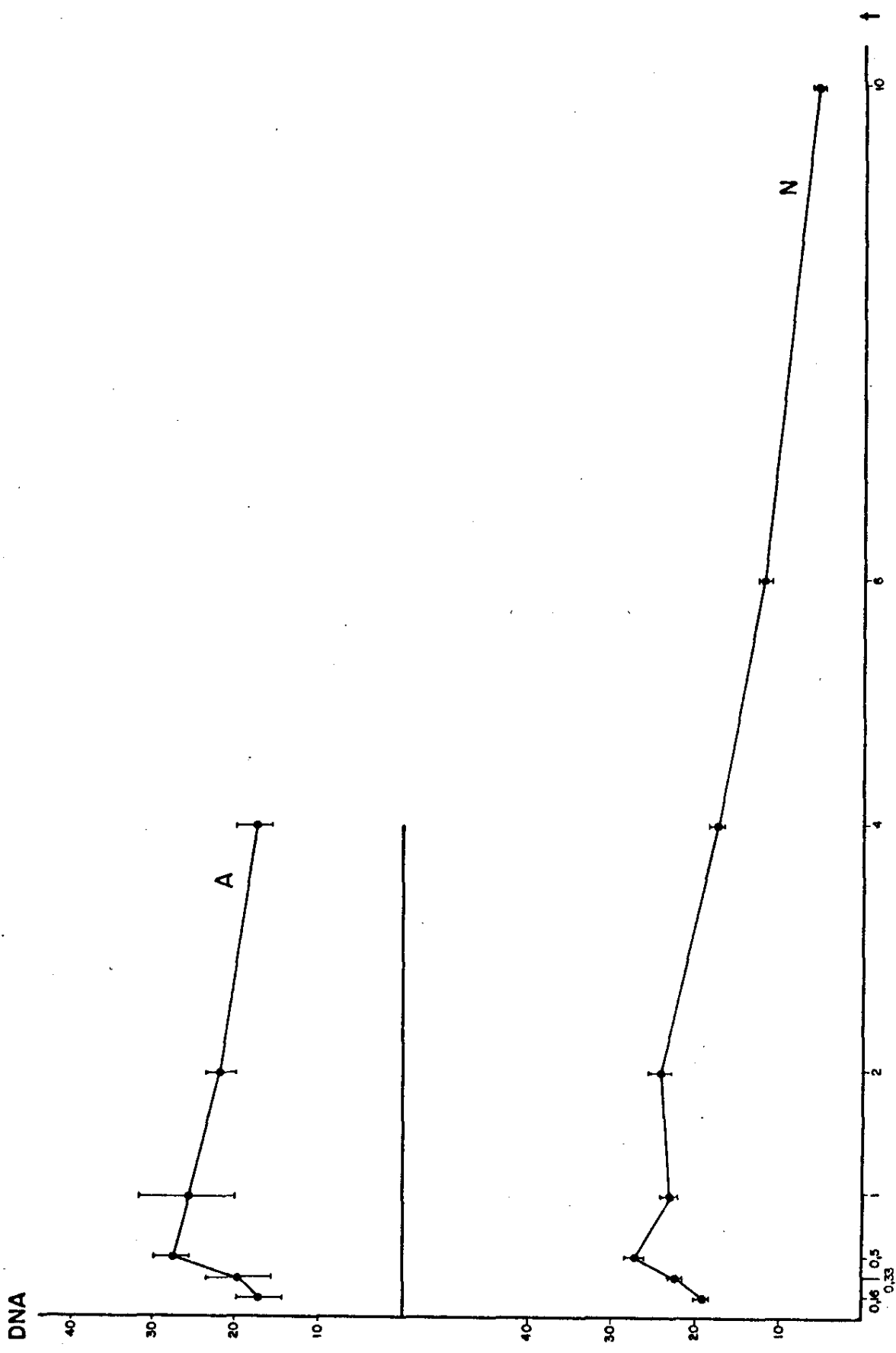


Fig. 7 . Curvas de hidrólise para espermatozoides normais e com forma anômala de *B. taurus*, quando fixados em formol. Ca da ponto das curvas é uma média aritmética de valores de 10 e 5 núcleos, normais e anômalos, respectivamente. As linhas verticais representam o intervalo de confiança. Na abcissa estão representados os tempos de hidrólise em horas e na ordenada os valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias. N = normais; A = anômalos.

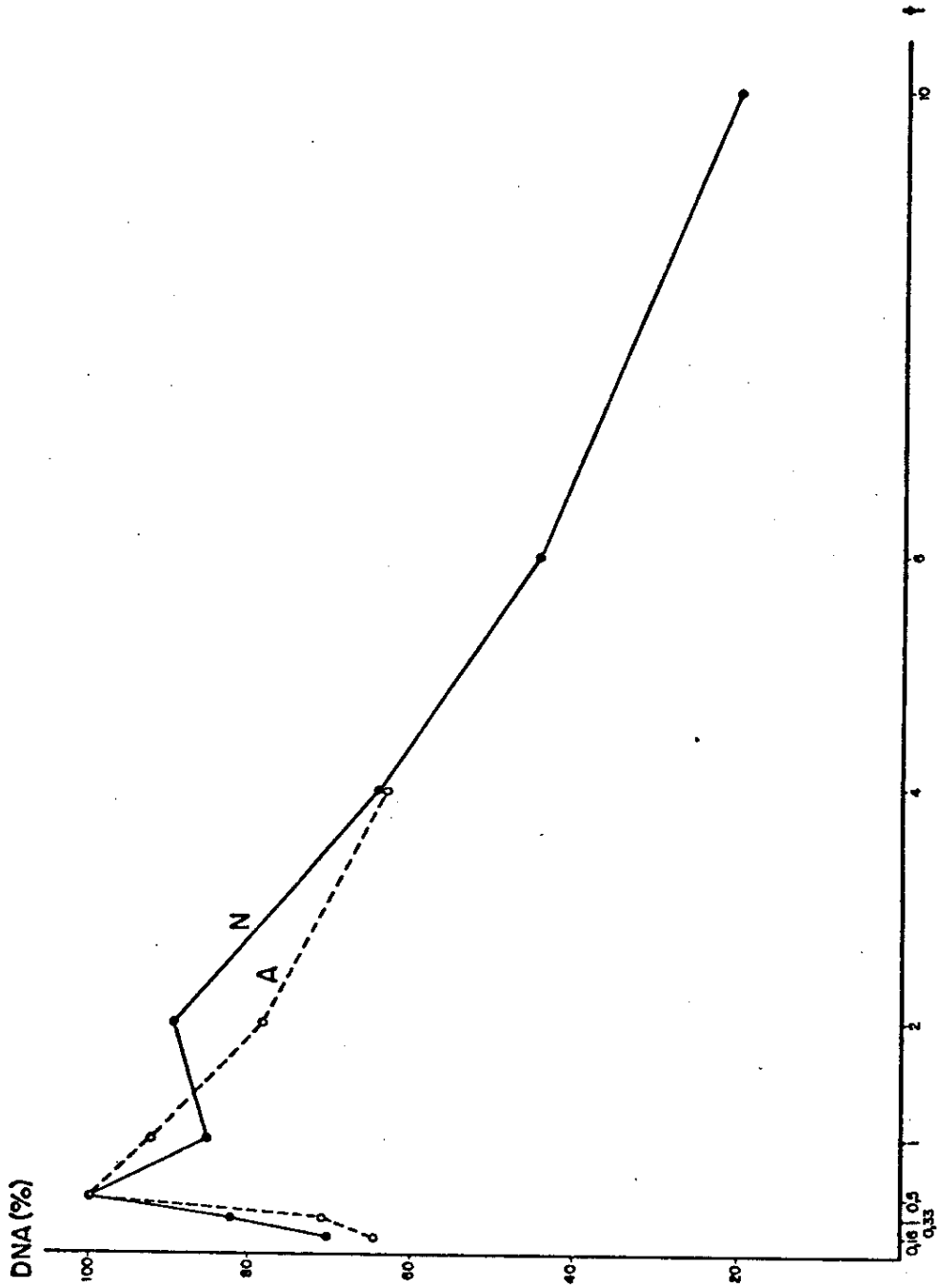


Fig. 8 . Curvas de hidrólise para núcleos morfológicamente normais e anômalos de *B. taurus* fixados em formol. Cada ponto da curva representa os valores percentuais segundo os dados da tabela III. Na abcissa estão representados os tempos de hidrólise em horas e na ordenada os valores Feulgen - DNA em unidades percentuais.

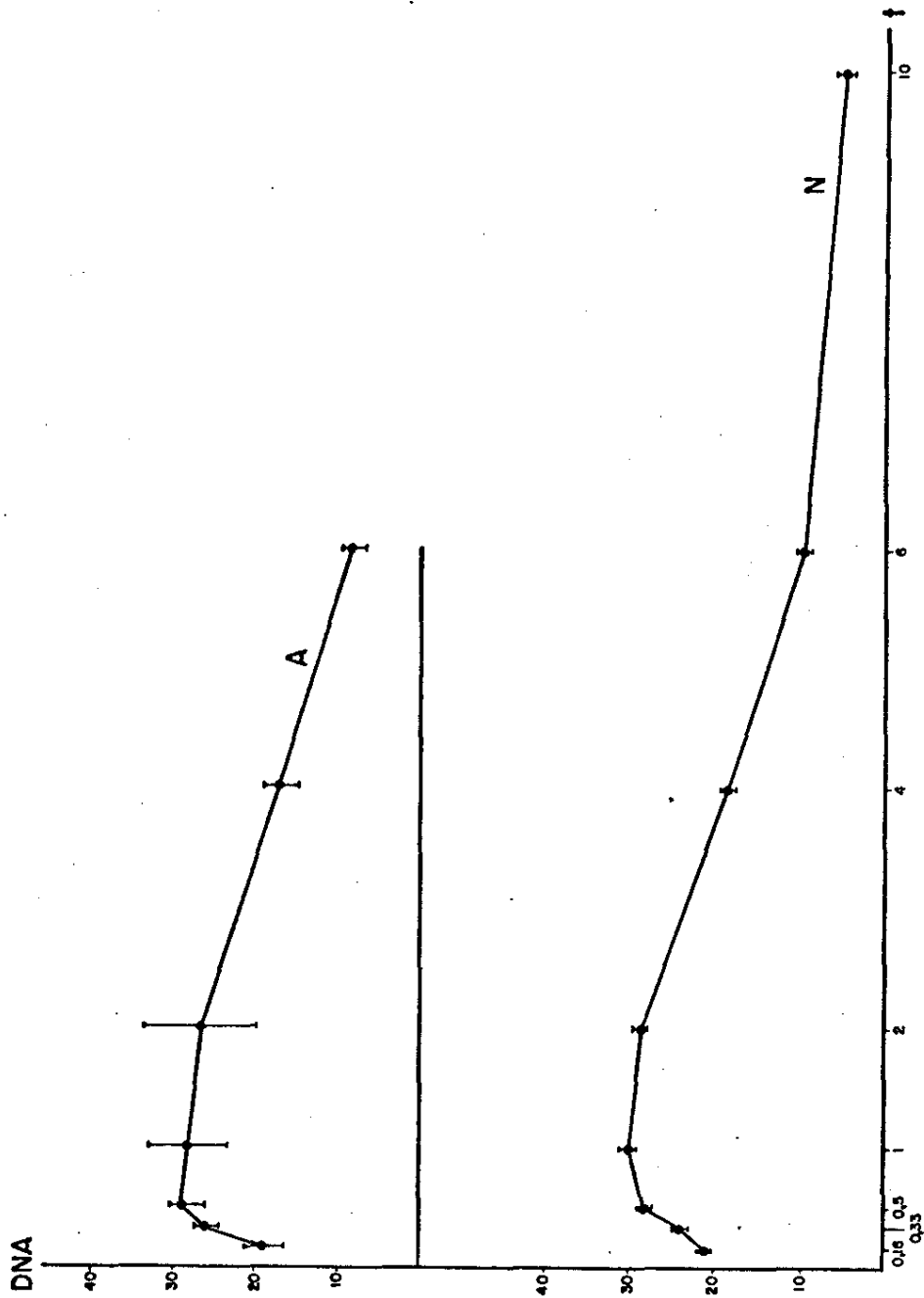


Fig. 9 . Curvas de hidrólise para espermatozoides morfologicamente normais e anômalos ("pera") de *B. taurus* submetidos à fixação em etanol-ácido acético. Cada ponto das curvas equivale a uma média aritmética para 20 e 5 valores de núcleos normais e anômalos, respectivamente. As linhas verticais representam os limites de confiança. Na abcissa estão representados os tempos de hidrólise em horas e na ordenada os valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias.

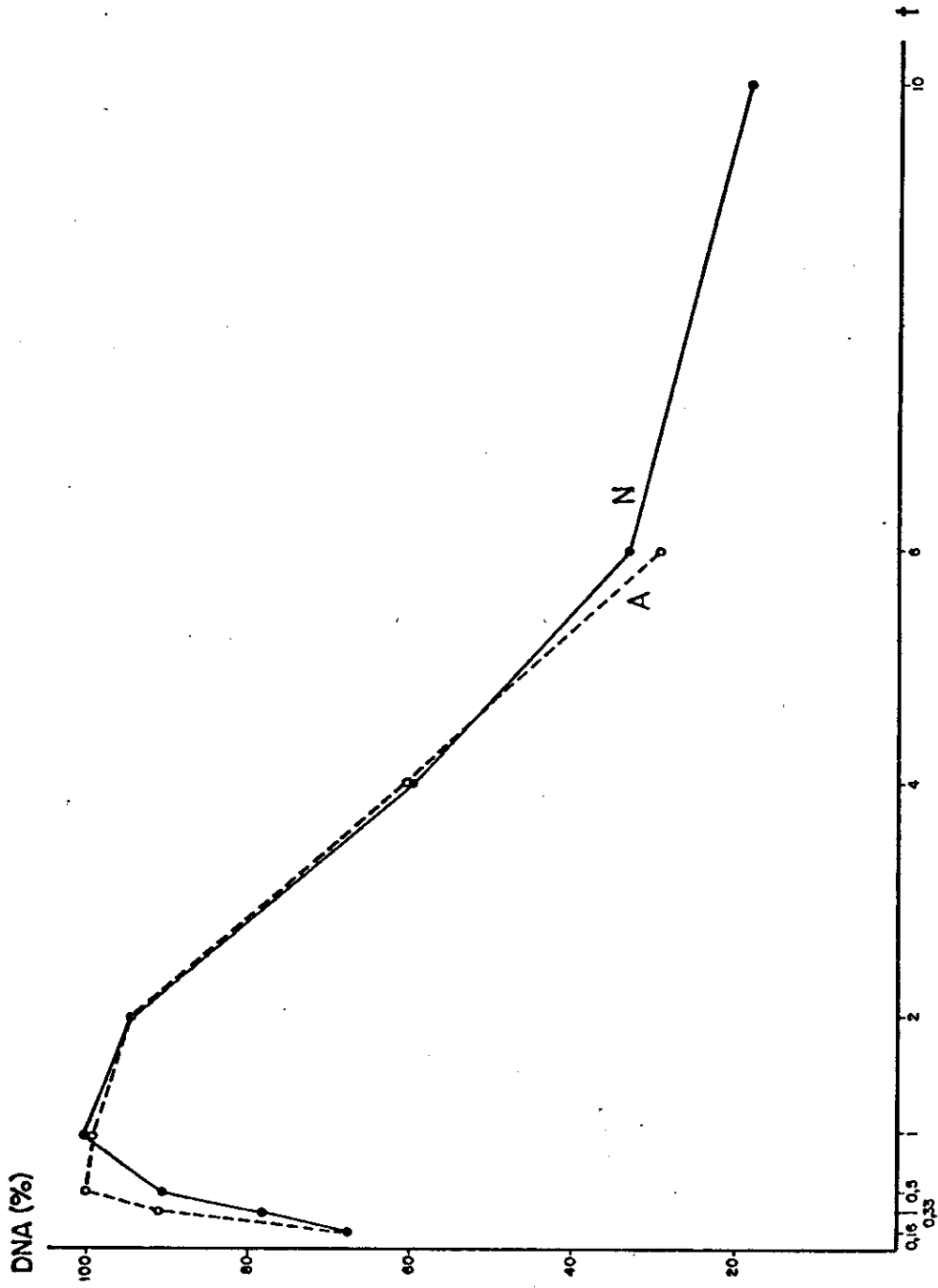


Fig. 10. Curvas de hidrólise para os valores Feulgen - DNA em unidades percentuais para espermatozoides morfológicamente normais (linha contínua) e anómalos (linha pontilhada) de *B. taurus*. A fixação utilizada foi etanol-ácido acético. Na ordenada estão representados os valores Feulgen - DNA em unidades percentuais e na abcissa os tempos de hidrólise em horas.

O padrão de resposta destas células à reação de Feulgen após a fixação em etanol - ácido acético e formol, seguida de diferentes tempos de hidrólise pode ser observado visualmente nas figs. 11 e 12.

Foram obtidas medidas citofotométricas de valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias para 10 espermatozoides em cada tempo de hidrólise e para cada tipo de fixador (tabelas IV e V). De modo geral, mesmo para os tempos de hidrólise correspondentes aos valores Feulgen - DNA máximos, os coeficientes de variação apareceram elevados. Com esses valores em unidades arbitrárias e com os de natureza percentual foram construídas as curvas de hidrólise respectivas (Figs. 13 e 14).

Da análise dessas curvas verificou-se que:

- a cinética de hidrólise varia de acordo com o fixador empregado;
- com a fixação do material em etanol - ácido acético (figs. 13 e 14) a depuração máxima é mais rápida (10 min.) quando comparada à de espermatozoides fixados em formol (1 h.);
- a solubilização do ácido apurínico inicia-se mais rapidamente em espermatozoides fixados em etanol-ácido acético;
- a solubilização do ácido apurínico, por outro lado, uma vez iniciada nos espermatozoides fixados em formol procede sem o aparecimento de ombros ou picos secundários, diferindo do que acontece no material fixado em etanol - ácido acético. Isto pode ser demonstrado estatisticamente através do teste t

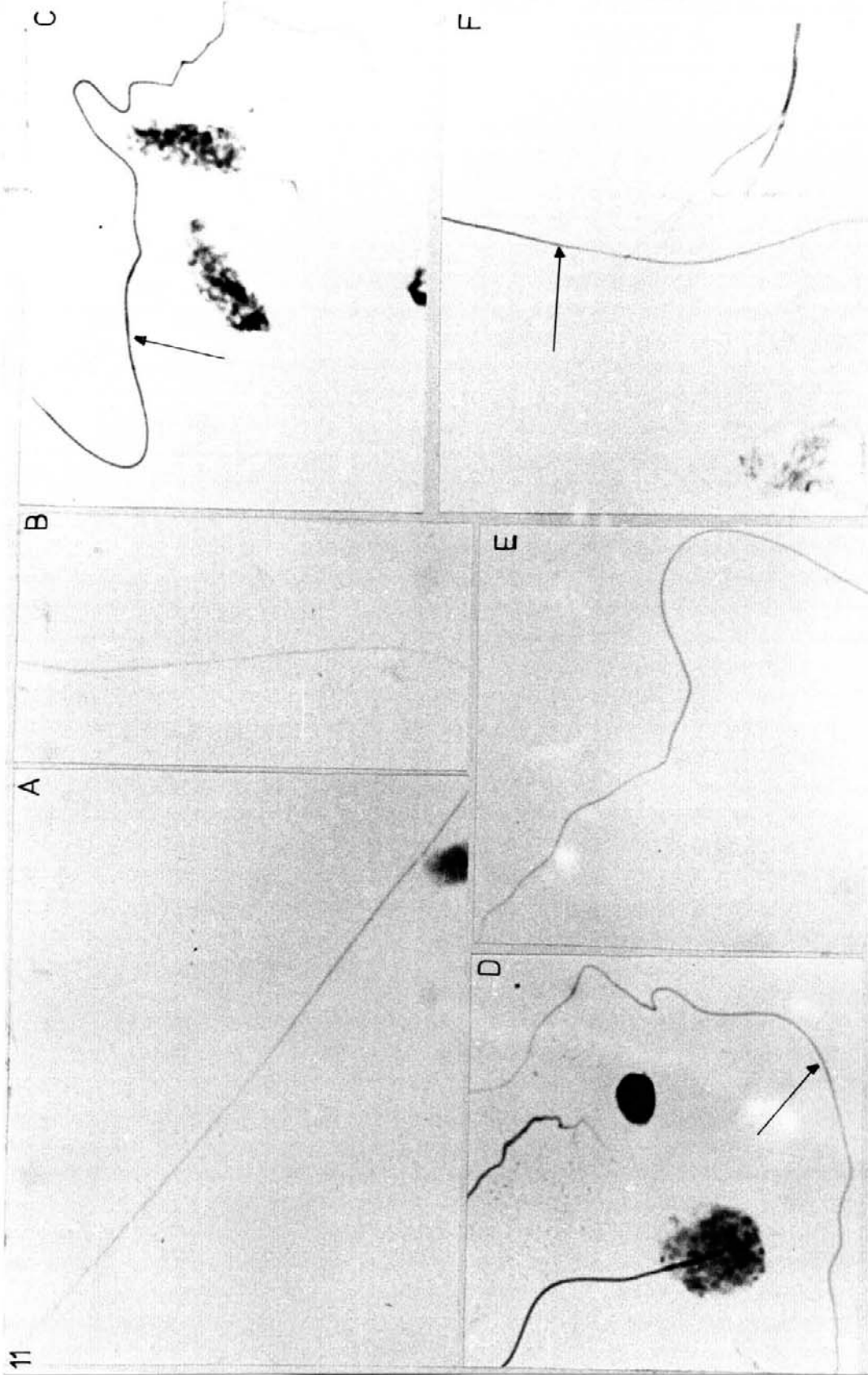


Fig. 11 Morfologia dos espermatozóides de *P. beutgi* fixados em etanol - ácido acético e submetidos à reação de Feulgen durante os seguintes tempos de hidrólise: 2 min. (A), 5 min. (B), 10 min. (C), 30 min. (D), 4 h. (E) e 6 h. (F). Em C, D e F as setas indicam um espermatozóide. Aumento: 2.100 X; $\lambda = 546$ nm.

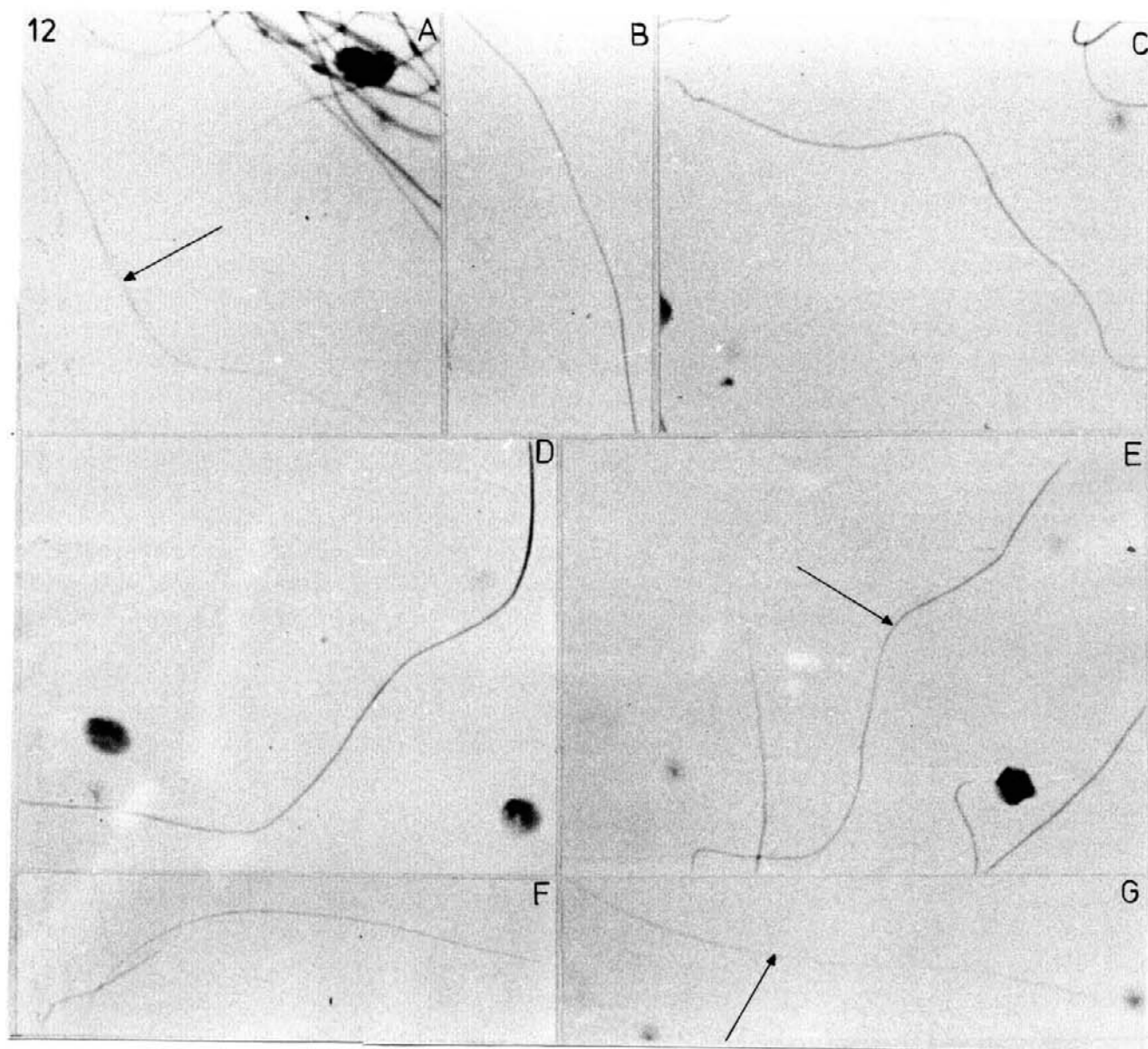


Fig. 12. Morfologia dos espermatozoides de *P. bergi* fixados em formol e submetidos à reação de Feulgen durante os seguintes tempos de hidrólise : 10 min. (A), 20 min. (B), 30 min. (C), 1 h. (D), 4 h. (E), 6 h. (F) e 10 h. (G). Aumento : 2.100 X; $\lambda = 546$ nm.

Tabela IV - Valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias para espermatozoides de gafanhoto, após diferentes tempos de hidrólise, e variando-se a fixação (n = 10)

Fixador	Tempos de Hidrólise	Valores Feulgen - DNA				
		$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	L.S.	I.C.	L.I.
Etanol-Ácido Acético	2 min.	20,76 ± 3,18	15,31	23,03		18,48
	5 min.	25,69 ± 5,38	20,93	29,54		21,84
	10 min.	94,13 ± 32,47	34,49	115,96		72,30
	20 min.	82,49 ± 18,73	22,71	94,39		70,60
	30 min.	69,73 ± 6,69	9,60	74,51		64,94
	1 h.	55,22 ± 7,26	13,15	60,41		50,03
	2 h.	69,39 ± 15,75	22,70	80,65		58,14
	4 h.	52,13 ± 5,46	10,47	56,04		48,23
	6 h.	42,49 ± 5,78	13,68	46,62		38,35
	10 h.	30,85 ± 8,67	28,09	37,05		24,66
Formol	10 min.	60,10 ± 7,32	12,18	65,02		55,17
	20 min.	76,55 ± 24,97	32,47	92,40		60,69
	30 min.	72,91 ± 10,99	15,07	80,76		65,06
	1 h.	94,63 ± 20,43	21,58	109,23		80,03
	2 h.	61,25 ± 15,99	26,12	72,68		49,82
	4 h.	49,15 ± 9,45	19,23	55,90		42,39
	6 h.	42,20 ± 5,95	14,11	46,46		37,95
	10 h.	34,31 ± 9,39	27,38	41,02		27,59

\bar{X} = média aritmética

S = desvio padrão

C.V. = coeficiente de variação

I.C. = intervalo de confiança

L.S. = limite superior

L.I. = limite inferior

Tabela V - Valores Feulgen - DNA percentuais em espermatozoides de gafanhoto com o avanço da hidrólise

Fixador	Tempos de Hidrólise	Valores Feulgen - DNA percentuais (%)
Etanol-Ácido Acético	2 min.	22,04
	5 min.	27,29
	10 min.	100
	20 min.	87,63
	30 min.	74,06
	1 h.	58,66
	2 h.	73,72
	4 h.	55,38
	6 h.	45,13
	10 h.	32,77
Formol	10 min.	63,49
	20 min.	80,89
	30 min.	77,04
	1 h.	100
	2 h.	64,72
	4 h.	51,93
	6 h.	44,59
	10 h.	36,25

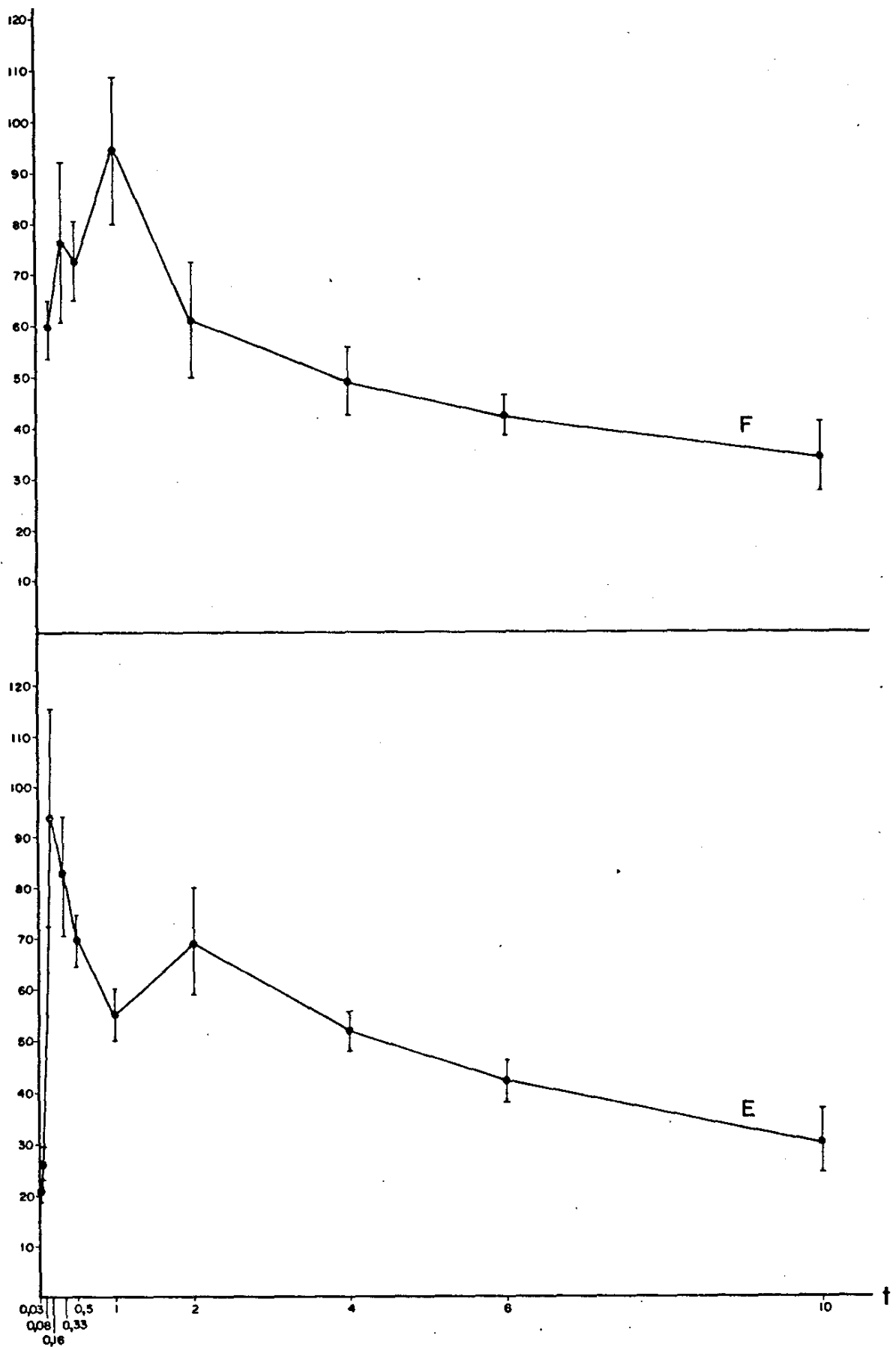


Fig. 13. Curvas de hidrólise para espermatozoides de *P. bergi* fixados em etanol-ácido acético (curva inferior) e formol (curva superior). Cada ponto das curvas representa a média aritmética de valores Feulgen - DNA de 10 núcleos. Os intervalos de confiança são indicados pelas linhas verticais e correspondem aos valores mostrados na tabela IV. Na ordenada estão representados os valores Feulgen - DNA em unidades arbitrarias e na abscissa os tempos de hidrólise em horas.

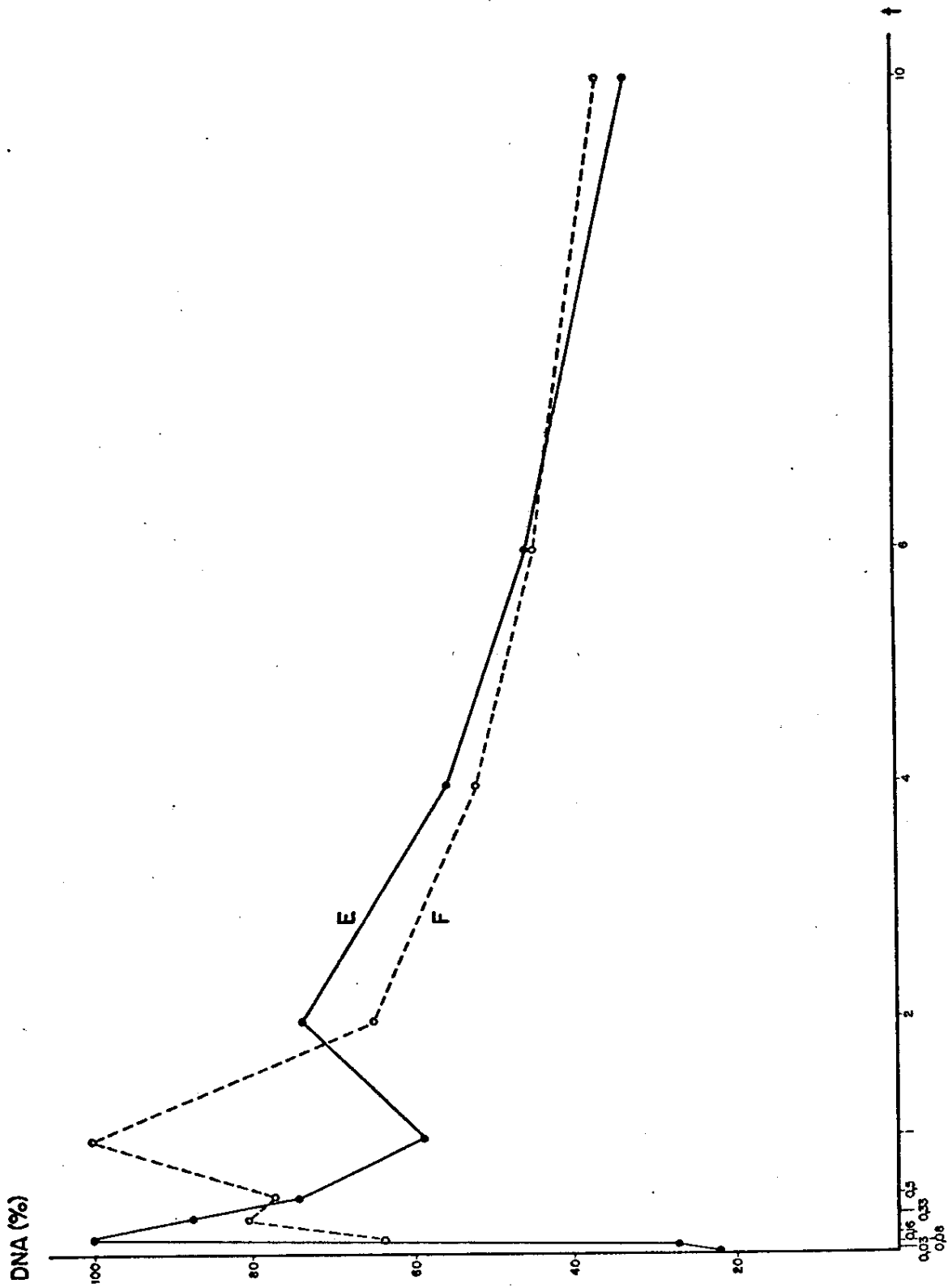


Fig. 14. Curvas de hidrólise com valores Feulgen - DNA percentuais para espermatozoides de *P. bergii* e baseados em dados ilustrados na tabela V. Na abscissa estão representados os tempos de hidrólise em horas e na ordenada os valores Feulgen - DNA em unidades percentuais.

($t_{obs\ 2h} = 3,654 > t_{0,01} = 2,878$; G.L. = 18). Em tempos longos de hidrólise (4, 6 e 10 h) o comportamento do ácido apurínico fixado em etanol - ácido acético e formol não difere entre si.

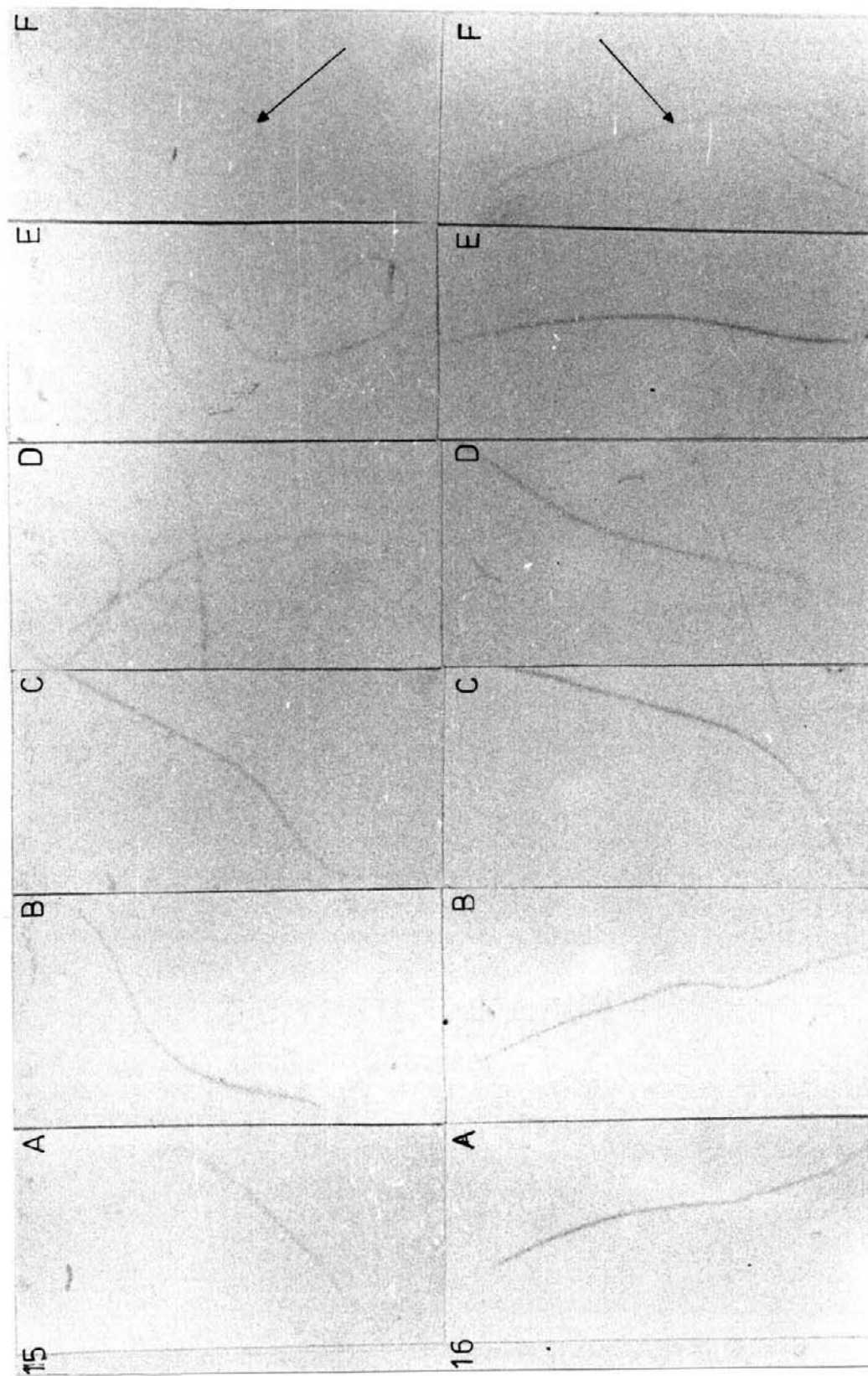
5.3. Espermatozóides de *Triatoma infestans* (barbeiro)

O aspecto morfológico dos espermatozóides de *Triatoma infestans* (barbeiro) quando submetidos à reação de Feulgen após diferente fixação e vários tempos de hidrólise é apresentado nas figuras 15 e 16. As variações de absorbância nesse material com o avanço da hidrólise não são nítidas visualmente.

Para a comparação do perfil das curvas de hidrólise, foram determinados valores Feulgen - DNA obtidos de 10 espermatozóides para cada um dos diferentes tempos de hidrólise e para os 2 tipos de fixadores usados. Os dados referentes a esses valores estão relatados nas tabelas VI e VII e nas figuras 17 e 18.

Também para este material observou-se que a labilidade à hidrólise ácida varia em função do fixador utilizado (figs. 17 e 18).

O máximo de depuração é alcançado mais rapidamente quando o material é fixado em etanol - ácido acético (20 min.). Quando o material é fixado em formol a depuração máxima se verifica após 1 h. de hidrólise. Por outro lado, a solubilização do ácido apurínico é mais lenta nos espermatozóides fixados em formol (ramo descendente da curva de hidrólise menos abrupto).



Figs. 15 e 16 Espermatozoides de *Triatoma infestans* submetidos à reação de Feulgen após fixação em etanol-ácido acético (fig. 15) e formol (fig. 16). Os tempos de hidrólise são os seguintes : 10 min. (A), 20 min. (B), 30 min. (C), 4 h. (D), 6 h. (E) e 6 h. (F) indicado pela seta. Aumento: 3.400 X; $\lambda = 546 \text{ nm}$.

Tabela VI - Valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias para espermatozoides de *Triatoma infestans*, após diferentes tempos de hidrólise e variando-se os fixadores utilizados (n = 10)

Fixador	Tempos de Hidrólise	Valores Feulgen - DNA			
		$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	I.C. L.S. L.I.	
Etanol-Ácido Acético	10 min.	14,72 ± 5,17	35,15	18,43	11,02
	20 min.	19,73 ± 5,52	27,97	23,68	15,78
	30 min.	16,31 ± 1,26	7,72	17,21	15,41
	1 h.	16,83 ± 2,52	15,00	18,63	15,02
	2 h.	16,25 ± 2,93	18,02	18,35	14,16
	4 h.	12,35 ± 2,33	18,85	14,02	10,68
	6 h.	9,61 ± 0,90	9,34	10,25	8,97
	10 h.	9,83 ± 1,18	12,02	10,67	8,98
Formol	10 min.	10,88 ± 1,35	12,37	11,85	9,92
	20 min.	10,58 ± 1,96	18,48	13,38	9,18
	30 min.	14,87 ± 3,26	21,92	17,21	12,65
	1 h.	15,27 ± 2,72	17,80	17,22	13,33
	2 h.	13,82 ± 0,96	6,98	14,51	13,13
	4 h.	12,89 ± 2,04	15,85	14,36	11,52
	6 h.	12,52 ± 1,51	12,03	13,60	11,45
	10 h.	10,50 ± 1,48	14,14	11,57	9,44

\bar{X} = média aritmética

S = desvio padrão

C.V. = coeficiente de variação

I.C. = intervalo de confiança

L.S. = limite superior

L.I. = limite inferior

Tabela VII - Valores Feulgen - DNA percentuais de espermatozoides de *Triatoma infestans* com o avanço da hidrólise

Fixador	Tempos de Hidrólise	Valores Feulgen - DNA percentuais (%)
Etanol-Ácido Acético	10 min.	74,66
	20 min.	100
	30 min.	82,66
	1 h.	85,25
	2 h.	82,36
	4 h.	62,59
	6 h.	48,65
	10 h.	49,82
Formol	10 min.	71,25
	20 min.	69,28
	30 min.	97,38
	1 h.	100
	2 h.	90,44
	4 h.	84,41
	6 h.	81,99
	10 h.	68,76

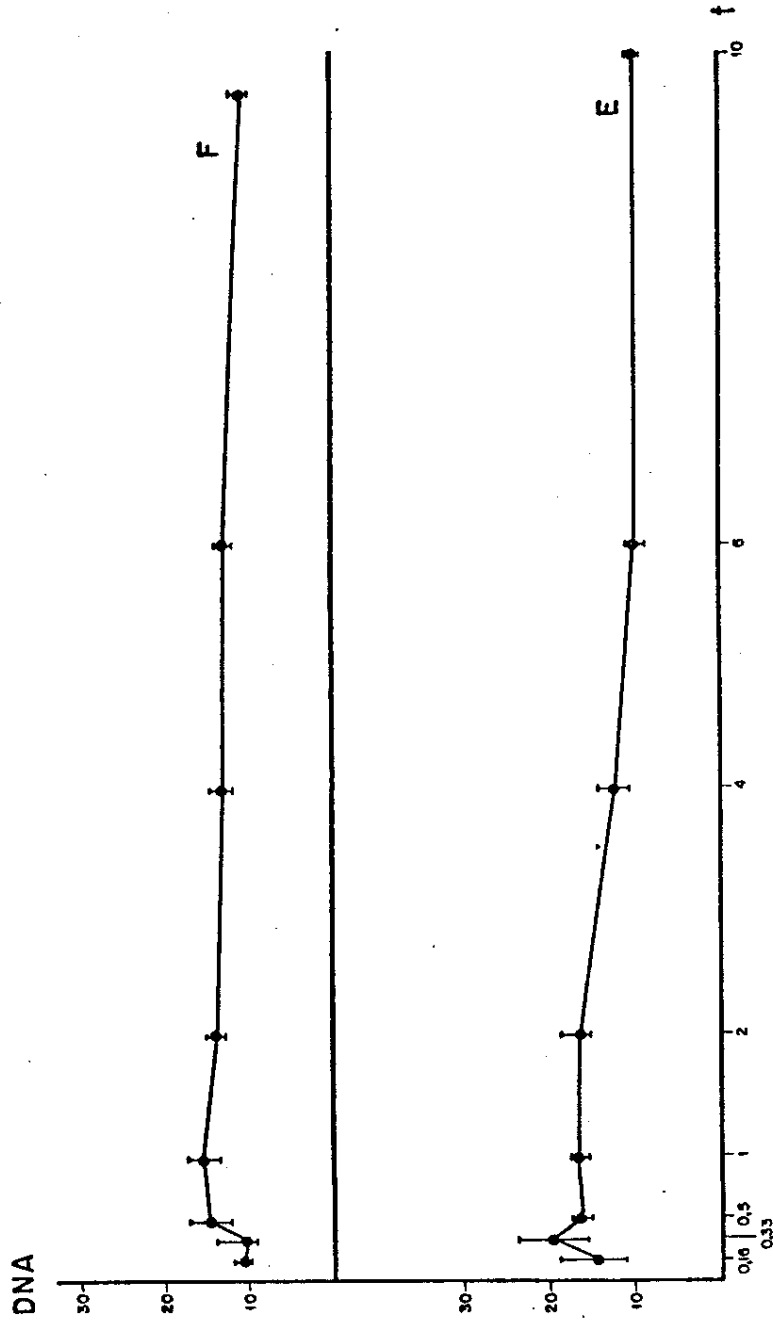


Fig. 17. Curvas de hidrólise para espermatozoides de *T. infestans* após fixação em formol e em etanol-ácido acético. Cada ponto das curvas equivale à média aritmética de 10 valores Feulgen - DNA. As linhas verticais representam os limites de confiança. Na abscissa estão representados os tempos de hidrólise em horas; na ordenada os valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias.

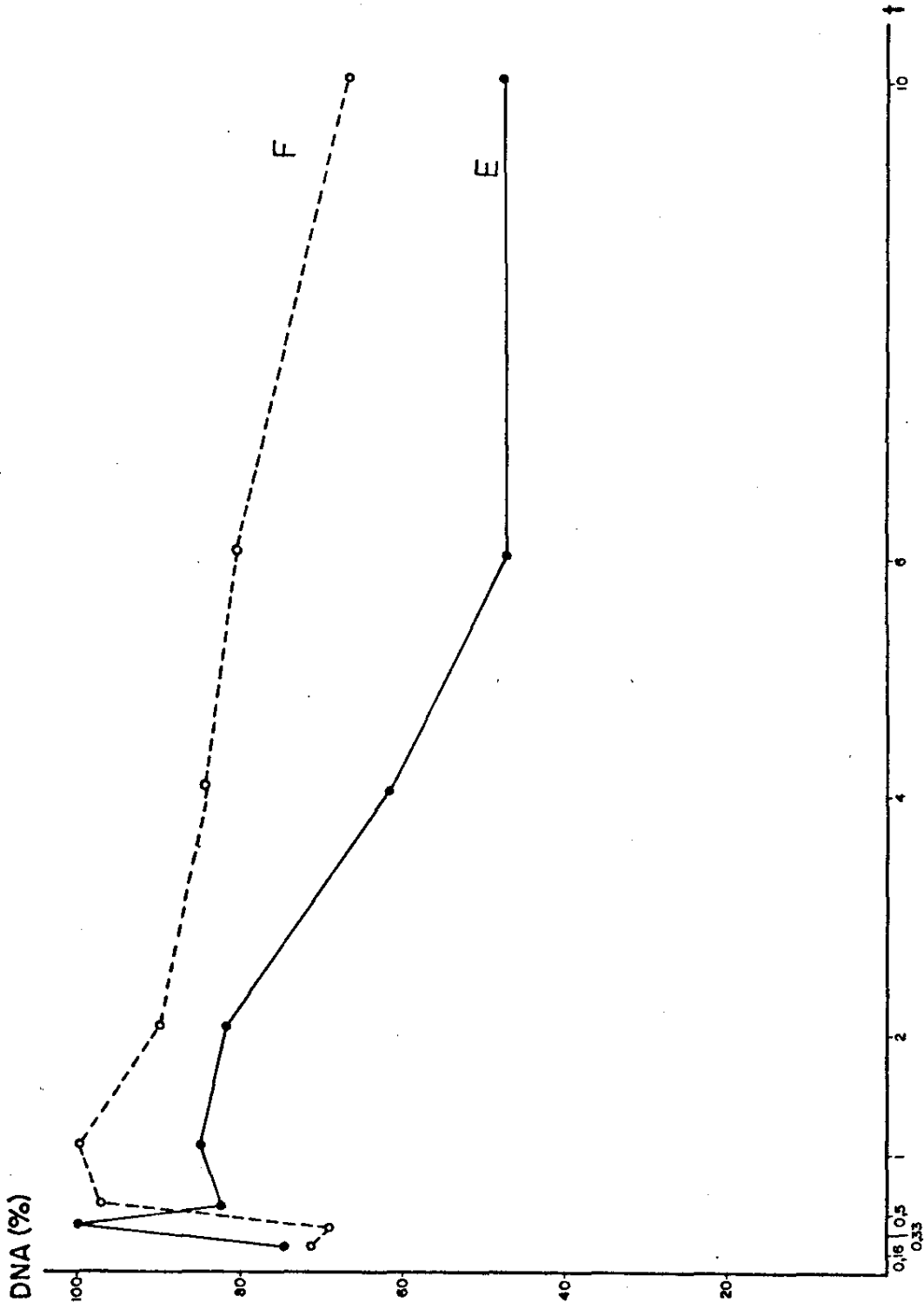


Fig. 18. Curvas de hidrólise construídas com valores Feulgen - DNA em unidades percentuais para núcleos de espermatozoides de *Triatoma infestans*. Esses valores estão listados na tabela VII. Na abcissa os tempos de hidrólise em horas, na ordenada, os valores Feulgen - DNA em unidades percentuais.

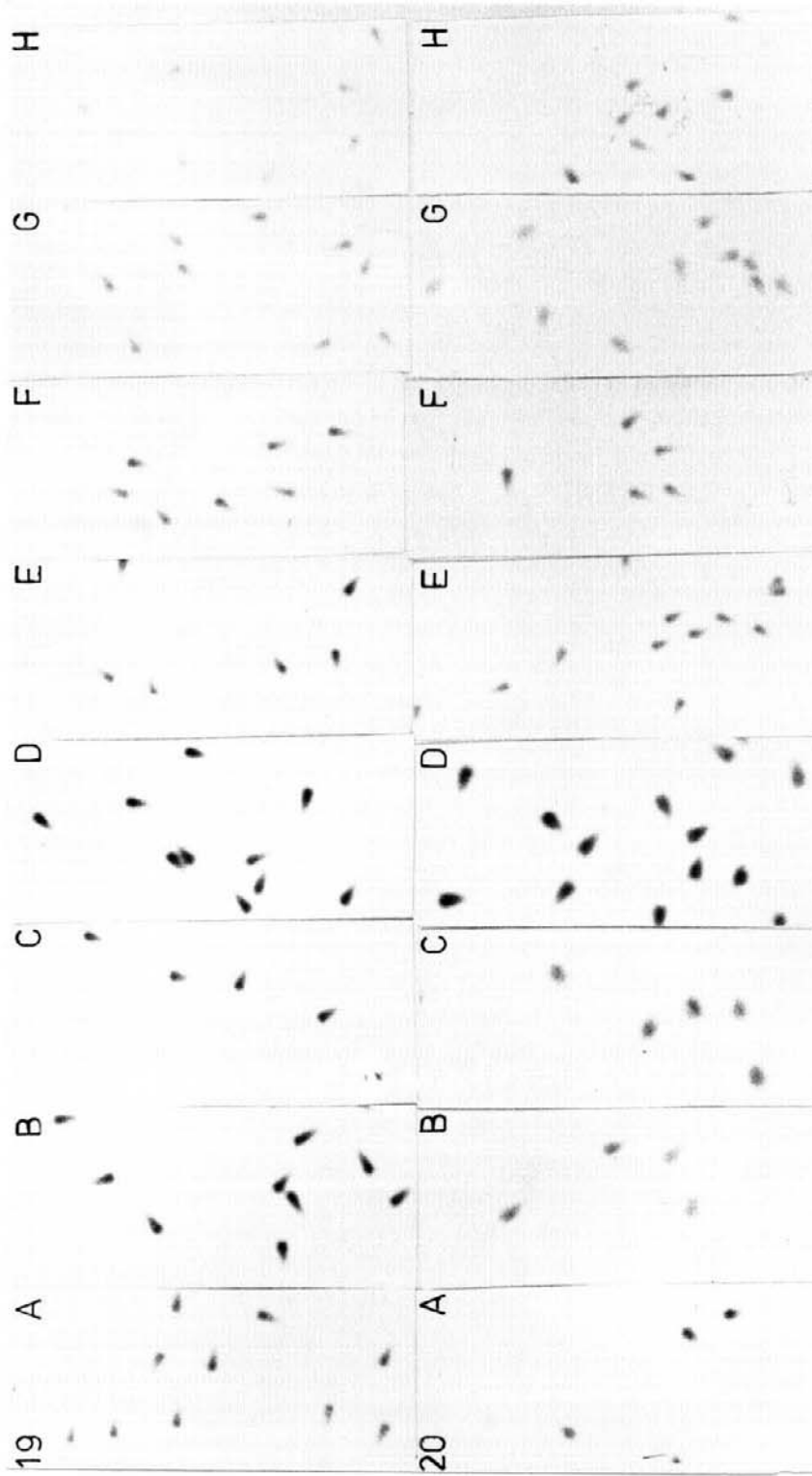
5.4. Espermatozoides de *Lythechinus variegatus* (ouriço -do-mar)

O aspecto morfológico geral dos espermatozoides de *L. variegatus* e a resposta dos mesmos à reação de Feulgen com diferentes tempos de hidrólise, após fixação em formol e etanol - ácido acético são mostrados nas figs. 19 e 20.

Para a estimativa dos valores Feulgen - DNA desse material foram obtidas medidas de 20 núcleos para cada tempo de hidrólise e após os dois tipos de fixação. Esses dados estão sumarizados nas tabelas VIII e IX e permitiram a construção das curvas de hidrólise mostradas nas figs. 21 e 22.

Os valores Feulgen - DNA máximos dos espermatozoides fixados em etanol - ácido acético são sensivelmente maiores do que os das células fixadas em formol (tabela VIII, fig. 21). Para este material o máximo de depuração foi alcançado num tempo de hidrólise (1 h.) que não diferiu quando se considera variação na fixação (fig. 21).

Quanto ao ramo descendente das curvas de hidrólise, nota-se que o mesmo difere em função da fixação: seu início parece menos abrupto em material fixado em etanol - ácido acético (fig. 22). Significa, portanto, que o início do processo de solubilização do ácido apurínico nos espermatozoides fixados em etanol - ácido acético é mais lento do que o verificado nas células fixadas em formol. Em espermatozoides fixados em etanol-ácido acético e formol, há ocorrência no tempo de 4 h. de hidrólise de um ombro ou pico secundário; ($t_{obs} = 3,032 > t_{0,01} = 2,704$, G.L. = 38) ($t_{obs} = 7,125 > t_{0,01} = 2,704$, G.L. = 38) (fig. 22).



Figs. 19 e 20 Aspecto dos espermatozoides de *L. variegatus* submetidos à reação de Feulgen após diferente fixação (formol, fig. 19; etanol-ácido acético, fig. 20) nos seguintes tempos de hidrólise: 10 min. (A), 20 min. (B), 30 min. (C), 1 h. (D), 2 h. (E), 4 h. (F), 6 h. (G) e 10 h. (H). A variação da intensidade de absorção dos núcleos com o avanço da hidrólise é detectável visualmente. Aumentou: 3.500 X; $\lambda = 546 \text{ nm}$.

Tabela VIII - Valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias de espermatozoides de *L. variegatus* (ouriço - do-mar) para diferentes tempos de hidrólise e após tratamento com diferentes fixadores (n = 20)

Fixador	Tempos de Hidrólise	Valores Feulgen - DNA			
		$\bar{X} \pm s$	C.V.(%)	L.S.	L.I.
Etanol-Ácido Acético	10 min.	6,42 ± 0,47	7,32	6,64	6,20
	20 min.	6,36 ± 0,56	8,89	6,63	6,09
	30 min.	7,22 ± 0,27	3,82	7,34	7,08
	1 h.	8,31 ± 0,42	5,04	8,50	8,11
	2 h.	6,91 ± 0,88	12,79	7,32	6,49
	4 h.	6,18 ± 0,62	10,02	6,47	5,89
	6 h.	4,15 ± 0,37	9,02	4,33	3,98
	10 h.	4,81 ± 0,36	7,55	4,98	4,64
Formol	10 min.	3,58 ± 0,28	7,83	3,71	3,45
	20 min.	4,06 ± 0,45	11,04	4,27	3,85
	30 min.	4,90 ± 0,55	11,16	5,16	4,64
	1 h.	5,25 ± 0,52	9,85	5,48	5,00
	2 h.	2,64 ± 0,17	6,49	2,73	2,56
	4 h.	3,21 ± 0,32	10,01	3,36	3,06
	6 h.	2,96 ± 0,68	23,03	3,28	2,64
	10 h.	2,00 ± 0,28	14,24	2,14	1,87

\bar{X} = média aritmética

S = desvio padrão

C.V. = coeficiente de variação

I.C. = intervalo de confiança

L.S. = limite superior

L.I. = limite inferior

Tabela IX - Valores percentuais Feulgen - DNA de espermatozoides de *L. variegatus* (ouriço-do-mar) com o avanço da hidrólise

Fixador	Tempos de Hidrólise	Valores Feulgen - DNA percentuais (%)
Etanol-Ácido Acético	10 min.	77,27
	20 min.	76,56
	30 min.	86,84
	1 h.	100
	2 h.	83,12
	4 h.	74,38
	6 h.	49,96
	10 h.	57,89
Formol	10 min.	68,23
	20 min.	77,39
	30 min.	93,37
	1 h.	100
	2 h.	50,40
	4 h.	61,16
	6 h.	56,44
	10 h.	38,19

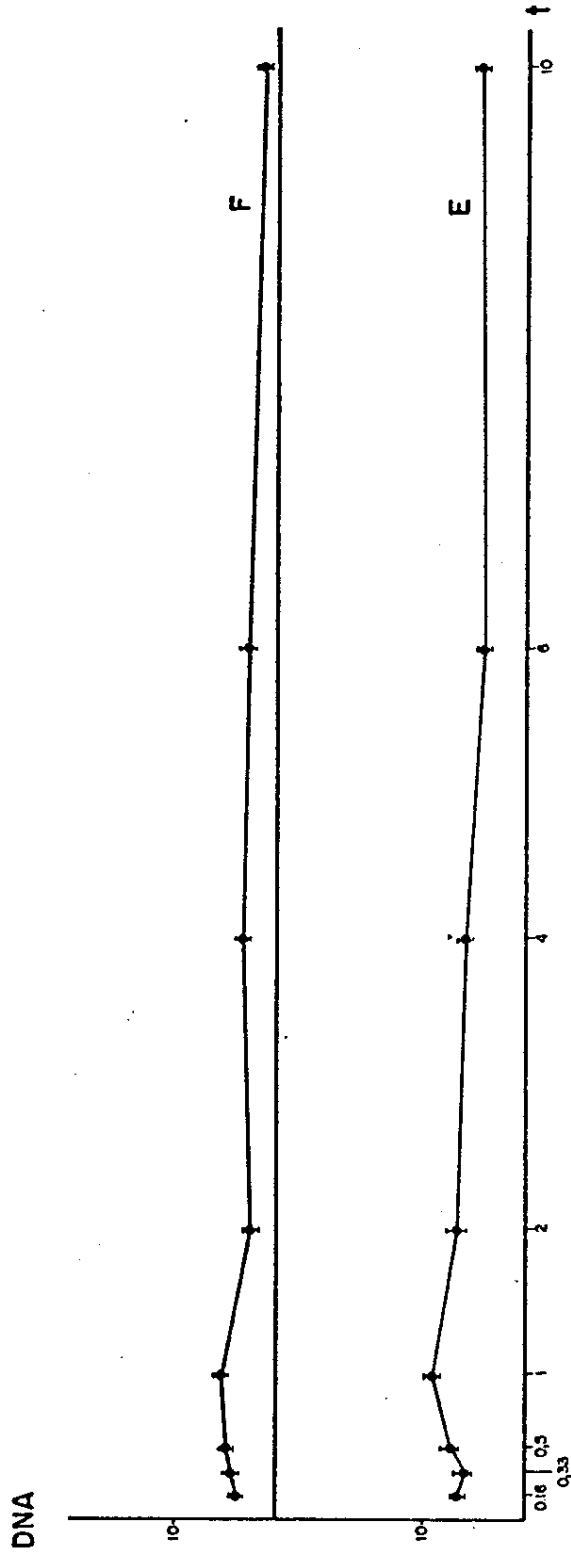


Fig. 21. Curvas de hidrólise para espermatozóides de *L. variegatus*, fixados em etanol-ácido acético (E) e em formol (F). Cada ponto da curva é a média aritmética de 20 valores. Os limites de confiança são representados pelas linhas verticais. Na abcissa os tempos de hidrólise em horas e na ordenada os valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias.

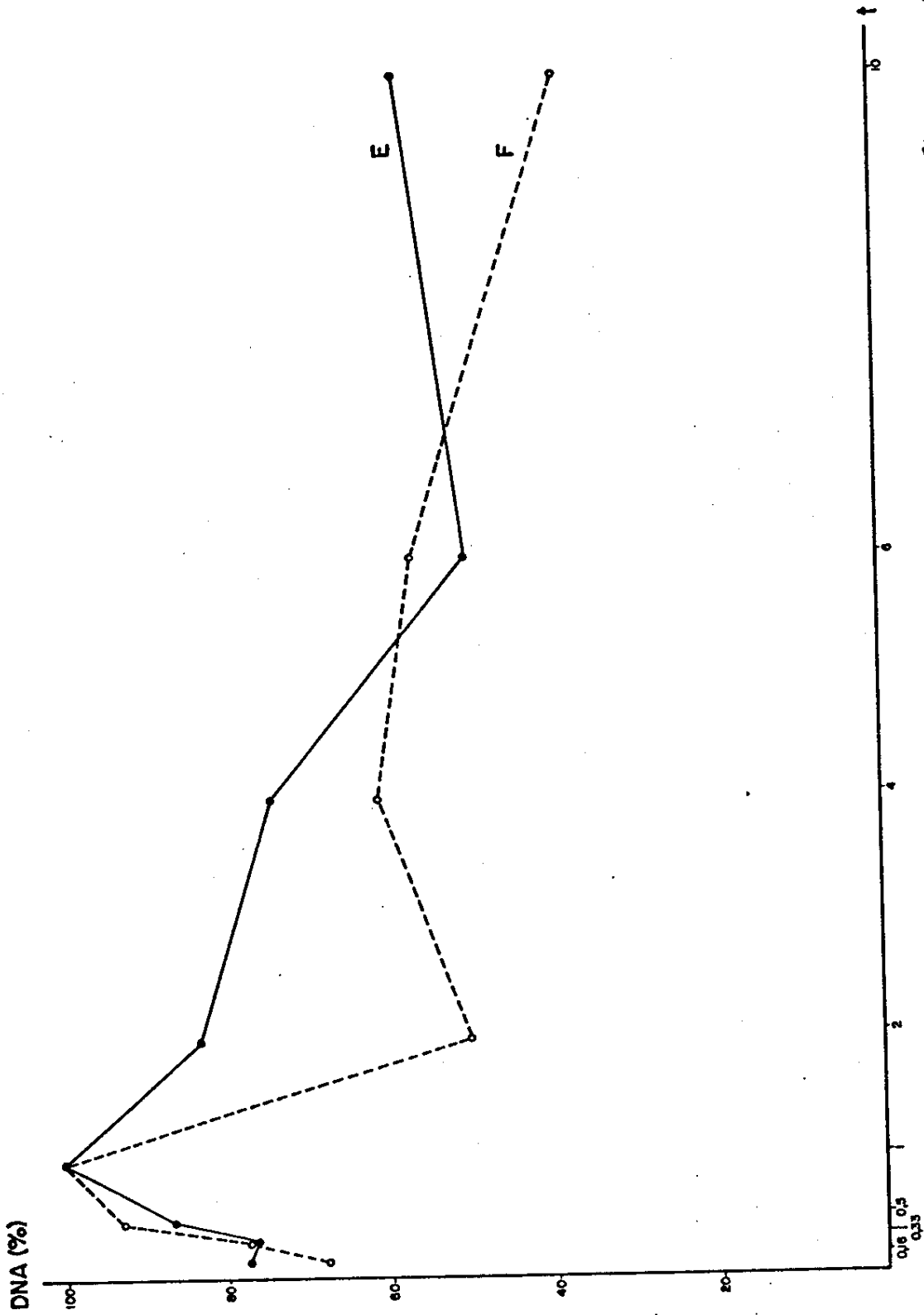


Fig. 22. Curvas de hidrólise construídas com valores Feulgen - DNA em unidades percentuais para espermatozoides de *L. variegatus*. A linha pontilhada representa a fixação em formol e a contínua a fixação em etanol-ácido acético. Na ordenada estão representados os valores Feulgen - DNA em unidades percentuais e na abcissa os tempos de hidrólise em horas.

Em tempos de hidrólise muito longos (10 h.) continua a ser observada solubilização menos intensa de ácido apurínico nos núcleos de espermatozóides fixados em etanol - ácido acético (Figs. 21 e 22).

5.5. Espermatozóides de *Apis mellifera* (abelha)

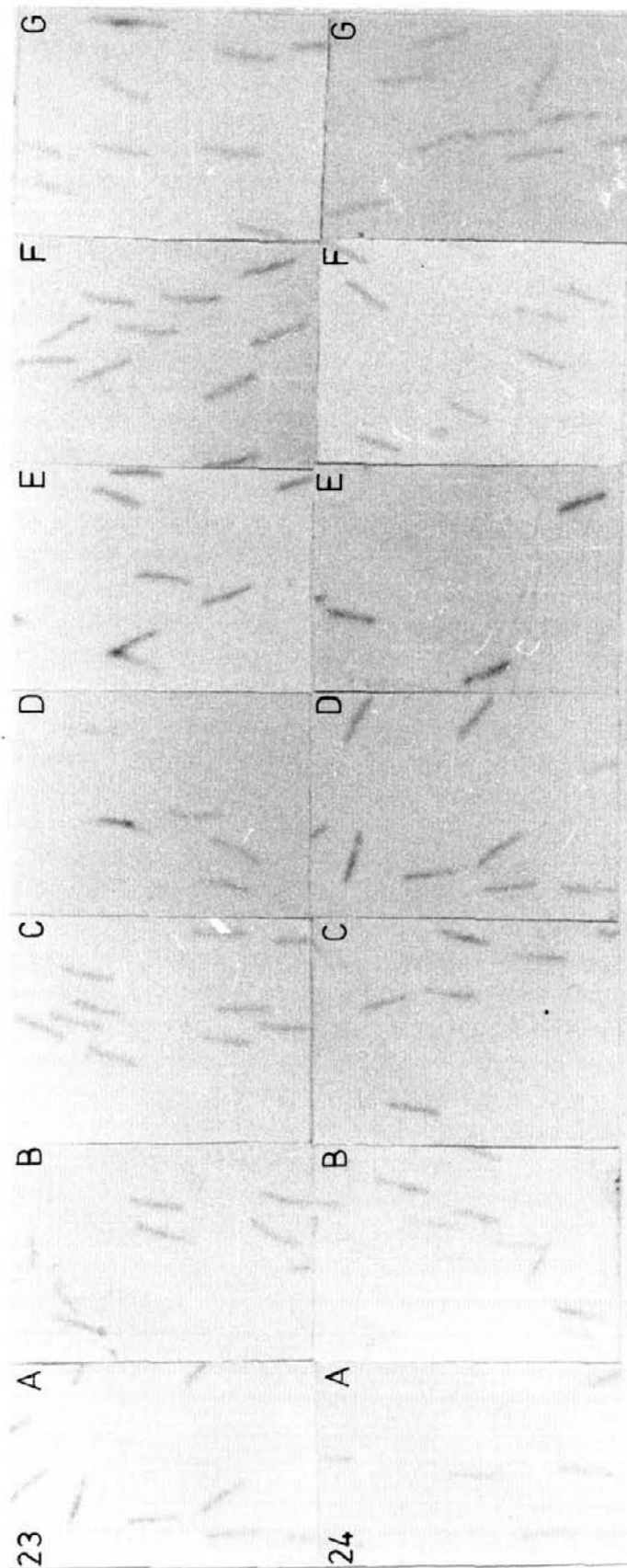
Os espermatozóides de *Apis mellifera* removidos diretamente dos zangões mostraram fraca absorção após a reação de Feulgen nos diferentes tempos de hidrólise e mesmo após se variar a fixação (Figs. 23 e 24).

Os valores Feulgen - DNA obtidos para 15 espermatozóides em cada tempo de hidrólise e para cada tipo de fixador empregado estão ilustrados nas tabelas X e XI. Maiores coeficientes de variação foram obtidos para os valores Feulgen - DNA de espermatozóides fixados em formol.

As curvas de hidrólise para os espermatozóides de *Apis mellifera* são mostrados nas figs. 25 e 26.

Constatou-se que o máximo de depuração é alcançado com 2 horas de hidrólise, tanto para os espermatozóides fixados em formol como para os fixados em etanol - ácido acético (figs. 25 e 26). Uma certa alteração no processo de depuração foi verificada em função da fixação, ou seja a depuração quase se completa já com 1 hora de hidrólise para o material fixado em etanol - ácido acético (Figs. 25 e 26).

O padrão de solubilização do ácido apurínico também é muito semelhante para as duas condições de fixação usadas.



Figs. 23 e 24 Espermatozoides de *Apis mellifera* fixados em etanol-ácido acético (fig. 23) e formol (fig. 24), submetidos à reação de Feulgen com os seguintes tempos de hidrólise : 10 min. (A), 20 min. (B), 30 min. (C), 1 h. (D), 2 h. (E), 4 h. (F) e 6 h (G). As diferenças de absorção com o avanço do tempo de hidrólise não são visualmente nítidas, dados os valores Feulgen - DNA baixos para estas células. Aumento : 3.900 X; $\lambda = 546 \text{ nm}$.

Tabela X - Valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias de espermatozoides de *Apis mellifera* após diferentes tempos de hidrólise e variando-se os tipos de fixador (n = 15)

Fixador	Tempos de Hidrólise	Valores Feulgen - DNA			
		$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	L.S.	L.I.
Etanol-Ácido Acético	10 min.	1,58 ± 0,19	12,02	1,68	1,47
	20 min.	2,38 ± 0,43	18,06	2,62	2,14
	30 min.	2,75 ± 0,29	10,54	2,91	2,59
	1 h.	3,13 ± 0,19	6,07	3,23	3,03
	2 h.	3,27 ± 0,40	12,23	3,49	3,05
	4 h.	1,64 ± 0,34	20,73	1,83	1,45
	6 h.	0,95 ± 0,15	15,79	1,03	0,87
	10 h.	0,41 ± 0,09	21,95	0,46	0,36
Formol	10 min.	2,67 ± 0,40	14,89	2,89	2,45
	20 min.	2,74 ± 0,85	31,02	3,21	2,27
	30 min.	2,59 ± 0,27	10,42	2,74	2,44
	1 h.	2,80 ± 0,45	16,07	3,05	2,55
	2 h.	3,67 ± 1,22	33,24	4,49	2,84
	4 h.	1,65 ± 0,47	28,49	1,91	1,39
	6 h.	1,15 ± 0,19	16,52	1,25	1,04
	10 h.	0,34 ± 0,09	26,47	0,39	0,29

\bar{X} = média aritmética

S = desvio padrão

C.V. = coeficiente de variação

I.C. = intervalo de confiança

L.S. = limite superior

L.I. = limite inferior

Tabela XI - Valores Feulgen - DNA em unidades percentuais de espermatozoides de *Apis mellifera* de acordo com os tempos de hidrólise e os tipos de fixadores utilizados

Fixador	Tempos de Hidrólise	Valores percentuais Feulgen - DNA (%)
Etanol-Ácido Acético	10 min.	48,38
	20 min.	72,78
	30 min.	84,09
	1 h.	95,72
	2 h.	100
	4 h.	50,15
	6 h.	29,05
	10 h.	12,54
Formol	10 min.	72,75
	20 min.	74,66
	30 min.	70,57
	1 h.	76,29
	2 h.	100
	4 h.	44,96
	6 h.	31,34
	10 h.	9,26

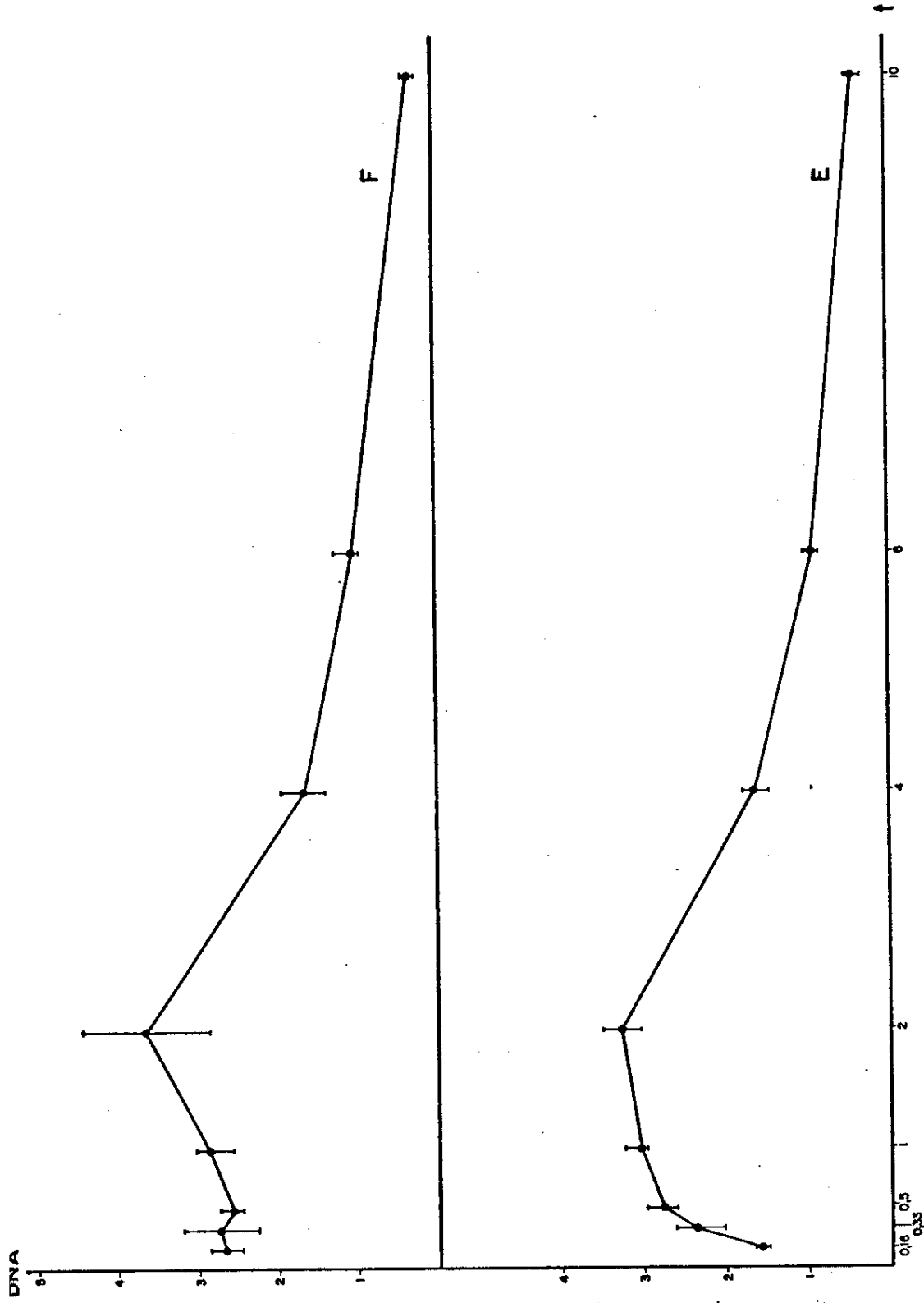


Fig. 25. Curvas de hidrólise construídas com valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias para espermatocitos de *Apis mellifera*. Cada ponto da curva representa a média aritmética de valores para 20 núcleos e as linhas verticais os intervalos de confiança mostrados na tabela VIII. Na abscissa está representado os tempos de hidrólise em horas e a ordenada os valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias.

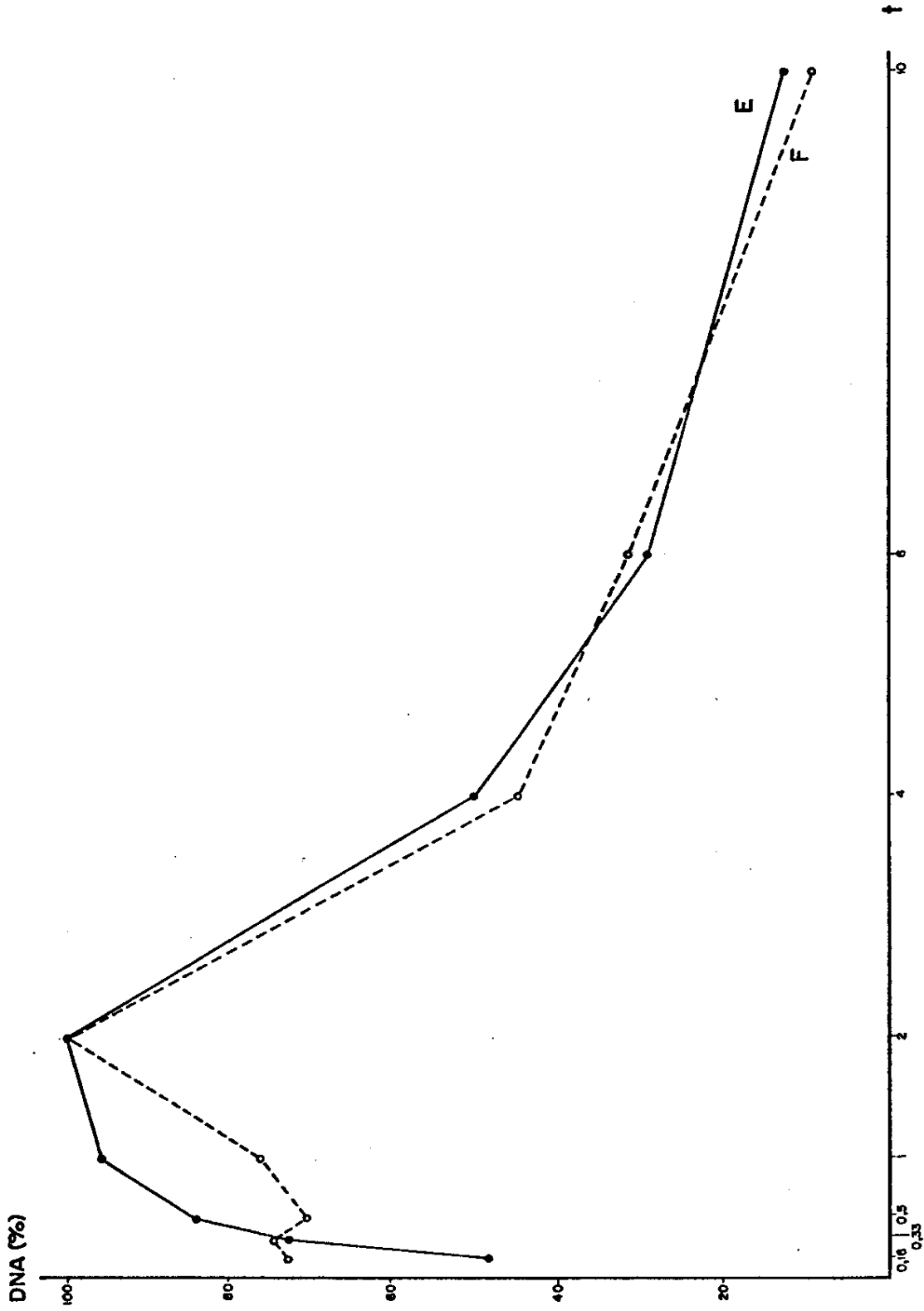


Fig. 26. Curvas de hidrólise construídas com valores Feulgen - DNA em unidades percentuais para espermatozoides de *Apis mellifera*. As linhas contínua e pontilhada representam, respectivamente, a fixação em etanol-ácido acético e for mol. Na abcissa os tempos de hidrólise em horas e na ordenada os valores Feulgen - DNA em unidades percentuais.

Quando se compara a cinética de hidrólise dos diferentes tipos de espermatozoides analisados no presente trabalho verifica-se que esta difere conforme a espécie considerada e o fixador utilizado.

Os valores Feulgen - DNA mais elevados foram encontrados nos espermatozoides de *Pichroplus bergi*, enquanto os mais baixos nos espermatozoides de *Apis mellifera* (Figs. 27 e 28). Dos diferentes materiais fixados em formol o máximo de depuração alcançado mais cedo o foi em células de *Bos taurus* e o alcançado mais tardiamente o foi em espermatozoides de *Apis mellifera*. Já nos materiais fixados em etanol-ácido acético a depuração máxima alcançada primeiramente foi a de *Pichroplus bergi* e a alcançada por último foi também a de *Apis mellifera* (Tabela XII).

Os espermatozoides de *Lytechinus variegatus*, de *Apis mellifera* e os anômalos de *Bos taurus* não exibem diferenças em função da fixação com relação ao tempo em que o máximo de depuração é alcançado.

Tabela XII - Tempos de hidrólise correspondentes aos máximos de depuração obtidos dos espermatozoides das diferentes espécies estudadas

Espermatozoides		Fixação	
		Formol	Etanol-Ácido Acético
<i>B. taurus</i>	normais	30 min.	1 h.
	anômalos	30 min.	30 min.
<i>P. bergi</i>		1 h.	10 min.
<i>T. infestans</i>		1 h.	20 min.
<i>L. variegatus</i>		1 h.	1 h.
<i>A. mellifera</i>		2 h.	2 h.

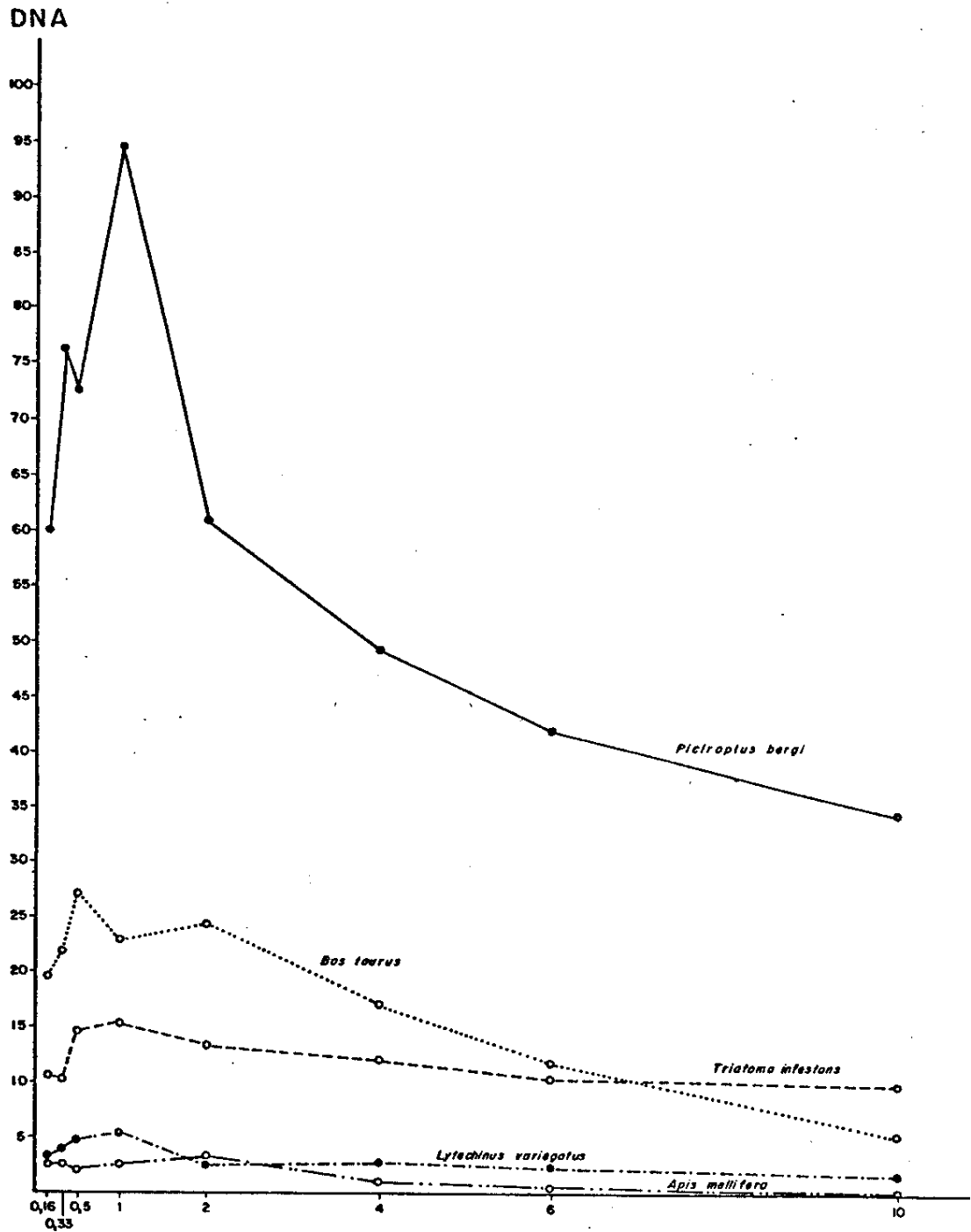


Fig. 27. Curvas de hidrólise para espermatozoides das 5 espécies estudadas quando submetidas à fixação em formol. Na ordenada estão representados os valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias e na abcissa os tempos de hidrólise em horas.

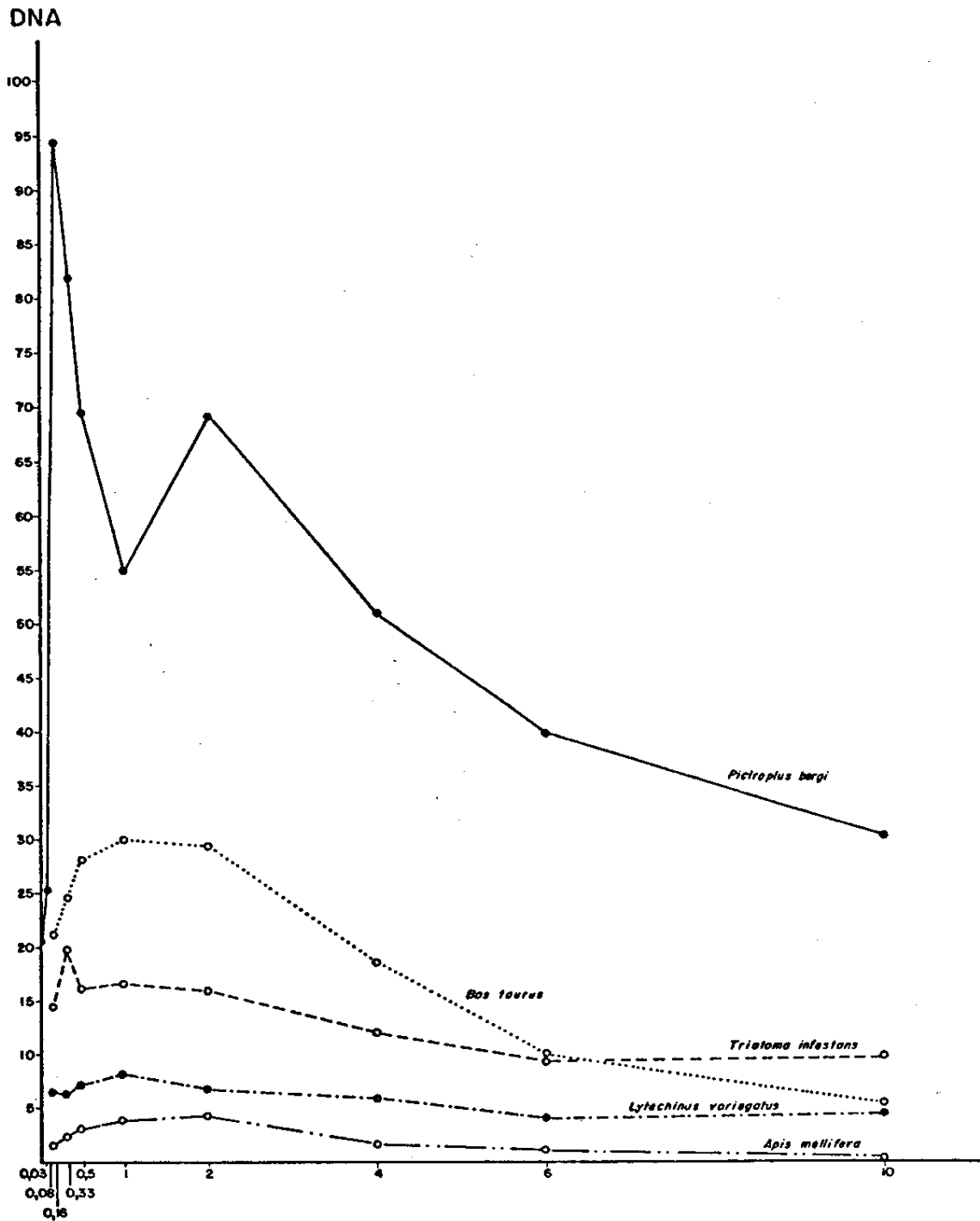


Fig. 28. Curvas de hidrólise para espermatozóides das 5 espécies estudadas quando a fixação foi feita em etanol-ácido acético. Na ordenada estão representados os valores Feulgen - DNA em unidades arbitrárias e na abcissa os tempos de hidrólise em horas.

6 - DISCUSSÃO

Com base nos dados do presente trabalho verifica-se que a cinética de hidrólise ácida varia em espermatozoides com diferentes complexos DNA - proteína. Além disso, em função da fixação a que as células são submetidas, há diferenças na cinética para espermatozoides da mesma espécie.

6.1. Cinética de hidrólise de Feulgen, proteínas nucleares e efeito da fixação

As diferenças na cinética hidrolítica para o DNA, em função da fixação, são bem marcantes em espermatozoides de touro, de gafanhoto e de barbeiro. Em espermatozoides de touro, a proteína nuclear básica, tipo protamina, além de relativa riqueza em arginina, (24 resíduos), contém também seis resíduos de cistina, como acontece também em alguns outros mamíferos (HENRICKS & MAYER, 1965a, b; VENDRELY & VENDRELY, 1966; COELINGH et alii, 1969, 1972 e CALVIN & BEDFORD, 1971). Não se detectou, porém, a ocorrência de cistina em proteínas de espermatozoides de outros grupos. A presença desses resíduos poderia conferir maior estabilidade à estrutura cromatínica conforme proposição de BALHORN (1982). Suspeita-se que a proteína nuclear básica mais representativa em espermatozoides de *Pichroplus bergi* seja também rica em arginina, com base bioquímica para outras espécies de ortópteros, (BLOCH & BRACK, 1964; CLAYPOOL & BLOCH, 1967; BLOCH 1969; TESSIER & PALLOTA, 1973; McMASTER - KAYE & KAYE, 1973, 1976; KAYE & McMASTER - KAYE, 1974; KAYE & MOSS, 1978). Também os espermatozoides de *Triatoma infestans* são suspeitos

de conterem uma proteína nuclear básica rica em arginina (MELLO, 1982b). De outro lado, as diferenças de cinética dependendo da fixação são bem menos intensas em espermatozóides contendo proteína(s) básica(s), "germinativa"(s), associada(s) ao DNA, considerada(s) rica(s) em lisina, ou "tipo H1", como é o caso de ouriço-do-mar (SUBIRANA & PALAU, 1968; PALAU et alii, 1969; OZAKI, 1971; SAVIC et alii, 1981; GIANCOTTI et alii, 1981a, b) e abelha (BLOCH, 1971).

Variações na cinética de hidrólise ácida em função da fixação já foram constatadas em cromatina de células somáticas (BAUER, 1932; HILLARY, 1939; DI STEPHANO, 1948; SWIFT, 1955; KASTEN, 1956; DEITCH et alii, 1967, 1968; BÖHM, 1968; BÖHM & SPRENGER, 1968; BACHMANN, 1968; GREENWOOD & BERLYN, 1968; MITTERMAYER et alii, 1971, MELLO, 1976, 1979) e mesmo em espermatozóides de touro e salmão (KJELLSTRAND & ANDERSSON, 1975a, b; ANDERSSON & KJELLSTRAND, 1975; KJELLSTRAND & LAMN, 1976), sob condições de processo hidrolítico outras que as usadas no presente trabalho.

É de modo geral aceito que a fixação em formol retarda tanto a depuração do DNA quanto a solubilização do ácido apurínico, quando comparada à fixação em etanol - ácido acético (BACHMANN, 1968; GREENWOOD & BERLYN, 1968; FRASCHINI et alii, 1981). Há indicações de que o etanol - ácido acético remove da cromatina alguns tipos de histonas (especialmente H1 e H4) e proteínas nucleares não-histônicas em células somáticas (DICK & JOHNS, 1967; SUMMER et alii, 1973; BRODY, 1974; RETIEF & RÜCHEL, 1977; FRASCHINI et alii, 1981). Por outro lado, o formol é o melhor fixador para proteínas ,

MELLO, MARIA LUÍZA S. Informação pessoal, 1982b.

BLOCH, D.P. Comunicação pessoal, 1971.

promovendo ligações covalentes, através de pontes metila, entre grupos amino, guanino, indol, fenil e sulfidril dos aminoácidos, na estrutura secundária das proteínas (MELLON, 1958; BÖHM, 1968). Com o seu uso há, por conseguinte, estabilização das estruturas protéicas, tornando-se difícil dissociá-las do DNA (SWIFT, 1955, 1966). Isto levaria a se esperar uma labilidade à hidrólise ácida mais rápida na cromatina fixada em etanol - ácido acético. Porém, esta não foi a regra observada nas células estudadas no presente trabalho, conforme será discutido posteriormente.

6.1.1. Fatores determinantes de depuração diferencial do DNA em espermatozoides

Em termos de fase de depuração, esta foi atingida mais rapidamente em espermatozoides fixados em etanol - ácido acético para gafanhoto e barbeiro, porém, não para touro. Em touro, mesmo em espermatozoides com anomalia de cabeça, a depuração é mais rápida quando a fixação é realizada em formol. Tal fenômeno possivelmente esteja ligado ao fato de ser justamente o formol conhecido como mal fixador da proteína nuclear básica, rica em cistina e arginina, de espermatozoides de touro (BLOCH, 1969; COELINGH et alii, 1969, 1972). O formol, portanto, facilitaria nesse material a extração parcial dessa proteína pelo HCl, deixando o DNA mais acessível à hidrólise ácida.

Já em espermatozoides de gafanhoto e barbeiro há ocorrência também de uma proteína básica rica em arginina, porém sem cistina. É possível, além disso, que outros tipos de proteína se achem também presentes nesses espermatozoides. Em algumas espécies de ortópteros, por exemplo, grilo, 6 a 7 frações protéicas foram identificadas, por eletroforese, em

núcleos de espermatozóides (McMASTER - KAYE & KAYE, 1973; TESSIER & PALLOTA, 1973). No entanto a proteína "germinativa" rica em arginina presente nesses espermatozóides é que lhes confere algumas propriedades citoquímicas especiais como coloração com fast green a pH 8,1 após desaminação (BLOCH, 1969) e máximo de absorção em λ longos, quando corados com azul de toluidina a pH 4,0 (MELLO & VIDAL, 1977). Já em espermatozóides de *Triatoma infestans* a cromatina reage ao fast green de modo semelhante ao que acontece em gafanhotos, porém as características de basofilia são ligeiramente diferentes: pico de absorção = 630 nm para espermatozóides de *Staurorhectus longicornis* (MELLO & VIDAL, 1977) e metacromasia γ para os de *Triatoma infestans* (MELLO, 1984). É de se supor, então, que a(s) proteína(s) básica(s) nuclear(es) de espermatozóides de *Triatoma infestans* difira(m) em composição ou conformação molecular da(s) de gafanhoto. Dados eletroforéticos são, no entanto, até o momento inexistentes para as proteínas nucleares de espermatozóides de triatomíneos.

Dos espermatozóides supostos como portadores de proteína nuclear "germinativa" essencialmente do tipo rica em lisina, (ouriço-do-mar e abelha) a depuração máxima ocorre num tempo que independe da fixação. Porém, em abelha, embora a depuração máxima seja atingida com 2 horas de hidrólise, quase se completa já após 1 h, no caso da fixação ter sido realizada em etanol - ácido acético. Isto sugere diferença em complexo DNA - proteína entre as duas espécies analisadas.

Dos materiais fixados em etanol - ácido acético, estudados neste trabalho, os espermatozóides de gafanhoto al

cançam depuração máxima mais rapidamente, seguidos pelos de barbeiro e dos espermatozoides anômalos de touro. Os espermatozoides de abelha apresentam a depuração mais longa. Segundo DU PRAW (1970), as protaminas e as histonas ricas em arginina possuem maior afinidade pelo DNA que histonas ricas em lisina. Era de se esperar, portanto, que em espécies cuja proteína nuclear é rica em lisina, a depuração ocorresse mais rapidamente, mais ainda após fixação em etanol - ácido acético. Tal fato não se notou, porém, neste trabalho, KJELLSTRAND & ANDERSSON (1975b) também obtiveram resultado semelhante na comparação que fizeram das cinéticas de hidrólise dos espermatozoides do peixe lúcio (proteína nuclear rica em lisina) com espermatozoides de truta. Esses autores não encontraram explicação para tal fato. É bem conhecida, no entanto, a ocorrência em espermatozoides de algumas espécies de ouriço-do-mar de histonas do tipo ricas em lisina em que ocorre uma variação na sua composição de aminoácidos presentes e/ou na sua mobilidade eletroforética. Espermatozoides de *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* e *Sphaerechinus granularis*, apresentam molécula de H1 "germinativa" com alto teor de arginina quando comparada com H1 do timo de vitelo. *S. granularis* apresenta mesmo uma maior quantidade de resíduos arginina do que lisina (SUBIRANA & PALAU, 1968).

OZAKI (1971) comparando as histonas de espermatozoides e embrião de *Strongylocentrotus purpuratus* verificou a presença tanto no embrião, como nos espermatozoides de um componente com baixa mobilidade eletroforética que se enquadrava na categoria das histonas ricas em lisina. Porém, nos espermatozoides, a proporção lisina: arginina era muito semelhante. Esse componente além de um alto peso molecular e maior carga elétrica, apresentava metionina, que é um amino-

ácido sempre ausente em histonas ricas em lisina. GIANCOTTI e col. (1981b) encontraram em espermatozóides de *S. granularis* um aumento em 36 resíduos de aminoácidos na molécula de H1 comparada com a H1 de timo de vitelo.

Baseado nesses dados bioquímicos pode-se levantar a hipótese de que os espermatozóides de *Lytechinus variegatus* estudados neste trabalho, também apresentem um tipo de H1 em que a quantidade de resíduos de arginina seja muito representativa, uma vez que esse tipo de histona parece ser de ocorrência geral dentro da classe Echinoidea (OZAKI, 1971).

Além disso, é importante mencionar que estudos da estrutura cromatínica com uso de nuclease microcócica em algumas espécies de ouriço-do-mar, tem mostrado uma difícil solubilização do DNA mesmo submetendo-se a cromatina a tempos prolongados de digestão enzimática (SPADAFORA et alii, 1976; KEICHLINE & WASSARMAN, 1977, 1979; GIANCOTTI et alii, 1981a, b; AZORÍN et alii, 1983). Segundo KEICHLINE & WASSARMAN (1979), o tratamento da cromatina de espermatozóides de *S. purpuratus* com nuclease microcócica revelou a presença de um DNA com 250 pares de bases. Porém, a análise eletroforética desse DNA extraído com nuclease microcócica e DNase I indica que o "core" nucleossômico é formado por um DNA com 140 pares de bases mais um adicional de 20 pares de bases extremamente resistentes a digestão. Estes resultados sugerem que a histona H1 presente nesses espermatozóides interage fortemente com os 160 pares de bases do DNA e previne a conversão em fragmentos do "core" com o concomitante desprendimento de H1.

De posse desses dados, a depuração do DNA mais tardia (1 h.) em espermatozóides de *L. variegatus* comparada com a das espécies cuja histona é rica em arginina poderia

ser explicada pela presença de um tipo de histona rica em lisina, mas também com alto teor em arginina, que se ligaria mais fortemente ao DNA, retardando a ação hidrolítica pelo HCl. Esse tipo de proteína parece também reagir diferentemente das chamadas proteínas ricas em arginina, uma vez que não se verificou diferença quanto ao tempo de máximo de depurinação, em função da fixação, em ouriço-do-mar. No entanto, o mesmo não ocorreu em relação à solubilização do ácido apurínico o que sustentaria a idéia de um tipo e/ou interação de uma histona rica em lisina não usual com o DNA nesses espermatozóides analisados.

No caso de espermatozóides de *Apis mellifera*, são eles considerados portadores de uma proteína nuclear "germinativa" rica em lisina, baseando-se em dados citoquímicos (BLOCH, 1969, 1971). Maiores detalhes sobre essa molécula protéica são, no entanto, desconhecidos. O tipo de complexo DNA - proteína, mais estável do que o das outras espécies estudadas, frente à depuração, é sugestivo de uma conformação diferente desta proteína "tipo H1" mesmo em relação à de espermatozóides de ouriço-do-mar.

Foram detectados valores Feulgen - DNA mais elevados nos espermatozóides de touro fixados em etanol-ácido acético, quando comparados aos de espermatozóides fixados em formol. Isto certamente se deve ao fato de que, com a extração parcial da proteína nuclear básica promovida pelo formol mais ação hidrolítica, uma parte do DNA fique também mais suscetível a uma extração precoce. No caso de espermatozóides de ouriço-do-mar e barbeiro o mesmo tipo de achado foi obtido com relação aos valores Feulgen - DNA. Não pôde, contudo, ser ex

plicado, principalmente porque se desconhece o comportamento da(s) sua(s) proteína(s) nuclear(es) frente ao formol.

Em touro, a depuração mais rápida em espermatozoides morfologicamente anômalos, após fixação em etanol-ácido acético indica para estes uma labilidade mais acentuada frente à hidrólise ácida. Estes achados encontram suporte em dados de GLEDHILL (1966) e GLEDHILL et alii (1966). Esses autores encontraram valores Feulgen - DNA drasticamente reduzidos em espermatozoides, quando comparados com os de espermátides. No entanto, o conteúdo de DNA, determinado através de microespectrofotometria ao U.V. não apresentava modificações. Considerando-se que durante a diferenciação de espermátides em espermatozoides ocorre a substituição no tipo de proteína básica associada ao DNA, esse fator seria responsável pela alteração na resposta à reação de Feulgen. GLEDHILL (1966), através de estudos citofotométricos ao U.V. e dados interferométricos de massa seca, também demonstrou não existirem diferenças no conteúdo de DNA dos espermatozoides de touro férteis, embora nesses últimos tenha encontrado um aumento da colorabilidade após a reação de Feulgen. Esses achados são sugestivos de que alterações no complexo DNP possam provocar algum tipo de infertilidade. Há forte indicação de que nesses espermatozoides com anomalia na forma da cabeça possam ocorrer alterações não no conteúdo de proteína, mas provavelmente nos resíduos de aminoácidos e/ou conformação molecular das mesmas. Esse tipo de anomalia, detectável por citoquímica, pode ser encontrado inclusive em espermatozoides de touro morfologicamente normais quando são revelados valores Feulgen - DNA mais elevados, porém a dosagem de DNA com ultra-violeta não mostra alterações (GLEDHILL, 1966). Ou ainda, a resistência à denaturação térmica seguida de coloração com alaranjado de acridina medida pela razão $\alpha =$

Fluorescência 600 nm/Fluorescência 530 nm (EVENSON et alii, 1980) ou a denaturação com HCl seguida de coloração com azul de toluidina aparecem também alteradas (MELLO, 1982a). Tais anomalias relativas à proteína nuclear básica parecem se refletir na capacidade de fertilização desses espermatozóides (MELLO, 1982a).

6.1.2. A solubilização do ácido apurínico

Quanto à fase de predominância em solubilização do ácido apurínico (parte descendente das curvas de hidrólise), é esta mais acelerada após a fixação em etanol - ácido acético, nos espermatozóides com proteína nuclear básica rica em cistina e/ou arginina. Isto indica que as porções polipeptídicas presentes nesses espermatozóides após depuração máxima, são mais facilmente dissociáveis e solubilizáveis junto com o ácido apurínico (KJELLSTRAND & LAMM, 1976), desde que o fixador como o etanol - ácido acético tenha sido usado. Esta facilidade de dissociação e/ou solubilização proteica não deve ocorrer nos espermatozóides cujo teor em lisi na da proteína nuclear básica seja considerável, uma vez que nestes a porção descendente da curva de hidrólise não varia em função da fixação e é menos abrupta em comparação com a dos outros espermatozóides estudados.

A hipótese de que os diferentes perfis possam resultar da presença de proteínas diferentes removidas com a hidrólise, é baseada nos seguintes fatos. Em espermatozóides de touro, mesmo após 3 h. de hidrólise com HCl 4N a 25°C, a permanência de proteína básica associada ao ácido apurínico, na maioria das células, é demonstrado pelas características de basofilia (pico de absorção em $\lambda = 600 \text{ nm}$) (MELLO, 1982). Em espermatozóides de gafanhoto, ouriço-do-mar, abe

lha e barbeiro, por outro lado, (trabalho em andamento da autora desta tese), revela que a presença de proteína nuclear básica associada ao ácido apurínico é demonstrada pela reação ao fast-green alcalino (pH 8,1) mesmo com 6 horas de hidrólise ácida com HCl 4N e 4 horas de hidrólise ácida para espermatozóide de barbeiro.

Em espermatozóides de gafanhoto fixados em etanol-ácido acético e de ouriço-do-mar, nos dois fixadores foi observada a ocorrência de picos secundários ou ombros na porção descendente das curvas de hidrólise. Há, portanto, indicação, com base nesse comportamento frente a hidrólise prolongada, de que mais de um tipo de complexo ácido apurínico - proteína estejam presentes nesses materiais. Dados bioquímicos, embora para espécies diferentes do mesmo grupo, estariam de acordo com tais achados (SUBIRANA & PALAU, 1968; PALAU et alii, 1969; McMASTER - KAYE & KAYE, 1973, 1976; KAYE & McMASTER - KAYE, 1974; OZAKI, 1971; SAVIC et alii, 1981; GIANCOTTI et alii, 1981a).

O fato de variações nos padrões cinéticos de espermatozóides, em função da fixação, não se comportarem como em células somáticas, certamente se liga aos tipos de proteínas básicas específicas presentes nessas células germinativas. Estas proteínas, mesmo quando "ricas em lisina" ou "ricas em arginina" não se identificam plenamente com as H1 e H3 ou H4 somáticas (CLAYPOOL & BLOCH, 1967; SUBIRANA & PALAU, 1968, PALAU et alii, 1969; OZAKI, 1971; PHELAN et alii, 1972; SUBIRANA et alii, 1973; PUWARAVUTIPANICH, 1975; BOLS & KASINSKY, 1976; SPADAFORA et alii, 1976; GOLDBERG et alii, 1977; COLOM & SUBIRANA, 1979, 1981; KENNEDY & DAVIES, 1980; GIANCOTTI et alii, 1981a, b; GUSSE & CHEVAILLIER, 1981; SAVIC et alii, 1981; AUSIÓ & SUBIRANA, 1982; MUÑOZ-GUERRA et alii,

1982; RAO et alii, 1982; USCHEWA et alii, 1982; AZORÍN et alii, 1983).

A par de ficar demonstrado que espermatozoides com diferente composição em proteína nuclear básica apresentam diferente cinética de hidrólise de Feulgen, fica também comprovado que o uso de espermatozoides como controle de conteúdo haplóide de DNA não é recomendável. Talvez nesse caso, fosse melhor o uso de espermátócito secundário (2C) ou célula somática comprovadamente 2C e cujo fenótipo nuclear não seja do tipo extremamente compactado (exemplo: linfócito) ou extremamente frouxo (exemplo: neurônio). O máximo de depuração ocorre em um tempo de hidrólise variável em função do tipo de complexo DNA - proteína existente, e que muitas vezes não coincidiria com o tempo de hidrólise de núcleos diploides ou poliplóides em estudo.

6.2. Confiabilidade na metodologia de medida

A metodologia de avaliação de valores Feulgen-DNA através de citofotometria de varredura automática, embora de extrema complexidade é considerada de alta confiabilidade (GOLDSTEIN, 1970). Mesmo assim, com tal método não se descarta a introdução de erros sistemáticos nas medidas, principalmente no caso de espermatozoides de gafanhoto. Estes são justamente os que apresentaram maiores coeficientes de variação para os valores Feulgen - DNA. No caso, os erros sistemáticos seriam devidos ao fato de apresentarem os espermatozoides de gafanhoto, entre os estudados, maior área (ao redor de $170 \mu\text{m}^2$ de área absorvente; os de touro, por exemplo, atingem uma área de $33 \mu\text{m}^2$) e comprimento de cabeça, além de certa heterogeneidade do material absorvente ao longo do nú

cleo. Com isso, a focalização precisa do material absorvente se tornou mais difícil, além do que erros distribucionais não foram totalmente descartados. (MAYALL & MENDELSON, 1970). Ambos fatores contribuíram, assim, para a introdução de maior variabilidade nos valores Feulgen - DNA desses espermatozoides.

Outros métodos de citofotometria não se aplicariam ao presente estudo, dada a forma e tamanho dos núcleos dos espermatozoides (MELLO & ZANARDI, 1976b).

7 - CONCLUSÕES

- A cinética de hidrólise ácida da cromatina de espermatozoides varia em função dos diferentes complexos DNA - proteína nela presentes.

- Diferenças na cinética de hidrólise em função da fixação empregada, são bem nítidas para espermatozoides de touro, gafanhoto e barbeiro (proteína nuclear "germinativa" rica em cistina e/ou arginina) e menos intensa para os de ouriço-do-mar e abelha (proteína nuclear "germinativa" rica em lisina).

- O formol não é um bom fixador para o complexo DNA - proteína de espermatozoides de touro por facilitar a extração não controlada de proteína nuclear junto a segmentos de DNA, pelo HCl, em curtos tempos de hidrólise.

- A cinética de hidrólise diferente para espermatozoides de barbeiro comparadas à de gafanhoto indica que embora suas proteínas nucleares básicas "germinativas" sejam ricas em arginina, não são exatamente iguais. Da mesma forma, é sugestivo que a proteína nuclear básica "germinativa" rica em lisina de espermatozoides de ouriço-do-mar difira da de abelha, dada a diferente cinética de hidrólise apresentada por esses materiais. É possível, inclusive, que esse tipo de proteína, especialmente em ouriço-do-mar, apresente teor significativo em resíduos de arginina.

- Os espermatozoides morfológicamente anômalos de touro por possuírem alterações nos resíduos de aminoácidos

e/ou conformação molecular de sua proteína nuclear básica, mostraram maior labilidade frente a hidrólise ácida, quando fixados em etanol-ácido acético.

- Os espermatozoides de touro, gafanhoto e barbeiro, quando fixados em etanol-ácido acético apresentam um tipo de complexo ácido apurínico-proteína mais facilmente solubilizável que o dos espermatozoides de ouriço-do-mar e abelha.

- Espermatozoides de gafanhoto e ouriço-do-mar apresentam mais de um tipo de complexo ácido apurínico-proteína indicado pela presença de picos secundários na porção descendente de suas curvas de hidrólise.

- O uso de espermatozoides como controle do conteúdo do haplóide de DNA, através da reação de Feulgen, não é recomendável, uma vez que o máximo de depurinação ocorre em um tempo de hidrólise variável, em função do tipo de complexo DNA - proteína existente.

8 - RESUMO

A cinética de hidrólise de Feulgen foi estudada em espermatozoides de composição diferente em complexos DNA - proteína. Espermatozoides de *Bos taurus* (proteína nuclear rica em arginina e cistina), *Pichroplus bergi*, *Triatoma infestans* (proteína nuclear rica em arginina), *Lytechinus variegatus* e *Apis mellifera* (proteína nuclear rica em lisina) foram submetidos à reação de Feulgen, variando-se a fixação e os tempos de hidrólise. Valores Feulgen - DNA foram, então, obtidos por citofotometria de varredura automática. Os resultados demonstraram diferenças na cinética de hidrólise em função dos diferentes complexos DNA - proteína presentes na cromatina. Diferenças nos padrões de cinética em função da fixação foram bem nítidas para espermatozoides de touro, gafanhoto e barbeiro e menos intensas para espermatozoides de ouriço-do-mar e abelha. As diferentes cinéticas de hidrólise da cromatina de espermatozoides de barbeiro comparada à de gafanhoto, e de ouriço-do-mar, comparada à de abelha, sugerem que, embora as proteínas nucleares básicas "germinativas" dos dois primeiros sejam ricas em arginina e as dos dois últimos sejam ricas em lisina, há diferenças nessas proteínas conforme a espécie considerada. A depuração do DNA foi alcançada mais rapidamente para espermatozoides de *T. infestans* (20 min.) e *P. bergi* (10 min.) quando fixados em etanol-ácido acético. Os espermatozoides anômalos de touro quando fixados em etanol-ácido acético apresentaram uma depuração mais rápida (30 min.) que os normais (1 h.) indicando sua maior labilidade frente à hidrólise ácida. Is

to se deve certamente a anomalias de sua proteína nuclear básica "germinativa".

Dos materiais fixados em formol, o máximo de depurinação alcançado mais cedo o foi em material de touro (espermatozoides normais e com anomalias de cabeça) (30 min.), seguidos de *P. bergi*, *T. infestans*, *L. variegatus* (todos com 1 h. de hidrólise) e finalmente *Apis mellifera* (2 h. de hidrólise).

A presença de picos secundários na porção descendente das curvas de hidrólise de espermatozoides de gafanhoto e ouriço-do-mar indicam para estes mais de um tipo de complexo ácidoapurínico-proteína. Os espermatozoides cuja proteína nuclear "germinativa" é do tipo rica em arginina e/ou, cistina apresentam um complexo ácidoapurínico-proteína mais facilmente solubilizável.

Dadas as diferenças na cinética de hidrólise da cromatina de espermatozoides portadores de proteína nuclear "germinativa" diferente, este tipo celular não é recomendável como controle haplóide em avaliações de conteúdo Feulgen DNA de células somáticas diplóides e poliplóides.

9 - SUMMARY

The Feulgen hydrolysis kinetics was investigated in spermatozoa with different composition in DNA - protein complexes. The species used were : *Bos taurus* (arginine- and cystine-rich nuclear protein), *Pichroplus bergi*, *Triatoma infestans* (arginine-rich nuclear protein), *Lytechinus variegatus* and *Apis mellifera* (lysine-rich nuclear protein). The spermatozoa were subjected to Feulgen's reaction, by varying the fixative type and the hydrolysis times. Feulgen - DNA values were obtained with an automatic scanning cytophotometric procedure. Differences were demonstrated in the hydrolysis kinetics as a function of differences in composition of the DNA - protein complexes being present in the spermatozoon chromatin. Differences in the profiles of Feulgen hydrolysis curves, having for basis the fixation, were rather clear for bull, grasshopper and blood-sucking insect spermatozoa than for sea-urchin and bee spermatozoa. The different hydrolysis kinetics of chromatin of blood-sucking insect spermatozoa compared to that of grasshopper, sea-urchin and bee sperm cells suggests that, although the first two materials contain an arginine-rich "germinative" protein and the latter two ones contain a lysine-rich protein, these differ to each other.

The DNA depurination was obtained more quickly for *T. infestans* (20 min.) and *P. bergi*. (10 min.) spermatozoa when they were fixed in the ethanol-acetic acid (EA) mixture. Morphologically anomalous bull spermatozoa fixed in the EA mixture presented a quicker depurination (30 min) as compared to the normal cells (1 h.). The fast lability

to acid hydrolysis in the abnormal cells is certainly due to anomalies in their basic nuclear "germinative" protein.

In the formalin fixed materials the maximal depurination was obtained earlier in bull spermatozoa (30 min.) followed by sperm cells of *P. bergi*, *T. infestans*, *L. variegatus* (all of them one-hour hydrolysis) and finally *Apis mellifera* (two-hours hydrolysis).

The presence of secondary peaks at the descending branch of the hydrolysis curves of grasshopper and sea-urchin spermatozoa, indicate for these , more than one kind of apurinic-acid protein complexes. The spermatozoa bearing arginine-and/or cystine-rich nuclear protein contain a more easily soluble apurinic acid protein complex.

Due to the differences in hydrolysis kinetics of chromatin in spermatozoa bearing different nuclear "germinative" proteins, this cellular type is not commended as an haploid control for evaluation of Feulgen - DNA contents of diploid and polyploid somatic cells.

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRELL, I. & BERGQVIST, H.A. Cytochemical evidence for varied DNA complexes in the nuclei of undifferentiated cells. J. cell. Biol., 15: 604-6, 1962.
- . Cytochemical studies on DNA complexes during cell multiplication and cell differentiation. Comp. Biochem. Physiol., 22: 189-98, 1967.
- ALVAREZ, M.R. Microfluorometric comparison of Feulgen - Deoxyribonucleic acid hydrolysis in meristematic and differentiated cells of the orchid embryo. Expl. Cell Res., 61: 191-8, 1970.
- ANDERSSON, G.K.A. & KJELLSTRAND, P.T.T. A study of DNA depolymerisation during Feulgen acid hydrolysis. Histochemistry, 43: 123-30, 1975.
- AUSIÓ, J. & SUBIRANA, J.A. Nuclear proteins and the organization of chromatin in spermatozoa of *Mytilus edulis*. Expl. Cell Res., 141: 39-45, 1982.
- AVRAMOVA, Z., DESSEV, G. & TSANEV, R. DNA - associated proteins of ram sperm nuclei. Febs letters, 118 (1): 58-62, 1980.
- , USCHEWA, A., STEPHANOVA, E., TSANEV, R. Trout sperm chromatin. I. Biochemical and immunological study of the protein composition. Eur. J. Cell Biol., 31: 137-42, 1983.
- AZORÍN, F., OLIVARES, C., JORDÁN, A., PÉREZ-GRAU, L., CORNUDELLA, L. & SUBIRANA, J.A. Heterogeneity of the histone-containing chromatin in sea-cucumber spermatozoa. Expl. Cell Res., 148: 331-44, 1983.
- BACHMANN, K. A cytochemical kinetic investigation of the

Feulgen hydrolysis of fixed chromatin. Histochemie, 16: 287-93, 1968.

BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. J. cell Biol., 93: 298-305, 1982.

BAUER, H. Die Feulgenische Nuklealfärbung in ihrer Anwendung auf cytologische Untersuchungen. Z. Zellforsch. Mikrosk Anat., 15: 225-47, 1932.

BLOCH, D.P. & HEW, Y.Y.C. Changes in nuclear histones during fertilization, and early embryonic development in the pulmonate snail, *Helix aspera*. J. Bioph. Biochem. cytol., 8: 69-81, 1960.

———— & BRACK, S.D. Evidence for the cytoplasmic synthesis of nuclear histone during spermiogenesis in the grasshopper *Chortophaga viridifasciata* (De geer). J. Cell Biol., 22: 327-40, 1964.

————. A catalog of sperm histones. Genetics (supl.), 61: 93-111, 1969.

BÖHM, N. Einfluss der Fixierung und der Säurekonzentration auf die Feulgenhydrolyse bei 28° C. Histochemie, 14: 201-11, 1968.

———— & SPRENGER, E. Fluorescence cytophotometry: A valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen - DNA. Histochemie, 16: 100-18, 1968.

BOLS, N.C. & KASINSKY, H.E. On the diversity of sperm histones in the vertebrates: II. A cytochemical spermiogenesis in the cartilaginous fish *Hydrolagus collieri*. J. expl. Zool., 198: 109-14, 1976.

BRACHET, J. & PREUMONT, A.M. Nouvelles techniques de détection des acides desoxyribonucléiques: Quelques résultats préliminaires. Annls. Histochem., 11: 157-71, 1966.

BRACHET, J., HULIN, N. & GUERMANT, J. Acid lability of deoxyribonucleic acids and cell differentiation. Expl. Cell Res., 51: 509-18, 1968.

BRODY, T. Histones in cytological preparations. Expl. Cell Res., 85: 255-63, 1974.

CALVIN, H.I. & BEDFORD, J.M. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. J. Reprod. Fert., 13: 65-75, 1971.

—————. Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa. Biochim. biophys. Acta, 434: 377-89, 1976.

CLAYPOOL, CAROL, J. & BLOCH, D.P. Synthesis of ribonucleic acid and histone change during spermatogenesis in the grasshopper *Chortophaga viridifasciata*. Nature, 215 (26) 966-7, 1967.

COELINGH, J.P., ROZIJN, T.H. & MONFOORT, C.H. Isolation and partial characterization of a basic protein from bovine sperm heads. Biochim. biophys. Acta, 188: 353-6, 1969.

—————, MONFOORT, C.H., ROZIJN, T.H., LEUVEN, J.A.G., SCHIPHOT, R., STEYN-PARVE ELIZABETH P., BRAUNITZER, G., SCHRANK, BARBARA & RUHFUS, ANNETTE. The complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull spermatozoa. Biochim. biophys. Acta, 285: 1-14, 1972.

COLOM, J. & SUBIRANA, J.A. Protamines and related proteins from spermatozoa of mulluscs. Characterization and molecular weight determination by gel electrophoresis. Biochim. biophys. Acta, 581: 217-27, 1979.

—————. Presence of H2b histone in spermatozoa from marine gastropoda. Expl. Cell Res., 131: 462-5, 1981.

CORNUDELLA, L. & ROCHA ELIZABETH. Nucleosome organization

during germ cell development in the sea cucumber *Holothuria tubulosa*. Biochemistry, 18 (17): 3724-32, 1979.

DEITCH, ARLINE D., WAGNER, D. & RICHART, R.M. The effect of hydrolysis conditions and fixation on the intensity of the Feulgen reaction. J. Histochem. Cytochem., 15: 779-83, 1967.

———. Conditions influencing the intensity of the Feulgen reaction. J. Histochem. Cytochem., 16 (5): 371-9, 1968.

DICK, CLAIRE & JOHNS, E.W. The removal of histones from calf thymus deoxyribonucleoprotein and calf thymus tissue with acetic acid containing fixatives. Biochem. J., 105: 46, 1967.

DI STEPHANO, H.S. A cytochemical study of the Feulgen nuclear reaction. Chromosoma, 3: 282-301, 1948.

DU PRAW, E.J. Physical Chemistry of Proteins, Nucleic Acids, and Nucleoproteins. In: ——— Cell and Molecular Biology, New York, Academic, 1968. Cap. 12, p. 287-324.

———. Sex Chromosomes, Nucleoli and Genetic Control. In: ——— DNA and Chromosomes. New York, Academic, 1970. Cap. 23, p. 261-235.

EVENSON, D.P., WITKIN, S.S., DE HARVEN, E. & BENDICH, A. Ultrastructure of partially decondensed human spermatozoal Chromatin. J. Ultrastruct. Res., 63: 178-87, 1978.

———, DARZYNKIEWICZ, Z. & MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Science, 210: 1131-3, 1980.

FEULGEN, R. & ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thyminucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen

in mikroskopischen Präparaten. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 135: 203-48, 1924.

FRASCHINI, A., PELLICCIARI, C., BIGGIOGERA, M. & ROMANINI, M.G.M. The effect of different fixatives on chromatin: cytochemical and ultrastructural approaches. Histochem. J., 13: 763-79, 1981.

GIANCOTTI, V., COSIMI, S., D. CARY, P., CRANE-ROBINSON, C. & GERACI, G. Preparation and characterization of histone H1 from the sperm of the sea-urchin *Sphaerechinus granularis*. Biochem. J., 195: 171-6, 1981a.

—————, RUSSO, E., COSIMI, S., D. CARY, P. & CRANE-ROBINSON, C. Secondary and tertiary structural differences between histone H1 molecules from calf thymus and sea-urchin (*Sphaerechinus granularis*) sperm. Biochem. J., 197: 655-60, 1981b.

GLEDHILL, B.L. Studies on the DNA content, dry mass and optical area of ejaculated spermatozoal heads from bulls with normal and lowered fertility. Acta vet. scand., 7: 166-74, 1966.

—————, GLEDHILL, M.R., RIGLER, R. & RINGERTZ, N.R. Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. Expl. Cell Res., 41: 652-65, 1966.

GOLDBERG, R.B., GEREMIA, R. & BRUCE, W.R. Histone synthesis and replacement during spermatogenesis in the mouse. Differentiation, 7: 167-80, 1977.

GOLDSTEIN, D.J. Aspects of scanning microdensitometry. I. Stray light (glare). J. Microsc. Soc. Vict., 92: 1-16, 1970.

GREENWOOD, M.S. & BERLYN, G.P. Feulgen cytophotometry of pine nuclei: effects of fixation, role of formalin. Stain technol., 43: 111-7, 1968.

GUSSE, M. & CHEVAILLIER, Ph. Molecular structure of Chromatin during sperm differentiation of the dogfish *Scylliorhynchus caniculus* (L.). Chromosoma, 77: 57-68, 1980a.

———. Electron microscope evidence for the presence of globular structures in different sperm chromatins. J. Cell Biol., 87: 280-4, 1980b.

———. Microelectrophoretic analysis of basic protein changes during spermiogenesis in the dogfish *Scylliorhynchus caniculus* (L.). Expl. Cell Res., 136: 391-7, 1981.

HENRICKS, D.M. & MAYER, D.T. Characterization of the basic protein associated with DNA in mammalian spermatozoa. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 119: 769-72, 1965a.

———. Isolation and characterization of a basic keratin like protein from mammalian spermatozoa. Expl. Cell Res. 40: 402-12, 1965b.

HILLARY, B.B. Use of the Feulgen reaction in cytology. I. Effect of fixatives on the reaction. Bot. Gaz., 101: 276-309, 1939.

KASTEN, F.H. Stability of the Feulgen - deoxyribonucleic acid absorption curve in situ with variation in nuclear protein content and other factors. J. Histochem. Cytochem., 4: 462-70, 1956.

KAYE, J.S. & McMASTER-KAYE, RACHEL. Histones of spermatogenous cells in the house cricket. Chromosoma, 46: 397-419, 1974.

——— & MOSS, S.B. Fractionation of cricket testis nuclei on gradients of colloidal silica for study of basic protein changes during spermiogenesis. Expl. Cell Res., 117: 245-52, 1978.

KEICHLINE, L.D. & WASSARMAN, P.M. Developmental study of the structure of sea urchin embryo and sperm Chromatin using micrococcal nuclease. Biochim. biophys. Acta, 475: 139-51, 1977.

———. Structure of chromatin in sea urchin embryos, sperm and adult somatic cells. Biochemistry, 18 (1): 214-9, 1979.

KENNEDY, B.P. & DAVIES, P.L. Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. J. biol. Chem., 255 (6): 2533-39, 1980.

———. Chromatin reorganization during spermatogenesis in the winter flounder. J. biol. Chem., 257 (18): 11160-5, 1982.

KHARCHENKO, E.P. & NALIVAERA, N.N. Analysis of structural characteristics of sperm chromatin in amphibians. J. Evol. biochem. Physiol., 15: 410-6, 1980.

KIERSZENBAUM, A.L. & TRES, LAURA, L. The packaging unit: a basic structural feature for the condensation of late cricket spermatid nuclei. J. Cell Sci., 33: 265-83, 1978.

KJELLSTRAND, P.T.T. & ANDERSSON, G.K.A. Histochemical properties of spermatozoa and somatic cells. I. Relations between the Feulgen hydrolysis pattern and the composition of the nucleoproteins. Histochem. J., 7: 563-73, 1975a.

———. Histochemical properties of spermatozoa and somatic cells. II. Differences in the Feulgen hydrolysis pattern induced through alterations of the nucleoprotein complex. Histochem. J., 7: 575-83, 1975b.

——— & LAMM, C.J. A model of the breakdown and removal of the chromatin components during Feulgen acid hydrolysis. Histochem. J., 8: 419-30, 1976.

KORNBERG, D. & KLUG, A. The nucleosome. Scient. Am., 244
(2): 52-64, 1981.

85

LEWIN, B. Nucleosome particles and the structure of chromatin. In: ————. Genes. New York, John Wiley & Sons, 1983. Cap. 29, p. 456-478.

LILLIE, R.D. Aminoacids and Groups, etc. In: ————. Histopathologic technic and pratical histochemistry. New York, Blakiston, 1954. Cap. 9, p. 144-181.

LOIR, M. & LANNEAU, M. An electrophoretic analysis of the basic nuclear proteins of ram spermatids. Expl. Cell Res., 92: 509-12, 1975.

———. Transformation of ram spermatid chromatin. Expl. Cell Res., 115: 231-43, 1978.

McMASTER-KAYE, RACHEL & KAYE, J.S. An electrophoretic analysis of the histones of the house cricket. Arch. Bioch. Biophy., 156: 426-36, 1973.

———. Basic protein changes during the final stages of sperm maturation in the house cricket. Expl. Cell Res., 97: 378-86, 1976.

———. Organization of chromatin during spermatogenesis: beaded fibers, partly beaded fibers, and loss of nucleosomal structure. Chromosoma, 77: 41-56, 1980.

MARUSHIGE, Y., MARUSHIGE, K. Properties of chromatin isolated from bull spermatozoa. Biochim. biophys. Acta, 340: 498-508, 1974.

MAYALL, B.H. & MENDELSON, M.L. Errors in absorption cytophotometry: some theoretical and practical considerations In: WIED, G.L. & BAHR, G.F. eds. Introduction to Quantitative Cytochemistry - II. New York, Academic, 1970, p. 171-197.

MELLO, MARIA LUÍZA S. Differential acid hydrolysis of some hetero- and euchromatins. In: CONGRESS Histochemistry and Cytochemistry, 4., Bucharest, 1976. p. 223-224.

———— & ZANARDI, VERÔNICA A. Dados cariométricos em espermatozoides de touro: influência de diferentes fixadores e tempos de hidrólise. Ciênc. Cult., S. Paulo, 28 (5): 551-4, 1976a.

————. Feulgen - DNA plug and two-wavelength Cytophotometry of bull spermatozoa. Mikroskopie, 32: 129-37, 1976b.

———— & VIDAL, B.C. Changes in Anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshopper, *Staurorhectus longicornis* Giglio-toss. Ad. Invert Reprod., 1: 75-83, 1977.

———— & VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. Ciênc. Cult., S. Paulo, 30 (6): 665-76, 1978.

————. Patterns of lability towards acid hydrolysis in heterochromatins and euchromatins of *Triatoma infestans* Klug. Cell.Mol. Biol., 24: 1-16, 1979.

———— & VIDAL, B.C. Acid lability of deoxyribonucleic acids of some polytene chromosome regions of *Rhynchosciara americana*. Chromosoma, 81: 419-29, 1980.

————. Induced metachromasia in bull spermatozoa. Histochemistry, 74: 387-92, 1982a.

MELLON, E.F. Aldehyde Tannage. In: D'FLATHERY, F., RODDY, W.T. & LOLLAR, R., eds. Chemistry and technology of leather. London, Chapman, 1958. p. 66-97.

MITTERMAYER, C., MADREITER, H., LEDERER, B. & SANDRITTER, W. Differential acid hydrolysis of euchromatin and heterochromatin (biochemical, histochemical and morphological studies). Beitr. Path. Verdau Org., 143: 157-71, 1971.

- MUÑOZ-GUERRA, S., AZORÍN, F., CASAS, M.T., MARCET, X., MARIS TANY, M.A., ROCA, J. & SUBIRANA, J.A. Structural organization of sperm chromatin from the fish *Carassius auratus*. Expl. Cell Res., 137: 47-53, 1982.
- NOESKE, K. Diskrepanzen von Feulgen-wert und DNS-Gehalt. Histochemie, 20: 322-7, 1969.
- OVEREND, W.G. & STACEY, M. Mechanism of the Feulgen nucleal reaction. Nature, 163: 538-40, 1949.
- OZAKI, H. Developmental studies of sea urchin chromatin. Chromatin isolated from spermatozoa of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Devl. Biol., 26: 209-19, 1971.
- PALAU, J., RUIZ-CARRILLO, A. & SUBIRANA, J.A. Histones from sperm of the sea urchin *Arbacia lixula*. Eur. J. Cell Biol., 7: 209-13, 1969.
- PHELAN, J.J., SUBIRANA, J.A. & COLED, R. An unusual group of lysine-rich histones from gonads of a sea cucumber, *Holothuria tubulosa*. Eur. J. Cell Biol., 31: 63-8, 1972.
- PIMENTEL, E.R. Fração histônica nuclear rica em histona H5: isolamento, caracterização, orientação macromolecular e interação com DNA. Campinas, 1984. 100 p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.
- PIMENTEL GOMES, F. Os testes de significância. In: _____ Curso de Estatística Experimental. São Paulo, Nobel, 1976. Cap. 3, p. 29-58.
- POGANY, G.C., CORZETT, MICHELE, WESTON, S. & BALHORN, R. DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. Expl. Cell Res., 136: 127-36, 1981.

- PUWARAVUTIPANICH, T. & PANYIM, S. The nuclear basic proteins of human testis and ejaculated spermatozoa. Expl. Cell Res., 90: 153-8, 1975
- RAO, M.S.S., RAO, B.J. & GANGULY, J. Localization of testis-variant histones in rat testis chromatin. Biochem. J., 205: 15-21, 1982.
- RASCH, R.W. & RASCH, ELLEN, M. Kinetics of hydrolysis during the Feulgen reaction for deoxyribonucleic acid. A reevaluation. J. Histochem. Cytochem., 21 (12): 1053-65, 1973.
- RETIEF, A.E. & RUCHEL, R. Histones removed by fixation their role in the mechanism of chromosomal banding. Expl. Cell Res., 106: 233-37, 1977.
- ROCHA, E. & CORNUDELLA. Differential nuclease action on nuclei and chromatin from developing germ cells of the echinoderm *Holothuria tubulosa*. Biochim. biophys. Res. Commun., 68 (4): 1073-81, 1976.
- SALISBURY, G.W., BIRGE, W.J., De LA TORRE, L. & LODGE, J.R. Decrease in nuclear Feulgen - positive material (DNA) upon aging in vitro storage of bovine spermatozoa. J. biophys. biochem. Cytol., 10: 353-9, 1961.
- , LODGE, J.R. & BAKER, F.N. Effects of age of stain hydrolysis time and freezing of the cells on the Feulgen-DNA content of bovine spermatozoa. J. Dairy Sci., 47: 165-8, 1964.
- SAVIC, A., RICHMAN, P., WILLIAMSON, P. & POCCIA, D. Alterations in chromatin structure during early sea urchin embryogenesis. Proc. Natn. Acad. Sci., 78 (6): 3706-10, 1981.
- SINCLAIR, G.D. & BRASCH, K. The nucleated erythrocyte: a model of cell differentiation. Rev. Can. Biol., 34 (4):

- SOBHON, P., CHUTATAPE, C., CHALERMISARACHAI, P., BONGPAYABAL, P. & STANPHAICHITR, N. Transmission and scanning electron microscopic studies of the human sperm chromatin decondensed by micrococcal nuclease and salt. J. expl. Zool., 221: 61-79, 1982.
- SPADAFORA, C., BELLARD, MARIA, COMPTON, J. LEE & CHAMBON, P. The DNA repeat lengths in chromatins from sea urchin sperm and gastrula cells are markedly different. Febs letters, 69 (1): 281-5, 1976.
- SUBIRANA, J.A. & PALAU, J. Histone-like proteins from the sperm of echinoderms. Expl. Cell Res., 53: 471-7, 1968.
- , COZCOLLUELA, CARMEN, PALAU, J., UNZETA, M. Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs. Biochim. biophys. Acta, 317: 364-79, 1973.
- , MUÑOZ-GUERRA, S., MARTINEZ, A.B., PÉREZ-GRAU, L., MARCET, X. & FITA, I. The subunit structure of chromatin fibres. Chromosoma, 83: 455-71, 1981.
- SUMNER, A.T., EVANS, H.J. & BUCKLAND, R.A. Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and giemsa. I. The effects of fixation in methanol-acetic acid. Expl. Cell Res., 81: 214-22, 1973.
- SWIFT, H. Cytochemical techniques for nucleic acids. In: CHARGAFF, E. & DAVIDSON, J.N. The nucleic acids. New York, Academic, 1955. v. 2, p. 51.
- . The quantitative cytochemistry of RNA. In: WIED, G.L., ed. Introduction to Quantitative Cytochemistry. New York, Academic, 1966. p. 355-386.
- TESSIER, ANNE & PALLOTTA, D. Analysis of basic proteins during spermatogenesis in the cricket, *Acheta domestica*.

TONIOLO, C. Secondary structure prediction of fish protamines. Biochim. biophys. Acta, 624: 420-7, 1980.

TSANEV, R. & AVRAMOVA, Z. Nonprotamine nucleoprotein ultrastructures in mature ram sperm nuclei. Eur. J. Cell Biol., 24: 139-45, 1981.

———. Trout sperm chromatin. II. Ultrastructural aspects after salt dissociation of proteins. Eur. J. Cell Biol., 31: 143-9, 1983.

USCHEWA, A., AVRAMOVA, Z. & TSANEV, R. Tightly bound somatic histones in mature ram sperm nuclei. Febs letters, 138 (1): 50-4, 1982.

VAUGHN, J.C. & LOCY, R.D. Changing nuclear histone patterns during development. III. The deoxyribonucleic acid content of spermatogenic cells in the crab *Emerita analoga*. J. Histochem. Cytochem., 17 (9): 591-600, 1969.

VENDRELY, R. & VENDRELY, C. Biochemistry of histones and protamines. Protoplasmotologia, 5: 1-88, 1966.

VIDAL, B.C. The effect of chupein on anisotropy and basophilia of polytene chromosomes. Histochemistry, 60: 309-16, 1979.