

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

**EXPRESSÃO DOS GENES PLCζ, WPB2NL E TNF-α NO ESPERMATOZOIDE E
SUAS RELAÇÕES COM A QUALIDADE SEMINAL E FERTILIDADE EM
EQUINOS DA RAÇA CRIOULA.**

VERÔNICA LA CRUZ BUENO

PORTO ALEGRE

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**EXPRESSÃO DOS GENES PLCζ, WPB2NL E TNF-α NO ESPERMATOZOIDE E
SUAS RELAÇÕES COM A QUALIDADE SEMINAL E FERTILIDADE EM
EQUINOS DA RAÇA CRIOULA.**

VERÔNICA LA CRUZ BUENO

Autor: Verônica La Cruz Bueno

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Sandra Fiala Rechsteiner

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Bueno, Verônica La Cruz
EXPRESSÃO DOS GENES PLCζ, WPB2NL E TNF-
α NO ESPERMATOZOIDE E SUAS RELAÇÕES COM A
QUALIDADE SEMINAL E FERTILIDADE EM EQUINOS DA RAÇA
CRIOULA. / Verônica La Cruz Bueno. -- 2018.
55 f.
Orientadora: Sandra Fiala Rechsteiner.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Garanhão. 2. Expressão gênica. 3. Parâmetros
seminais. 4. Taxa de prenhez. I. Fiala Rechsteiner,
Sandra, orient. II. Título.

VERÔNICA LA CRUZ BUENO

**EXPRESSÃO DOS GENES PLCZ, WPB2NL E TNF- α NO ESPERMATOZOIDE E
SUAS RELAÇÕES COM A QUALIDADE SEMINAL E FERTILIDADE EM
EQUINOS DA RAÇA CRIOULA.**

APROVADO POR:

Prof.^a. Dr^a. Sandra Fiala Rechsteiner
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr^a Adriana Pires Neves
Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky
Membro da Comissão

Dr. Henrique Boll de Araujo Bastos
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela saúde, por me orientar nas escolhas certas, por me dar forças nos momentos mais difíceis e por fazer possível a realização de cada conquista.

A minha família, em especial ao meu marido Leandro Krenski da Silva, que esteve ao meu lado em cada passo da realização deste trabalho. .

A Professora Dr.^a Sandra Fiala Rechsteiner pela orientação, por seus conhecimentos e experiência oferecidos. Ainda, pela amizade e confiança dispensadas e, sobretudo, pela seriedade e profissionalismo que tanto contribuíram para minha formação.

Ao Professor Dr. Rodrigo Costa Mattos, sempre solícito e disposto a ajudar e esclarecer diversas dúvidas em todos os momentos. Sua colaboração foi fundamental para a realização deste projeto.

Aos meus amigos Henrique Bastos, Luiz Augusto Machado, Gustavo Larentis e Bruna Beretta por todo desenvolvimento científico e pelo trabalho em conjunto no REPROLAB.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos por compartilharem o conhecimento e possibilitar meu crescimento profissional.

Aos inúmeros amigos e colegas do REPROLAB, estagiários, mestrandos e doutorandos, agradeço pela convivência.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível pela bolsa de estudo. A Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos pelo auxílio financeiro concedido para realização do projeto de pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

Bax: Like protein 4

BMP15: Bone morphogenetic protein 15

Ca²⁺: Cálcio

FIV: Fertilização in vitro

HOST: Teste hiposmótico

HSP70: Proteína com 70 kilodalton heat shock proteins

IA: Inseminação Artificial

ICSI: Injeção intracitoplasmática de espermatozoides

K⁺: Potássio

Kg: Quilos

MMP1: Metallopeptidase 1

MMP2: Metallopeptidase 2

Na⁺: Sódio

PBS: Solução phosphate buffered saline

PCLζ: Fosfolipase C zeta

PCR: Reação em cadeia da polimerase

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

ROS: Espécies reativas de oxigênio

TNF-α: TNFalpha

WBP2NL: Proteína 2 de ligação ao domínio WW N-terminal Like

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de iniciadores para qPCR. 35

Tabela 2: Coeficiente de correlação simples de Pearson entre parâmetros seminais, taxa de prenhez e expressão dos genes PCL ζ , WPB2NL e TNF- α de garanhões da raça Crioula. 41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 A raça Crioula.....	13
2.2 Fertilidade.....	14
2.3 Espermatozoide	15
2.4 Fecundação.....	18
2.5 Expressão Gênica na Reprodução Equina.....	20
2.6 Gene PLCζ.....	21
2.7 Gene WPB2NL.....	25
2.8 Gene TNF-α	25
2.9 Identificação Gênica.....	27
3. ARTIGO.....	29
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

EXPRESSÃO DOS GENES PLC ζ , WPB2NL E TNF- α NO ESPERMATOZOIDE E SUAS RELAÇÕES COM A QUALIDADE SEMINAL E FERTILIDADE EM EQUINOS DA RAÇA CRIOULA.

RESUMO

Em todas as espécies de mamíferos estudadas, o gene PLC ζ é responsável pelo aumento de cálcio no momento da fecundação do oócito. Recentemente, o gene WBP2NL, também está sendo estudado por sua possível capacidade de iniciar a ativação de oócitos. O gene TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que pode ser encontrada no plasma seminal, mas seu efeito na viabilidade espermática ainda não está claro. O objetivo desse trabalho foi investigar a expressão dos genes PLC ζ , WPB2NL e TNF- α no espermatozoide e suas relações com a qualidade e fertilidade em equinos. Foram utilizados ejaculados de 40 garanhões da raça Crioula, de criatórios localizados próximos a Porto Alegre. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer. As demais análises microscópicas foram realizadas através do Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision. A análise da integridade física da membrana foi realizada utilizando-se sondas fluorescentes. A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico. Para análise estatística foi utilizada correlação de Pearson, com nível de significância de $P < 0,05$. Foi encontrada correlação positiva do gene PCL ζ com integridade funcional da membrana plasmática (0,449), integridade física da membrana plasmática (0,438), taxa de prenhez (0,454), motilidade total (0,486), motilidade progressiva (0,413); correlação negativa com motilidade lenta (-0,427) e espermatozoides imóveis (-0,405). Não foram encontradas correlações dos genes WBP2NL e TNF- α . Concluí-se que a expressão do gene PCL ζ no Espermatozoide equino pode ser utilizada com um marcador para a qualidade seminal e fertilidade do garanhão.

Palavras Chaves: Garanhão, expressão gênica, taxa de prenhez e parâmetros seminais.

EXPRESSION OF THE PLC ζ , WBP2NL AND TNF- α GENES IN SPERMATOZOA AND ITS RELATIONS WITH SEMINAL QUALITY AND FERTILITY IN CRIOULA EQUINE

Abstract

In all species of mammals studied, the PLC ζ gene is a factor of calcium increase at the time of oocyte fertilization. Recently, the WBP2NL gene is also being studied for its potential ability to initiate oocyte activation during fertilization. The TNF- α is a pro-inflammatory cytokine found in seminal plasma but its effect on motility and viability of sperm is still unclear. The aim of this study was to verify the expression of PLC ζ , WBP2NL and TNF- α genes in spermatozoa and their relationship with quality and fertility in horses. We used the ejaculates of 40 Crioulo stallions, were used from horse farms located near Porto Alegre. After semen collection, the ejaculate was diluted in a commercially available extender. Microscopic analysis of total and progressive motility was performed using a computer assisted sperm analysis system AndroVision. Membrane physical integrity was assessed by fluorescent probes and membrane functionality was analyzed by the hypo-osmotic test (HOST). Statistical analysis was performed using the Pearson correlation, with a significance level of $P < 0.05$. A moderate positive correlation of the PLC ζ gene was found with functional plasma membrane function (0.449), physical organization of the plasma membrane (0.438), conception rate (0.454), total motility (0.486), progressive motility (0.413) and negative correlation with slow motility (-0.427) and spermatozoa properties (-0.405). No correlation on WBP2NL and TNF- α genes were found, showing that those genes expression should not be used as a marker of seminal quality and fertility in stallions. It can be concluded that expression of the PLC ζ gene on equine spermatozoa can be used as a marker for seminal quality and fertility in the stallion.

Key words: Stallion, gene expression, conception rate and seminal parameters.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e o quarto mundial. A tropa nacional é superior a cinco milhões de cavalos, computados os cavalos de lida, os de raça, lazer e competição. A atividade movimentada anualmente R\$ 16,15 bilhões e gera 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos, sendo responsável, assim, por três milhões de postos de trabalho (MAPA, 2017).

Nos últimos anos a equideocultura deu um salto qualitativo, havendo no mercado, animais de alto valor e zootécnico. Isso é possível devido aos avanços na área da genética animal, os quais permitem identificar, não apenas anomalias, mas também diversos genes de interesse econômico.

O interesse no estudo da reprodução equina é fomentado cada vez mais como ferramenta para acelerar o ganho genético e competitividade na indústria do cavalo (HINRICHS, 2013). A redução da fertilidade no garanhão resulta em importantes perdas econômicas para a indústria equina. Diferente de outras espécies domésticas de interesse zootécnico, os equinos são valorizados como indivíduo e animais de alto padrão genético atingem valores elevados de comércio e reprodução (CHOWDHARY et al., 2008). Portanto, fatores fisiológicos e de capacidade reprodutiva muitas vezes são selecionados negativamente, o que leva a menores índices reprodutivos (LEON et al., 2013).

Mesmo existindo variações nos processos reprodutivos das diversas espécies, é possível reconhecer padrões gerais no plano estrutural e funcional, e buscar modelos experimentais mais adequados à espécie humana. Tendo em vista os avanços obtidos em outras espécies, tais como: camundongos, humanos, suínos, felinos, bovinos e ovinos (SAUNDERS et al., 2002; KUROKAWA et al., 2005; VILLAVARDE, 2010; 2002; MOURA et al, 2006, SYLVIA, et al., 2012), com pesquisas sobre marcadores de fertilidade e a importância deste tema na esfera reprodutiva. Torna-se imprescindível o desenvolvimento de estratégias para a identificação, caracterização e compreensão de componentes de interesse e sua participação nas células espermáticas, relacionando-os aos processos de fecundação e melhorias de indicadores reprodutivos.

Em todas as espécies de mamíferos estudadas até agora (ouriço do mar, camundongos, humanos, suínos e felinos), os resultados de fertilização FIV, demonstram que o gene PLC ζ é responsável pelo aumento de Ca⁺² no momento da fertilização do oócito (GAT e ORVIETO, 2017). O WBP2NL, também está sendo estudado por sua possível função no início da ativação de oócitos durante a fecundação (AARABI et al., 2014). O gene TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que pode ser encontrada no plasma seminal, mas seu efeito sobre a motilidade e viabilidade espermática ainda não está claro (PERDICHIZZI et al. 2007). Pesquisas em humanos demonstraram que as concentrações crescentes de TNF- α levam a um aumento no número de espermatozoides não viáveis (SAKAMOTO et al., 2003).

A criação de equinos da raça Crioula vem crescendo em todo Brasil nos últimos anos, porém ainda há uma escassez de informações sobre genes relacionados aos parâmetros de fertilidade desta raça. O objetivo desse trabalho foi investigar a expressão dos genes PLC ζ , WPB2NL e TNF- α no espermatozoide e suas relações com a qualidade seminal e fertilidade em equinos da raça crioula.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A raça Crioula

A raça Crioula é o resultado de uma seleção natural que ocorreu principalmente no sul da América, por cerca de quatro séculos. Os cavalos Crioulos são considerados extremamente bem adaptados à região, devido ao fato de que somente os mais fortes sobreviviam e conseguiam passar seus genes para as futuras gerações (ABCCC, 2009).

São animais descendentes das raças Andaluz e Bérbere, trazidos por conquistadores do século XV. O cavalo que aportou na América era a mais desenvolvida ferramenta de guerra existente na época. A partir do século XVII, muitos cavalos foram perdidos ou abandonados, reproduzindo-se de forma livre pelo sul do continente. Na região das cordilheiras e pampas, formaram-se manadas extremamente bem adaptadas à região devido à seleção natural ao longo dos quatro séculos (TEIXEIRA, 2011).

No final do século XIX e início do século XX, criadores argentinos, uruguaios e brasileiros começaram a se conscientizar da importância e da qualidade dos cavalos que habitavam suas propriedades e deram início à recuperação destes animais, contribuindo assim, para a formação da raça Crioula. Consequente a isso, esta nova raça passou a ser preservada conquistando notoriedade a partir do século XX, quando várias associações foram criadas, comprovando o valor do cavalo Crioulo (ABCCC, 2009).

Em 1932, foi fundada a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos, com a missão de preservar e difundir o cavalo Crioulo no país. Cinquenta anos depois, a prova do Freio pode ser considerada uma ferramenta de seleção, uma vez que motivou a otimização da raça, tanto morfológica quanto funcionalmente (ABCCC, 2016). A criação de cavalo crioulo no Brasil gera mais de 240 mil empregos diretos e indiretos, só no último ano, cresceu mais de 20% em número de eventos (mais de mil realizados) e acima de 40% em comercialização de animais (ABCCC, 2018).

Hoje são mais de 400 mil animais distribuídos em 100% do território nacional. A criação de equinos da raça Crioula vem crescendo em todo Brasil nos últimos anos, porém ainda há uma escassez de informações sobre alterações de fertilidade desta raça.

2.2 Fertilidade

O termo fertilidade é habitualmente utilizado na indústria equestre para relatar a capacidade individual de se reproduzir. Este valor sempre será menor do que a percentagem de oócitos fertilizados *in vivo* pelo sêmen de um determinado garanhão (AMANN, 2005). O resultado de qualquer monta natural, IA ou FIV depende da interação de ambos os gametas (masculino e feminino). Assim, ao descrever fertilidade, o conceito verdadeiro seria o produto da (fertilidade masculina) X (fertilidade feminina) X (todas as outras fontes de variação), o que dificulta atribuir o resultado obtido ao reprodutor ou ao sêmen (AMANN e HAMMERSTEDT, 2002).

Diferente de outras espécies, de interesse econômico como os bovinos, os garanhões são selecionados por características como conformação, resultados em competição ou devido a sua genealogia (VARNER et al., 2008). O aspecto reprodutivo na maioria das vezes não é levado em consideração. A indústria equestre está repleta de reprodutores que possuem índices de fertilidade insatisfatórios ou abaixo do preconizado para a espécie. A fertilidade no garanhão é uma característica economicamente importante, fortemente relacionada com aspectos ambientais e genéticos complexos (HARALD e OTTMAR, 2012). Esta característica pode ser afetada negativamente por uma ampla variedade de condições, tais como: distúrbios de comportamento, capacidade de acasalamento e outros problemas específicos, sem necessariamente apresentar relação com a função espermática (VARNER et al., 2008).

As taxas de prenhez por ciclo estão associadas ao ano, estação reprodutiva, centro de criação, idade das éguas, histórico reprodutivo, tipo de cobertura, manejo reprodutivo e a natureza do sêmen, entre outros (AMANN et al.,

2005). Os esforços empregados, até então, têm se baseado na otimização da nutrição, cuidados preventivos com saúde, técnicas de IA e manejo reprodutivo de éguas e garanhões, enquanto que as características quantitativas de desempenho reprodutivo não são utilizadas como critérios para seleção de garanhões (AMANN et al., 2002).

Em produção animal, a predição do potencial de fertilidade do macho é importante, contudo, em equinos, os exames tradicionais de avaliação da qualidade do esperma falham em detectar casos de subfertilidade e/ou infertilidade. Os parâmetros seminais utilizados na rotina laboratorial para prever a fertilidade potencial de um garanhão têm um valor preditivo limitado na medida em que falham na detecção de casos de sub-fertilidade ou mesmo infertilidade (GAMBOA, 2011).

As modernas técnicas de reprodução possibilitam melhorar a fertilidade, no entanto, não podemos esquecer nem da fonte genética nem da herança epigenética de algumas situações de infertilidade sob pena de se comprometer a capacidade de gerar descendência nas gerações subsequentes (GAMBOA, 2011).

O conhecimento de genes específicos do espermatozoide de humanos já está bem documentado (LAMBARD et al., 2004), enquanto poucos estudos estão disponíveis para equinos (CHOWDHARY et al., 2008). A descoberta de genes específicos relacionados à fertilidade de garanhões é uma necessidade para a indústria do cavalo.

2.3 Espermatozoide

Os mamíferos são bastante eficientes quanto à produção de espermatozoides, gerando grandes quantidades a partir de uma população renovável de células e tendo por principal objetivo a transmissão do genoma paterno ao oócito. Todo o processo acontece dentro dos túbulos seminíferos e é bastante controlado, tanto em termos de tempo quanto de espaço. O DNA dos espermatozoides está inicialmente associado às histonas, que são gradualmente substituídas por protaminas durante a espermiogênese mediante o auxílio de proteínas de transição (GAUCHER et al., 2010). Estes acontecimentos resultam

numa célula altamente diferenciada, funcionalmente e estruturalmente capaz de se combinar com um oócito e iniciar o processo que dá origem à geração seguinte (FAWCETT, 1975).

Os espermatozoides são constituídos por cabeça e cauda, que por sua vez é subdividida em três peças: intermediária, principal e terminal, sendo recobertos pela membrana plasmática. A cabeça do Espermatozoide é formada pelo acrossoma, lâmina pós-acrossomal e núcleo. No núcleo, os dois terços anteriores são sobrepostos pelo acrossoma, que formam uma vesícula especializada originada do complexo de Golgi, uma membrana de duas camadas que contém enzimas hidrolíticas essenciais para a penetração do Espermatozoide no oócito. O núcleo preenche a maior parte da cabeça do Espermatozoide e é onde fica armazenado o material genético em formato de DNA altamente condensado e contido por dupla camada nuclear. O espaço entre a cabeça e o pescoço na célula espermática é bem definido por um anel, este é o local de fixação da membrana plasmática com o envelope nuclear na base da cabeça (BRITO, 2007).

Na bainha mitocondrial se localiza a peça intermediária que contém as mitocôndrias, responsáveis pela produção de ATP através de fosforilação oxidativa, cuja função é a de suprimento energético para os movimentos flagelares (COSSON, 1996). Desta forma, o ATP é importante, entre outros fatores, no processo de manutenção da bomba de Na^+ e K^+ , responsável pela regulação química e pelo transporte de gradientes eletrolíticos. Assim, a integridade funcional das mitocôndrias é um fator importante na sobrevivência da célula espermática durante o trajeto pelo trato reprodutivo da fêmea e na aplicação das técnicas reprodutivas (SILVA e GADELLA, 2006).

A membrana plasmática é constituída por bicamada lipídica contendo proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em composição fluída. Esses componentes permanecem agregados às regiões específicas da membrana, sendo essas: cabeça, peça intermediária e o flagelo (GADELLA e HARRISON, 2000). Desta maneira, a integridade da membrana se torna essencial para o metabolismo normal do espermatozoide, capacitação e reação acrossômica. A reação acrossomal, resultante da liberação

e ativação das enzimas acrossomais, é ativada pela ligação do Espermatozoide com a zona pelúcida. A penetração do mesmo na zona pelúcida é facilitada por esse processo associado com a hiperativação da motilidade. Desta maneira, a fertilização só ocorrerá caso o acrossoma permaneça intacto durante todo trajeto espermático pelo trato reprodutor feminino até o momento final da ligação com a zona pelúcida (SILVA e GADELLA, 2006).

A membrana espermática é de estrutura assimétrica, e sua bicamada lipídica é composta por faces interna e externa. Seus diferentes componentes possuem afinidades específicas com cada região recoberta por sítios de ligação (GWATHMEY et al., 2006). Desta forma, cada região da membrana plasmática é considerada como domínio de funções específicas. Na região da cabeça do espermatozoide ela exerce função de interagir com o oócito; enquanto que na região que recobre a peça intermediária estão localizadas as mitocôndrias envolvidas na produção de energia e na região do flagelo ela está envolvida na motilidade (FLESCHE e GADELLA, 2000).

Acreditou-se durante muito tempo que o genoma masculino fosse o único material introduzido no citoplasma do oócito que detinha papel determinante no processo de fecundação. A descoberta de que os espermatozoides introduzem também centríolos (SIMERLY et al., 1995), fatores solúveis que ativam o oócito (SAUNDERS et al., 2002), e RNAs (OSTERMEIER et al., 2004) mudou essa percepção. O estudo do RNA de espermatozoides teve seu início nos primeiros experimentos que buscavam entender o fluxo das informações genéticas nessas células. Durante a condensação e alongação, a maquinaria transcricional é desligada e a maior parte do citoplasma das espermátides redondas é perdida e fagocitada pelas células de Sertoli. Acreditava-se que o restante não fosse capaz de suportar a tradução de mRNA (MILLER e OSTERMEIER, 2006).

De forma semelhante, também existem relatos da presença de RNA em espermatozoides bovinos. Além disso, a comparação entre espermatozoides obtidos de animais de alta e baixa fertilidade mostrou que tais grupos possuem um transcriptoma diferente, levando a acreditar que esses RNAs que foram

diferencialmente expressos estariam de alguma forma, correlacionados à fertilidade (BISSONNETTE et al., 2009; FEUGANG et al., 2010).

2.4 Fecundação

A fecundação ocorre quando há fusão do oócito com o espermatozoide. É necessário que ocorra a migração espermática entre as células do cumulus oophorus, a união da cabeça do espermatozoide à zona pelúcida e em seguida a penetração do espermatozoide por uma abertura através da zona pelúcida para atingir a membrana vitelínica e, por último, a fusão dos gametas (HAFEZ e HAFEZ, 2004). No momento da ovulação ocorre a liberação do oócito maturado, o qual foi submetido a transformações durante o desenvolvimento folicular, como a formação da zona pelúcida e a retomada e finalização da primeira divisão meiótica, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, em preparo para a fecundação. A placa metafásica marca o início da segunda divisão meiótica, porém a meiose não pode continuar até que ocorra a penetração do espermatozoide no oócito (GINTHER, 1992).

Para atingir a capacidade de fecundação os espermatozoides passam por várias modificações sequenciais incluindo a maturação, capacitação e a reação do acrossoma. Os componentes de sua superfície são modificados ou removidos pelas secreções do trato genital feminino, desestabilizando a bicamada fosfolipídica e permitindo a ativação do acrossoma. A capacitação desencadeia a reação acrossomal que envolve a fusão da membrana plasmática do espermatozoide com a membrana externa do acrossoma, seguida por uma extensa vesiculação sobre o segmento anterior do acrossoma. Essa reação promove a liberação de enzimas hidrolíticas, como hialuronidase e acrosina que são necessárias para a penetração no oócito (HAFEZ e HAFEZ, 2004). A união da cabeça do espermatozoide à zona pelúcida é regida por receptores espermáticos específicos na sua superfície. A zona pelúcida é sintetizada pelo oócito em maturação, sendo sua matriz extracelular constituída por glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 e ZP3, presentes em todas as espécies de mamíferos. As

ZP1 e ZP2 são glicoproteínas estruturais, enquanto a ZP3 age como receptor espermático (HERRLER e BEIER, 2000). Apenas espermatozoides com acrossomas intactos podem se ligar à ZP3. A ligação da cabeça espermática à ZP3 permite interações com outras zonas competentes que estimulam a ativação do acrossoma, liberando enzimas que digerem uma abertura através da zona pelúcida para atingir a membrana vitelínica (KLINE, 2002). A região equatorial da cabeça espermática liga-se à membrana vitelínica estimulando a retomada da segunda divisão meiótica, liberando o segundo corpúsculo polar (GINTHER, 1992; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O início da fecundação é um processo controlado, rigorosamente dependente da integridade nuclear e estrutural do oócito maturado e da penetração pelo espermatozoide. A fecundação induz uma série de oscilações (ondas) intracelulares de Ca^{+2} que promovem alterações citoplasmáticas e nucleares do oócito, essenciais para o início da embriogênese. Dentre as principais funções destas elevações periódicas do íon Ca^{+2} estão: a exocitose dos grânulos corticais, a ativação oocitária e a liberação do segundo corpúsculo polar, assim completando a segunda divisão meiótica e realizando a singamia e a preparação para a primeira clivagem embrionária. Estas ondas de Ca^{+2} no oócito são originadas dos estoques intracelulares, localizados no retículo endoplasmático. No momento da penetração pelo espermatozoide, uma cascata de eventos se desencadeia, culminando com a formação do inositol trifosfato (IP3) que induzirá a liberação de Ca^{+2} (JONES et al., 1998).

No primeiro pico, a onda se inicia no sítio da penetração do espermatozoide no oócito e migra, pelo citoplasma, para o pólo oposto. Já nos demais ciclos, as ondas se iniciam no córtex do oócito no hemisfério oposto ao fuso da meiose, em seguida, propagando-se para todo o citoplasma. O aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} é pulsátil e periódico, pois o mesmo, em altas concentrações, por longos períodos de tempo, é citotóxico e prejudica a organização dos fusos, afetando a formação dos pronúcleos e conseqüentemente a clivagem. Os picos de Ca^{+2} livre são importantes tanto na ativação do oócito quanto no desenvolvimento embrionário normal (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994).

2.5 Expressão Gênica na Reprodução Equina

A reprodução é um dos principais aspectos na criação de equinos. Estudos foram realizados buscando correlação entre fatores ambientais, comportamentais e fisiológicos com a fertilidade de equinos. No entanto, pouco se sabe sobre os fatores genéticos que atuam na fertilidade (HINRICHS, 2013). Atualmente, os estudos relacionados à genômica aplicada à reprodução equina têm focado na fertilidade de garanhões (GIESECKE et al., 2010).

A seleção de garanhões é baseada na genética, desempenho e conformação. Claramente, a saúde reprodutiva do animal não é inserida nesta seleção. Os garanhões representam 50% da equação da reprodução e a indústria do cavalo é repleta de garanhões com nível de fertilidade indesejável (VARNER et al., 2008). Dentre os fatores que podem alterar os índices reprodutivos, a qualidade seminal assume um efeito considerável. No entanto, os testes laboratoriais de rotina, aplicados na avaliação da qualidade do sêmen, por muitas vezes não são capazes de determinar o potencial de fertilidade dos reprodutores. Diversos estudos sugerem que componentes moleculares dos espermatozoides, ou do meio que os cercam, podem influenciar sua capacidade fecundante (MOURA et al., 2011).

O desenvolvimento de mapas genéticos de alta resolução é uma ferramenta valiosa para o isolamento de genes e marcadores associados com características economicamente importantes, como a reprodução. Além disso, permitem que os pesquisadores desenvolvam testes específicos de diagnóstico e elaborem medidas preventivas de manejo e tratamento (BROSNAHAN et al. 2010).

Modernas técnicas de Biologia Molecular vem sendo utilizadas em estudos envolvendo a determinação da relação entre a ocorrência de variações no DNA com características fenotípicas, contribuindo para abordagens preventivas na medicina humana e animal. Em animais, o interesse consiste no aprimoramento e seleção genética criteriosa, especialmente na criação de equinos, onde cada animal é valorizado individualmente (LEON et al., 2013).

MORTENSEN et al. (2010) estudaram a expressão gênica de HSP70 em blastocistos equinos após a exposição dos oócitos a altas temperaturas *in vitro* e *in vivo*, observando que embriões produzidos *in vitro* apresentaram maiores níveis de mRNA de HSP70, sugerindo que esta alteração no padrão de expressão gênica seja em resposta à agressão ambiental sofrida *in vitro*.

Um estudo foi desenvolvido com o objetivo de determinar a expressão de genes ligados à viabilidade celular e apoptose em complexos cúmulus oócito antes e após a vitrificação. Este estudo concluiu que os resultados observados na expressão do gene BMP15 sugerem a permanência da viabilidade celular em complexos cúmulus oócito equinos, porém, os resultados observados na expressão do gene BAX sugerem a ativação do processo de apoptose nas células expostas ao processo de vitrificação (POLENZ et al., 2016).

Os genes MMP-1 e MMP-2 foram apontados como genes importantes em todo o processo de remodelamento tecidual, que ocorre durante o desenvolvimento folicular em éguas e que o receptor de hormônio luteinizante presente no ovário e no epitélio superficial ovariano pode ter um papel fundamental para o mecanismo de sinalização para a produção das metaloproteinases, visto que os ovários que apresentaram maiores concentrações de receptor de hormônio luteinizante tiveram maior expressão gênica das MMPs (BASTOS et al., 2014).

2.6 Gene PLC ζ

Em todas as espécies de mamíferos estudadas até agora, os resultados de fertilização *in vitro* demonstram que o gene PLC ζ é responsável pelo aumento de Ca⁺² no momento da fecundação para induzir a ativação do oócito, divisão meiótica e formação do embrião (SYLVIA et al., 2012), pois no momento da fecundação o espermatozoide é responsável pelo desencadeamento de uma série de oscilações de Ca⁺² intracelular. Essas oscilações são necessárias para ativação de oócitos e desenvolvimento embrionário (GRADIL et al., 2006). No equino o gene é expresso sob a cabeça do espermatozoide e na região da cauda (SYLVIA et al., 2012).

Para o mecanismo de liberação do Ca^{+2} no oócito, acredita-se que a ligação do espermatozoide à membrana plasmática do oócito ative os receptores de proteínas G (sítios de ligação do GTP), os quais promovem ativação da cascata de fosfoinosítídeos. As fosfolipase C (PLC) induzem a hidrólise do fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PI4,5P2), formando dois mediadores intracelulares: o IP3 , que se funde no citoplasma e libera picos de Ca^{+2} , e o diacilglicerol (DAG), que permanece na membrana plasmática e auxilia na ativação da enzima proteína quinase C (ALBERTS et al., 2002). O IP3 se difunde no citoplasma rapidamente, reage na membrana do retículo endoplasmático e abre seus canais dependentes, liberando o Ca^{+2} estocado. Para cessar a liberação de Ca^{+2} , o IP3 é desativado (defosforilado para IP2 ou fosforilado para IP4) e o Ca^{+2} que entrou no citosol é bombeado para o meio extracelular ou retorna para o retículo endoplasmático (ALBERTS et al., 2002; BOOTMAN et al., 2001). Há, também, a participação dos receptores de rianodina do retículo endoplasmático que mantêm aberto os canais de Ca^{+2} (WHITE e YUE, 1996).

A partir da observação de que a atividade da PLC presente nos estratos espermáticos induziu oscilações do Ca^{+2} intracelular em estratos de oócitos de ouriço-do-mar gerando IP3 (JONES et al., 1998), foi sugerido que a proteína indutora de oscilações do Ca^{+2} intracelular seria uma isoforma da PLC. Desta forma, foi averiguada uma possível candidata entre as PLC previamente identificadas em espermatozoides (WU et al. 2001). Entretanto, as isoformas recombinantes $\text{PCL}\beta 1$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\text{PCL}\delta 4$ falharam em desencadear a liberação do Ca^{+2} intracelular (JONES et al., 2000) ou a induziram apenas quando presente em altas concentrações no oócito (MEHLMANN et al., 2001).

Espermatozoides de camundongos com deficiência na isoforma $\text{PCL}\zeta 4$ falharam na fertilização, mas não na indução das oscilações de Ca^{+2} (WU et al., 2001). Diante do exposto, foi proposta a existência de uma nova isoforma da PLC. Neste contexto, o exame de uma sequência EST (*expressed sequence tag*) derivada de testículos de camundongo e humano possibilitou o isolamento e caracterização de um DNA complementar, o qual transcreve uma proteína espermática nomeada de $\text{PCL}\zeta$ (SAUNDERS et al., 2002). Esta isoforma da PCL é

única no que diz respeito ao fato dela ser uma proteína específica do espermatozoide.

Estudos posteriores sobre as características estruturais e funcionais da PLC ζ tornaram essa nova proteína a melhor candidata a proteína indutora de oscilações de Ca⁺². Dentre esses achados podemos destacar que a injeção de RNA complementar de PLC ζ induziu uma série de oscilações de Ca⁺² prolongadas em oócitos de camundongo com amplitude e frequência dose dependentes e consequente ativação oocitária (SAUNDERS et al., 2002). Da mesma forma, a injeção da proteína PLC ζ recombinante também demonstrou gerar oscilações de Ca⁺² em camundongos (YODA et al., 2004). Outro achado importante é o fato de que a quantidade estimada de PLC ζ determinada por anticorpos, presente em um único Espermatozoide de camundongo (SAUNDERS et al., 2002) está dentro do limite da concentração de PLC ζ capaz de desencadear as oscilações de Ca⁺² no oócito (YODA et al., 2004).

A PLC ζ já foi encontrada em estrato espermático solúvel em camundongo, humano, suíno, bovinos, felinos e equinos (SAUNDERS et al., 2002; KUROKAWA et al., 2005; YOON e FISSORE, 2007; VILLAVARDE 2010; SYLVIA et al., 2012).

Pesquisadores investigaram a associação e expressão de PLC ζ e COX-2 como candidatos a genes para verificação da qualidade do sêmen e fertilidade em suínos. Estes chegaram à conclusão que a maior expressão de COX-2 pode contribuir para a má qualidade espermática e levar a infertilidade. Por outro lado, comparativamente, a expressão mais elevada de PLC ζ pode ser benéfica para a qualidade do sêmen uma vez que a expressão desta proteína é maior em suínos com melhor qualidade do seminal (KAEWMALA et al., 2012).

Nos seres humanos, o fator de infertilidade masculina associado à incapacidade de expressar a proteína fosfolipase C zeta corresponde de 35% a 40% de todos os casos encaminhados para clínicas de fertilidade. Esses homens produzem sêmen "normal", embora aparentemente sejam incapazes de induzir a ativação do oócito após a fertilização (SYLVIA et al., 2012).

Defeitos na expressão de PLC ζ em homens inférteis podem ser resolvidos por meio de injeção intracitoplasmática de espermatozoides para ativação de

oócitos: tais como estímulos elétricos ou Ca^{+2} ionóforo, informação que enfatiza a importância que PLC ζ carrega no contexto da fertilidade do macho (GRADIL et al., 2006).

Outro estudo em humanos relacionou a expressão de PLC ζ com o efeito da seleção de espermatozoides móveis. Uma porcentagem maior de espermatozoides era desprovida de PLC ζ quando nenhuma seleção de espermatozoides móveis foi realizada (HEINDRYCK et al, 2012).

Conseqüentemente, há muito interesse na implantação de ensaios de PLC ζ sensíveis como testes de prognóstico e diagnóstico para homens inférteis, como uma forma alternativa de terapia, pois a associação entre PLC ζ e fertilidade masculina é cada vez mais reconhecida (AMDANI et al., 2015).

Foi estudada a associação genômica para valores genéticos estimados do componente paternal de garanhões Hanoverianos relacionado com a taxa de prenhez por ciclo estral das fêmeas. Um total de 228 garanhões Hanoverianos foram genotipados usando o Equine SNP50 Beadchip. Em conclusão, os polimorfismos não codificantes dentro PLC ζ foram identificados como conferindo a fertilidade do garanhão (SCHRIMPF et al., 2014). Outro estudo utilizando seis garanhões subférteis com taxa de prenhez inferiores a 30%, demonstrou quantidades inferiores de PLC ζ em cinco garanhões quando comparada com garanhões controle (WALAA et al., 2012).

Foram realizadas clonagens para a caracterização da PLC ζ em espermatozoides de equinos com o objetivo de caracterizar a atividade extracelular e intracelular de Ca^{+2} e a expressão da PLC ζ no espermatozoide equino. Microinjeções do gene foram realizadas em oócitos equinos, onde foram observadas aumento das ondas de Ca^{+2} (SYLVIA et al., 2012).

No momento, pouco se sabe sobre a potencial ligação entre a deficiência de PLC ζ e subfertilidade ou infertilidade no garanhão. Embora a diminuição dos níveis de expressão de PLC ζ tenha sido previamente relatada em sêmen de garanhões inférteis (GRADIL et al., 2006). No equino o gene é expresso sob a cabeça do espermatozoide e na região da cauda (SYLVIA et al., 2012).

2.7 Gene WBP2NL

Recentemente, o gene da proteína 2 de ligação ao domínio WW N-terminal Like (WBP2NL), foi proposta como uma via alternativa ou complementar para a ativação de oócitos com base em achados que demonstraram a injeção de oscilações Ca^{2+} induzidas pela proteína de ligação (PAWP) recombinante comparáveis às da fecundação (AARABI, et al., 2014). No entanto, para o nosso conhecimento, a expressão de WBP2NL não foi descrita em espermatozoides de garanhões.

A PAWP expressa pelo gene WBP2NL é uma proteína espermática específica encontrada na região pós-acrosomal da matriz perinuclear, subjacente à membrana plasmática na cabeça do Espermatozoide (WU et al., 2007). Até o momento apenas um gene derivado da célula espermática, o PLC ζ teve sua capacidade como ativador do oócito comprovada (SAUNDERS et al., 2002). No entanto, foi sugerido que a proteína de espermatozoide PAWP é o agente utilizado pelo espermatozoide para ativar o desenvolvimento do embrião em mamíferos (WU et al., 2007; AARABI et al., 2010).

Em ratos, a proteína de PAWP não conseguiu clivar o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato *in vitro* e não causou nenhuma liberação de Ca^{2+} detectável em oócitos. Entretanto, apesar de não ser observada a indução de Ca^{+2} intracelular para ativação dos oócitos, os valores expressos de PAWP foram semelhantes aos expressos de PLC ζ em roedores. Estes dados sugerem que o PAWP derivado de Espermatozoide não está envolvido no desencadeamento das oscilações de Ca^{2+} na fertilização em oócito de mamíferos (NOMIKOS et al., 2012).

Estudos em seres humanos e em ratos descreveram a falta de correlação entre expressão gênica e fertilidade, pois não observaram nenhuma correlação entre a expressão deste gene e a qualidade do sêmen (FREOUR et al., 2017).

2.8 Gene TNF- α

O TNF- α é uma proteína transmembrana tipo 2 com uma terminação amino intracelular. Possui potencial de sinalização tanto como uma proteína integrada à

membrana, ou como uma citocina solúvel liberada após clivagem proteolítica. Existem dois receptores para o TNF: TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1), encontrado na maioria das células do corpo, e o TNFR2 (tumor necrosis factor receptor 2), expresso principalmente em células hematopoiéticas (HEHLGANS e PFEFFER, 2005).

As citocinas são um grupo de proteínas de baixo peso molecular que atuam na intercomunicação celular (HAMBLIN, 1993). As citocinas são liberadas em decorrência de diferentes estímulos e interagem com os seus receptores regulando a função celular (ABBAS et al., 1998), além de estarem intimamente relacionadas ao processo inflamatório. O TNF- α foi descoberto em 1975 (CARSWELL et al., 1975), sendo considerada uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do corpo.

O TNF- α foi isolado primeiramente como uma citocina anticâncer, exercendo papel terapêutico quando expresso localmente pelas células do sistema imune. No entanto, quando desregulado e secretado na circulação, pode mediar uma série de doenças, inclusive câncer (AGGARWAI et al., 2003). Estímulos patogênicos induzem a expressão de TNF- α que, por sua vez, induz outros mediadores e proteases responsáveis pela resposta inflamatória. É produzido também por tumores, podendo agir como um promotor tumoral endógeno (BALKWILL e MANTOVANI 2001).

Várias citocinas pró-inflamatórias estão presentes no plasma seminal, porém, seu efeito na motilidade e viabilidade espermática ainda não está claro. Alguns estudos foram realizados com TNF- α e descreveram uma redução significativa na motilidade progressiva quando em concentrações mais elevadas de maneira dependente da dose e do tempo. Este resultado indica que TNF- α têm efeito sobre a função espermática. Este efeito é possivelmente mediado através de um aumento na produção de óxido nítrico (PERDICHIZZI et al., 2007). As concentrações crescentes de TNF- α levaram a um aumento das células não viáveis (SAKAMOTO et al., 2003).

Citocinas, especialmente o fator de necrose TNF- α , estão presentes no espermatozoide humano, mas seus efeitos sobre a qualidade do sêmen ainda não estão esclarecidos. Infliximab e adalimumab são agentes biológicos da classe anti-TNF- α que demonstraram eficácia na indução e manutenção da remissão para pacientes com doença intestinal crônica. Estudos realizados em homens tratados com infliximab mostraram redução na motilidade espermática e morfologia alterada. Se esses resultados levam à deterioração da fertilidade não foi formalmente analisado (VALER et al., 2017).

2.9 IDENTIFICAÇÃO GÊNICA

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das técnicas mais dominantes na área de biologia molecular. Desenvolvida na década de 1980 por Kary Mullis, é um método sensível que possibilita a amplificação de trechos específicos de DNA para comparação de diferentes amostras e verificar a concentração da molécula, sem necessidade de um organismo vivo (VALASEK E REPA, 2005). A metodologia de PCR em tempo real quantitativo (quantitative Polymerase Chain Reaction), conhecida pela sigla qPCR, é uma técnica de biologia molecular que permite a amplificação *in vitro* de DNA (deoxyribonucleic acid) de forma rápida. Quando a sequência alvo é composta por RNA, a reação de qPCR é precedida pela transcrição reversa (*Reverse Transcriptase*), na qual o RNA será convertido em DNA complementar (cDNA). O primeiro ciclo da síntese consiste na transcrição reversa do RNA em cDNA com o auxílio de oligonucleotídeos iniciadores (PRIMERS) (WONG e MEDRANO, 2005).

A análise por qPCR é constituída por três etapas: a desnaturação que consiste na separação da fita dupla de DNA em dois filamentos devido a altas temperaturas, que são capazes de degradar as pontes de hidrogênio que unem essas fitas. A segunda etapa ou pareamento acontece no momento em que os oligonucleotídeos iniciadores reconhecem as extremidades da sequência-alvo. O início da sequência do DNA é reconhecido pelo oligonucleotídeo que se liga com a sequência complementar. Após essa etapa acontece a polimerização ou extensão, realizada pela enzima DNA polimerase (derivada da bactéria termofílica *Thermus*

aquaticus, 20 denominada de Taq), que adiciona nucleotídeos à cadeia crescente de DNA. O diferencial da metodologia de qPCR é a detecção do cDNA amplificado em tempo real a cada ciclo de amplificação, o que é dado pela adição de um oligonucleotídeo marcado com um fluoróforo (sonda) que pareia-se ao DNA-alvo (MACKAY et al.,2002).

Após a realização da quantificação, as médias são comparadas estatisticamente para se avaliar a existência de possíveis diferenças significativas entre eles. Para possibilitar uma melhor análise estatística, gerando resultados significativos, recomendam a realização de três repetições independentes para cada tratamento e para cada amostra biológica são comumente utilizadas três réplicas, tanto para o gene alvo como para o gene referência (LOBO, 2014).

3. ARTIGO

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO NA BIOLOGY OF REPRODUCTION

EXPRESSÃO DOS GENES PLC ζ , WPB2NL E TNF- α NO ESPERMATOZOIDE E SUAS RELAÇÕES COM A QUALIDADE SEMINAL E FERTILIDADE EM EQUINOS

Verônica La Cruz Bueno^{1,2*}, Henrique Boll de Araujo Bastos², Luiz Augusto Centeno², Nélon Alexandre Kretzmann Filho², Rodrigo Costa Mattos², Sandra Fiala Rechsteiner^{1,2}.

¹HISTOREP - Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas-RS, Brasil;

²Programa de Pós-graduação em Medicina Animal: equinos - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil.

* **Correspondence:** Verônica La Cruz Bueno, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil, email: veronicalacruzbuono@hotmail.com or Tel: 55 51985808081

Grant Support: Este trabalho foi apoiado pela ABCCC, Capes and FAURGS.

RESUMO

Em mamíferos, o gene PLC ζ é responsável pelo aumento de cálcio (Ca²⁺) no momento da fecundação do oócito. Essas oscilações de Ca²⁺ são essenciais para o desenvolvimento inicial do embrião. O gene WPB2NL está sendo estudado por sua possível capacidade de iniciar a ativação de oócitos durante a fecundação. O gene TNF- α é uma citocina pró-inflamatória encontrada no plasma seminal, porém, seu efeito na motilidade e viabilidade espermática ainda não está claro. O objetivo desse trabalho foi avaliar a correlação da expressão gênica do PLC ζ , WPB2NL e TNF- α no espermatozoide com a qualidade seminal e fertilidade em garanhões. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer. As demais análises microscópicas foram realizadas através do sistema Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision® com leja. A análise da integridade física da membrana foi realizada utilizando-se sondas fluorescentes. A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico,

para avaliação da patologia espermática, foi realizado esfregaço e corado com kit panotico®. Foram utilizados ejaculados de 40 garanhões da raça Crioula, de propriedades próximas a Porto Alegre, RS, Brasil, com histórico reprodutivo conhecido. Para análise estatística foi utilizada correlação de Pearson através do programa Minitab, com nível de significância de $p < 0,05$. Foi encontrada correlação positiva moderada do gene PCL ζ com funcionalidade de membrana (0,449), integridade de membrana (0,438), taxa de concepção (0,454), motilidade total (0,486), motilidade progressiva (0,413) e correlação negativa com motilidade lenta (-0,427) e espermatozoides imóveis (-0,405). Não foram encontradas correlações dos genes WBP2NL e TNF- α nas análises realizadas, demonstrando que a expressão gênica de ambos não deve ser utilizada como marcador de qualidade seminal e fertilidade em garanhões. Concluímos que a expressão do gene PCL ζ no espermatozoide equino pode desempenhar diversos papéis na fisiologia do sêmen, assim pode tornar-se um marcador para a qualidade seminal e fertilidade do garanhão.

Palavras-chave: Garanhão, expressão gênica, taxa de prenhez e parâmetros seminais.

INTRODUÇÃO

Diferente de outras espécies de interesse zootécnico, os garanhões são selecionados pelo desempenho esportivo e sua genealogia (VARNER *et al.*, 2008). O aspecto reprodutivo na maioria das vezes não é levado em consideração (HARALD e OTTMAR, 2012). A biotecnologia da reprodução se coloca como uma importante ferramenta a serviço da equideocultura mundial, como instrumento direto do melhoramento genético. Muitas dessas biotecnologias são utilizadas para aumentar a produção de potros e contribuem com pesquisadores e profissionais que trabalham com reprodução equina (HINRICHS, 2013).

Em todas as espécies animais estudadas, a ativação do oócito envolve o aumento da concentração de cálcio (Ca^{2+}) intracelular (STRICKER, 1999). O debate científico sobre o mecanismo preciso de como um único espermatozoide provoca a geração de oscilações de Ca^{2+} para ativação do oócito persiste ao longo de várias décadas. Muitas teorias foram propostas para explicar os mecanismos que desencadeiam a ativação do oócito durante a fecundação de mamíferos (NOMIKOS *et al.*, 2012).

Até o momento apenas um gene derivado da célula espermática, o que o gene Fosfolipase C zeta (PLC ζ) teve sua capacidade como ativador do oócito comprovada (SAUNDERS *et al.*, 2002). Os resultados de fertilização *in vitro*, demonstram que o gene PLC ζ é responsável pelo aumento de Ca²⁺ no momento da fecundação do oócito (GAT e ORVIETO, 2017). O estudo da PLC ζ pode representar um método endógeno para tratar clinicamente os casos de falha de ativação do oócito. A falha de ativação do oócito é clinicamente tratada por métodos de ativação de oócitos, predominantemente por aplicação de ionóforos de Ca²⁺, resultando em prenhez bem sucedida (NOMIKOS *et al.*, 2017).

O gene da proteína 2 de ligação ao domínio WW N-terminal Like (WBP2NL), foi apontado como um possível ativador das oscilações de Ca²⁺ durante a ativação do oócito no processo de fecundação (WU *et al.*, 2007; AARABI *et al.*, 2014; ESCOFFIER *et al.*, 2016). A correlação do gene WBP2NL com resultados de fertilização *in vitro* só foram relatadas duas vezes (AARABI *et al.*, 2014; TAVALAEE e NASR-ESFAHANI, 2016).

O Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) é uma citocina com importantes funções conhecidas na homeostase e na patogênese de doenças. Em condições inflamatórias, maiores concentrações de TNF- α são detectadas em líquido seminal e efeitos adversos na espermatogênese foram relatados, tais como uma redução na motilidade espermática, viabilidade e parâmetros de movimento (LAMPÍÃO, *et al.*, 2008).

A maioria dos mRNAs armazenados nos espermatozoides são produzidos durante os estágios iniciais da espermatogênese e permanecem presentes no espermatozoide até a fecundação (DADOUNE, 2009). Existem poucos trabalhos que verificaram a expressão gênica na célula espermática em mamíferos. O objetivo desse trabalho foi investigar a expressão dos genes PLC ζ , WBP2NL e TNF- α no espermatozoide e suas relações com a qualidade e fertilidade em equinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 40 garanhões da raça Crioula, com idade entre 4 a 18 anos, com peso entre 450 a 500 Kg, alimentados com concentrado e feno de alfafa diariamente, com água e sal mineral. Os garanhões, dos quais foi coletado um ejaculado, eram provenientes

de centrais de reprodução próximas a Porto Alegre (30°S, 51°W), no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Experimento

Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de ética e experimentação animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pelotas com número 2753-2018.

Taxa de Fertilidade

A fertilidade dos garanhões utilizados foi avaliada pelo histórico reprodutivo dos animais fornecido pelas centrais de reprodução que alojavam os garanhões e no número de embriões recuperados/prenhez, de forma que para cada garanhão foram consideradas 30 inseminações de diferentes éguas. O diagnóstico de prenhez foi realizado através de ultrassonografia transretal aos 14 dias após inseminação artificial e repetido aos 30 dias. Foram consideradas as últimas duas estações reprodutivas. A taxa de prenhez variou entre 20% a 90%.

Análise de sêmen

Para a coleta do sêmen, utilizou-se uma vagina artificial modelo Hannover com lubrificação e pré-aquecimento (42°C - 45°C). Imediatamente após a coleta o ejaculado foi filtrado, depositado em um tubo Falcon e encaminhado para o Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, acondicionado em caixa térmica em temperatura ambiente, com limite máximo de transporte de duas horas. Um ml de cada ejaculado foi reservado para as análises do sêmen fresco e o restante foi armazenado para expressão gênica. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer (BRITO, 2007). As avaliações de Motilidade Total (%) (MT); Motilidade Progressiva (%) (MP); Motilidade Rápida (%) (MR), Motilidade Lentos

(%) (ML), Motilidade Local (%) (MC) Velocidade de Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$); Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$); Velocidade Curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$); Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, μm); Frequência de Batimentos (BCF, Hz); Retilinearidade (STR, %) (VSL/VAP); Linearidade (LIN, %) (VSL/VCL); Velocidade Rápida (VAP,%) foram realizadas através do sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis computadorizado, Tiefenbach, Alemanha, AndroVision®, Minitube).

Para a análise da integridade física da membrana plasmática, 400 μl de sêmen foram incubados com 3 μl de iodeto de propídio (PI) e 2 μl de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), a 37°C por oito minutos. A amostra foi avaliada por microscopia de epifluorescência, em aumento de 1000 x, sob imersão. Um total de 100 espermatozoides por amostra foram avaliados. Foram considerados íntegros aqueles espermatozoides que apresentaram coloração verde (GARNER et al., 1986).

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico. Para tanto, 200 μL de água destilada foram adicionados a 100 μL de sêmen (osmolaridade: 100mOsmol kg⁻¹). As amostras foram incubadas a 37°C por oito minutos, posteriormente, amostras de sêmen foram analisadas em microscópio de contraste de fase em aumento de 400x. Foram avaliados 100 espermatozoides por amostra e foram considerados íntegros os Espermatozoides em que houve um enrolamento da cauda (LAGARES *et al.* 1998).

Para avaliação da patologia espermática foi utilizado kit panóptico® (Laborclin), a lâmina com o esfregaço de sêmen foi mergulhada por 10 segundos nos corantes e imediatamente após a secagem, a lâmina foi levada ao microscópio de contraste de fase em objetiva de imersão (1000x) para análise, foram contadas 100 células espermáticas de cada amostra (CBRA, 2013).

q-PCR

O restante do ejaculado foi dividido em tubos Falcon de 15ml e centrifugado a 400 x g durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* restante no fundo do tubo Falcon foi ressuscitado em meio BPS e centrifugado novamente, esse procedimento foi repetido três vezes. O *pellet* restante após as

centrifugações foi novamente ressuspendido em dois ml de RNAlater® (Life Technologies) em criotubo livre de RNA e armazenado em freezer a -80°C para posterior análise. No total, foram armazenados 750×10^6 espermatozoides de cada garanhão. A extração do mRNA foi realizada através do Kit Comercial Trizol® (Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante. A conversão para cDNA foi realizada através de kit comercial SuperScript III Reverse Transcriptase® (Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante. A verificação da expressão dos genes PCLζ, WBP2NL e TNF-α na célula espermática foi realizada através da técnica de qPCR. A amplificação do cDNA foi realizada por meio de primer desenhado especificamente para um amplicon (sequência de interesse) utilizando o fluoróforo SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific).

A expressão dos genes PCLζ e WBP2NL foi analisada com iniciadores projetados no site GenBank (GENBANK, 05/2017) e a expressão do gene TNF-α foi analisada com iniciadores descritos anteriormente (Riihimäki *et al.*, 2008). A sequência de RNA utilizada para desenhar os primers foi verificada através do blast suit (NCBI, 2018): PREDICTED: Equus caballus 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase zeta-1-like (LOC111767502), transcript variant X6, mRNA Sequence ID: XM_023643199.1; PREDICTED: Equus caballus WBP2 N-terminal like (WBP2NL), transcript variant X2, mRNASequence ID: XM_023631051.1, todos demonstraram 100% de eficiência. Os primers foram obtidos através da Integrated DNA Technologies (IDT®) e as sequências utilizadas estão citadas na Tabela 1. O perfil do programa utilizado para a amplificação foi 95°C por 10 minutos seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. A amplificação foi realizada utilizando o termociclador real-time PCR Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), sendo os dados processados pelo software integrado v2.3. Os resultados quantitativos da qPCR foram determinados usando uma curva padrão absoluta (fórmula= $10^{-(ct\ alvo - CT\ padrão)/slope}$).

Tabela 1: Sequências de iniciadores para qPCR.

Gene	Primer (5'-3')	Temperatura *
PCLζ	F:5'-AAGGATGCCGTTGTCTGGAA-3'	57°C
	R:5'-CCGGTAGTCAGAGGTAATGA-3'	
WBP2NL	F:5'-CTCAGTCAACGATCCCATGCT-3'	60°C
	R5'-:GTCCTTCCCAGCCACCATCTG-3'	
TNFα	For 5'-GCTCCAGACGGTGCTTGTG-3'	57,5°C
	Rev 5'-GCCGATCACCCCAAAGTG-3'	

F:5':Forward (extremidade 5'); R:3':Reverse (extremidade 3'); *Temperatura de anelamento utilizada.

Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o software Minitab 18 com nível de significância de $p < 0,05$. A correlação simples de Pearson foi utilizada para verificar relações entre as características estudadas. Foram consideradas correlações de média e alta intensidade as que compreendiam valores entre 0,40 a 0,60 e $> 0,60$ respectivamente.

RESULTADOS

Os resultados das correlações observadas no presente estudo, entre parâmetros seminais, taxa de concepção e expressão dos genes avaliados, estão demonstrados na Tabela 2. A expressão do gene PCL ζ apresentou correlação positiva média com a integridade física e funcional da membrana plasmática, taxa de prenhez, motilidade total, motilidade progressiva e correlação negativa média com espermatozoides lentos e imóveis. A expressão dos genes WBP2NL e TNF- α não apresentou correlação com nenhuma das variáveis avaliadas.

DISCUSSÃO

Acreditou-se durante muito tempo que o genoma masculino fosse o único material introduzido no citoplasma do oócito que detinha papel determinante no processo de fecundação. A descoberta de que os espermatozoides introduzem também centríolos

(SIMERLY *et al.*, 1995), fatores solúveis que ativam o oócito (SAUNDERS *et al.*, 2002), e RNAs (OSTERMEIER *et al.*, 2004) mudou essa percepção.

Gene Pcl ζ

O gene PCL ζ apresentou correlação positiva com a taxa de prenhez (0,454/p<0,007). Essa relação pode ser explicada pelo mecanismo de ativação do oócito. Em todas as espécies de mamíferos estudadas até agora, os resultados de fertilização *in vitro* demonstram que o gene PLC ζ é responsável pelo aumento de Ca⁺² no momento da fecundação do oócito, sendo o gatilho para divisão celular meiótica, dando origem ao embrião (SYLVIA, *et al.*, 2012), pois no momento da fecundação o espermatozoide é responsável por desencadear uma série de oscilações de Ca⁺² intracelular. Em oócitos de mamíferos, o aumento inicial de Ca⁺² é seguido de oscilações da concentração do mesmo, que são desencadeadas por um fator solúvel introduzido no ooplasma na fusão do espermatozoide com o oócito (DALE *et al.*, 1985). Essas oscilações são necessárias para ativação de oócitos e desenvolvimento embrionário (GRADIL *et al.*, 2006). No equino, o gene é expresso sob a cabeça do espermatozoide e na região da cauda (SYLVIA, *et al.*, 2012).

Para o mecanismo de liberação do Ca⁺² no oócito acredita-se que a ligação do espermatozoide à membrana plasmática ative os receptores de proteínas G (sítios de ligação do GTP), os quais promovem ativação da cascata de fosfoinosítídeos. A PLC ζ já foi encontrada em estrato espermático solúvel de camundongo, humano, suíno, felinos e equinos (SAUNDERS *et al.*, 2002; KUROKAWA *et al.*, 2005; VILLAVERDE 2010; SYLVIA *et al.*, 2012).

Dada à evidência que implica PLC ζ como agente endógeno da ativação de oócitos, parece plausível que certos tipos de infertilidade masculina ocorram por um defeito na função PLC ζ . Um estudo recente demonstrou que os espermatozoides de vários homens que não possuem PLC ζ não conseguem ativar os oócitos (YOON *et al.*, 2008).

Nos seres humanos, o fator de infertilidade masculina associado à incapacidade de expressar a proteína PLC ζ corresponde de 35% a 40% de todos os casos encaminhados para clínicas de fertilidade. Esses homens produzem sêmen "normal", embora, aparentemente,

sejam incapazes de induzir a ativação do oócito após a fertilização (WALAA et al., 2012). Um estudo de associação genômica ampla para valores genéticos estimados do componente paternal de 228 garanhões Hanoverianos (genotipados usando o Equine SNP50 Beadchip) relacionado com a taxa de prenhez por ciclo estral das fêmeas, identificou os polimorfismos não codificantes dentro do gene PLC ζ como responsáveis pela fertilidade do garanhão (SCHRIMPF et al., 2014). Seis garanhões subférteis com taxas de éguas prenhez inferiores a 30% foram estudados, e o sêmen destes expressaram quantidades inferiores de PLC ζ quando comparado com garanhões controle (SYLVIA, et al., 2012). No momento, pouco se sabe sobre a potencial ligação entre a deficiência de PLC ζ e a subfertilidade ou infertilidade no garanhão, embora a diminuição dos níveis de expressão de PLC ζ tenha sido previamente relatada em sêmen de garanhões inférteis (GRADIL, et al., 2006).

Observou-se correlação positiva da expressão de PLC ζ com a MT (0,486/p<0,014), MP (0,413/<0,008) e correlação negativa com ML (-0,427/p<0,008) e espermatozoides imóveis (-0,404/p<0,009), corroborando com achados anteriores onde a MT apresentou correlação positiva com a fertilidade em garanhões (LOVE, 2001). Algumas pesquisas demonstraram correlação positiva entre a fecundação *in vitro* e MP de espermatozoides bovinos (KATHIRAVAN et al., 2008) e correlação positiva entre a taxa de fertilidade de dromedários e MP e LIN (AL-QARAWI et al., 2002). Também foram observados efeitos positivos da MP sobre a taxa de parição de porcas e da MT sobre o número de leitões paridos (BROEKHUIJSE et al., 2012). Outro estudo em humanos relacionou a expressão de PLC ζ com o efeito da seleção de espermatozoides móveis demonstrando que uma porcentagem maior dos mesmos era desprovida de PLC ζ quando nenhuma seleção de espermatozoides móveis foi realizada (HEINDRYCK et al., 2012). O gene da PLC ζ também foi associado à qualidade espermática em suínos sendo que os animais que apresentaram melhores parâmetros espermáticos apresentaram maior expressão da PLC ζ no espermatozoide (KAEWMALA et al., 2012).

A expressão gênica do PCL ζ demonstrou correlação com integridade funcional da membrana plasmática (0,449/p<0,004) e integridade física da membrana plasmática (0,438/p<0,014). A membrana plasmática do espermatozoide exerce um importante papel na sobrevivência e nas funções da célula, incluindo o estabelecimento de gradientes iônicos, facilitando a entrada de moléculas de maior dimensão e regulando vários eventos

de sinalização celular. Por este motivo, a integridade da membrana plasmática do espermatozoide é indispensável para que ocorra a fecundação do oócito (HAMAMAH *et al.*, 1990).

Verificou-se uma correlação moderada entre funcionalidade de membrana e a expressão de RNAm para o PCL ζ . O HOST tem por princípio avaliar a integridade funcional da membrana biológica (transporte seletivo de moléculas), que apenas ocorre de maneira eficiente em células com membrana plasmática íntegra (JEYENDRAN *et al.*, 1984). A integridade funcional da membrana espermática é fundamental no processo de fecundação, esta não poderá ocorrer caso as membranas estejam bioquimicamente inativas, mesmo que estejam estruturalmente intactas (CORREA e ZAVOS, 1994).

Gene WBP2NL

O gene WBP2NL foi proposto como uma via alternativa ou complementar para a ativação de oócitos com base em achados que demonstraram a ocorrência de oscilações de Ca²⁺ induzidas pela proteína de ligação recombinante PAWP comparáveis às da fecundação (AARABI *et al.*, 2014). A PAWP, expressa pelo gene WBP2NL, é uma proteína espermática específica encontrada na região pós-acrossomal da matriz perinuclear, que está subjacente a membrana plasmática na cabeça do espermatozoide (WU *et al.*, 2007). No entanto, a expressão de WBP2NL não foi descrita anteriormente em espermatozoides de garanhões. Em nosso estudo observou-se correlação da expressão deste gene com parâmetros seminais e taxa de prenhez. Corroborando com estudos em seres humanos e em ratos descreveram a falta de correlação entre expressão gênica e fertilidade, pois não observaram nenhuma correlação entre a expressão deste gene e a qualidade do sêmen (FREOUR *et al.*, 2017).

Em ratos, a proteína PAWP não conseguiu clivar o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato *in vitro* e não causou nenhuma liberação de Ca²⁺ detectável em oócitos. Entretanto, apesar de não ser observada a indução de Ca²⁺ intracelular para ativação dos oócitos, os valores expressos de PAWP foram semelhantes aos expressos de PLC ζ em roedores. Estes dados sugerem que a proteína, derivada de espermatozoide, não está envolvida no

desencadeamento das oscilações de Ca^{2+} na fertilização de oócitos em mamíferos (NOMIKOS *et al.*, 2014).

Dois estudos apontam o WBP2NL como possível biomarcador de fertilidade, não corroborando com o presente estudo. No primeiro estudo, os autores observaram correlação positiva significativa entre o sêmen e a expressão de WBP2NL, níveis de proteína PAWP e taxa de fecundação após a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (AARABI *et al.*, 2014). No segundo estudo, avaliando WBP2NL/PAWP, indicaram que os perfis de expressão gênica eram baixos em indivíduos com globozoospermáticos e a ICSI combinada com a ativação artificial de oócitos aumentou a taxa de fecundação nesses pacientes (TAVALAEE e NASR-ESFAHANI 2016).

Gene TNF- α

No presente estudo não observou-se correlação da expressão do gene TNF- α com qualidade seminal e fertilidade em garanhões. Esta ausência de correlação pode ter ligação com a categoria de garanhões utilizada, pois as citocinas estão relacionadas a processos inflamatórios e todos os garanhões utilizados no experimento apresentavam-se hígdidos, sem nenhuma alteração clínica. O TNF- α é uma proteína transmembrana tipo 2 com uma terminação amino intracelular, possui potencial de sinalização tanto como uma proteína integrada à membrana, ou como uma citocina solúvel liberada após clivagem proteolítica. As citocinas são um grupo de proteínas de baixo peso molecular que atuam na intercomunicação celular (HAMBLIN, 1993). As citocinas são liberadas em decorrência de diferentes estímulos e interagem com os seus receptores regulando a função celular (ABBAS *et al.*, 1998), além de estarem intimamente relacionadas ao processo inflamatório (CARSWELL *et al.*, 1975).

Um estudo realizado com TNF- α descreveu uma redução significativa na motilidade progressiva quando esta citocina aparecia em concentrações seminais mais elevadas de maneira dependente da dose e do tempo. Este resultado indica que TNF- α têm efeito sobre a função espermática. Este efeito é possivelmente mediado através de um aumento na produção de óxido nítrico (PERDICHIZZI *et al.*, 2007).

Citocinas, especialmente o fator de necrose TNF- α , estão presentes no espermatozoide humano, mas seus efeitos sobre a qualidade do sêmen nesta espécie são uma questão em debate. Infiximab e adalimumab são agentes biológicos da classe anti-TNF- α que demonstraram eficácia em indução e manutenção da remissão para pacientes com doença intestinal crônica. Estudos realizados em homens tratados com infliximab e adalimumab mostraram redução na motilidade espermática e morfologia alterada (VALER *et al.*, 2017).

As infecções do trato genital masculino e as condições não inflamatórias específicas podem estar associadas à infertilidade inexplicada. Estudos mostraram a presença de citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) no sêmen de homens inférteis (ESTRADA *et al.*, 2007). As infecções e as condições inflamatórias das glândulas sexuais acessórias masculinas (por exemplo: orquite, epididimite e prostatite) representam causas conhecidas de infertilidade. A leucocitospermia observada nestes pacientes resulta em baixa qualidade do sêmen e na falência da fertilização *in vitro* e pode ser responsável pela produção local e/ou seminal de várias citocinas que podem reduzir a capacidade de penetração de oócitos, afetando assim a fertilidade masculina (KRAUSE *et al.*, 2003).

CONCLUSÃO

Dentre os fatores que podem alterar os índices reprodutivos, a qualidade seminal assume um efeito considerável. No entanto, os testes laboratoriais de rotina, aplicados na avaliação da qualidade do sêmen, por muitas vezes não são capazes de determinar o potencial de fertilidade dos reprodutores. Desta forma, diversos estudos sugerem que componentes moleculares dos espermatozoides, ou do meio que os cercam, podem influenciar sua capacidade fecundante.

Conclui-se que a expressão do gene PCL ζ no espermatozoide equino pode ser utilizada como um marcador para a qualidade seminal e fertilidade do garanhão. Este estudo demonstrou que a expressão gênica de WBP2NL e TNF- α não deve ser utilizada como marcador de qualidade seminal e fertilidade em garanhões, pois não foi encontrada nenhuma correlação com parâmetros avaliados.

Tabela 2: Coeficiente de correlação simples de Pearson entre parâmetros seminais, taxa de prenhez e expressão dos genes PCL ζ , WPB2NL e TNF- α de garanhões da raça Crioula.

	Concentração Espermiática	Teste Hiposmótico	Teste de Fluorescência	Defeitos Maiores	Defeitos Menores	Taxa de Prenhez	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Motilidade Circular	Motilidade Rápida
Teste Hiposmótico	-0,049	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Teste de Fluorescência	-0,130	0,933*	-	-	-	-	-	-	-	-
Defeitos Maiores	0,011	-0,475*	-0,403*	-	-	-	-	-	-	-
Defeitos Menores	0,554*	0,023	-0,087	0,062	-	-	-	-	-	-
Taxa de Prenhez	-0,128	0,796*	0,810*	-0,396	-0,079	-	-	-	-	-
Motilidade Total	-0,128	0,937*	0,959*	-0,427*	-0,097	0,829*	-	-	-	-
Motilidade Progressiva	-0,164	0,775*	0,794	-0,336	-0,087	0,694*	0,824*	-	-	-
Motilidade Circular	0,164	0,503*	0,415*	-0,248	0,210	0,448*	0,506*	0,404*	-	-
Motilidade Rápida	-0,166	0,465*	0,539*	-0,152	-0,011	0,429*	0,601*	0,770*	0,556*	-
Motilidade Lentos	-0,056	0,713*	0,707*	-0,341	-0,116	0,600*	0,668*	0,807*	0,132	0,287
Motilidade Local	-0,019	0,102	0,032	-0,146	-0,031	0,072	0,133	-0,278	0,188	-0,289
Imóveis	-0,083	-0,630*	-0,614*	0,400*	-0,161	-0,551*	-0,654*	-0,696*	-0,428*	-0,551*
VCL	0,059	0,600*	0,566*	-0,220	0,170	0,490*	0,589*	0,480*	0,315	0,271
VSL	0,088	0,649*	0,589*	-0,256	0,248	0,456*	0,610*	0,538*	0,371	0,347
VAP	0,098	0,634*	0,579*	-0,257	0,221	0,467*	0,604*	0,525*	0,364	0,328
Linearidade	-0,174	0,270	0,219	-0,245	-0,051	0,153	0,232	0,245	0,069	0,110
BCF	-0,154	0,428*	0,516*	-0,180	-0,052	0,446*	0,565*	0,620*	0,276	0,557*
ALH	0,166	0,079	-0,042	0,055	0,289	-0,041	-0,050	0,044	0,220	0,008
PCLζ	0,204	0,449*	0,484*	-0,208	0,254	0,454*	0,486*	0,413*	0,101	0,196
TNF-α	0,106	-0,043	-0,093	-0,228	-0,046	-0,050	-0,027	0,155	0,026	0,127
WPB2NL	-0,124	-0,117	-0,083	0,095	0,017	0,023	-0,071	-0,010	-0,136	0,009

Indica diferença estatística ($P < 0,05$).

Tabela 2: Coeficiente de correlação simples de Pearson entre parâmetros seminais, taxa de prenhez e expressão dos genes PCL ζ , WPB2NL e TNF- α de garanhões da raça Crioula.

	Motilidade Lentos	Motilidade Local	Imóveis	VCL	VSL	VAP	Linearidade	BCF	ALH	PCL ζ	TNF- α
Motilidade Local	-0,208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Imóveis	-0,529*	0,151	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VCL	0,469*	0,066	-0,238	-	-	-	-	-	-	-	-
VSL	0,496*	0,033	-0,306	0,956*	-	-	-	-	-	-	-
VAP	0,490*	0,039	-0,289	0,978*	0,991*	-	-	-	-	-	-
Linearidade	0,227	0,125	0,124	0,033	0,190	0,125	-	-	-	-	-
BCF	0,458*	-0,084	-0,387	0,327	0,270	0,287	-0,038	-	-	-	-
ALH	-0,065	-0,064	0,190	0,328	0,399	0,393	0,133	-0,197	-	-	-
PCL ζ	-0,427*	-0,063	-0,405*	0,078	0,147	0,137	0,205	0,257	-0,086	-	-
TNF- α	0,055	-0,163	-0,018	-0,158	-0,142	-0,148	0,090	0,092	-0,235	0,080	-
WPB2NL	-0,065	-0,062	0,098	0,101	0,038	0,081	-0,143	0,166	-0,073	-0,067	-0,080

*Indica diferença estatística ($P < 0,05$).

REFERÊNCIAS

AARABI, M.; BALAKIER, H.; BASHAR, S.; MOSKOVTSSEV, S.I.; SUTOVSKY, P.; LIBRACH, C.L. et al. Sperm content of postacrosomal WW binding protein is related to fertilization outcomes in patients undergoing assisted reproductive technology. **Fertility Sterility**. v.2, p.440, 2014.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. CITOCINAS. In: **Imunologia celular e molecular**. v.2, p.253-276. 1998.

AL-QARAWI, A. A.; ABDEL-RAHMAN, H. A.; EL-MOUGY, S. A.; EL-BELELY, M. S. Use of a new computerized system for evaluation of spermatozoal motility and velocity characteristics in relation to fertility levels in dromedary bulls. **Animal Reproduction Science**. v. 74, p. 1-9, 2002.

BRITO LFC. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v.6, p.249-264, 2007.

BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. **Journal of Animals Science**. v. 90, p. 779-789, 2002.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 72, p. 3666, 1975.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 2013.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.;M. The hypoosmotic swelling test: its employment as assay to frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**. v. 42, p.351-60, 1994.

DALE, B.; DEFELICE, L.J.; EHRENSTEIN, G . Injection of a soluble sperm fraction into sea-urchin eggs triggers the cortical reaction. **Experientia**. v. 41,p.1068-1070. 1985.

DADOUNE, J. P. Spermatozoal RNAs: what about their functions? **Microscopy Research and Technique**. v. 72, p. 536-51, 2009.

ESCOFFIER, J.; LEE, H.C.; YASSINE, S.; ZOUARI, R.; MARTINEZ, G.; KARAOUZENE, T. Homozygous mutation of PLC ζ 1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WW binding protein PAWP. **Human Molecular Genetics**. v. 25, p. 878–91, 2016.

ESTRADA, L.S.; CHAMPION, H.C.; WANG, R.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.J.C.; AGGARWAL, B.; SIKKA, S.; C. Effect of tumour necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) on human sperm motility, viability and motion parameters Blackwell Science Ltd. **International Journal of Andrology**. v.20, p. 237-242, 2007.

FREOUR, T.; BARRAGAN, M.; FERRER-VAQUER, A.; RODRÍGUEZ, A.; VASSENA, R. WBP2NL/PAWPmRNA and protein expression in sperm cells are not related to semen parameters, fertilization rate, or reproductive outcome. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. v. 34, p. 803-10, 2017.

GARNER, D.I.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; AND PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**. 34 p. 12-138, 1986.

GAT, I.; ORVIETO, R. “This is where it all started” – the pivotal role of PLCZ ζ within the sophisticated process of mammalian reproduction: a systemic review Itai. **Basic and Clinical Andrology**. v. 27, p 1-9, 2017.

GENBANK. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>. Acesso em 07/2018.

GRADIL C, YOON S, BROWN J, HE C, VISCONTI P, FISSORE R. PLC ζ : A marker for stallion fertility? **Animal Reproduction Science**. v. 94, p.23-25, 2006.

HAMAMAH, S.; ROYERE, D.; NICOLLE, J.C.; PAQUIGNON, M.; LANSAC, J. Effects of freezing-thawing on the spermatozoa nucleus: a chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. **Reproduction Nutrition and Development**. v. 30, p.59-64, 1990.

HAMBLIN, A.S. Cytokines and cytokine receptors. **Oxford University**. v. 2, p.5, 1993.

HARALD, S.; OTTMAR, D Genomics and Fertility in Stallions. **Journal Equine Veterinary Science**. v. 32, p. 467–470, 2012.

HEINDRYCK, D.; NIKIFORAKI, F.; VANDEN MEERSCHAUT, W.; DE VOS, S. e LIERMAN, P. DE SUTTER. Influence of human sperm motility and cryopreservation on the oocyte activating factor phospholipase c zeta. **Fertility and Sterility**. v. 23, p.134, 2012.

JEYENDRAN, R.S.; VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L., J., D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**. v.70, p. 219-228, 1984.

KAEWMALA, K.; UDDIN, M.J.; CINAR, M.U.; GROBE-BRINKHAUS, C.; JONAS, E.; TEFAYE, D.; PHATSARA, C.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K. Investigation into Association and Expression of PLC ζ and COX-2 as Candidate Genes for

Boar Sperm Quality and Fertility. **Reproduction in Domestic Animals**. v.47, p. 213–23, 2012.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M.J.; VEERAPANDIAN, C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**. v.104, p.9-17, 2008.

KRAUSE, W.; BOHRING, C.; GUETH, A.; HORSTER, S.; KRISP, A.; SKRZYPEK, J. Cellular and biochemical markers in semen indicating male accessory gland inflammation. **Andrologia**. v.35, p.279–282, 2003.

KUROKAWA, M.; SATO, K.; WU, H.; HE, C.; MALCUI, C.; BLACK, S.J.; FUKAMI, K.; FISSORE, R.A. Functional, biochemical and chromatographic characterization of the complete [Ca²⁺] oscillation-inducing activity of porcine sperm. **Developmental Biology**. v. 285, p.376–392, 2005.

LAGARES M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H. et al. Preservação do sêmen fresco equino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. **Arquivos Faculdade Veterinária**. UFRGS, v.26, p.29-42, 1998.

LAMPIÃO, F. D.U.; PLESSIS, S.S. TNF-alpha and IL-6 affect human sperm function by elevating nitric oxide production. **Reproductive BioMedicine Online**. v.17, p. 62831, 2008.

LOVE, C. C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**. v.76, p.547–557, 2001.

NOMIKOS, M., SWANN, K. AND LAI, F.A. Starting a new life: sperm PLC-zeta mobilizes the Ca²⁺ signal that induces egg activation and embryo development: an essential phospholipase C with implications for male infertility. **BioEssays**. v.34, p. 126–134, 2012.

NOMIKOS, N.; JESSICA, R. S.; ANTHONY, LAI. The role and mechanism of action of sperm PLC-zeta in mammalian fertilization. **Biochemical Journal**. v. 474, p. 3659–3673, 2017.

NOMIKOS, N.; JESSICA, R. S.; THEODORIDOU, M.; JUNAID, K.; MATTHEWS, E.; NOUNESIS, G.; ANTHONY, L; KARL SWANN. Sperm-specific post-acrosomal WW-domain binding protein (PAWP). **Molecular Human Reproduction**. v.10, p.938-47, 2014.

OSTERMEIER, G.C.; MILLER, D.; HUNTRISS, J.D.; DIAMOND, M.P.; KRAWETZ, S.A. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**. v. 429, p.154, 2004.

PERDICHIZZI, A.; NICOLETTI, F.; VIGNERA, S. et al. Effects of tumor necrosis factor- α on human sperm motility and apoptosis. **Journal of Clinical Immunology**. v. 27, p. 152–162, 2007.

SAUNDERS, C.M.; LARMAN, M.G.; PARRINGTON, J.; COX, L.J.; ROYSE, J.; BLAYNEY, L.M.; SWANN, K. e LAI, F.A. PLCz: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. **Development**. v. 129, p. 3533–3544, 2002.

SCHRIMPF, R.; DIERKS, C.; MARTINSSON, G.; SIEME, H. E DISTL, O. Genome-Wide Association Study Identifies Phospholipase C zeta 1 (PLCz1) as a Stallion Fertility Locus in Hanoverian Warmblood Horses. **Plos One**. v. 29, p. 10, 2014.

SIMERLY, C.; WU, G.J.; ZORAN, S.; ORD, T.; RAWLINS, R.; JONES, J.; NAVARA, C. et al. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. **Nature Medicine**. v.1, p.47-52, 1995.

STRICKER, S.A. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. **Developmental Biology**. v. 211, p. 157-176, 1999.

SYLVIA, J.; BEDFORD, G.; LORI, A.; MC, P.; DICKSON, D. e VARNER, M.; S. Characterization of Equine Phospholipase C Zeta: A Review and Preliminary Results on Expression Defects in Subfertile Stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.32, p.445-450, 2012.

TAVALAEE, M., NASR-ESFAHANI, M.H. Expression profile of PLCzeta, PAWP, and TR-KIT in association with fertilization potential, embryo development, and pregnancy outcomes in globozoospermic candidates for intra-cytoplasmic sperm injection and artificial oocyte activation. **Andrology**. v.4, p. 850-860, 2016.

VALER, P.; ALGABA, A. M. D.; SANTOS, D. MANUEL, E. F.; NIETO, E.; JAVIER, P.; GISBERT, M.D.; PILAR, L.; ELVIRA, Q.; FRANCISCO J.; GARCÍA, A.; IVÁN, G.; ÁLVARO, P.; BERMEJO, F. Evaluation of the Quality of Semen and Sexual Function in Men with Inflammatory Bowel Disease. **Original Article**. v. 23, p.1144-1153, 2017.

VARNER, D.D.; LOVE C.C.; BRINSKO S.P.; BLANCHARD, T.L.; HARTMAN, D.L.; BLISS, S.B.; CARROLL B.S.; ESLICK, M.C. Semen Processing for the Subfertile Stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 28, p. 677-685, 2008.

VILLAVERDE, A. I. LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA FOSFOLIPASE C ZETA EM EXTRATOS ESPERMÁTICOS DE GATOS DOMÉSTICOS NORMOSPÉRMICOS E TERATOSPÉRMICOS. Dissertação de Doutorado. **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 2010.

WALAA, M.; RAMADAN, J. KASHIR, C.J.; KEVIN, C. Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLCζ): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology. **Cell Communication and Signaling**. v.10, p. 1-12, 2012.

WU, A.T.; SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G.; XU, W.; KATAYAMA, M.; DAY, B.N.; PARK, K.W.; YI, Y.J.; XI, Y.W.; Prather, R.S. et al. PAWP, a sperm-specific WW

domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. **Journal of Biological Chemistry**. v. 282, p. 12164–12175, 2007.

YOON, S. Y.; FISSORE, R.A. Release of phosphoinositolase C ζ and $[Ca^{2+}]$ oscillation-inducing activity during mammalian fertilization. **Reproduction**. v.134, p.695-704, 2007.

YOON, S.Y.; JELLERETTE, T. SALICIONI, A.M.; LEE, H.C.; YOO, M.S.; COWARD, K.; PARRINGTON, J.; GROW, D.; CIBELLI, J.B.; VISCONTI, P.E.; MAGER, J.; FISSORE, R.A. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca^{2+} release and are unable to initiate the first step of embryo development. **Journal of Clinical Investigation**. v. 118, p. 3671-3681, 2008.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As intersecções entre a reprodução e a genômica são numerosas. Ao selecionar reprodutores, além do objetivo de produzir prole com características desejáveis, outros fatores genéticos podem contribuir para problemas reprodutivos.

Este estudo demonstrou que a expressão gênica do WBP2NL, não deve ser utilizada como marcador de qualidade seminal e fertilidade em garanhões, pois não observou-se nenhuma correlação positiva com parâmetros avaliados, o que corrobora com trabalhos realizados em humanos.

Não observou-se correlação da expressão do gene TNF- α com qualidade seminal e fertilidade em garanhões. Esta ausência de correlação pode ter relação com a categoria de garanhões utilizada, pois as citocinas estão relacionadas a processos inflamatórios e todos os garanhões utilizados no experimento apresentavam-se hígidos.

Conclui-se que a expressão do gene PCL ζ no espermatozoide equino pode ser utilizada como um marcador para a qualidade seminal e fertilidade do garanhão. Pois esta análise conseguiu distinguir grupos de fertilidades distintas e no futuro esta avaliação pode ser introduzida na rotina laboratorial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARABI, M.; BALAKIER, H.; BASHAR, S.; MOSKOVITSEV, S.I.; SUTOVSKY, P.; LIBRACH, C.L. et al. Sperm content of postacrosomal WW binding vprotein is related to fertilization outcomes in patients undergoing assisted reproductive technology. **Fertility and Sterility**. v.2, p.440, 2014.

AARABI, M.; BALAKIER, H.; BASHAR, S.; MOSKOVITSEV, S.I.; SUTOVSKY, P. LIBRACH, CL.; OKO, R. Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice. **The FASEB Journal**. v. 28. p.4434-4440, 2010

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. CITOCINAS. In: Imunologia celular e molecular. **Revinter**. v. 2, p.253-276, 1998.

ABCCC, Disponível em http://cavalocrioulo.org.br/studbook/cavalo_crioulo> Acesso em abril de 2016.

ABCCC. **Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Crioulo**. Disponível em <http://www.cavalocrioulo.org.br/noticias/detalhes/134729/nota-de-repudio-declaracoes-do-ex-presidente-lula>> Acesso em março de 2018.

ABCCC. Associação Brasileira de Criadores de Cavalo. **Manual do Criador da Associação dos Criadores dos Cavalos Crioulos**. 2009.

AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**. v. 3, p. 745–756, 2003.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RALFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. v.4, p. 1463, 2002.

AMANN RP, HAMMERSTEDT RH. Detection of differences in fertility. **Journal of Andrology**. v.23, p.17-25, 2002.

AMANN RP. Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. **Theriogenology**. v.63, p.698-715, 2005.

AMDANI, S.N.; YESTE, M.; JONES, C.; COWARD, K. Sperm Factors and Oocyte Activation: Current Controversies and Considerations. **Biology of Reproduction**. v. 93, p. 50 2015.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow. **The Lancet**. v. 357, p. 539–545, 2001.

BASTOS, H.B.A.; KRETZMANN, N. A.; SANTOS, G.O.; ESMERALDINO, A.T.; FIALA RECHSTEINER, S.; MATTOS, M.C.; NEVES, A.P. Gene expression of

matrix metalloproteinases and LH receptors in mare follicular development. **Theriogenology**. v. 82, p.1131-1136, 2014.

BISSONNETTE N, LEVESQUE-SERGERIE JP, THIBAUT C, BOISSONNEAULT G. Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. **Reproduction**. v.138, p.65-80, 2009.

BOOTMAN, M. D.; COLLINS, T. J.; PEPPIATT, C. M.; PROTHERO, L. S.; MACKENZIE, L.; DE SMET, P.; TRAVERS, M.; TOVEYS, S. C.; SEO, J. T.; BERRIDGE, M. J.; CICCOLINI, F.; LIPP, P. Calcium signaling - an overview. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. v. 12, p. 3-10, 2001.

BRITO LFC. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v.6, p.249-264, 2007.

BROSNAHAN, M. M; BROOKS, S. A.; ANTCZAK, D. F. Equine clinical genomics: A clinician's primer. **Equine Veterinary Journal**. v.42, p.658-670, 2010.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 72, p.3666, 1975.

CHOWDHARY, B.P.; PARIA, N.; RAUDSEPP, T. Potential applications of equine genomics in dissecting diseases and fertility. **Animal Reproduction Science**. v. 107, p. 208–218, 2008.

COSSON, J.A.; A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**. v. 20, p.83-94, 1996.

FAWCETT, D. W. The mammalian spermatozoon. **Developmental Biology**. v. 44, p. 394-436, 1975.

FLESCHE, F.M.; GAZELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in 586 the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1469:197-35, 2000.

FREOUR, T.; BARRAGAN, M.; FERRER-VAQUER, A.; RODRÍGUEZ, A.; VASSENA, R. WBP2NL/PAWP mRNA and protein expression in sperm cells are not related to semen parameters, fertilization rate, or reproductive outcome. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. v.34, p. 803-810, 2017.

FEUGANG, J.M.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KAYA, A.; WANG, H.; PAGE, G.; OSTERMEIER, G. C.; TOPPER, E. K.; MEMILI, E. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. **Reproductive BioMedicine Online**. v.21, p.312- 324, 2010.

GADELLA BM, HARRISON RAP. The capacitating agente bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. **Development**. v. 127, p. 2407-20, 2000.

GAMBOA, S. INFERTILIDADE EQUINA: MÚLTIPLAS FRAGILIDADES OU UM “FADO” DO ESPERMATOZÓIDE. **Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra**. p 267, 2011.

GAT, I.; ORVIETO, R. “This is where it all started” – the pivotal role of PLCζ within the sophisticated process of mammalian reproduction: a systemic review Itai. **Basic and Clinical Andrology**. v. 27, p. 1-9, 2017.

GAUCHER J, REYNOIRD N, MONTELLIER E, BOUSSOUAR F, ROUSSEAU S, KHOCHBIN S. From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. **FEBS Letters**. v. 277, p.599-604, 2010.

GIESECKE, K.; SIEME, H.; DISTL, O. Infertility and candidate gene markers for fertility in stallions: A review. **The Veterinary Journal**. v.185, p.265–271, 2010.

GINTHER O. J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2^a Ed. Equiservices: Madison, **Wisconsin**. v. 2, p. 642, 1992.

GRADIL C, YOON S, BROWN J, HE C, VISCONTI P, FISSORE R. PLCζ: A marker for stallion fertility? **Animal Reproduction Science**. v. 94, p.23-25, 2006.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S.S. Bovine Seminal Plasma Proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa Share Functional Roles in Storing Sperm in the Oviduct. **Biology of Reproduction**. v. 75, p.501–507, 2006.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Reprodução Animal. **Monole**. 7 ed, p.513, 2004.

HAMBLIN, A.S. Cytokines and cytokine receptors. **Oxford University**. v. 2, p.5, 1993.

HARALD, S.; OTTMAR, D. Genomics and fertility in stallions. **Journal Equine Veterinary Science**. v. 32, p.467–470, 2012.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**. v. 115, p. 1–20, 2005.

HEINDRYCK, D.; NIKIFORAKI, F.; VANDEN MEERSCHAUT, W.; DE VOS, S. e LIERMAN, P. DE SUTTER. Influence of human sperm motility and cryopreservation on the oocyte activating factor phospholipase c zeta. **Fertility e Sterility**. v. 23, p.134, 2012.

HERRLER, A.; BEIER, H.M. Early Embryonic Coats: Morphology, Function, Practical Applications. **Cells Tissues Organs**. v.166, p.233-246, 2000.

HINRICHS, K. Assisted reproduction techniques in the horse. **Reproduction Fertility and Development**. v. 25, p.80–93, 2013.

JONES, K.T.; CRUTTWELL, C.; PARRINGTON, J.; SWANN, K. A mammalian sperm cytosolic phospholipase C activity generates inositol trisphosphate and causes Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates. **FEBS Letters**. v.437, p.297, 1998.

KAEWMALA, K.; UDDIN, M.J.; CINAR, M.U.; GROÙE-BRINKHAUS, C.; JONAS, E.; TESFAYE, D.; PHATSARA, C.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K. Investigation into Association and Expression of PLC ζ and COX-2 as Candidate Genes for Boar Sperm Quality and Fertility. **Reproduction in Domestic Animals**. v.47, p.213–223, 2012.

KLINER, D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. **Current Topics in Developmental Biology**. v. 50, p.125-54, 2000.

KUROKAWA M, SATO K-I, WU H, HE C, MALCUIT C, BLACK SJ, FUKAMI K, FISSORE RA. Functional, biochemical, and chromatographic characterization of the complete [Ca²⁺]_i oscillation-inducing activity of porcine sperm. **Developmental Biology**. v. 285, p. 376-392, 2005.

LAMBARD, S.; GALERAUD-DENIS, I.; MARTIN, G.; LEVY, R.; CHOCAT, A.; CARREAU, S. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. **Molecular Human Reproduction**. v.10, p.535-541, 2004.

LEON, P.M.M.; CAMPOS, V.P.; KAEFER, C.; BEGNIN, K. R.; MCBRIDE, J.A.; DELLAGOSTIN, O. A.; SEIXAS, K.; DESCHAMPS, J. C. e COLLARES, T. Expression of apoptotic genes in immature and in vitro matured equine oocytes and cumulus cells. **Zygote**. v. 21, p.279-285, 2011.

LOBO, A. M. B. O.; LOBO, R. N. B. Considerações Estatísticas na Análise de Dados de Expressão gênica Gerados pela Técnica de RT-qPCR. **Embrapa Caprinos e Ovinos Documentos**. 2014.

MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**. v.6, p.1292–305, 2002.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Caval**. p.7, 2017.

MEHLMANN, L.M.; Chattopadhyay, A.; Carpenter, G., Jaffe, L. A. SH2 Domain-Mediated Activation of Phospholipase C γ Is Not Required to Initiate Ca²⁺ release at fertilization in mouse eggs. **Developmental Biology**. v. 236, p.492–501, 2001.

MILLER D, OSTERMEIER GC. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? **Obstetrics, Gynecology & Infertility**. v. 34, p.840-846, 2006.

MORTENSEN , C. J.; CHOI, Y. H.; ING, N. H.; KRAEMER, D. C.; VOGELSANG, M. M.; HINRICHS, K. Heat shock protein 70 gene expression in equine blastocysts after exposure of oocytes to high temperatures in vitro or in vivo after exercise of donor mares. **Theriogenology**. v. 74, p. 374-83, 2010.

MOURA, A.; ANDRADE, C. R.; SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. A. M; MARTINS, R. V e OLIVEIRA, E. B. S. Menezes. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.35, p.139-144, 2011.

MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**. v.27, p.201-211, 2006.

NOMIKOS, M., SWANN, K. AND LAI, F.A. Starting a new life: sperm PLC-zeta mobilizes the Ca²⁺ signal that induces egg activation and embryo development: an essential phospholipase C with implications for male infertility. **BioEssays**. v. p.34, 126–134, 2012.

OSTERMEIER, G.C.; MILLER, D.; HUNTRISS, J.D.; DIAMOND, M.P.; KRAWETZ, S.A. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**. v. 429, p.154, 2004.

PERDICHIZZI, A.; NICOLETTI, F.; VIGNERA, S. et al. Effects of tumor necrosis factor- α on human sperm motility and apoptosis. **Journal of Clinical Immunology**. v. 27, p. 152–162, 2007.

POLENZ, M. F.; PEREIRA, G. R.; AUGUSTO, C. G. FIALA S. RECHSTEINER. Gene expression before and after vitrification of equine CCO's. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 41, p. 76-77, 2016.

SAKAMOTO Y, HARADA T, HORIE S, IBA Y, TANIGUCHI F, YOSHIDA S, IWABE T, TERAOKA N. Tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 (IL-8) expression in endometriotic stromal cells, probably through nuclear factor-kappa B activation: gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced IL-8 expression. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 88, p. 730-735, 2003.

SAUNDERS, C.M.; LARMAN, M.G.; PARRINGTON, J.; COX, L.J.; ROYSE, J.; BLAYNEY, L.M.; SWANN, K. e LAI, F.A. PLCz: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. **Development**. v. 129, p. 3533–3544, 2002.

SCHRIMPF, R.; DIERKS, C.; MARTINSSON, G.; SIEME, H. E DISTL, O. Genome-Wide Association Study Identifies Phospholipase C zeta 1 (PLCz1) as a Stallion Fertility Locus in Hanoverian Warmblood Horses. **Plos One**. v. 29, p.10, 2014.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**. v. 65, p.958-978, 2006.

SIMERLY, C.; WU, G.J.; ZORAN, S.; ORD, T.; RAWLINS, R.; JONES, J.; NAVARA, C. et al. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. **Nature Medicine**. v.1, p.47-52, 1995.

SYLVIA, J.; BEDFORD, G.; LORI, A.; MC, P.; DICKSON, D. e VARNER, M.; S. Characterization of Equine Phospholipase C Zeta: A Review and Preliminary Results on Expression Defects in Subfertile Stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.32, p.445-450, 2012.

TEIXEIRA, A. L. Cavalo Crioulo – O símbolo do Rio Grande do Sul. Editora: **Viver no Campo**. 2 ed., 2011.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**. v.3, p.151–159, 2005.

VALER, P.; ALGABA, A. M. D.; SANTOS, D. MANUEL, E. F.; NIETO, E.; JAVIER, P.; GISBERT, M.D.; PILAR, L.; ELVIRA, Q.; FRANCISCO J.; GARCÍA, A.; IVÁN, G.; ÁLVARO, P.; BERMEJO, F. Evaluation of the Quality of Semen and Sexual Function in Men with Inflammatory Bowel Disease. **Original Article**. v. 23, p.1144-1153, 2017.

VARNER, D.D.; LOVE C.C.; BRINSKO S.P.; BLANCHARD, T.L.; HARTMAN, D.L.; BLISS, S.B.; CARROLL B.S.; ESLICK, M.C. Semen Processing for the Subfertile Stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 28, p. 677-685, 2008.

VILLAVERDE, A. I. LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA FOSFOLIPASE C ZETA EM EXTRATOS ESPERMÁTICOS DE GATOS DOMÉSTICOS NORMOSPÉRMICOS E TERATOSPÉRMICOS. Dissertação de Doutorado. **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 2010.

WALAA, M.; RAMADAN, J. KASHIR, C.J.; KEVIN, C. Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLC ζ): diagnostic and therapeutic implications for assisted

reproductive technology. **Cell Communication and Signaling**. v. 10, p. 1-12, 2012.

WASSARMAN, P. M.; ALBERTINI, D. F. The mammalian ovum. The physiology of reproduction. **Raven Press**. 2 ed, p. 79-122, 1994

WHITE, K. L.; YUE, C. Intracellular receptors and agents that induce activation in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 91-100, 1996.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.;F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**. v. 39, p.75–85, 2005.

WU, A.T.; SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G.; XU, W.; KATAYAMA, M.; DAY, B.N.; PARK, K.W.; YI, Y.J.; XI, Y.W.; Prather, R.S. et al. PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. **Journal of Biological Chemistry**. v. 282, p.12164–12175, 2007.

WU, H.; SMYTH, J.; LUZZI, V.; FUKAMI, K.; TAKENAWA, T.; BLACK, S. L.; ALLBRITTON, N.L.; FISSORE, R. A. Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. **Biology Reproduction**. v.64, p.1338–1349, 2001.

YODA. A.; ODA, S.; SHIKANO, T.; KOUCHI, Z.; AWAJI, T.; SHIRAKAWA, H.; KINOSHITA; K. e MIYAZAKIA S. Ca²⁺ oscillation-inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus during egg activation. **Developmental Biology**. v. 268, p. 245– 257, 2004.

YOON, S. Y.; FISSORE, R.A. Release of phosphoipase Cζ and [Ca²⁺]oscillation-inducing activity during mammalian fertilization. **Reproduction**. v.134, p.695-704, 2007.