

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

**EXPRESSÃO GÊNICA DA MMP-1, MMP-2, TNF- α E I κ B β NO TRATO
REPRODUTIVO DO GARANHÃO**

MARCELO BARCELOS ROCHA

PORTO ALEGRE

2019

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

**EXPRESSÃO GÊNICA DA MMP-1, MMP-2, TNF- α E I κ B β NO TRATO
REPRODUTIVO DO GARANHÃO**

MARCELO BARCELOS ROCHA

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Medicina
Animal na área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Nélon Alexandre
Kretzmann Filho

Co-orientador: Dr. Henrique Boll de Araujo
Bastos

PORTO ALEGRE

2019

MARCELO BARCELOS ROCHA

**EXPRESSÃO GÊNICA DA MMP-1, MMP-2, TNF- α E I κ B β NO TRATO
REPRODUTIVO DO GARANHÃO**

APROVADO POR:

Prof. Dr. Néelson Alexandre Kretzmann Filho
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky
Membro da Comissão

Prof. Dr. Gustavo Henrique Zimmermann Winter
Membro da Comissão

Dr. Giovanni Casanova Camozzato
Membro da Comissão

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Rocha, Marcelo Barcelos
EXPRESSÃO GÊNICA DA MMP-1, MMP-2, TNF-a E IkBB NO
TRATO REPRODUTIVO DO GARANHÃO / Marcelo Barcelos
Rocha. -- 2019.
46 f.
Orientador: Néelson Alexandre Kretzmann Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Equino. 2. Fisiologia reprodutiva. 3. Proteases. 4. Citocinas. 5. qPCR. I. Filho, Néelson Alexandre Kretzmann, orient. II. Título.

LISTA DE ABREVIATURAS

3 β HSD	3 β -Hydroxiesteroide desidrogenase/ δ 5-4 isomerase
AR	Receptor de andr3geno
CYP17	P450, 17-20 lyase
CYP19	Aromatase p450
CRISP-3	Prote3na secret3ria rica em ciste3na 3
EGF	Fator de crescimento epid3rmico
ESR1	Receptor de estr3geno 1
ESR2	Receptor de estr3geno 2
FasL	Prote3na transmembrana ligante do tipo II
FSH	Horm3nio fol3culo estimulante
GH	Horm3nio do crescimento
GnRH	Horm3nio liberador das gonadotropinas
HSP-1	Prote3na seminal equina 1
HSP-2	Prote3na seminal equina 2
HSP-7	Prote3na seminal equina 7
IFN γ	Interferon-gama
IGF-1	Fator de crescimento semelhante 3 insulina 1
I κ B	Inibidores kappa B
I κ B β	Inibidor beta do fator de transcri33o nuclear kappa B
IKK	Complexo cinase kappa B
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
LH	Horm3nio luteinizante
MB	Membrana basal
MEC	Matriz extracelular
MEHP	Mono-2-etilhexilftalato
min	Minutos
MMP	Metaloproteinases de matriz
MMP-1	Metaloproteinase de matriz 1
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
NF- κ B	Fator de transcri33o nuclear kappa B

POMC	Proiomelanocortina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo
proMMP-2	Pró-forma da MMP-2
RNAm	RNA mensageiro
s	Segundos
Sp-1	Proteína específica 1
TF	Transferrina
TGF- α	Fator de crescimento transformador alpha
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alpha

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Modelo indicando ambos, efeitos diretos (a) sobre as células de Sertoli e as respostas indiretas (b) pelas células germinativas que desempenham um papel no aumento da expressão de FasL pelas células de Sertoli como consequência da lesão induzida pelo mono-2-etilhexilftalato (MEHP). (a) MEHP atua diretamente sobre as células de Sertoli, conseqüentemente, ativa o NF- κ B e a proteína específica 1 (Sp-1) através de um mecanismo que ainda não foi descrito. NF- κ B e Sp-1 ativados resultam no aumento dos níveis de transcrição da FasL nas células de Sertoli. FasL na membrana celular liga-se com o receptor Fas expresso nas células germinativas adjacentes para desencadear apoptose. (b) Lesão das células de Sertoli induzidas pelo MEHP diminui o suporte físico, hormonal e nutritivo das células germinativas, levando ao aumento da produção e liberação da forma solúvel do TNF- α (sTNF- α) liberado dessas células. Aumentos no sTNF- α são provavelmente produzidos pela ação de um ou mais membros da família das metaloproteinases (MMP). O sTNF- α produzido por células germinativas pode então ligar-se ao TNF- α -R1 que está presente na célula de Sertoli, resultando na ativação da via de ativação do NF- κ B e consequente aumento na transcrição do gene FasL (YAO et al., (2007) 27
- FIGURA 2** Gene expression of MMP-1 in the reproductive tract of stallion. ^{ab}Different letters indicate significant differences between tissues (p = 0,014) 33
- FIGURA 3** Gene expression of MMP-2 in the reproductive tract of stallion. ^{abc}Different letters indicate significant differences between tissues (p = 0,012) 34
- FIGURA 4** Gene expression of TNF- α in the reproductive tract of stallion. ^{ab}Different letters indicate significant differences between tissues (p = 0,01) 34
- FIGURA 5** Gene expression of I κ B β in the reproductive tract of stallion..... 35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Sequences of primers used in the experiment	32
TABELA 2	Pearson's correlation coefficient between gene expression of MMP-1, MMP-2, TNF- α and I κ B β of testicle, head and body epididymis, prostate	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Endocrinologia reprodutiva do garanhão	13
2.2	Testículo	15
2.3	Epidídimo	16
2.4	Espermatogênese.....	17
2.5	Glândulas sexuais acessórias.....	19
2.6	Metaloproteinases de matriz.....	21
2.6.1	Metaloproteinases de matriz no trato reprodutor masculino	22
2.7	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NF-κB)	24
2.8	Fator de Necrose Tumoral Alpha (TNF-α)	25
3	ARTIGO	28
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
	APÊNDICE A - Resumo publicado no ISABR 2018	44
	APÊNDICE B - Expressão gênica da MMP-1, MMP-2, TNF-α e IκBβ no trato reprodutivo do garanhão. Animais utilizados no experimento são representados pelos números em romanos	45

EXPRESSÃO GÊNICA DA MMP-1, MMP-2, TNF- α E I κ B β NO TRATO REPRODUTIVO DO GARANHÃO

RESUMO

A fisiologia reprodutiva do garanhão é um complexo mecanismo que envolve hormônios, citocinas, fatores de crescimento, proteases, entre outros mecanismos regulatórios. As metaloproteinases de matriz (MMP) constituem uma família de proteases que desempenham papéis chave em muitos processos fisiológicos incluindo, sinalização celular, migração celular, remodelação celular e interação célula-célula. O TNF- α e o I κ B β (Inibidor β do NF- κ B) também atuam nos mecanismos fisiológicos. O objetivo do estudo foi verificar a expressão gênica da MMP-1, MMP-2, TNF- α e do I κ B β em diferentes regiões do aparelho reprodutor do garanhão. O trato reprodutivo completo de cinco garanhões foi coletado. Fragmentos teciduais foram coletados do testículo; da cabeça, corpo e cauda do epidídimo; da próstata, da vesícula seminal e da ampola do ducto deferente. Os tecidos selecionados foram destinados a técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR). A expressão gênica da MMP-1, MMP-2, TNF- α e I κ B β foi verificada em todos os tecidos avaliados. Diferenças estatísticas foram observadas na expressão gênica da MMP-1 ($p = 0,014$) em relação as diferentes regiões do trato reprodutivo do garanhão. O corpo e a cauda do epidídimo apresentaram maior expressão gênica da MMP-1 que o testículo, ampola, próstata e vesícula seminal. Diferenças foram observadas na expressão gênica da MMP-2 ($p = 0,012$). O testículo, corpo e cauda do epidídimo apresentaram maior expressão gênica da MMP-2 que a próstata e a cabeça do epidídimo. O testículo e o corpo do epidídimo também apresentaram maior expressão gênica em relação a vesícula seminal. Diferenças foram observadas na expressão gênica do TNF- α ($p = 0,01$). O testículo e a cauda do epidídimo apresentaram maior expressão gênica do TNF- α que a próstata e a vesícula seminal. Não foram observadas diferenças na expressão gênica do I κ B β . Nosso estudo apresentou correlações positivas da MMP-2 com TNF- α no testículo ($R = 0,99/ p = 0,007$), MMP-1 com TNF- α na cabeça do epidídimo ($R = 0,99/ p = 0,006$), MMP-2 com I κ B β no corpo do epidídimo ($R = 0,99/ p = 0,0084$) e MMP-1 com TNF- α na próstata ($R = 0,86/ p = 0,05$). Os testículos coordenam a diferenciação celular e produção de espermatozoides. O corpo e a cauda do epidídimo envolvem a maturação espermática. Nós sugerimos que a MMP-2 e o I κ B β possam ser marcadores da produção espermática devido a alta expressão gênica evidenciada nos testículos nesse estudo, como também a MMP-1 possa ser um marcador de maturação espermática devido a alta expressão gênica evidenciada no corpo e cauda do epidídimo nesse estudo. Nossas correlações positivas reforçam a relação fisiológica entre as MMP e o TNF- α .

Palavras chave: equino, fisiologia reprodutiva, proteases, citocinas, qPCR

GENE EXPRESSION OF MMP-1, MMP-2, TNF- α AND I κ B β IN THE REPRODUCTIVE TRACT OF STALLION

ABSTRACT

Reproductive physiology of the stallion is a complex mechanism involving hormones, cytokines, growth factors, proteases, among other regulatory mechanisms. Matrix metalloproteinases (MMP) constitute a family of proteases characterized by playing key roles in almost all physiological processes including, cell signaling, cell migration, cell remodeling and cell-cell interactions. TNF- α and I κ B β (NF- κ B inhibitor β) also plays a key role in various physiological processes. The objective of the study was to verify the gene expression of MMP-1, MMP-2, TNF- α and I κ B β in different regions of the stallion's reproductive apparatus. The reproductive tracts of five stallions was collected. Tissue samples were collected from the testis; the head, body and tail of the epididymis; prostate, seminal vesicle and ampulla of deferent duct. The selected tissues were destined to the qPCR technique. The gene expression of MMP-1, MMP-2, TNF- α and I κ B β was verified in all tissues evaluated. Statistical differences were observed in the gene expression of MMP-1 ($p = 0,014$) in relation to the different regions of the reproductive tract of the stallion. The body and tail of the epididymis presented greater MMP-1 gene expression than the testis, ampulla, prostate and seminal vesicle. Differences were observed in the MMP-2 gene expression ($p = 0,012$). The testis, body and tail of the epididymis presented greater MMP-2 gene expression than the prostate and the head of the epididymis. The testis and the body of the epididymis also presented greater gene expression in relation to the seminal vesicle. Differences were observed in the gene expression of TNF- α ($p = 0,01$). The testis and tail of the epididymis presented greater TNF- α gene expression than the prostate and seminal vesicle. Differences were not observed in the gene expression of I κ B β . Our study presented positive correlations MMP-2 with TNF- α in the testis ($R = 0,99/ p = 0,007$), MMP-1 with TNF- α in the head of the epididymis ($R = 0,99/ p = 0,006$), MMP-2 with I κ B β in the body of the epididymis ($R = 0,99/ p = 0,0084$) and MMP-1 with TNF- α in the prostate ($R = 0,86/ p = 0,05$). The testis coordinates cell differentiation and sperm production, body and tail of the epididymis involves sperm maturation. We suggest that MMP-2 and I κ B β may be markers of sperm production due to the high gene expression evidenced in the testis in this study. We suggest that MMP-1 may be a marker of sperm maturation due to the high gene expression evidenced in the body and tail of the epididymis in this study. Our positive correlations reinforce the physiological relationship between MMP and TNF- α .

Keywords: equine, reproductive physiology, proteases, cytokines, qPCR

1 INTRODUÇÃO

Pesquisadores vêm se dedicando e aprimorando o estudo da reprodução equina desde o início do século passado. Entretanto, é importante ressaltar que apenas recentemente aspectos reprodutivos ligados ao equino macho estão recebendo maiores estudos com devida atenção quando comparados aos avanços e estudos sobre a reprodução na égua.

A fisiologia reprodutiva do garanhão é um complexo mecanismo que envolve hormônios, citocinas, fatores de crescimento, proteases entre outros mecanismos regulatórios. Várias proteases tem sido encontradas (MBIKAY et al., 1997) e relacionadas com o desenvolvimento testicular e espermatogênese (LONGIN et al., 2001) através da expressão gênica utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR) (LONGIN et al., 2001; MBIKAY et al., 1997).

As metaloproteinases de matriz (MMP) constituem uma família de proteases (NAGASE; WOESSNER, 1999) caracterizadas por desempenhar papéis-chave em quase todos os processos fisiológicos, incluindo, sinalização celular, migração celular (LONGIN et al., 2001), remodelamento celular (HULBOY; RUDOLPH; MATRISIAN, 1997) e interações célula-célula (MÉTAYER et al., 2002), tendo assim, inúmeros impactos sistêmicos em vários processos fisiológicos, como a remodelação testicular durante a espermatogênese (MBIKAY et al., 1997), mudança nos domínios da membrana espermática na passagem pelo epidídimo (VARNER, JOHNSON, 2011) e maturação espermática (MÉTAYER et al., 2002).

Fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) é uma citocina que age na imunidade natural, como também atua em processos fisiológicos. O complexo de ligação formado pelo TNF- α e receptor implica em outra importante função, ativação de fatores de transcrição, especialmente o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). NF- κ B desempenha um papel fundamental em vários processos fisiológicos. O NF- κ B, ao nível celular, regula o ciclo, proliferação e morte celular (CHRISTIAN; SMITH; CARMODY, 2016). Em células em homeostase, o NF- κ B mantém-se no citoplasma em sua forma inativa, associado com as proteínas inibidoras do sítio κ B, denominadas inibidores κ B (I κ B) (ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003). I κ B β (Inibidor beta do NF- κ B) pertence a uma família de proteínas que funcionam como reguladores do NF- κ B (BUDDE et al., 2002).

Este estudo tem por objetivo verificar a expressão gênica: MMP-1, MMP-2, TNF- α e I κ B β no trato reprodutivo do garanhão relacionando-os com a sua fisiologia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Endocrinologia reprodutiva do garanhão

O sistema endócrino reprodutivo do garanhão é regulado pelo eixo hipotalâmico-hipofisário gonadal sofrendo influência do efeito sazonal. O aumento do estímulo luminoso, durante a época reprodutiva, induz uma menor produção e secreção de melatonina pela glândula pineal; não suprimindo a secreção do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) de forma pulsátil pelo hipotálamo (AMANN, 2011b; ROSER, 2011).

A liberação de GnRH estimula a síntese e secreção de dois hormônios na adenohipófise: o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Ambos, LH e FSH são hormônios glicoproteicos que atuam no trato reprodutivo masculino. Agem principalmente sobre os testículos estimulando sua função, incluindo a produção de hormônios esteroidais e espermatozoides (ROSER, 2011).

Durante os primeiros nove meses de vida do jovem garanhão há secreção limitada dos hormônios LH e FSH, deixando os testículos em uma função quiescente. A falta de secreção de GnRH juntamente com o baixo número de receptores de GnRH tem sido sugerido como a base para este período. Após, há um aumento da frequência e amplitude dos pulsos de LH e de FSH em resposta ao GnRH iniciando o período de peri-puberdade do garanhão (HENINGER, 2011).

O FSH tem importância fundamental na iniciação e expansão da espermatogênese. O estímulo do FSH nas células de Sertoli do epitélio testicular faz com que estas secretem para a circulação periférica um par de hormônios glicoproteicos: ativina que faz retroalimentação positiva com o FSH e a inibina que faz retroalimentação negativa no FSH (AMANN, 2011b; ROSER, 2011).

Com o desenvolvimento testicular do garanhão durante a puberdade há um aumento na concentração das células testiculares intersticiais de Leydig (AMANN, 2011b; ROSER, 2011).

As células de Leydig são estimuladas pelo LH em receptores localizados na membrana plasmática e produzem hormônios esteroides (ROSER, 2011). A testosterona é o principal hormônio masculino que controla a espermatogênese, libido e as características sexuais secundárias (GARNER; HAFEZ, 2004). O controle de retroalimentação negativa do LH na adenohipófise é exercido pela testosterona e pelo estrógeno produzido pelas células de Leydig (ROCHIRA et al., 2006).

A prolactina tem sido relatada como um agente que afeta diretamente a fisiologia testicular. O hormônio desempenha um papel na indução da transcrição do receptor de

estrógeno. Foi demonstrada que a prolactina, juntamente com o hormônio do crescimento (GH), controla a ligação do LH nos receptores testiculares, ativando a síntese de andrógenos e estimulando a espermatogênese (ROSER, 2008). Os níveis de prolactina são mais elevados durante a temporada reprodutiva quando comparados com níveis menores mensurados fora da temporada, sugerindo assim, que a prolactina possa ter um papel no desenvolvimento testicular (ROSER, 1995).

O GH também possui relação com a endocrinologia reprodutiva no macho. O mesmo influencia a função testicular através da modulação da síntese de esteroides gonadais e da espermatogênese (ROSER, 2008). Foi realizado um estudo em ratos e demonstrou-se que o GH faz retroalimentação negativa na liberação do LH na hipófise, como também atua aumentando a síntese e liberação do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (CHANDRASHEKAR; BARTKE, 1998).

Além do controle endócrino da função testicular e espermatogênese, existem os mecanismos de controle parácrino-autócrino, através de esteroides, proteínas e peptídeos. Os fatores parácrinos são produzidos e exercem sua ação em tipos celulares diferentes, enquanto os fatores autócrinos atuam na própria célula que os produziu. Ambos os fatores coordenam as diferentes células testiculares e/ou modulam as ações no testículo através da comunicação entre as células somáticas e entre as células germinativas do epitélio seminífero (ROSER, 2008).

Os principais reguladores parácrino-autócrinos da função testicular de significado fisiológico comprovado incluem: estrógeno, testosterona, inibina e ativina, GnRH, IGF-1, fator de crescimento transformador alpha (TGF- α), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), ocitocina, vasopressina, pró-encefalinas, encefalinas, proopiomelanocortina (POMC), endorfinas, citocinas e transferrina (TF) (ROSER, 2008).

O estrógeno é um importante fator parácrino-autócrino na regulação da função testicular e espermatogênese no gananhão. O hormônio é produzido nas células de Leydig e Sertoli a partir da conversão enzimática de andrógenos pela enzima aromatase p450 (CYP19). As células germinativas expressam a atividade da CYP19, o que sugere que os próprios espermatozoides podem controlar os níveis de estrógeno no fluido luminal e no epidídimo. No testículo do gananhão, os receptores de estrógeno foram localizados nas células de Leydig e Sertoli (ROSER, 2008).

2.2 Testículo

O testículo equino é um órgão em formato ovoide com eixo horizontal. O órgão possui a função exócrina com a produção de espermatozoides, e a função endócrina produzindo hormônios importantes para a diferenciação sexual, espermatogênese e desenvolvimento das características sexuais secundárias (AMANN, 2011a).

O parênquima testicular é composto dos túbulos seminíferos e do tecido intersticial (VARNER; JOHNSON, 2011). Os túbulos seminíferos são compostos pelas células de Sertoli e pelo epitélio espermatogênico formado de diferentes tipos de células espermáticas (AMANN, 2011a; HULEIHEL; LUNENFELD, 2004; NEVES; CHIARINI-GARCIA; FRANÇA, 2002), sendo limitados pela lâmina própria (fibroblastos, células musculares lisas). O tecido intersticial inclui vasos sanguíneos, canais linfáticos, nervos, células de Leydig, linfócitos, mastócitos e tecido conjuntivo (AMANN, 2011a; VARNER; JOHNSON, 2011). O tamanho e o volume testicular são medidas diretas da quantidade do parênquima testicular presente, que por sua vez determina o potencial da produção espermática (AMANN, 2011a; ROSER, 2011). Os diferentes tipos de células testiculares têm sido identificados produzindo e secretando peptídeos, proteínas e esteroides (AMANN, 2011a; ROSER, 2011).

As células intersticiais de Leydig são conhecidas por sua marcante produção de esteroides, a partir de uma molécula base, o colesterol (AMANN, 2011a). As células de Leydig sintetizam andrógenos tais como a testosterona e a dihidrotestosterona (GARNER; HAFEZ, 2004), os quais são responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino, da genitália externa na fase fetal e pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e manutenção quantitativa da espermatogênese (VARNER; JOHNSON, 2011). A testosterona possui uma ação andrógena nas células de Sertoli, modulando sua expressão gênica, proliferação e diferenciação (ROSER, 2008).

As células de Sertoli coordenam a diferenciação celular e produção de espermatozoides. As interações celulares entre as células de Sertoli formam a barreira hematotesticular, formando uma região protegida do sistema imunológico para o desenvolvimento das células germinativas. Devido a isso, ocorre uma compartimentalização do epitélio seminífero, facilitando a espermição das espermátides, movimento das linhagens jovens, fagocitose das células germinativas degeneradas e corpos residuais além de secreção de fluido luminal e comunicação intercelular (AMANN, 2011a). Elas também secretam uma variedade de proteínas e fatores reguladores da função testicular que estão intimamente ligados com a espermatogênese (AMANN, 2011a; VARNER; JOHNSON, 2011).

O IGF-1, secretado pelas células de Sertoli (AMANN, 2011a), estimula a proliferação das mesmas e tem um pequeno efeito mitogênico nas células imaturas de Leydig. O IGF-1 estimula a produção de testosterona. Além disso, acredita-se que o IGF-1 esteja envolvido na espermatogênese (ROSER, 2008). O IGF-1 foi identificado no tecido testicular, em garanhões com idade inferior a 2 anos, apresentavam maiores concentrações de IGF-1 no plasma e nos extratos testiculares quando comparados aos outros grupos etários de garanhões mais velhos. Os autores sugeriram que o IGF-1 pode estar envolvido no desenvolvimento testicular. No mesmo estudo, foi mensurada a concentração de IGF-1, sendo mais elevada durante a estação reprodutiva quando comparada ao período fora da temporada de reprodução (HESS; ROSER, 2001).

A TF é uma proteína ligante de ferro; fornecendo-o como componente para as células germinativas. As células de Sertoli sintetizam TF e após a ligação da proteína com o ferro, o complexo é secretado no espaço adluminal. A TF ligada ao ferro fica então disponível para os receptores nos espermátócitos que possuem sítios específicos de ligação à TF (HOLMES et al., 1983). No garanhão, a TF é produzida pelas células de Sertoli e regulada pelo FSH (BIDSTRUP et al., 2002). A interleucina 6 (IL-6) mostrou afetar a secreção de TF pelas células de Sertoli (HULEIHEL; LUNENFELD, 2004). A TF está presente no fluido seminal e não há diferença nas concentrações entre o primeiro e o segundo ejaculado. A TF não parece estar correlacionada com a fertilidade em garanhões, contudo são necessários mais estudos para melhor elucidar essa correlação (ROSER, 2008).

A interleucina 1 (IL-1) e IL-6, produzidas pelas células de Sertoli, podem potencialmente atuar como um fator fisiológico parácrino nos linfócitos e em outras células testiculares. Essas citocinas também podem ser necessárias para regular as funções dos linfócitos locais, importantes para a proteção imunológica tecidual. Outros produtos leucocitários, como o interferon-gama ($IFN\gamma$) e o fator de necrose tumoral alpha ($TNF-\alpha$), mostraram regular, induzindo ou inibindo, a esteroidogênese das células de Leydig e secreção de transferrina pelas células de Sertoli (HULEIHEL; LUNENFELD, 2004).

2.3 Epidídimo

O epidídimo é um órgão alongado, monotubular e enrolado em espiral. O órgão no garanhão apresenta comprimento aproximadamente de 70-80 metros sendo um ducto compactado dividido em três segmentos anatômicos: cabeça, corpo e cauda (VARNER; JOHNSON, 2011).

A cabeça está intimamente ligada com o parênquima testicular, sua estrutura consiste de vários condutos eferentes que se unem para formar um único túbulo, o ducto epididimário, o qual, por suas espirais complexas, forma o corpo e a cauda do epidídimo. As espirais do ducto epididimário são mantidos na posição por tecido conjuntivo e por fibras musculares lisas. O corpo do epidídimo é cilíndrico e localiza-se na superfície dorso-medial testicular. Cauda é destacada e localiza-se no polo caudal do testículo (AMANN, 2011a).

Do ponto de vista funcional a cabeça do epidídimo recebe os espermatozoides (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005), como também, absorve fluidos e solutos advindos do testículo. O corpo envolve a maturação espermática e a cauda armazena os espermatozoides. Do número total de espermatozoides estocados, aproximadamente 61% se localizam na cauda epididimária (VARNER; JOHNSON, 2011).

A maturação espermática é iniciada durante o trânsito epididimário (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). A partir da maturação, a membrana plasmática do espermatozoide sofre remodelações de superfície por interações específicas de proteínas e glicoproteínas, que são secretadas ao longo do trato genital masculino e que também estão presentes no plasma seminal (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005; VARNER; JOHNSON, 2011). A célula espermática sofre a translocação da gota citoplasmática proximal para distal, adquire a capacidade para motilidade (AMANN, 2011a) e capacidade fertilizante (AMANN, 2011a; TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Fatores exatos que causam o início de motilidade são desconhecidos, mas o pH intracelular pode estar envolvido (AMANN, 2011a). Todavia, os mecanismos que controlam a maturação espermática em nível de expressão gênica ainda são desconhecidos (VARNER; JOHNSON, 2011).

2.4 Espermatogênese

O processo da espermatogênese é regulado por uma complexa interação de sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos (ROSER, 2008). Antes do nascimento, as células germinativas primordiais do embrião migram do saco vitelino para a região indiferenciada do gânglio fetal. Essas células sofrem várias divisões nas gônadas para produzir gonócitos. Os gonócitos persistem até o período peri-puberdade, momento que se diferenciam em espermatogônias, estabelecendo o início da espermatogênese no ganhão (HENINGER, 2011).

A espermatogênese é iniciada pela diferenciação das espermatogônias a partir de um grupo de células-tronco (VARNER; JOHNSON, 2011). Todavia, pouco sabe-se sobre os sinais neuroendócrinos no início da espermatogênese (HENINGER, 2011).

A espermatogênese é um processo cíclico altamente organizado, sendo caracterizada por divisões e alterações celulares para produção de espermatozoides dentro do epitélio do túbulo seminífero. Estes túbulos são compostos por células germinativas em diferentes graus de desenvolvimento, intercaladas e sustentadas pelas células de Sertoli (VARNER; JOHNSON, 2011). O tempo de duração da espermatogênese no garanhão é de 57 dias, sendo dividida em três fases: espermatocitogênese, meiose e espermiogênese (JOHNSON; GRIFFIN; MARTIN, 2011).

A espermatocitogênese ocorre na região basal do epitélio seminífero tendo duração de 19,4 dias na espécie equina (JOHNSON; GRIFFIN; MARTIN, 2011). Nessa etapa as espermatogônias (A0) dividem-se por mitose e diferenciam-se outras formas morfológicas de espermatogônias (A1, A2, A3, A4, B1 e B2), originando posteriormente os espermatócitos primários, gerações mais avançadas de células germinativas (HULEIHEL; LUNENFELD, 2004; JOHNSON; GRIFFIN; MARTIN, 2011).

Após a última divisão espermatogonial, inicia-se a fase de meiose com duração de 19,4 dias. Os espermatócitos primários (diploides) em pré-leptóteno vão para a fase de leptóteno (cromossomos são espiralizados), posteriormente, zigóteno (pareamento dos cromossomos homólogos). Logo após, os cromossomos compactam-se e entram na fase de paquíteno (troca de segmento entre cromossomos homólogos), posteriormente, de diplóteno e diacinese espermática (VARNER; JOHNSON, 2011). O núcleo, agora, passa pela metáfase I, anáfase I e telófase I produzindo os espermatócitos secundários (haploides). Na segunda divisão meiótica, os espermatócitos secundários dividem-se e passam a ser denominados espermátides (JOHNSON; GRIFFIN; MARTIN, 2011).

A espermiogênese caracteriza-se como a última etapa tendo duração de 18,6 dias no garanhão. Nesse período, as espermátides esféricas sofrem uma compactação da cromatina, formação do acrossoma e flagelo diferenciando-se nos espermatozoides (JOHNSON; GRIFFIN; MARTIN, 2011). A partir da liberação dos espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero, processo denominado de espermiação, estes transitam pelo epidídimo onde ocorrerá a maturação espermática (VARNER; JOHNSON, 2011). Pouco se sabe sobre os mecanismos regulatórios envolvidos no processo da espermiogênese. Há evidências crescentes do envolvimento de vários genes, que são expressos pelo genoma haploide (HULEIHEL; LUNENFELD, 2004).

A apoptose de células germinativas ocorre espontaneamente no testículo adulto e provavelmente serve como um mecanismo fisiológico para controlar o número de células germinativas no testículo e manter a espermatogênese funcional (PRINT; LOVELAN, 2000). A FasL, uma proteína transmembrana ligante do tipo II, pertencente à superfamília do TNF- α , é uma proteína iniciadora de apoptose bem caracterizada (NAGATA, 1997). Riccioli et al., (2003) indicam que as células de Sertoli são as principais células que expressam FasL no túbulo seminífero.

2.5 Glândulas sexuais acessórias

As ampolas do ducto deferente, as vesículas seminais ou glândulas vesiculares, a próstata e as glândulas bulbouretrais compõem as glândulas sexuais acessórias no garanhão (BRINSKO; BLANCHARD, 2011; WEBER; WOODS, 1993).

À medida que o ducto deferente aproxima-se da uretra pélvica, alarga-se em uma estrutura denominada ampola do ducto deferente (AMANN, 2011a). O diâmetro médio da ampola é de 18 mm (VARNER; SCHUMACHER, 2011). As ampolas, juntamente com a cauda do epidídimo compõem as reservas extragonadais de espermatozoides armazenando aproximadamente 20-30 bilhões de células espermáticas (BRINSKO; BLANCHARD, 2011).

As vesículas seminais são bolsas alongadas, ocas, 15-20 cm de comprimento, 5 cm de diâmetro e situam-se lateralmente às ampolas. O ducto de cada vesícula seminal converge com o ducto deferente ipsilateral para formar um ducto comum no lúmen da uretra pélvica (VARNER; SCHUMACHER, 2011). As glândulas vesiculares sofrem uma grande expansão durante a estimulação sexual; liberando produtos emitidos pelo seu lúmen; secretam um gel viscoso nas últimas frações do ejaculado (WEBER; WOODS, 1993) contribuindo para a produção de grande parte do plasma seminal do garanhão (AMANN, 2011a).

A próstata no garanhão é uma única glândula nodular firme com dois lóbulos estreitos conectados por um istmo transversal fino. Os lóbulos estão situados lateral à uretra pélvica e caudal as glândulas vesiculares correspondentes. Cada lóbulo tem aproximadamente 5 a 8 cm de comprimento, 2-3 cm de largura e 1-2 cm de espessura. A próstata tem vários ductos que entram no lúmen uretral (VARNER; SCHUMACHER, 2011).

As duas glândulas bulbouretrais estão posicionadas próximas do arco isquiático adjacentes a uretra pélvica (AMANN, 2011a). Essas glândulas ovóides têm 3-4 cm de comprimento e 2-2,5 cm de largura. Cada glândula bulbouretral tem vários ductos excretórios direcionados ao lúmen uretral (VARNER; SCHUMACHER, 2011).

Durante o estímulo sexual e ejaculação (VARNER; SCHUMACHER, 2011; WEBER; WOODS, 1993), as secreções provenientes do epidídimo, juntamente com as glândulas anexas contribuem para a formação do plasma seminal (AMANN, 2011a; TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). O plasma seminal exerce múltiplos efeitos no espermatozoide através de proteínas de ligação espermática; essas têm se mostrado envolvidas no estabelecimento do reservatório de espermatozoides oviductais (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005), no controle da capacitação espermática e em eventos de fertilização central, por exemplo, interação espermatozoide-zona pelúcida e fusão óvulo-espermatozoide (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005; VARNER; JOHNSON, 2011). A expressão dessas proteínas funcionalmente importantes corresponde às regiões específicas dentro do trato genital masculino (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

Proteínas de ligação à Fibronectina tipo II, como a proteína seminal equina 1 (HSP-1) e a proteína seminal equina 2 (HSP-2) são sintetizadas em grande parte pelas ampolas, estando relacionadas diretamente com a modulação da capacitação espermática. A proteína secretória rica em cisteína 3 (CRISP-3) é sintetizada na ampola, como também nas vesículas seminais e está relacionada com a ligação espermatozoide-oócito. As espermadecinas são glicoproteínas associadas à superfície espermática na ejaculação, predominantemente na região acrossomal da cabeça do espermatozoide. São sintetizadas principalmente nas vesículas seminais. As espermadecinas têm sido atribuídas em múltiplas ações; estando envolvidas nas etapas de fertilização. A espermadecina, proteína seminal equina 7 (HSP-7), é uma proteína de ligação a carboidratos que apresenta um papel na interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

Ellerbrock et al., (2016), realizaram um estudo para avaliar a expressão gênica: receptor de estrógeno 1 (ESR1), receptor de estrógeno 2 (ESR2), receptor de andrógeno (AR), 3 β -Hydroxisteroide desidrogenase/ δ 5-4isomerase (3BHSD), P450, 17-20 lyase (CYP17), 17 α hidroxilase e CYP19 nas glândulas acessórias de garanhões adultos, potros púberes, cavalos castrados e fetos machos de 300 dias. Os pesquisadores hipotetizaram que os receptores de esteroides sexuais e as enzimas esteroidogênicas dependiam do status reprodutivo do macho. A expressão gênica do AR, ESR2, CYP17, ou CYP19 na ampola não apresentou diferença ($p > 0,1$) entre os estados reprodutivos. O ESR1 foi mais expresso na ampola de castrados e fetos do que nos garanhões ou potros ($p < 0,05$). Não houve diferença na expressão de qualquer um dos receptores ou enzimas em todos os estados reprodutivos na glândula bulbouretral. A expressão do AR na glândula vesicular foi maior no feto e no castrado do que no garanhão. Da mesma forma, a expressão de ESR1 e ESR2 foi menor nas vesículas seminais do garanhão em comparação com o feto e o macho castrado. Ao comparar a expressão entre as glândulas, a

expressão do AR, ER1 e CYP17 foi menor na bulbouretral em comparação com as outras glândulas. ESR1 foi mais altamente expresso na próstata do que na bulbouretral, e não foram observadas diferenças com CYP19 ou 3BHSD. Os autores concluíram que os receptores de esteroides sexuais são expressos em todas as glândulas sexuais acessórias e nos diferentes estágios de vida do equino macho.

2.6 Metaloproteinases de matriz

As proteases desempenham papéis chave em quase todos os processos da fisiologia celular (MÉTAYER et al., 2002), tendo assim inúmeros impactos sistêmicos em diversos processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário, morfogêneses dos órgãos, angiogênese, remodelamento de cartilagens, crescimento ósseo, cicatrização de feridas, integridade periodontal, reparação corneal (CURRY; OSTEEEN, 2003), remodelação testicular durante a espermatogênese (MBIKAY et al., 1997) e mudança de domínios de membrana do espermatozoide na passagem pelo epidídimo (VARNER; JOHNSON, 2011).

As metaloproteinases de matriz (MMP) constituem uma família de proteases caracterizadas em diferentes espécies (NAGASE; WOESSNER, 1999). Atualmente existem cerca de 40 famílias e mais de 200 MMP descritas na literatura (CURRY; OSTEEEN, 2003).

As MMP degradam a maioria, senão todos os componentes da matriz extracelular (MEC) e membrana basal (MB) (LONGIN et al., 2001); estando envolvidas no remodelamento celular e tecidual (BASTOS et al., 2013; HULBOY; RUDOLPH; MATRISIAN, 1997), nas interações celulares (HOEBEN et al., 1996; ROBINSON et al., 2001), como também, sinalização e migração celular (LONGIN et al., 2001). Além de desempenhar um papel na perda de massa do tecido conjuntivo, as MMP podem influenciar o fenótipo dos componentes celulares dos tecidos, alterando funções celulares básicas como proliferação, diferenciação e apoptose (HULBOY; RUDOLPH; MATRISIAN, 1997). A capacidade das MMP de clivar as ligações proteicas, bem como clivar domínios extracelulares ativos de fatores de crescimento expande o repertório de ações, incluindo também, modulação do crescimento celular (CURRY; OSTEEEN, 2003).

O advento e desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, permitiram que as mudanças no padrão de expressão de RNAm sejam investigadas, superando algumas das insuficiências dos ensaios enzimáticos. As mudanças nos níveis de RNAm, na maioria das vezes, no entanto, correspondem com as mudanças relatadas na atividade de collagenases e gelatinases (CURRY; OSTEEEN, 2003).

A regulação do sistema das MMP é extremamente complexo, sinais que coordenados podem regular uma MMP, pode regular diferencialmente outras MMP. Da mesma forma, os sinais que regulam uma determinada MMP em um lugar, podem não ter efeito ou mesmo um efeito oposto dependendo da presença ou ausência de outros sinais (CURRY; OSTEEEN, 2003). As MMP são expressas de uma maneira altamente regulada em muitos processos reprodutivos (HULBOY; RUDOLPH; MATRISIAN, 1997).

2.6.1 Metaloproteinases de matriz no trato reprodutor masculino

Os órgãos do sistema reprodutivo sofrem uma remodelação extensiva, ocorrendo rápidas mudanças na massa e função tecidual (HULBOY; RUDOLPH; MATRISIAN, 1997). As concentrações e atividade das MMP podem ser reguladas por hormônios reprodutivos, bem como por fatores de crescimento e citocinas (HULBOY; RUDOLPH; MATRISIAN, 1997). É citada uma interação de ligação entre as MMP e o fator de crescimento epidérmico (EGF), como também uma ligação com o TNF- α (CURRY; OSTEEEN, 2003). A IL-1 e o TNF- α foram implicados no controle da expressão das MMP (SALAMONSEN; WOOLLEY, 1996).

O testículo é um órgão que sofre uma remodelação constante devido à espermatogênese (MBIKAY et al., 1997). Os túbulos seminíferos reestruturam-se de um modo cíclico (LONGIN et al., 2001). À medida que as células germinativas desenvolvem-se e diferenciam-se em células mais especializadas, essas progridem para o lúmen tubular (VARNER; JOHNSON, 2011). Várias proteases foram encontradas (MBIKAY et al., 1997) e relacionadas com o desenvolvimento testicular e espermatogênese (LONGIN et al., 2001) através da expressão gênica utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR) (LONGIN et al., 2001; MBIKAY et al., 1997).

O epidídimo é uma estrutura tecidual que liga o testículo ao canal deferente. A capacidade de fertilização do espermatozoide é adquirida durante a sua permanência nesse órgão (AMANN, 2011a). A maturação da célula espermática no epidídimo envolve alterações em domínios específicos da membrana principalmente devido a modificações em sua composição proteica (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005; VARNER; JOHNSON, 2011). Algumas dessas modificações resultam de um processamento proteolítico muito específico levando ao desaparecimento ou redistribuição de proteínas entre os diferentes domínios (PHELPS et al., 1990).

A próstata representa outro tecido reprodutivo que sofre extensas alterações morfológicas ao longo da vida, com maturação e involução representando períodos de construção e remodelação tecidual (HULBOY et al., 1997). Wilson et al., (1992) encontraram uma atividade gelatinolítica dependente de cálcio, provavelmente uma MMP ativa. Curiosamente, o momento dessa atividade da MMP coincide com o período de diferenciação da estrutura do complexo prostático. Saarialho-Kere; Crouch; Parks, (1995) citam que as MMP desempenham ação na abertura dos ductos prostáticos.

Longin et al., (2001) realizaram um experimento em ratos para avaliar as MMP no desenvolvimento testicular e no controle da espermatogênese. Os autores demonstraram que a metaloproteinase de matriz-1 (MMP-1), metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) e uma pró-forma da MMP-2 (proMMP-2) estão presentes dentro do testículo. Através da utilização da técnica de qPCR demonstraram a expressão gênica da MMP-1 e MMP-2 durante o desenvolvimento testicular em ratos. A partir da imunohistoquímica, encontraram uma homogênea distribuição da MMP-1 no compartimento adluminal, onde a meiose e espermiogênese se desenvolvem. Já a MMP-2 foi encontrada nas células de Sertoli através da imunomarcagem. As células de Sertoli foram também isoladas e cultivadas com posterior estimulação pelo FSH; resultando em um aumento da expressão de MMP-2. Os pesquisadores enfatizaram sobre a importância das MMP regulando a fisiologia testicular.

Métayer et al., (2002), analisaram os fluidos testiculares e epididimários do carneiro, javali e garanhão. O método de eletroforese bidimensional e Western blot demonstraram a presença e a distribuição regional de diferentes proteases no epidídimo do rato, garanhão e touro. Com o uso da eletroforese isolou-se no fluido epididimal do garanhão uma pró-forma da MMP-2. A presença da proteína foi confirmada utilizando um anticorpo policlonal anti-MMP-2. O estudo demonstrou a distribuição de diferentes proteases no fluido epididimário, sugerindo que essas podem atuar no processo de maturação espermática.

Warinrak et al., (2015), conduziram um estudo para avaliar a expressão e localização celular da MMP-2 nos testículos, epidídimos e espermatozoides em cães. A expressão de RNAm da MMP-2 foi confirmada nos tecidos testiculares e epididimais. A imunohistoquímica revelou uma forte relação da MMP-2 na cabeça das espermátides, como também ao longo da região acrossomal do espermatozoide. Os pesquisadores sugeriram que a MMP-2 pode ser um marcador da qualidade espermática, pois encontraram uma forte correlação da concentração da MMP-2 no sêmen de alta qualidade.

2.7 Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NF- κ B)

O NF- κ B é um fator de transcrição que desempenha um papel fundamental em vários processos fisiológicos (CHRISTIAN; SMITH; CARMODY, 2016), regulando a expressão de inúmeros mediadores celulares (ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003) através de informações intra e extracelulares (DELFINO; WALKER, 1998). O NF- κ B, ao nível celular, regula o ciclo, proliferação e morte celular (CHRISTIAN; SMITH; CARMODY, 2016). Esse fator foi primeiramente descrito, em 1986, por Sen e Baltimore como capaz de ligar-se a sítios específicos kappa, nas regiões promotoras dos genes das imunoglobulinas em células B (BALTIMORE, 1986). Reconhece-se também que o NF- κ B é expresso na maioria dos tipos celulares, sendo constituído por um dímero composto dos membros da família da Rel (ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003).

A família do NF- κ B/Rel compreende cinco subunidades, chamadas p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, e RelB (DELFINO; WALKER, 1998; ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003). Essas subunidades formam homodímeros e heterodímeros em várias combinações. Geralmente o NF- κ B é constituído de dois polipeptídeos: um de 50 kDa (p50) e um de 65 kDa (p65). Em células em homeostase, o NF- κ B mantém-se no citoplasma em sua forma inativa, associado com as proteínas inibidoras do sítio κ B, denominadas inibidores κ B (I κ B). Sete espécies de I κ B são descritas: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, p100, e p105. O NF- κ B pode ser ativado por uma variedade de sinais relevantes, conforme a etiologia e a fisiopatologia (ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003).

Para ativar o NF- κ B, são necessários estímulos intracelulares e/ou extracelulares (CHRISTIAN; SMITH; CARMODY, 2016), podendo ser desencadeados pelos seguintes agentes: citocinas (TNF- α e interleucinas), produtos bacterianos (endotoxinas e peptidoglicanos), componentes virais, protozoários e radicais livres (ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003).

A ativação do NF- κ B requer a fosforilação de seus inibidores fisiológicos (I κ B) em resíduos específicos de Serina (YAMAOKA et al., 1998). Tal fosforilação é mediada por um complexo proteico, o complexo cinase kappa B (IKK) (CHRISTIAN; SMITH; CARMODY, 2016). O complexo IKK é composto de três subunidades, duas unidades catalíticas IKK- α , IKK- β , e uma unidade reguladora IKK γ (NF- κ B essencial modulador, NEMO) (YAMAOKA et al., 1998). Após a fosforilação, ocorre a subsequente degradação dos I κ B através das ubiquitinas. A degradação proteolítica dos I κ B permite a translocação do NF- κ B ao núcleo,

onde ele regula a expressão de centenas de genes que são importantes na fisiologia celular (DELFINO; WALKER, 1998; YAMAOKA et al., 1998).

Delfino e Walker, (1998) determinaram por imunohistoquímica que o NF- κ B está presente no núcleo das células de Sertoli e em determinados estágios das células germinativas no epitélio seminífero, cultivadas a partir de testículos de ratos. Identificaram o NF- κ B no final da fase meiótica e inicialmente na espermiogênese, evidenciada nas espermátides haploides. A partir desses resultados, os autores sugerem que o NF- κ B é um importante regulador da espermatogênese.

Budde et al., (2002) desenvolveram um experimento para evidenciar a expressão gênica do I κ B α e I κ B β , ambos inibidores do NF- κ B. Os resultados demonstraram que I κ B α e I κ B β foram ambos expressos em baixos níveis no cérebro, coração, fígado e pulmão. O I κ B α foi mais expresso no baço que o I κ B β . Todavia, I κ B β foi altamente expresso nos testículos do que em qualquer outro tecido analisado, o que sugere que o I κ B β possa desempenhar um importante papel na fisiologia testicular.

2.8 Fator de Necrose Tumoral Alpha (TNF- α)

As citocinas são polipeptídeos secretados pelas células da imunidade natural e/ou adquirida, sendo liberadas em decorrência de diferentes estímulos; interagindo com os seus receptores regulando a função celular, além de estarem intimamente relacionadas ao processo inflamatório (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; HULEIHEL; LUNENFELD, 2004). As citocinas geralmente não são armazenadas como moléculas pré-formadas; sua síntese é iniciada por novas transcrições de genes, como resultado da ativação celular. A produção de algumas citocinas pode ser controlada adicionalmente por processamento de RNA e por mecanismos pós-transcricionais, como a liberação proteolítica de um produto ativo de um precursor inativo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O TNF- α é uma citocina que age na imunidade natural, como também atua em processos fisiológicos locais e sistêmicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). O TNF- α foi descoberto em 1975, sendo considerada uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do corpo (CARSWELL et al., 1975). O TNF- α é sintetizado como uma proteína de membrana, com uma extremidade aminoterminal intracelular e uma extremidade carboxiterminal extracelular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; HEHLGANS; PFEFFER, 2005). Possui potencial de sinalização tanto como uma

proteína integrada à membrana, ou como uma citocina solúvel liberada após clivagem proteolítica (HEHLGANS; PFEFFER, 2005). As MMP são essenciais para o processamento do TNF- α (BLACK et al., 1997). A forma de membrana do TNF- α é clivada por uma MMP associada à membrana, liberando um polipeptídeo de 17 kD (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Salamonsen; Woolley (1996) realizaram um estudo e evidenciaram uma relação de interação entre a MMP-1 e o TNF- α . Após a clivagem, o TNF- α liga-se aos receptores que são membros de uma grande família de proteínas.

Dentre as funções do TNF- α destacamos: ativação de neutrófilos, atuação no hipotálamo para induzir a febre, catabolismo no tecido muscular e adiposo, atuação nos hepatócitos para aumentar a síntese de certas proteínas séricas, como a proteína amiloide A do soro e o fibrinogênio, como também apoptose em vários tipos celulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). O TNF- α apresenta um efeito modulador na esteroidogênese das células de Leydig (MORALES et al., 2003) e secreção de transferrina pelas células de Sertoli (HULEIHEL; LUNENFELD, 2004).

O complexo de ligação formado pelo TNF- α e receptor implica em outra importante função, ativação de fatores de transcrição, especialmente o NF- κ B (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). As subunidades p50 e p65 do NF- κ B sofreram aumentos de concentração no núcleo celular das células de Sertoli, sugerindo que a acumulação nuclear dessas subunidades poderia ser induzida em resposta a sinais. Um candidato a indutor do NF- κ B no testículo é o TNF- α . A adição do TNF- α às células de Sertoli resultou em um expressivo aumento na ligação nuclear do NF- κ B. Após cessar a estimulação diminuiu-se a atividade de ligação do NF- κ B. Esses dados sugerem que o TNF- α induz a atividade de ligação do NF- κ B nos núcleos celulares das células de Sertoli (DELFINO; WALKER, 1998).

Yao et al., (2007) realizaram um estudo para investigar a regulação transcricional da proteína FasL nas células de Sertoli. Os autores identificaram que o NF- κ B é um dos fatores de transcrição que participa da expressão da FasL. Além disso, demonstraram que a expressão da FasL controlada pelo NF- κ B nas células de Sertoli é desencadeada pelo TNF- α liberado pelas células germinativas. Os autores hipotetizam que o TNF- α é secretado como um fator parácrino a partir de células germinativas em resposta à lesão de células de Sertoli. Estes resultados reiteram a importância das interações parácrinas entre as células de Sertoli e as células germinativas (Figura 1).

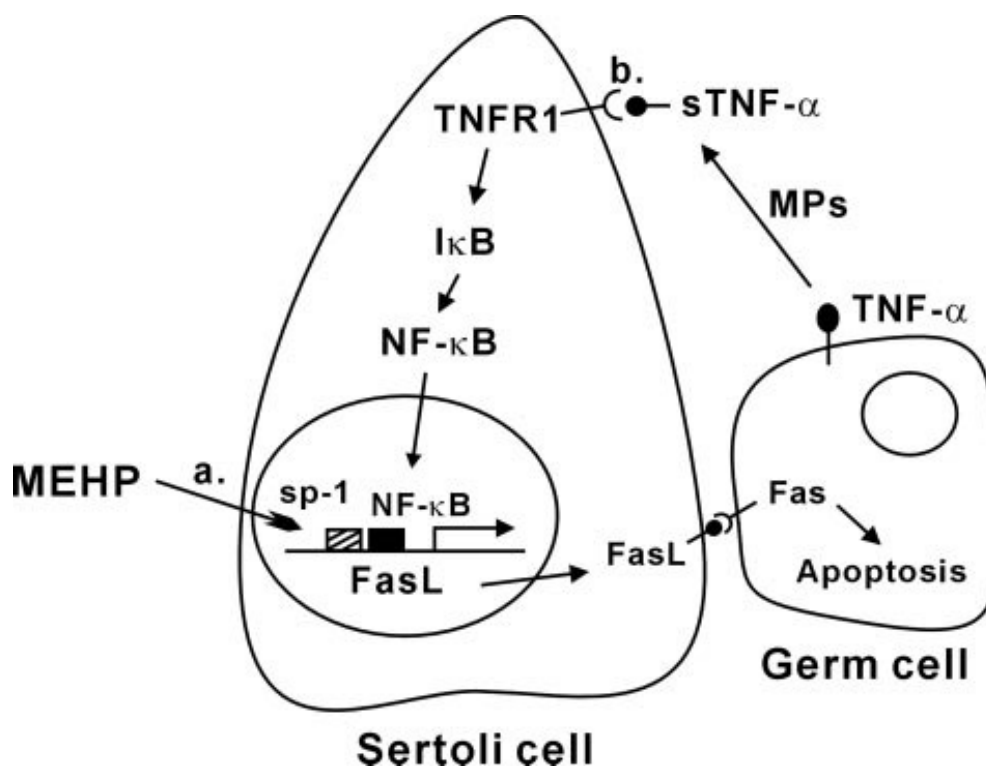


FIGURA 1 - Modelo indicando ambos, efeitos diretos (a) sobre as células de Sertoli e as respostas indiretas (b) pelas células germinativas que desempenham um papel no aumento da expressão de FasL pelas células de Sertoli como consequência da lesão induzida pelo mono-2-etilhexilftalato (MEHP). (a) MEHP atua diretamente sobre as células de Sertoli, consequentemente, ativa o NF- κ B e a proteína específica 1 (Sp-1) através de um mecanismo que ainda não foi descrito. NF- κ B e Sp-1 ativados resultam no aumento dos níveis de transcrição da FasL nas células de Sertoli. FasL na membrana celular liga-se com o receptor Fas expresso nas células germinativas adjacentes para desencadear apoptose. (b) Lesão das células de Sertoli induzidas pelo MEHP diminui o suporte físico, hormonal e nutricional das células germinativas, levando ao aumento da produção e liberação da forma solúvel do TNF- α (sTNF- α) liberado dessas células. Aumentos no sTNF- α são provavelmente produzidos pela ação de um ou mais membros da família das metaloproteinases (MMP). O sTNF- α produzido por células germinativas pode então ligar-se ao TNF- α -R1 que está presente na célula de Sertoli, resultando na ativação da via de ativação do NF- κ B e consequente aumento na transcrição do gene FasL (YAO et al., (2007).

3 ARTIGO

Artigo para publicação na Journal of Equine Veterinary Science (JEVS)

Gene expression of MMP-1, MMP-2, TNF- α and I κ B β on the reproductive tract of stallion

Marcelo Barcelos Rocha^{1*}, Henrique Boll de Araujo Bastos¹, Gabriel de Oliveira Santos¹, Luciana Bortoluzzi¹, Maria Inês Mascarenhas Jobim¹, Rodrigo Costa Mattos¹, Néelson Alexandre Kretzmann Filho¹

¹REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre – RS

*E-mail: marcelobarcelos.vet@hotmail.com

Abstract

Reproductive physiology of the stallion is a complex mechanism involving hormones, cytokines, growth factors, proteases, among other regulatory mechanisms. Matrix metalloproteinases (MMP) constitute a family of proteases characterized by playing key roles in almost all physiological processes including, cell signaling, cell migration, cell remodeling and cell-cell interactions. TNF- α and I κ B β (NF- κ B inhibitor β) also plays a key role in various physiological processes. The objective of the study was to verify the gene expression of MMP-1, MMP-2, TNF- α and I κ B β in different regions of the stallion's reproductive apparatus. The reproductive tracts of five stallions was collected. Tissue samples were collected from the testis; the head, body and tail of the epididymis; prostate, seminal vesicle and ampulla of deferent duct. The selected tissues were destined to the qPCR technique. The gene expression of MMP-1, MMP-2, TNF- α and I κ B β was verified in all tissues evaluated. Statistical differences were observed in the gene expression of MMP-1 ($p = 0,014$) in relation to the different regions of the reproductive tract of the stallion. The body and tail of the epididymis presented greater MMP-1 gene expression than the testis, ampulla, prostate and seminal vesicle. Differences were observed in the MMP-2 gene expression ($p = 0,012$). The testis, body and tail of the epididymis presented greater MMP-2 gene expression than the prostate and the head of the epididymis. The testis and the body of the epididymis also presented greater gene expression in relation to the seminal vesicle. Differences were observed in the gene expression of TNF- α ($p = 0,01$). The testis and tail of the epididymis presented greater TNF- α gene expression than the prostate and seminal vesicle. Differences were not observed in the gene expression of I κ B β . Our study presented positive correlations MMP-2 with TNF- α in the testis ($R = 0,99/ p = 0,007$), MMP-1 with TNF- α in the head of the epididymis ($R = 0,99/ p = 0,006$), MMP-2 with I κ B β in the body of the epididymis ($R = 0,99/ p = 0,0084$) and MMP-1 with TNF- α in the prostate ($R = 0,86/ p = 0,05$). The testis coordinates cell differentiation and sperm production, body and tail of the epididymis involves sperm maturation. We suggest that MMP-2 and I κ B β may be markers of sperm production due to the high gene expression evidenced in the testis in this study. We suggest that MMP-1 may be a marker of sperm maturation due to the high gene

expression evidenced in the body and tail of the epididymis in this study. Our positive correlations reinforce the physiological relationship between MMP and TNF- α .

Keywords: equine, reproductive physiology, proteases, cytokines, qPCR

1 INTRODUCTION

Reproductive physiology of the stallion is a complex mechanism involving hormones, cytokines, growth factors, proteases, among other regulatory mechanisms. Several proteases have been found (MBIKAY et al., 1997) and related to testicular development and spermatogenesis (LONGIN et al., 2001) through gene expression using the quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) technique (LONGIN et al., 2001; MBIKAY et al., 1997).

Matrix metalloproteinases (MMP) constitute a family of proteases (NAGASE; WOESSNER, 1999) characterized by playing key roles in almost all physiological processes including, cell signaling, cell migration (LONGIN et al., 2001), cell remodeling (HULBOY et al. 1997) and cell-cell interactions (MÉTAYER et al., 2002), thus having numerous systemic impacts on several physiological processes such as testicular remodeling during spermatogenesis (MBIKAY et al., 1997), change in sperm membrane domains in passage through the epididymis (VARNER, JOHNSON, 2011), sperm maturation (MÉTAYER et al., 2002) and regulation of male fertility (BUCHMAN-SHAKED, et al., 2002).

Study demonstrated through qPCR that matrix metalloproteinases 1 (MMP-1) and matrix metalloproteinases 2 (MMP-2) are present during testicular development in rats. From the immunohistochemistry, was found a homogeneous distribution of MMP-1 in the testicular adluminal compartment. MMP-2 was found in Sertoli cells. Sertoli cells were also isolated and cultured with subsequent stimulation by follicle-stimulating hormone (FSH); resulting in an increase in MMP-2 expression (LONGIN et al., 2001).

Researchers through the method of two-dimensional electrophoresis and Western blot evidenced the presence and the regional distribution of different proteases in the epididymis of rat, stallion and bull. Two-dimensional electrophoresis isolated a pro-form of MMP-2 into the epididymal fluid of the stallion. The presence of the protein was confirmed using a polyclonal anti-MMP-2 antibody (MÉTAYER et al., 2002).

Research was conducted to evaluate the expression and cellular localization of MMP-2 in the testis, epididymis and spermatozoa in dogs. MMP-2 mRNA expression was confirmed in testicular and epididymal tissues. Immunohistochemistry revealed a strong relationship of

MMP-2 at the spermatids head, as well as along the spermatozoa acrosomal region (WARINRAK et al., 2015).

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is a cytokine that acts on physiological processes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). The binding complex formed by TNF- α and these receptors implies in another important function, activation of transcription factors, especially nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). NF- κ B is a transcription factor that plays a key role in various physiological processes (CHRISTIAN; SMITH; CARMODY, 2016), regulating the expression of innumerable cellular mediators (ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003) and extracellular agents (DELINO, WALKER, 1998).

NF- κ B is present in the nucleus of Sertoli cells and in certain stages of germ cells in the seminiferous epithelium, grown from rat testes. NF- κ B was identified at the end of the meiotic phase and initially on spermiogenesis, evidenced in haploid spermatids (DELFINO; WALKER, 1998). Researchers developed an experiment to evidence the gene expression of inhibitor kappa B alpha (I κ B α) and inhibitor kappa B beta (I κ B β), both NF- κ B inhibitors. The results demonstrated that I κ B α e I κ B β were both expressed at low levels in the brain, heart, liver and lung. I κ B α was more expressed in the spleen than the I κ B β . However, I κ B β was highly expressed in the testis than in any other tissue analyzed (BUDDE et al., 2002).

The objective of the study was to verify the gene expression of MMP-1, MMP-2, TNF- α and I κ B β in different regions of the stallion's reproductive tract.

2 MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out at the Animal Reproduction Laboratory UFRGS (REPROLAB).

Animals

This study was carried out with an Animal Ethical Use Committee approved protocol at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (protocol number 36450 from March 06, 2019).

The reproductive tracts of five stallions no signs of pathological abnormality, with age between five and fifteen years, without distinction of breed, with an unknown reproductive

history were collected in a slaughterhouse in the south of Uruguay (34° 22 S, 55° 36' W). Tissue fragments were collected from the testis; the head, body and tail of the epididymis; the prostate, the seminal vesicle and the ampulla of deferent duct. Tissue samples were stored under refrigeration in RNA later® (Life Technologies) during transport to the laboratory, and after were frozen in a freezer at -80°C.

RNA extraction

Total cellular mRNA was extracted from the tissue samples using TRIzol® Reagent reagent (Life Technologies), according to the manufacturer's recommendations. After extraction, the mRNA was quantified in the NanoVue Plus (GE Healthcare) spectrophotometer by measuring absorbance at 260 nanometers (nm).

cDNA synthesis

The cDNA was synthesized in a thermocycler apparatus from the reverse transcription reaction of the RNA extracted from the tissue samples using the ReadyScript™ cDNA Synthesis Mix commercial kit (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). The commercial kit contains: MgCl₂, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), RNase inhibitor recombinant proteins, reverse transcriptase enzyme, random primers, primer oligo (dT) and buffer solution. The conversion was performed according to the manufacturer's recommendations. Initially, 4 µL of the ReadyScript™ cDNA synthesis Mix solution (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) was mixed with 10 µL of the tissue RNA extracted from each sample, supplemented with 6 µL of RNase-free water; final volume of 20 µL in each eppendorf tube. The eppendorfs were then placed in the thermal cycler and incubated at 25°C for 5 min, 42°C for 30 min, 85°C for 5 min and finally cooled to 4°C. The cDNA was storage in a freezer at -20°C.

qPCR

The selected tissues were destined to the quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) technique. Reactions consisted of 1 µL of both primers (Table 1), 10 µL Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems by Life Technologies), 5 µL cDNA; water was added to make up a final volume of 20 µL. Amplification was performed using the StepOne™ real-time reaction detection system (Applied Biosystems). The data were processed using StepOnePlus™

Software v2.3. Amplification was performed at 95°C for 2 min, followed by 40 denaturation cycles at 95°C for 3 s, annealing at 60°C for 30 s, and elongation at 60°C for 30 s. After the amplification cycles, the melting curves were analyzed to ensure that there was only the specific reaction of the amplification of the chosen primer, discarding possible contaminations or reactions of primer dimers. The annealing temperatures used are shown in Table 1. Amplification primers were obtained from Integrated DNA Technologies (IDT®), and the sequence used is shown in Table 1. Relative quantification was performed, and the mRNA levels of the target genes were normalized against β -Actina (β -Actin) mRNA levels. The comparative threshold cycle (CT) ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method was used for calculating relative mRNA expression.

Table 1 – Sequences of primers used in the experiment.

Gene	Sequences of primer	T°C annealing
MMP-1-F	5' - CAT CGT GAC AAT TCT CCC TTT G - 3'	60°
MMP-1-R	5' - TAC GTG GGC CTG GCT GAA - 3'	60°
MMP-2-F	5' - ATG GCG CCC ATT TAC ACG TA - 3'	60°
MMP-2-R	5' - AGC TCT TGA ATG CCC TTG ATG - 3'	60°
TNF- α -F	5' - GCT CCA GAC GGT GCT TGT G - 3'	60°
TNF- α -R	5' - GCC GAT CAC CCC AAA GTG - 3'	60°
I κ B β -F	5' - CGT CAT CCA CAA AGA TGC AG - 3'	60°
I κ B β -R	5' - CTG GGC CTC AAC AGC CTA GT - 3'	60°
β -Actin-F	5' - CGA CAT CCG TAA GGA CCT GT - 3'	60°
β -Actin-R	5' - GTG GAC AAT GAG GCC AGA AT - 3'	60°

Abbreviations: F: Primer Forward, R: Primer Reverse, MMP-1: Matrix Metalloproteinases 1, MMP-2: Matrix Metalloproteinases 2, TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha, I κ B β : Inhibitor beta of Nuclear Transcription Factor kappa B, β -Actin.

3 STATISTICAL ANALYSIS

The gene expression data were submitted to the Kruskal Wallis test according to normality, each gene was considered dependent variable and the different tissues collected were considered as independent variables. The significance level was set at 5% ($p < 0.05\%$) and the analyzes were performed with the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

Pearson's correlation was used to verify relationships between the genes studied.

4 RESULTS

Gene expression of MMP-1, MMP-2, TNF- α and I κ B β was verified in all tissues evaluated. Statistical differences were observed in the gene expression of MMP-1 ($p = 0,014$). Body and tail of the epididymis presented greater MMP-1 gene expression than the testis, ampulla, prostate and seminal vesicle (Figure 2). Differences were observed in the gene expression of MMP-2 ($p = 0,012$). Testis, body and tail of the epididymis presented greater MMP-2 gene expression than the prostate and the head of the epididymis. Testis and the body of the epididymis also presented greater gene expression in relation to the seminal vesicle (Figure 3). Differences were observed in the gene expression of TNF- α ($p = 0,01$). Testis and tail of the epididymis presented greater TNF- α gene expression than the prostate and seminal vesicle (Figure 4). Differences were not observed in the gene expression of I κ B β in relation to the different regions of the reproductive tract of the stallion. There was a statistical trend ($p = 0,06$) of the testis and seminal vesicle to present greater gene expression in relation to the tail of the epididymis (Figure 5).

Positives Pearson's correlation are given in Table 2.

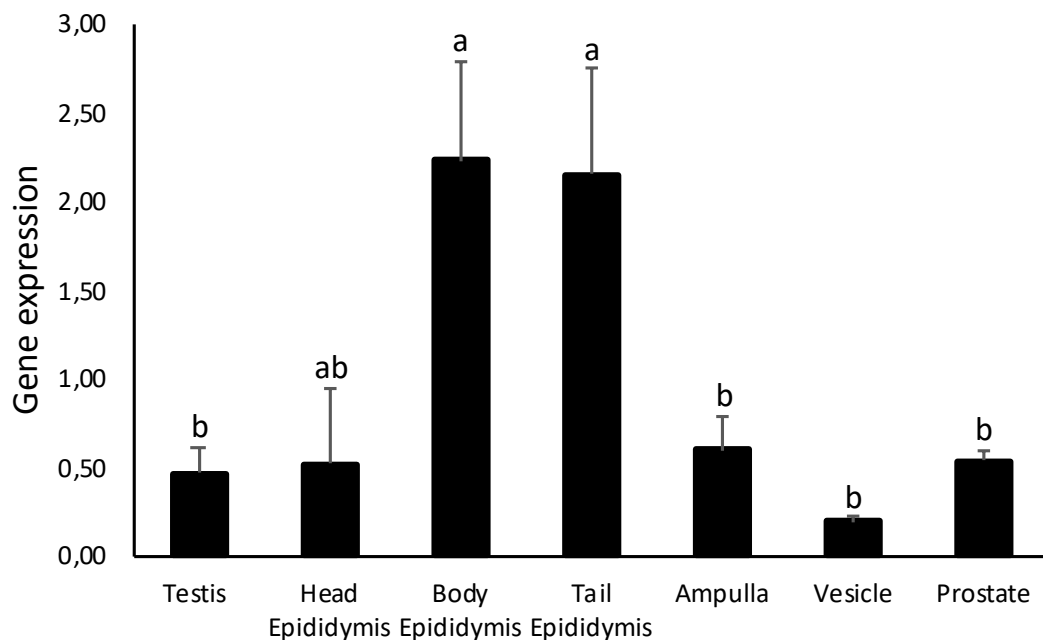


Figure 2 - Gene expression of MMP-1 in the reproductive tract of stallion.

^{ab}Different letters indicate significant differences between tissues ($p = 0,014$).

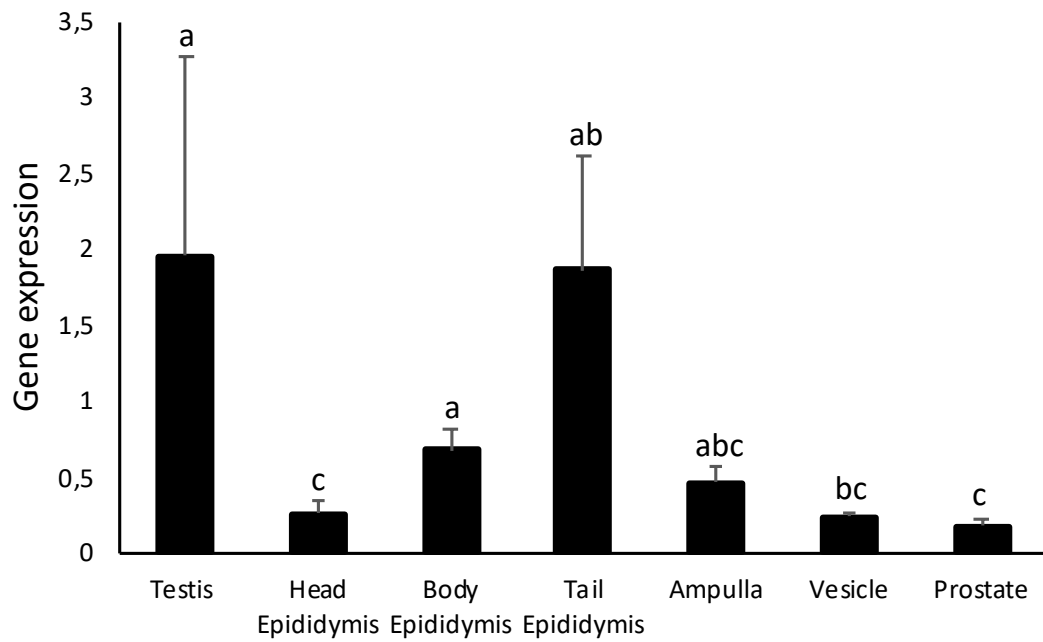


Figure 3 - Gene expression of MMP-2 in the reproductive tract of stallion.
^{abc}Different letters indicate significant differences between tissues ($p = 0,012$).

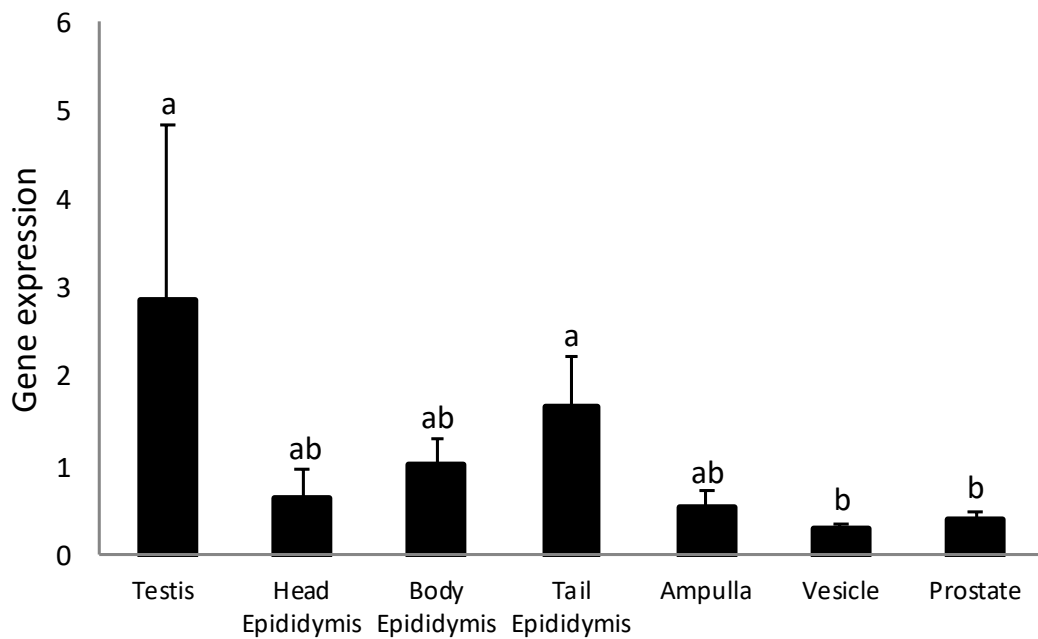


Figure 4 - Gene expression of TNF- α in the reproductive tract of stallion.
^{ab}Different letters indicate significant differences between tissues ($p = 0,01$).

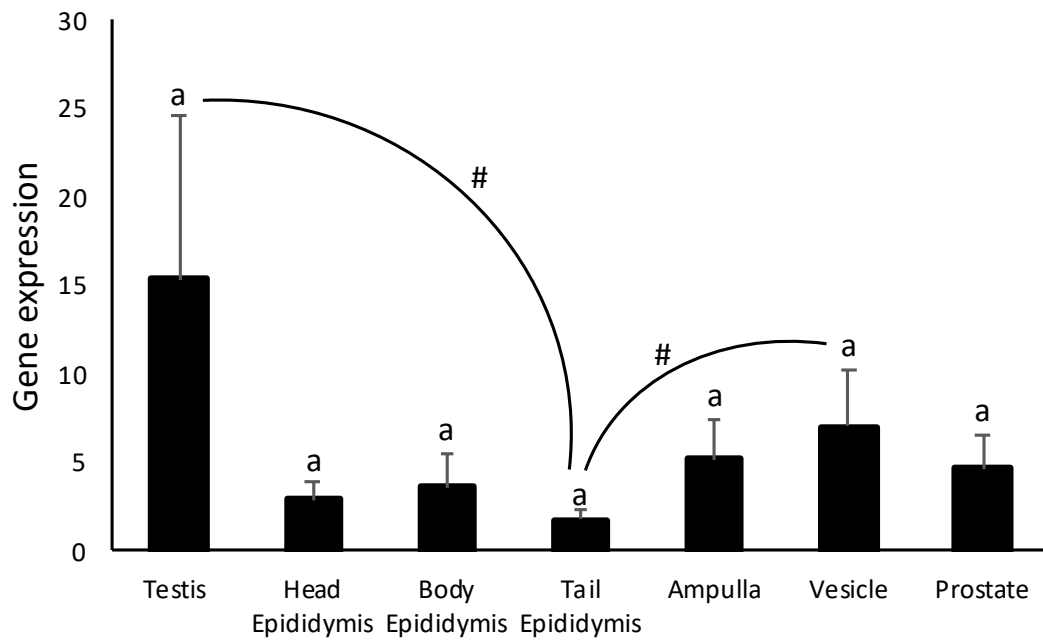


Figure 5 - Gene expression of IκBβ in the reproductive tract of stallion. Pound mark (#) indicate trend to difference statistical.

Table 2 – Pearson’s correlation coefficient between gene expression of MMP-1, MMP-2, TNF-α and IκBβ of testicle, head and body epididymis and prostate.

Testicle	Head Epididymis	Body Epididymis	Prostate
MMP-2 – TNF-α	MMP-1 – TNF-α	MMP-2 – IκBβ	MMP-1 – TNF-α
R = 0,99	R = 0,99	R = 0,99	R = 0,86
p = 0,007	p = 0,006	p = 0,0084	p = 0,05

Abbreviations: F: Primer Forward, R: Primer Reverse, MMP-1: Matrix Metalloproteinases 1, MMP-2: Matrix Metalloproteinases 2, TNF-α: Tumor Necrosis Factor alpha, IκBβ: Inhibitor beta of Nuclear Transcription Factor kappa B, β-Actin.

5 DISCUSSION

The results of this study demonstrated the presence of MMP-1 and MMP-2 mRNA in the testis, epididymis and accessory glands of the stallion. Our results corroborate studies that, through qPCR, showed MMP-1 and MMP-2 are present during testicular development in rats (LONGIN et al., 2001), and confirmed MMP-2 gene expression in testicular and epididymal tissues of dogs (WARINRAK et al., 2015). In stallions were isolated a pro-form of MMP-2 into the epididymal fluid through two-dimensional electrophoresis suggesting that this can act in the process of sperm maturation (MÉTAYER et al., 2002)

We suggest that MMP-1 and MMP-2 can be related to the male reproductive physiology and sperm production. Was emphasized the importance of MMP by regulating testicular physiology (LONGIN et al., 2001). Testis parenchyma undergoes a constant remodeling due to spermatogenesis (MBIKAY et al., 1997) and coordinates cell differentiation, and sperm production (AMANN, 2011a). Seminiferous tubules restructure cyclically during spermatogenesis (LONGIN et al., 2001). The seminiferous epithelial cycle, exhibits extensive restructuring when spermiation occurs (SOARES et al., 2009). Homogeneous distribution of MMP-1 was found in the adluminal compartment by immunohistochemistry, where meiosis and spermiogenesis develop (LONGIN et al., 2001).

Sertoli cells secrete a variety of proteins and regulating factors of testicular function that are closely linked with spermatogenesis (VARNER; JOHNSON, 2011). The present study demonstrated highest expression of MMP-2 in testis, these agree with others studies that showed thought immunohistochemistry staining MMP-2 localizations within the cytoplasm of gonocytes and Sertoli cells in human fetal testis (ROBINSON et al., 2001). Sertoli cells were also isolated and cultured with subsequent stimulation by FSH; resulting in an increase in MMP-2 expression (LONGIN et al., 2001). MMP-2 is likely involved in the FSH-induced structural changes of Sertoli cells playing a pivotal role in the restructuring events during spermatogenesis (LONGIN; LE MAGUERESSE-BATTISTONI, 2002).

Our study demonstrated that the testis, the body and the tail of the epididymis presented greater MMP-2 gene expression than other tissues and body and tail of the epididymis presented greater gene expression of the MMP-1 than other tissues. Epididymis is a tissue structure that connects the testis to the duct deferent (AMANN, 2011a). The body of the epididymis involves sperm maturation, and the tail stores the spermatozoa (VARNER; JOHNSON, 2011). Fertilization capacity of spermatozoa is acquired during their journey in the epididymis (AMANN, 2011a). The maturation of the sperm cell in the epididymis involves changes in specific domains of the membrane, mainly due to modifications in its protein composition (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005; VARNER; JOHNSON, 2011). Cellular localizations of MMP in testis revealed cell-type-specific expression, indicating their substantial involvement in the regulation of junction restructuring events in the testis and the maintenance of spermatogenesis (WARINRAK et al., 2015). However, the mechanisms controlling sperm maturation at the level of gene expression are still unknown (VARNER; JOHNSON, 2011). Our study suggests that MMP-1 and MMP-2 are important in the development, maturation and storage of spermatozoa.

TNF- α gene expression was verified in all tissues evaluated. TNF- α is a cytokine that acts on natural immunity, but also acts on local and systemic physiological processes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). TNF- α is synthesized as a membrane protein (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; HEHLGANS; PFEFFER, 2005) and has potential for signaling either as a membrane-integrated protein, or as a soluble cytokine released after proteolytic cleavage (HEHLGANS; PFEFFER, 2005). MMP are essential for the processing of TNF- α (BLACK et al., 1997). Membrane form of TNF- α is cleaved by membrane-bound MMP (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). After cleavage, TNF- α binds to receptors that are members of a large family of proteins (SALAMONSEN; WOOLLEY, 1996). These correlation between TNF- α and MMP were showed in the present research in three different tissues analyzed. Positive correlation was observed between MMP-1 and TNF- α genes in the head of the epididymis ($R = 0,99 / p = 0,006$), MMP-1 and TNF- α in the prostate ($R = 0,86 / p = 0,05$), MMP-2 and TNF- α genes in the testis ($R = 0,99 / p = 0,007$). Our data reinforce the physiology relationship MMP with TNF- α .

We demonstrated that are correlation between MMP-1 and TNF- α in head of the epididymis and prostate. These agree with others studies that showed in human endometrial cells that showed an interaction relationship between MMP-1 and TNF- α (SALAMONSEN; WOOLLEY, 1996). Head of the epididymis and prostate have morphological changes throughout life (HULBOY et al., 1997) and we suggest that this interaction is important to equine reproductive physiology.

Cellular localizations of MMP in testis revealed cell-type-specific expression, indicating their substantial involvement in the regulation of junction restructuring events in the testis and the maintenance of spermatogenesis (WARINRAK et al., 2015). Gene expression of I κ B β was verified in all tissues evaluated. However, differences were not observed in the gene expression of I κ B β . Our results corroborate the study that I κ B β was highly expressed in the testis, suggesting that I κ B β may play an important role in testicular physiology (BUDDE et al., 2002). One candidate for NF- κ B inducer in the testis is TNF- α . Addition of TNF- α to Sertoli cells resulted in a significant increase in NF- κ B nuclear binding. After to close stimulation NF- κ B binding activity was decreased. From these results, the authors suggest that NF- κ B is an important regulator of spermatogenesis (DELFINO; WALKER, 1998).

Our study found positive correlations between MMP-2 and I κ B β genes in the body of the epididymis ($R = 0,99 / p = 0,0084$). Researchers suggested that MMP-2 may be a marker of

sperm quality, as they found a strong correlation of MMP-2 concentration in high-quality semen (WARINRAK et al., 2015). MMP-2 in human seminal plasma was positively correlated to the number of sperm (BAUMGART et al., 2002).

Was proposed that increases in the sTNF- α are probably produced by the action of one or more members of the MMP family. The sTNF- α produced by the germ cell can bind to TNF- α -R1 which is present in the Sertoli cell, resulting in activation of the NF- κ B and consequent increase in FasL gene transcription (YAO et al., 2007). The proposed model is in agreement with the correlations between the genes studied in the present research.

6 CONCLUSIONS

MMPs participate in the reproductive physiology of the stallion because they are involved in cell and tissue remodeling, cell interactions, cell signaling and migration. We suggest that MMP-2 and I κ B β may be markers of sperm production due to the high gene expression evidenced in the testis in this study. We suggest that MMP-1 may be a marker of sperm maturation due to the high gene expression evidenced in the body and tail of the epididymis in this study. Our positive correlations reinforce the physiological relationship between MMP and TNF- α .

Acknowledgments

The authors are thankful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and FAPERGS for funding this study; Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular VET/UFRGS and Prof. Ana Paula Ravazollo for qPCR device availability.

Conflict of interest

None of the authors has any conflict of interest to declare.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo sobre expressão gênica da MMP-1, MMP-2, TNF- α e I κ B β no trato reprodutivo do garanhão nos permite concluir que:

As MMP participam da fisiologia reprodutiva do garanhão macho pois estão envolvidas no remodelamento celular e tecidual, nas interações celulares, como também, na sinalização e migração celular.

Sugerimos que a MMP-2 e o I κ B β possam ser marcadores da produção espermática devido a alta expressão gênica evidenciada nos testículos nesse estudo.

Sugerimos que a MMP-1 possa ser um marcador de maturação espermática devido a alta expressão gênica evidenciada no corpo e cauda do epidídimo nesse estudo.

Nossos resultados reforçam a relação fisiológica entre as MMP e o TNF- α em função das nossas correlações positivas entre: MMP-2 e TNF- α no testículo; MMP-1 e TNF- α na cabeça do epidídimo; MMP-1 e TNF- α na próstata.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Citocinas. **Imunologia Celular e Molecular**. 6^a ed. Saunders Elsevier, 2008, cap. 12, p. 267-302.
- AMANN, R. P. Functional Anatomy of the Adult Male. In: McKINNON, A. O. et al. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley- Blackwell, 2011a. v. 1, cap. 95, p. 867-880.
- AMANN, R. P. Physiology and Endocrinology. In: McKINNON, A. O. et al. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley- Blackwell, 2011b. v. 1, cap. 96, p. 881-908.
- BALTIMORE, D. Inversion for gene construction. **Nature**, v. 319, n. 6048, p. 12-13, 1986.
- BASTOS, H.B.A. et al. Gene expression of matrix metalloproteinases and LH receptors in mare follicular development. **Theriogenology**, v. 82, p.1131-1136, 2014.
- BAUMGART, E. et al. Quantitative differences in matrix metalloproteinase MMP-2, but not in MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP-1 or TIMP-2, in seminal plasma of normozoospermic and azoospermic patients. **Human Reproduction**, v. 17, p. 2919–2923, 2002.
- BIDSTRUP, L. A. Transferrin production in cultured Sertoli cells during testicular maturation in the stallion. **Biology of Reproduction Supplements**, v. 66, p. 493, 2002.
- BLACK, R. A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. **Nature**, v. 385, p. 729–733, 1997.
- BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L. **Manual of Equine Reproduction**. 3th ed. Maryland Heights: Elsevier. 2011, cap. 9, p. 182-192, 230.
- BUDDE, L. M. et al. Regulation of I κ B β expression in testis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4179–4194, 2002.
- BUCHMAN-SHAKED, O. et al. Presence of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in human sperm. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 702–708, 2002.
- CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 72, p. 3666, 1975.
- CHANDRASHEKAR, V.; BARTKE, A. The role of growth hormone in pituitary and testicular function in adult mice. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 98, 1998.
- CHRISTIAN, F.; SMITH, E. L.; CARMODY, R. J. The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. **Cells**, v.5, p. 1-19, 2016.
- CURRY, T. E. JR.; OSTEEEN, K. G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. **Endocrine Reviews**, v. 24, p. 428–465, Ago, 2003.

- DELFINO, F. J.; WALKER, W. H. NF- κ B induces cAMP-response element-binding protein gene transcription in Sertoli cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 35607-35613, 1999.
- DELFINO, F. J.; WALKER, W. H. Stage-specific nuclear expression of NF-kappa B in mammalian testis. **Molecular Endocrinology**, v. 12, p. 1696–1707, 1998.
- ELLERBROCK, R. et al. Expression of steroidogenic enzymes and sex steroidreceptors in the accessory sex glands of the horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 43, p. 59-60, 2016.
- GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7^a ed. São Paulo: Manole, 2004, p. 99-106.
- HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, v. 115, p 1-20, 2005.
- HENINGER, N. L. Puberty. In: McKINNON, A. O. et al. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley- Blackwell, 2011. v. 1, cap. 100, p. 1015-1025.
- HESS, M. F.; ROSER, J. F. The effects of age, season and fertility status on plasma and intratesticular insulin-like growth factor I concentration in stallions. **Theriogenology**, v. 56, p. 723–733, 2001.
- HOEBEN, E. et al. Gelatinase A secretion and its control in peritubular and Sertoli cell cultures: effects of hormones, second messengers and inducers of cytokine production. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 118, p. 37–46, 1996.
- HOLMES, S.D. et al. Transferrin binds specifically to pachytene spermatocytes. **Endocrinology**, v. 113, p. 1916–1918, 1983.
- HULBOY, D. L.; RUDOLPH, L. A.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 27-45, 1997.
- HULEIHEL, M.; LUNENFELD, E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, p. 259-268, 2004.
- JOHNSON, L.; GRIFFIN, C. E.; MARTIN, M. T. Spermatogenesis. In: McKINNON, A. O. et al. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley- Blackwell, 2011. v. 1, cap. 101, p. 1026-1052.
- LONGIN, J.; LE MAGUERESSE-BATTISTONI, B. Evidence that MMP-2 and TIMP-2 are at play in the FSH-induced changes in Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 189, p. 25–35, 2002.
- LONGIN, J. et al. MT1-MMP in rat testicular development and the control of sertoli cell proMMP-2 activation. **Journal of Cell Science**, v.114, p. 2125–2134, 2001.

MBIKAY, M. et al. Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. **Proceedings National Academy Science U.S.A.**, v. 94, p. 6842–6846, 1997.

MÉTAYER, S. et al. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. **Biology of reproduction**, v. 66, p.1219–1229, 2002.

MORALES, V. et al. Intratesticular delivery of tumor necrosis factor and ceramide directly abrogates steroidogenic acute regulatory protein expression and leydig cell steroidogenesis in adult rats. **Endocrinology**, v. 144, p. 4763–4772, 2003.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **Journal Biology Chemical**, v. 274, p. 21491–21494, 1999.

NAGATA, S. Apoptosis by Death Factor. **Cell**, v. 88, p. 355–365, 1997.

NEVES, E. S.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, L. R. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 247–255, 2002.

PHELPS, B. M. et al. Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. **Journal Cellular Biology**, v. 111, p. 1839–1847, 1990.

PRINT, C. G.; LOVELAND, K. L. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. **BioEssays**, v. 22, p. 423-430, 2000.

RICCIOLI, A. et al. The Fas system in the seminiferous epithelium and its possible extra-testicular role. **Andrologia**, v. 35, p. 64–70, 2003.

ROBINSON, L. L. et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human fetal testis and ovary. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, p. 641–648, 2001.

ROCHIRA, V. et al. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in two men with aromatase deficiency: evidence that circulating estrogens are required at the hypothalamic level for the integrity of gonadotropin negative feedback. **European Journal of Endocrinology**, v.155, p. 513-522, 2006.

ROSER, J.F. Idiopathic subfertility/infertility in stallions: new endocrine methods of diagnosis. **Proceedings Society Theriogenology**, p.136–146, 1995.

ROSER, J. F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 179-196, 2008.

ROSER, J. F. Endocrine–paracrine–autocrine regulation of reproductive function in the stallion. In: McKINNON, A. O. et al. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. v. 1, cap. 99, p. 996-1014.

SALAMONSEN, L.A.; WOOLLEY, D. E. Matrix metalloproteinases in normal menstruation. **Human Reproduction**, v. 11, p. 124-133, 1996.

SAARIALHO-KERE, U. K.; CROUCH, E.C.; PARKS, W.C. The matrix metalloproteinase matrilysin is constitutively expressed in adult human. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 105, p. 190–196, 1995.

SOARES, J. M.; AVELAR, G. F.; FRANCA, L. R.; The seminiferous epithelium cycle and its duration in different breeds of dog (*Canis familiaris*). **Journal of Anatomy**, v. 215, p. 462–471, 2009.

TOPFER-PETERSEN, E. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 159–170, 2005.

VARNER, D. D.; JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View - revisiting our perception of this intriguing cell. In: McKINNON, A. O. et al. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. v. 1, cap. 97, p. 909-990.

VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J. Abnormalities of the accessory sex glands. In: McKINNON, A. O. et al. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley- Blackwell, 2011. v. 1, cap. 107, p. 1113-1118.

YAMAOKA, S. et al. Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. **Cell**, v. 93, p. 1231-40, 1998.

YANAGIMACHI, R.; Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of the Reproduction**, 2nd ed. Raven Press Ltd, 1994, p. 189–317.

YAO, P. L.; LIN, Y. C.; SAWHNEY, P.; RICHBURG, J. H. Transcriptional regulation of FasL expression and participation of TNF in response to Sertoli cell injury. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 5420–5431, 2007.

WARINRAK, C. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in canine testis, epididymis and semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 48–57, 2015.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L. Ultrasonographic measurement of stallion accessory sex glands and excurrent ducts during seminal emission and ejaculation. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 267-273, 1993.

WILSON, M. J. et al. Metalloproteinase activities expressed during development and maturation of the rat prostatic complex and seminal vesicles. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 683–691, 1992.

ZINGARELLI, B.; SHEEHAN, M.; WONG, H. R. Nuclear factor-kappa B as a therapeutic target in critical care medicine. **Critical Care Medicine**, v. 31, p. 105-111, 2003.

APÊNDICE A - Resumo publicado no ISABR 2018

Gene expression of MMP1 and MMP2 in the reproductive tract of stallion

Expressão gênica da MMP1 e MMP2 no trato reprodutivo do garanhão

Marcelo Barcelos Rocha^{1*}, Henrique Boll de Araujo Bastos¹, Gabriel de Oliveira Santos¹, Luciana Bortoluzzi¹, Gustavo Henrique Zimmermann Winter¹, Maria Inês Mascarenhas Jobim¹, Rodrigo Costa Mattos¹, Nélon Alexandre Kretzmann Filho¹

¹REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre - RS

*E-mail: marcelobarcelos.vet@hotmail.com

Reproductive physiology of the stallion is a complex mechanism involving hormones, cytokines, growth factors, proteases, among other regulatory mechanisms. Matrix metalloproteinases (MMPs) constitute a family of proteases characterized by playing key roles in almost all physiological processes including, cell signaling, cell migration, cell remodeling and cell-cell interactions. The objective of the study was to verify the gene expression of MMP1 and MMP2 in different regions of the stallion's reproductive tract. The complete reproductive tracts of five stallions were collected, without distinction of breed or age, with an unknown reproductive history in a commercial slaughterhouse. Tissue fragments were collected from the testis; the head, body and tail of the epididymis; of the accessory sex glands: prostate, seminal vesicle and ampulla of deferent duct. Tissue samples were stored under refrigeration in RNAlater® (Life Technologies) during transport to the laboratory, and after were frozen in a freezer at -80°C. The selected tissues were destined to the quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) technique. Amplification was performed at 95°C for 2 minutes, followed by 40 denaturation cycles at 95°C for 3 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds, and elongation at 60°C for 30 seconds. Relative quantification was performed, and the mRNA levels of the target genes were normalized against β -Actina (β -Actin) mRNA levels. The comparative threshold cycle (CT) ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method was used for calculating relative mRNA expression. The gene expression of MMP1 and MMP2 was verified in all tissues evaluated. Statistical differences were observed in the gene expression of MMP1 ($p = 0.014$) in relation to the different regions of the reproductive tract of the stallion. The body and tail of the epididymis presented greater MMP1 gene expression than the testis, ampulla, prostate and seminal vesicle. Differences were observed in the MMP2 gene expression ($p = 0.012$). The testis, body and tail of the epididymis presented greater MMP2 gene expression than the prostate and the head of the epididymis. The testis and the body of the epididymis also presented greater gene expression in relation to the seminal vesicle. The body of the epididymis involves sperm maturation, and the tail stores the spermatozoa and the testis coordinates cell differentiation and sperm production. Our study demonstrated that the body and tail of the epididymis presented greater gene expression of the MMP1 than other groups. The testis, body and tail of the epididymis presented greater MMP2 gene expression than other groups, suggesting that these genes are important in the cell remodeling, cell-cell interactions and cell signaling during the development, maturation and stores of spermatozoa. In summary, MMP1 and MMP2 are probably related to spermatogenesis, transit and sperm maturation, as well as related to the accessory sex glands of the stallion, being important for the reproductive physiology of the stallion.

Keywords: equine, qPCR, matrixmetalloproteinases, semen

Palavras-chave: equino, qPCR, metaloproteinase de matriz, sêmen

APÊNDICE B – Expressão gênica da MMP-1, MMP-2, TNF- α e I κ B β no trato reprodutivo do garanhão. Animais utilizados no experimento são representados pelos números em romanos.

