



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

**EXPRESSÃO DE PROTAMINA 1, 2 E CATSPER 1 EM ESPERMATOZÓIDES DE
GARANHÕES**

MARÍLIA MARCOLLA DE FIGUEIREDO

PORTO ALEGRE

2023

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

**EXPRESSÃO DE PROTAMINA 1, 2 E CATSPER 1 EM ESPERMATOZÓIDES DE
GARANHÕES**

Autor: Marília Marcolla de Figueiredo

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

Orientador: Henrique Boll de Araujo Bastos

Coorientador: Rodrigo Costa Mattos

PORTO ALEGRE

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Figueiredo, Marília Marcolla
EXPRESSÃO DE PROTAMINA 1, 2 E CATSPER 1 EM
ESPERMATOZÓIDES DE GARANHÕES / Marília Marcolla
Figueiredo. -- 2023.
48 f.
Orientadora: Henrique Boll de Araujo Bastos.

Coorientadora: Rodrigo Costa Mattos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto
Alegre, BR-RS, 2023.

1. Expressão gênica. 2. Espermatozoide. 3.
Fertilidade. 4. Reprodução. 5. Equinos. I. Bastos,
Henrique Boll de Araujo, orient. II. Mattos, Rodrigo
Costa, coorient. III. Título.

MARÍLIA MARCOLLA DE FIGUEIREDO

**EXPRESSÃO DE PROTAMINA 1, 2 E CATSPER 1 EM ESPERMATOZÓIDES DE
GARANHÕES**

APROVADA POR:

Prof. Dr. Henrique Boll de Araujo Bastos

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Gustavo Henrique Zimmermann Winter

Membro da Comissão

Prof. Dra. Monique de Albuquerque Lagares

Membro da Comissão

Dra. Verônica La Cruz Bueno

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais, Fausta e Saul Fernando, e meus irmãos, Maria Eduarda e Pedro Henrique, por estarem sempre presentes, torcendo por mim e me incentivando. Muito obrigada por toda a dedicação e todo o carinho.

Ao Daniel pelo companheirismo e por estar sempre ao meu lado, sempre me estimulando e me apoiando. Agradeço ao Dudu, minha nova fonte de estímulo. Muito obrigada pelo amor e o carinho de vocês.

Ao meu orientador Henrique Bastos por mostrar-se sempre disponível e pelo verdadeiro interesse e entusiasmo pela pesquisa e por este trabalho. Agradeço pela confiança, pela ajuda, por toda a paciência e por todos os ensinamentos.

Ao Professor Rodrigo Mattos por todo o conhecimento compartilhado e pelas oportunidades que me foram proporcionadas desde a graduação.

À Professora Sandra Fiala que sempre mostrou-se acessível e solícita quando eu precisei, tanto para este quanto para outros projetos.

À Professora Ana Paula Ravazzolo pela prestatividade em colaborar abrindo as portas do laboratório para mim, isto possibilitou que este trabalho fosse feito.

À Laura pela ajuda com o inglês.

À Beta, Gabi, Vane, Ana e Lê, grandes amigas que a faculdade me deu e que me acompanham desde então. Muito obrigada pela amizade, pelas trocas, pelo carinho, pelos desabafos e pelos incentivos. Mesmo quando vocês estão longe vocês se fazem presentes.

À Veronica pela contribuição e colaboração com o trabalho e os ensinamentos no laboratório.

À todos os amigos que fiz no Reprolab durante a graduação e o mestrado e que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

À UFRGS, ao Reprolab e ao PPGMAE por possibilitar que este trabalho fosse feito, pelo ensino de qualidade e por possibilitar meu crescimento profissional.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH: Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (μm)

BCF: Frequência de batimentos (Hz)

Ca^{2+} : Cálcio

CaVs: Canais de cálcio seletivos ativados por voltagem

cDNA: DNA complementar

DNA: Ácido desoxirribonucleico

iRNA: RNA de interferência

Kg: Quilos

LIN: Linearidade (%)

MC: Motilidade local (%)

miRNA: Micro RNA

μl : Microlitros

ml: Mililitros

ML: Motilidade lenta (%)

MP: Motilidade progressiva (%)

MR: Motilidade rápida (%)

MT: Motilidade total (%)

ng: Nanogramas

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

PRM1: Protamina 1

PRM2: Protamina 2

qPCR: *PCR* em tempo real

RNA: Ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

STR: Retilinearidade (%)

VAP: Velocidade média de trajeto ($\mu\text{m/s}$)

VCL: Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$)

VSL: Velocidade linear ($\mu\text{m/s}$)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da sequência de substituição de histonas por proteínas de transição e protaminas na transformação da espermátide redonda em espermátide condensada.	16
Figura 2. Estrutura do canal catsper.	22
Figure 3. Mean (\pm SD) of PRM1 and PRM2 gene expression of sperm from fertile and subfertile stallions.....	33
Figure 4. Mean (\pm SD) of Catsper 1 gene expression of sperm from fertile and subfertile stallions..	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequences details used for stallion sperm mRNA quantitative polymerase chain reaction.....	31
Tabela 2. Semen analysis.....	32
Tabela 3. Pearson coefficient of correlation between seminal parameters and the PRM1 / PRM2 ratio.	34
Tabela 4. Pearson coefficient of correlation between seminal variables and Catsper1 gene.....	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	112
2.1 Fertilidade	12
2.2 Espermatogênese	14
2.3 mRNA espermático	17
2.4 Genes	19
2.4.1 PRM1 e PRM2	19
2.4.2 Catsper1	21
3. ARTIGO	26
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
5. REFERÊNCIAS.....	43
APÊNDICE I.....	48

EXPRESSÃO DE PROTAMINA 1, 2 E CATSPER 1 EM ESPERMATOZÓIDES DE GARANHÕES

RESUMO

A identificação de genes envolvidos na reprodução masculina e a avaliação de suas funções melhoram a compreensão sobre as bases moleculares da espermatogênese, fertilização, qualidade espermática e infertilidade masculina. A protamina 1 (PRM1) e a protamina 2 (PRM2) se ligam ao DNA espermático para produzir uma cromatina altamente condensada, que é necessária para minimizar o volume nuclear para melhorar a ergonomia do espermatozoide e para proteger o material genético. O gene Catsper 1 codifica uma proteína de canal de cálcio que é exclusiva dos espermatozoides e tem um papel vital na motilidade espermática e na fertilidade masculina. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão dos genes PRM1, PRM2 e Catsper 1 no espermatozoide equino e suas relações com a qualidade espermática e a fertilidade em garanhões. Foram realizadas coletas de sêmen de 18 garanhões, os quais foram divididos em dois grupos, férteis e subférteis, com base na taxa de prenhez por ciclo. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer. 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. As demais análises foram realizadas através do Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision®. O RNAm foi extraído dos espermatozoides e a verificação da expressão dos genes PRM1, PRM2 e Catsper 1 foi realizada através da técnica de qPCR. Os resultados demonstram uma maior expressão de PRM1 e Catsper 1 no grupo de garanhões férteis comparado aos subférteis e não ocorreu diferença na expressão de PRM2; não houve correlação da expressão de PRM1 e PRM2 com parâmetros de qualidade espermática; houve correlação da expressão de Catsper 1 com morfologia e com parâmetros de motilidade. Foi encontrada correlação negativa entre a relação PRM1/PRM2 e fertilidade e parâmetros de motilidade. Concluiu-se que os genes PRM1, e Catsper 1 estão relacionados com a fertilidade e a qualidade espermática em garanhões, e podem servir como marcadores gênicos.

Palavras-chave: PRM1, PRM2, Catsper1, fertilidade, equino

PROTAMINE 1, 2 AND CATSPER1: QUALITY INDICATORS OF SPERM AND FERTILITY IN STALLIONS

Abstract

Several genes are involved in male reproduction and the fertilization cascade and could serve as fertility markers. Identifying these genes and assessing their functions would improve our understanding of the molecular basis of spermatogenesis, fertilization, sperm quality, and male infertility. The protamine 1 (PRM1) and protamine 2 (PRM2) genes encode PRM1 and PRM2 proteins, which bind to DNA to produce a highly condensed chromatin, which is required to minimize nuclear volume to improve sperm ergonomics and to protect genetic material. The Catsper 1 gene encodes a calcium channel protein that is unique to sperm and plays a vital role in sperm motility and male fertility. There are few researches about the molecular mechanisms that affect stallion fertility. The present study aimed to verify the gene expression of PRM1, PRM2 and Catsper 1 in equine sperm and their relationship with sperm quality and fertility in stallions. Semen collections of 18 stallions were performed and the stallions were divided into two groups, fertile and subfertile, based on the pregnancy rate per cycle. Semen analysis were performed and the mRNA was extracted from sperm. Gene expression of PRM1, PRM2 and Catsper 1 in the extracted RNA from the sperm cell was verified by qPCR technique. The results show a higher expression of PRM1 and Catsper 1 in the fertile stallions group and no has difference in PRM2 expression; there was no correlation between PRM1 and PRM2 expression with sperm quality parameters; Catsper 1 expression was correlated with morphology and motility parameters; There was a negative correlation between PRM1 / PRM2 ratio and fertility and motility parameters. We conclude that PRM1, and Catsper 1 genes can be used as markers of fertility and sperm quality in stallions.

Key words: PRM1, PRM2, Catsper1, equine, fertility

1. INTRODUÇÃO

A população nacional de equinos é de 5.777.046 animais (IBGE, 2021), tratando-se da terceira maior do mundo, estando atrás apenas dos Estados Unidos e México (Allan, 2021). O agronegócio brasileiro é uma potência reconhecida internacionalmente, e a equinocultura, por sua vez, é uma importante fonte de renda e de empregos no país.

Existe um aumento significativo de publicações científicas nas áreas da ciência dos equinos, principalmente nas áreas de medicina, reprodução e sanidade, o que reflete as tendências atuais da indústria equina (ALMEIDA; SILVA, 2010). Nas últimas quatro décadas houve um grande avanço e grandes descobertas na reprodução equina. A maioria dos estudos, na década de 70 e 80 eram essencialmente do animal como um todo, atualmente os estudos analisam mecanismos celulares do processo reprodutivo. A nova geração de pesquisadores de equinos certamente deve ter conhecimento e habilidade em biologia molecular para fornecer novas informações (SQUIRES, 2009).

O garanhão representa metade da equação da reprodução; no entanto, o tempo e o financiamento têm sido consideravelmente menores para avançar na área da reprodução de garanhões, em comparação com a reprodução de éguas (VARNER; JOHNSON, 2011). A fertilidade do garanhão é uma característica economicamente importante, e a subfertilidade ou a infertilidade em garanhões reprodutores resulta em perdas financeiras importantes na indústria equina (ROSER, 2011).

As análises atuais de sêmen são maneiras úteis de prever a qualidade do espermatozoide e da fertilidade do garanhão. Para complementá-los, ensaios moleculares têm sido desenvolvidos (ING et al., 2018). Estudos em humanos revelaram um grande número de genes que podem estar envolvidos nos mecanismos de reprodução masculina e na cascata de fertilização, e que poderiam servir como marcadores de fertilidade (OSTERMEIER *et al.*, 2005; AOKI *et al.*, 2006; DAS *et al.*, 2010). No entanto, existem poucos estudos relacionados com expressão gênica e fertilidade em garanhões.

Os genes protamina 1 (PRM1) e protamina 2 (PRM2) codificam as proteínas PRM1 e PRM2, que encontram-se no núcleo e são específicas do espermatozoide. Elas se ligam ao DNA para produzir uma cromatina altamente condensada (LEE et al., 2011). Esta forte condensação é necessária para minimizar o volume nuclear e

melhorar a ergonomia do espermatozoide e também para proteger o material genético contra nucleases, mutagênese, componentes tóxicos e radicais livres (BALHORN *et al.*, 2000). Os produtos dos genes PRM1 e PRM2 são um dos mais estudados no espermatozoide humano, e muitos trabalhos relacionam esses genes com fertilidade (STEGER *et al.*, 2003; AOKI *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; STEGER *et al.*, 2008; DEPA-MARTINOW *et al.*, 2011).

O gene cation channel sperm associated 1 (Catsper 1) codifica uma proteína de canal de cálcio que tem um papel vital na motilidade espermática e na fertilidade masculina (REN *et al.*, 2001). Ren *et al.* (2001) eliminaram o gene Catsper 1 de camundongos, o que resultou em uma baixa motilidade dos espermatozoides e infertilidade. Nikpoor *et al.* (2004) encontraram expressão gênica de Catsper diminuída em homens subférteis com baixa motilidade espermática e concluíram que isso pode contribuir para o diagnóstico e o tratamento de casos de infertilidade atribuídos a motilidade espermática deficiente. O gatilho para a abertura do Catsper é a despolarização alcalina causada pela mudança no ambiente iônico do oviduto, que resulta em um elevado pH (CARLSON *et al.*, 2003). O contato do espermatozoide com o ambiente alcalino aumenta o pH intracelular que ativa os canais Catsper (LEEMANS *et al.*, 2019). A presença do RNAm de Catsper 1 foi identificado em espermatozoides de garanhões (LOUX, 2010), no entanto não está claro quando ocorre a abertura destes canais nesta espécie. A falha na estimulação da motilidade hiperativada do espermatozoide equino sob condições padrão de capacitação para outras espécies pode estar relacionada a diferenças espécie-específicas na presença ou na função dos canais Catsper (LOUX, 2013).

Os estudos sobre a fertilidade humana, assim como a de outros mamíferos, avançou consideravelmente nos últimos anos, mas existem poucas pesquisas sobre os mecanismos moleculares que afetam a fertilidade dos garanhões. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão dos genes PRM1, PRM2 e Catsper 1 no espermatozoide equino e suas relações com a qualidade espermática e a fertilidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Garanhão x Fertilidade

A eficiência reprodutiva pode ser afetada por inúmeros fatores, como idade, doenças, fatores ambientais, nutrição, manejo e, também, por fatores genéticos (PARADOWSKA-DOGAN *et al.*, 2014; HAMANN *et al.*, 2007). A seleção de um equino como reprodutor é baseada em sua performance esportiva, em sua conformação ou em seu pedigree; praticamente nenhuma consideração é feita acerca de seu potencial para a reprodução. A fertilidade e adequada qualidade de sêmen são geralmente de importância secundária (GOTTSCHALK *et al.*, 2016).

Um único garanhão normalmente reproduz com várias éguas, por isso, sua fertilidade é um fator crítico no sucesso de um programa de reprodução. Para uma acurada avaliação da fertilidade do reprodutor é necessário um grande número de éguas sem problemas reprodutivos para um balanço retrospectivo. Os verdadeiros índices de fertilidade são as taxas de prenhez e as taxas de parto, no entanto ambos são retrospectivos e influenciados por fatores extrínsecos ao garanhão, como a saúde reprodutiva das éguas e o manejo da reprodução (COLENBRANDER *et al.*, 2003).

Avaliar a fertilidade ou o potencial reprodutivo de um cavalo é uma parte importante para a seleção de um garanhão e para um adequado manejo da reprodução. Além disso, o conhecimento do histórico reprodutivo e a qualidade do sêmen são muito importantes na investigação de problemas com fertilidade (COLENBRANDER *et al.*, 2003). O ideal seria prever a fertilidade anteriormente à carreira reprodutiva desse cavalo, e busca-se fazer isso através de exames físicos e análises de rotina da qualidade do sêmen. As avaliações andrológicas da fertilidade baseiam-se principalmente nos achados da análise tradicional de sêmen, que englobam uma série de avaliações que fornecem informações sobre o conteúdo do ejaculado, a viabilidade, o movimento e a forma dos espermatozoides e, também, alguma informação sobre a possível função espermática (PARADOWSKA-DOGAN *et al.*, 2014). As tentativas de encontrar uma relação entre a fertilidade do garanhão e as características espermáticas demonstram resultados inconsistentes (VOSS *et al.*, 1981; LOVE, 2011). Por outro lado, a combinação de vários testes de função espermática melhora a confiabilidade da estimativa de fertilidade. No entanto, enquanto esses exames identificam garanhões que têm uma clara diminuição de

fertilidade, eles tem uso limitado para predizer o nível de fertilidade e falham em identificar alguns garanhões subférteis (COLENBRANDER *et al.*, 2003).

Enquanto o sêmen de má qualidade é um bom indicador de subfertilidade, um de boa qualidade não é garantia de boa fertilidade (COLENBRANDER *et al.*, 2003), e, como consequência, pode levar o médico veterinário a classificar machos subfértis erroneamente como reprodutor com fertilidade normal (PARADOWSKA-DOGAN *et al.*, 2014). Por esta razão, diversos estudos têm sido realizados para identificar marcadores de capacidade funcional que possam prever com maior eficiência a fertilidade do garanhão (COLENBRANDER *et al.*, 2003).

Os garanhões subférteis são um problema da indústria equina (DAS *et al.*, 2010), e esta subfertilidade pode resultar de uma ampla variedade de etiologias, que podem ser tanto conhecidas, como causas ainda não identificadas (PARADOWSKA-DOGAN *et al.*, 2014).

Os reprodutores equinos são os únicos entre os animais em que, como os homens, geralmente recebem tratamento médico para a infertilidade. Em ambas as espécies, cerca de 15% dos indivíduos têm parâmetros normais de sêmen, mas são subférteis, indicando a necessidade de novas análises da função dos espermatozoides (ING *et al.*, 2014).

Além dos fatores de manejo e ambientais, particularmente, os efeitos genéticos levam a uma variação significativa na qualidade do sêmen entre os garanhões. Nos últimos anos, vários genes com importância funcional para a fertilidade do garanhão foram descritos (GIESECKE *et al.*, 2010; SIEME; DISTL, 2012).

A fertilidade dos garanhões é importante para um programa de reprodução bem-sucedida e as análises atuais de sêmen são preditivos úteis de qualidade de espermatozoides e de fertilidade desses cavalos. Para complementá-los, novos ensaios moleculares, como avaliação de RNAs espermáticos, estão sendo desenvolvidos (ING *et al.*, 2018).

As descobertas em humanos revelaram que o espermatozoide contém milhares de RNAm que refletem a expressão gênica durante a espermatogênese (OSTERMEIER *et al.*, 2002). Como a regulação genética da fertilidade masculina envolve centenas de genes, avanços na avaliação da capacidade reprodutiva podem ser feitos utilizando uma nova geração de ferramentas para avaliação do genoma equino (SIEME; DISTL, 2012).

Alguns autores têm proposto que o perfil de expressão gênica espermática possa ser utilizado como marcador de fertilidade (DAS *et al.*, 2010; OSTERMEIER *et al.*, 2005). De fato, um número crescente de estudos em humanos demonstra que o perfil de RNAm do espermatozoide pode servir como uma plataforma de diagnóstico molecular para avaliar a fertilidade masculina (OSTERMEIER *et al.*, 2002; AOKI *et al.*, 2006; DAS *et al.*, 2010). Além de marcadores de fertilidade, a identificação desses genes e a avaliação de suas funções melhorariam nossa compreensão sobre as bases moleculares da espermatogênese, fertilização, clivagem inicial dos embriões, qualidade espermática e infertilidade masculina (GANGULY *et al.*, 2013).

Existem poucas pesquisas sobre os mecanismos moleculares que afetam a fertilidade dos garanhões. Marcadores genéticos associados à fertilidade de garanhões podem ser úteis na seleção e no manejo de melhoramento. A análise do transcriptoma de espermatozoides de garanhões foi realizada por Suliman *et al.* (2018) e permitiu a comparação da abundância de genes entre garanhões férteis e subférteis.

Em resumo, a previsão da fertilidade dos garanhões é um problema importante na criação de cavalos e a análise das características do sêmen tem capacidade limitada para prever a fertilidade. Além disso, ainda existem poucos estudos genéticos sobre a fertilidade dos garanhões, que poderiam fornecer possibilidades e novas ferramentas que ajudariam a prever a fertilidade dos reprodutores (SULIMAN *et al.*, 2018).

2.2 Espermatogênese

A espermatogênese é o processo de divisão e de diferenciação celular pela qual o espermatozoide é produzido. Ocorre a transformação de espermatogônias diploides em espermatozoides haploides dentro dos túbulos seminíferos. É um processo contínuo, complexo e altamente regulado (DARSZON *et al.*, 2011).

Este processo pode ser dividido em 3 fases. A primeira fase, chamada de proliferativa ou de mitótica, ocorre quando as espermatogônias, servindo como células-tronco que revestem a base dos túbulos seminíferos, dividem-se por mitose para manter sua quantidade e produzir espermatócitos em um padrão cíclico. As espermatogônias proliferam e diferenciam-se em espermatócitos, que são o único tipo de célula que atravessa a barreira hemato-testicular para o compartimento adluminal

(DARSZON *et al.*, 2011). A segunda fase é chamada de fase meiótica, onde os espermatócitos sofrem meiose, que consiste em uma duplicação de cromossomos seguida de duas divisões, para produzir espermátides haploides. Durante a fase meiótica, a diversidade genética é garantida pela replicação do DNA e *crossing over* (SHARMA; AGARWAL, 2011). A terceira e última fase é a de diferenciação ou espermiogênese, em que a espermátide esférica e indiferenciada passa por uma marcada transformação que resulta na produção de um espermatozoide completamente diferenciado e altamente especializado, composto pela cabeça, onde encontra-se o material nuclear, e pela cauda. Nesta fase, ocorre a formação do acrossomo, a condensação da cromatina e a eliminação do excesso de citoplasma. Os espermatozoides totalmente desenvolvidos são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos (DARSZON *et al.*, 2011).

Durante a espermatogênese dos mamíferos, a estrutura da cromatina é marcadamente modificada. Nas espermátides em alongamento, as histonas são removidas e substituídas pelas proteínas de transição, que são subsequentemente substituídas por protaminas (Figura 1), proteínas específicas dos espermatozoides, o que resulta em uma cromatina altamente condensada (MILLER *et al.*, 1999). Esta supercondensação do DNA ocorre por dois motivos: o primeiro é que o volume do núcleo é minimizado (a protamina condensa o DNA pelo menos seis vezes mais do que as histonas) (BRAUN, 2001) e, portanto, a ergonomia do espermatozoide como um dispositivo de transporte para entregar o genoma para o oócito é maximizado, e o segundo é que as estruturas supercondensadas protegem o DNA contra mutagênese, nucleases, componentes tóxicos e radicais livres (BALHORN *et al.*, 2000).

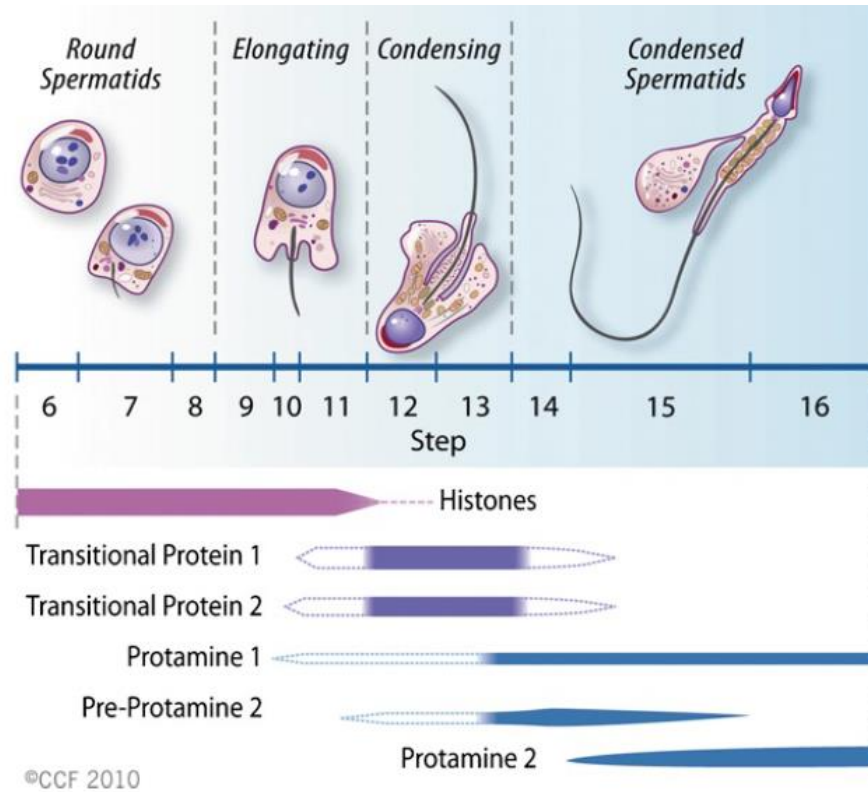


Figura 1. Representação da sequência de substituição de histonas por proteínas de transição e protaminas na transformação da espermátide redonda em espermátide condensada antes de ser liberada no lúmen dos túbulos seminíferos (SHARMA; AGARWAL, 2011).

As proteínas que participam desse processo, assim como as demais necessárias à espermiogênese, precisam estar disponíveis para a célula, no entanto, durante a condensação e a alongação do DNA, não há síntese proteica em espermátides em maturação, o que coincide com um declínio progressivo no conteúdo de RNA. A transcrição de DNA em RNA também é suprimida em espermátides, durante a condensação do DNA (SHARMA; AGARWAL, 2011). Nos estágios finais da espermiogênese, o citoplasma, incluindo todos os elementos do aparato de tradução, são fagocitados pelas células de Sertoli. No passado aceitava-se que não deveria existir nenhum tipo de RNA na célula espermática, exceto possíveis RNAs intranucleares e mitocondriais remanescentes. Acreditava-se que o RNAm restante não fosse capaz de suportar a tradução (MILLER *et al.*, 2005).

Ainda que o núcleo espermático não tenha capacidade transcricional, essa célula contém um complexo sistema de RNAm, sendo que alguns são transcritos imediatamente antes da inativação nuclear e, outros, são remanescentes da espermatogênese (NISHIMURA; DODE, 2014).

A célula espermática pode ser considerada como uma célula especializada e diferenciada, com ergonomia máxima para a entrega do genoma haploide ao oócito.

Para isto, ela minimizou seu volume interno, eliminou todas as suas organelas redundantes e silenciou todos os seus processos celulares não relevantes para essa tarefa. Como consequência, quantidades mínimas de RNA estão presentes nestas células, que perdem a capacidade aparente de sintetizar RNA e proteínas (BOERKE *et al.*, 2007).

Os espermatozoides representam o estágio final na diferenciação espermatogênica e funcionam como um "veículo" para transmitir o conteúdo paterno genômico, transcriptômico e proteômico acumulado ao oócito (ANTON e KRAWETZ, 2012).

2.3 mRNA espermático

Acreditou-se durante muito tempo que o genoma masculino fosse o único material entregue ao oócito com papel determinante no processo de fecundação (NISHIMURA e DODE, 2014). Atualmente sabe-se que o espermatozoide não apenas fornece DNA genômico, mas também RNA ao oócito. A célula espermática contém vários tipos de RNAs, incluindo RNAs mensageiros (mRNA) que codificam proteínas, RNAs longos não codificantes de funções indeterminadas, microRNAs (miRNA) que regulam a expressão da maioria dos genes, RNA de interferência (iRNA) e RNA antisense (HOSKEN e HODGSON, 2014).

Muitos RNAm no espermatozoide são sintetizados imediatamente após a meiose e traduzidos nas espermátides em alongamento. Os longos RNAs nos espermatozoides são fragmentados durante a espermiogênese. A fragmentação interrompe a função dos RNAm, no entanto, os fragmentos podem refletir a qualidade do desenvolvimento do espermatozoide (ING *et al.*, 2018).

A função e o papel biológico desses RNAs ainda continuam desconhecidos, mas existem suposições e estudos que apontam para algumas teorias. Uma delas é que o RNA seja requerido pelo próprio espermatozoide, e que após a capacitação ele esteja apto a traduzir pelo menos alguns de seus RNAm novamente. Esses RNAs seriam traduzidos com o aparato mitocondrial e isso talvez ocorresse para suplementar as proteínas que foram degradadas ou desnaturadas (AOKI *et al.*, 2006; GUR; BREITBART, 2006). Outra possibilidade é que o RNA atue no zigoto, após a fecundação. Segundo Ostermeier *et al.* (2004), o espermatozoide introduz uma carga

de RNA no ovócito e que este permanece intacto por algumas horas após a fecundação.

A população de genes do espermatozoide do ser humano é a mais bem caracterizada entre todos os mamíferos (JODAR *et al.*, 2013). Os primeiros perfis gerais de RNA de espermatozoides sugeriram que em humanos exista mais de 3.000 genes de codificação diferentes (OSTERMEIER *et al.*, 2002).

O conteúdo de RNA de um espermatozoide pode, em princípio, ser usado como padrão para a análise genômica da qualidade do sêmen, tanto em termos de espermatogênese quanto em potencial de fertilidade (BISSONNETTE *et al.*, 2009; DAS *et al.*, 2013; GOVINDARAJU *et al.* 2012; KRAWETZ *et al.*, 2011). Qualquer alteração testicular que altere a produção de espermatozoides, conseqüentemente reduz a fertilidade e, portanto, também modifica a “impressão digital” de RNA do espermatozoide (OSTERMEIER *et al.*, 2002).

Estudos com RNAm de espermatozoides humanos indicaram que genes específicos podem ser úteis para avaliação da fertilidade masculina (HAMATANI, 2012). Sendo assim, tem-se estudado diferentes RNAm de espermatozoide como possíveis marcadores de infertilidade em amostras de sêmen por meio da PCR em tempo real (STEGER *et al.*, 2008; AVENDAÑO *et al.*, 2009).

Alguns estudos relataram diferenças na quantidade de certos RNAm espermáticos entre homens inférteis e férteis (STEGER *et al.*, 2008; AVENDAÑO *et al.*, 2009). Diferenças na expressão de algumas centenas de genes entre homens férteis e inférteis com parâmetros normais de sêmen foram descritas (GARRIDO, 2009). Sugere-se que a análise dos genes de espermatozoides será o futuro no diagnóstico da infertilidade masculina, no entanto, nenhuma lista de genes proposta foi consenso até agora (ALTAMAE; SALUMETS, 2011).

Das *et al.* (2013) caracterizaram o transcriptoma global nos espermatozoides de ganhões férteis e exploraram o importante papel desses genes na fertilidade. Estas descobertas forneceram um melhor conceito da importância biológica dos RNAs espermáticos, permitindo a identificação de biomarcadores da fertilidade dos ganhões (SULIMAN *et al.*, 2018).

DAS *et al.* (2013) e ING *et al.* (2014) relataram concentrações de RNAm específicos em espermatozoides de ganhões. Quando os espermatozoides são submetidos à centrifugação por gradiente de densidade, o padrão de concentração de vários RNAm específicos em espermatozoides densos é diferente daquele em

espermatozoides menos densos de gananhões. A identificação de diferentes concentrações de RNAm em espermatozoides de gananhões férteis comparando com subfértéis poderia levar ao desenvolvimento de um novo ensaio para prever a função dos espermatozoides em cavalos (ING *et al.*, 2014).

Os marcadores genéticos podem ser úteis na seleção de gananhões reprodutores. Como são conhecidos muitos genes que influenciam a fertilidade de mamíferos em outras espécies, especialmente em humanos e em camundongos, é provável que mais genes em gananhões se tornem conhecidos (SIEME, 2012).

Atualmente, vários estudos têm surgido com foco na análise de transcritos ou de proteínas em espermatozoides que poderiam estar associados à fertilidade masculina. Apesar dos avanços obtidos na análise transcricional de espermatozoides em diversas espécies, os estudos genéticos de espermatozoides de gananhões ainda são limitados (SULIMAN *et al.*, 2018).

2.4 Genes

2.4.1 PRM1 e PRM2

As protaminas são proteínas nucleares específicas do espermatozoide que substituem as histonas na ligação ao DNA através de um processo de várias etapas em sequência. Inicialmente, nas espermátides redondas, histonas são substituídas por proteínas de transição. Posteriormente, no alongamento das espermátides, as proteínas de transição são removidas da cromatina em condensação e são substituídas por protaminas 1 e 2 (PRM1 e PRM2), constituindo as principais proteínas das espermátides alongadas e do espermatozoide maduro (DADOUNE, 1995).

As protaminas são aproximadamente metade do tamanho das histonas e são caracterizadas por um núcleo rico em arginina e resíduos de cisteína (FUENTES-MASCORRO *et al.*, 2000). O alto nível de arginina provoca uma carga positiva, facilitando assim a forte ligação ao DNA (BALHORN *et al.*, 2000). Os resíduos de cisteína facilitam a formação de múltiplas ligações dissulfeto inter e intraprotamina, essenciais para o empacotamento de cromatina de alta ordem. As protaminas 2 contêm menos grupos cisteína e, portanto, contêm menos ligações cruzadas dissulfeto. Isso, teoricamente, deixa o DNA mais suscetível a danos (CORZETT *et al.*, 2002).

Estas substituições de histonas por protaminas resultam em uma cromatina altamente condensada e transcricionalmente inativa. O núcleo compacto resultante das ligações por protaminas tem tamanho de cerca de 5% do núcleo somático (LEE *et al.*, 2011).

Enquanto a PRM1 parece ser transcrita e traduzida nas espermatídes de todos os mamíferos, a PRM 2 tem a tradução regulada de maneira espécie-específica. A proteína PRM2 foi identificada em espermatozoide de ratos, garanhões e na maioria dos primatas, incluindo o homem (CORZETT *et al.*, 2002).

O empacotamento do DNA no espermatozoide dependente de protamina, e sua posterior deprotaminação no zigoto representa uma característica comum para todos os mamíferos. Sabe-se que a proporção de PRM1 e PRM2 varia entre diferentes espécies de mamíferos, mas é constante dentro da mesma espécie. Proporções anormais parecem estar relacionadas a infertilidade (CORZETT *et al.*, 2002).

Os produtos dos genes PRM1 e PRM2 são um dos mais estudados no espermatozoide. Os RNAm da PRM1 e PRM2 são pequenos (426 e 683 bases de comprimento para PRM1 e PRM2 em humanos, respectivamente), então eles podem estar presentes como RNAm intactos e funcionais em espermatozoides. Os RNAm de PRM1 e PRM2 são entregues do espermatozoide ao embrião durante a fertilização (KEMPISTY *et al.*, 2008).

Em humanos, a relação PRM1/PRM2 no espermatozoide é de aproximadamente 1.0 (AOKI *et al.*, 2005). Em homens, onde a maioria dos estudos de protamina relacionados à fertilidade foram realizados, a subfertilidade foi correlacionada com uma persistência anormal de histonas (ZHANG *et al.*, 2006), ou com níveis de protamina, ou com uma relação anormal de PRM1/PRM2 tanto nas concentrações de proteína e níveis de mRNA no espermatozoide, como em nível de mRNA em espermatídes (STEGER *et al.*, 2003). Distintos níveis de mRNA espermático de PRM1 e PRM2 foram relatados em homens férteis e inférteis (AOKI *et al.*, 2006; STEGER *et al.*, 2008).

Depa-Martinow *et al.* (2011) sugeriram que RNAm e proteínas PRM1 e PRM2 contribuem não só para a qualidade espermática e para o sucesso na fertilização, mas podem ter um papel no desenvolvimento inicial de embriões pré-implantação.

Aoki *et al.* (2006) relataram associação entre síntese proteica anormal com retenção aberrante de mRNA, sugerindo que defeitos na regulação da tradução da protamina podem contribuir para a deficiência de protamina em homens inférteis.

Dois elos são propostos entre a expressão anormal de protamina e a espermatogênese aberrante: primeiro, que a expressão anormal de protamina seria indicativo de uma anormalidade geral da espermatogênese, possivelmente devido a função anormal da transcrição ou regulador translacional; segundo, que as protaminas atuariam como reguladores de ponto de verificação da espermatogênese, e a expressão anormal da protamina levaria à indução de um processo apoptótico e à diminuição grave da qualidade do espermatozoide (CARREL *et al.*, 2007).

Como os níveis de protamina tem sido propostos como um parâmetro clínico potencial para a avaliação da capacidade de fertilização do espermatozoide de humanos, pode ser que isso também seja aplicável ao ganhão (PARADOWSKA-DOGAN *et al.*, 2014).

2.4.2 Catsper1

Para que ocorra a fertilização, o objetivo do espermatozoide é simples e fundamental: se unir com o oócito e entregar o material genético paterno. Apesar deste simples objetivo, existem muitos obstáculos que o espermatozoide tem que superar, sendo que o cálcio (Ca^{2+}) está envolvido em quase todas essas etapas. Ele é essencial para capacitação espermática, quimiotaxia e penetração no oócito. Somente com a capacitação completa o espermatozoide está pronto para fertilizar o oócito (REN; XIA, 2010).

O Catsper é um canal de cátion específico do espermatozoide que é essencial para a motilidade espermática hiperativada (DARSZON *et al.*, 2011). Os canais Catsper são compostos por múltiplas proteínas, incluindo proteínas Catsper 1-4, que compõe uma complexa formação porosa, e as proteínas acessórias Catsper β , Catsper γ e Catsper δ (LISHKO *et al.*, 2012). A primeira subunidade formadora de poros, a Catsper1, foi descoberta por Ren *et al.* (2001) e desempenha um papel vital na motilidade dos espermatozoides (SUN *et al.*, 2017).

Um grande número de canais de membrana plasmática permeáveis a Ca^{2+} foram encontrados no testículo e em espermatozoides nas últimas décadas. Estes incluem canais de cálcio seletivos ativados por alta voltagem e canais ativados por baixa voltagem (CaVs), canais iônicos receptores de potencial transitório (TRP), canais operados por nucleotídeos cíclicos (CNG), e canais Catsper (REN; XIA, 2010).

Os canais Catsper contêm seis domínios transmembrana. A sua sequência geral é similar aos CaVs, e contém uma sequência na região do filtro de seletividade de íons que é um recurso compartilhado por Catspers e CaVs (REN; XIA, 2010). O Catsper 1 tem um domínio terminal citoplasmático grande e rico em histidina (REN *et al.*, 2001) que varia em sequência e comprimento entre espécies (DARSZON *et al.*, 2011) e pode estar relacionado com a sensibilidade do canal ao pH. Além disso, os segmentos S4 dos canais Catspers têm resíduos carregados a cada terceira posição, uma característica de canais iônicos dependentes de voltagem (REN; XIA, 2010) (Figura 2).

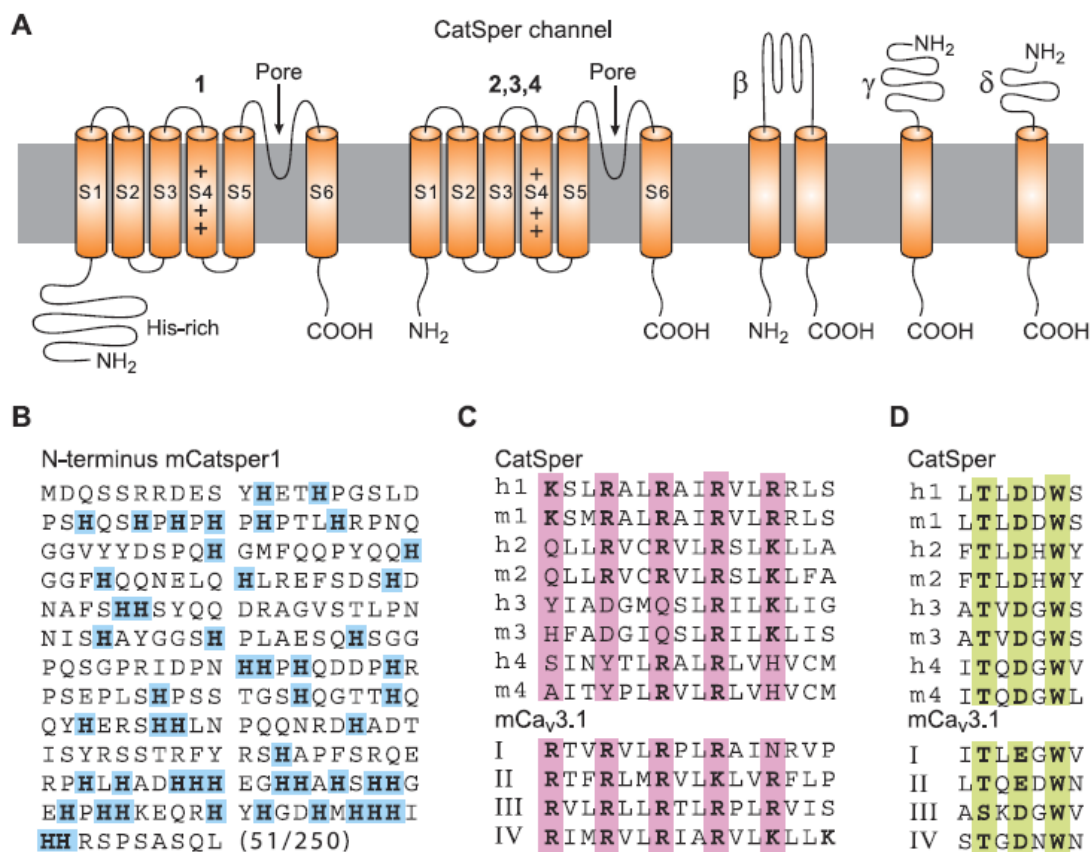


Figura 2. Estrutura do canal catsper. A, à esquerda: topologia da proteína do canal catsper1, mostrando seis segmentos transmembrana (S1-S6), com S4 contendo vários resíduos com carga positiva, a região do poro, e os terminais citoplasmáticos COOH e NH₂ (com a sua região rica em histidina); No centro: catsper 2, 3 e 4 com a mesma arquitetura de catsper 1, exceto por um terminal COOH e NH₂ mais curto e sem a região rica em histidina; à direita: topologia das subunidades β, γ e δ com seus segmentos transmembrana. B: sequência do terminal NH₂ do catsper1 de camundongo, mostrando a região rica em histidina (51 dos 250 resíduos de histidina mostrados em negrito). C, no alto: sequência de aminoácidos do segmento S4 do catsper 1 a 4 de humanos (h) e ratos (m) em alinhamento, o suposto sensor de voltagem. C, embaixo: O segmento S4 de cada domínio (I-IV) do canal CaV3.1 de ratos, apenas para comparação. Resíduos com carga positiva (arginina e lisina) são mostrados em negrito). D, no alto: sequência de aminoácidos da região do poro do catsper 1 a 4 de humanos (h) e ratos (m) em alinhamento. D, embaixo: a sequência de cada domínio (I-IV) do canal CaV3.1 de ratos, para comparação. A região do poro em consenso dos canais seletivos a Ca²⁺ é mostrada em negrito (DARSZON, *et al.*, 2011).

Vários canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem estão localizados no testículo, mas também tem efeito em outros órgãos. Somente Catsper é exclusivamente expresso em espermatozoides (SUN *et al.*, 2017). No espermatozoide, o canal é localizado na peça principal da cauda (REN *et al.*, 2001).

O canal Catsper é sensível ao pH e fracamente dependente de voltagem (SUN *et al.*, 2017). No espermatozoide de rato ele se abre em resposta ao aumento do pH intracelular que é tipicamente associado com capacitação espermática (REN *et al.*, 2001).

Ren *et al.* (2001) eliminaram o gene Catsper 1 de camundongos, o que resultou em uma baixa motilidade dos espermatozoides e infertilidade. A deleção do gene revelou seu papel vital na motilidade espermática e na fertilidade masculina, e um exame aprofundado não revelou anormalidades aparentes nesses camundongos, exceto por falta de motilidade espermática.

Os espermatozoides de camundongos com o gene nulo não conseguiram fertilizar oócitos com a zona pelúcida intacta, no entanto fertilizaram oócitos livres de zona pelúcida, indicando que os canais Catsper são necessários para permitir que o espermatozoide penetre a zona pelúcida (REN *et al.*, 2001). Uma comparação da forma do movimento da cauda de espermatozoides de camundongos com o gene nulo revelou que o espermatozoide não conseguia exibir motilidade hiperativada e que seus batimentos flagelares permaneciam simétricos com pouca amplitude e pouca curvatura, mesmo em meios capacitantes (CARLSON *et al.*, 2003). Em concordância com o envolvimento do Catsper 1 na motilidade, espermatozoides de camundongo com gene Catsper 2 nulo tiveram menor motilidade progressiva do que os espermatozoides normais em meio com alta viscosidade (DARSZON *et al.*, 2011).

Sendo assim, Ren *et al.* (2001) propuseram que o Catsper é uma proteína de canal de cátions única necessária para a motilidade normal dos espermatozoides e, em particular, para a penetração espermática da zona pelúcida. A presença de uma proteína inativa de Catsper em camundongos machos induz a infertilidade (KIRICHOK *et al.*, 2006).

Em camundongos, os espermatozoides com motilidade hiperativada em resposta a capacitação dependem da presença de Catsper (REN *et al.*, 2001) e, em humanos, as mutações nos genes Catsper são associados com infertilidade e motilidade espermática anormal (NIKPOOR *et al.*, 2004).

O mecanismo exato para a indução da hiperativação da motilidade mediada pelo Catsper não é claro, e pode envolver não só o influxo de cálcio do ambiente, mas também a liberação de cálcio de um armazenamento interno do espermatozoide (LOUX *et al.*, 2013). O gatilho geral para o Catsper é a despolarização alcalina causada pela mudança no ambiente iônico da tuba uterina (CARLSON *et al.*, 2003). O contato do espermatozoide com o ambiente alcalino aumenta o pH intracelular que ativa os canais Catsper (LEEMANS *et al.*, 2019).

Sendo o principal canal de cálcio do espermatozoide, o Catsper é o principal mecanismo para transportar cálcio extracelular para a cauda do espermatozoide e é, portanto, vital para a fertilidade do espermatozoide. As células espermáticas deficientes de Catsper não são capazes de hiperativar e, portanto, falham em penetrar as camadas protetoras do oócito (QI *et al.*, 2007). Na ausência de cálcio no ambiente, o canal Catsper pode transportar sódio, resultando em despolarização espermática e perda de motilidade (TORRES-FLORES *et al.*, 2011).

Os mecanismos para hiperativação mediada por Catsper tem sido atualmente investigado em ratos e humanos. Enquanto muitos aspectos são similares entre essas espécies, existem notáveis diferenças; a progesterona e prostaglandinas, por exemplo, estimulam diretamente a ativação do Catsper em espermatozoide de humanos, mas não de ratos (LISHKO *et al.*, 2012). Pouco se sabe sobre o Catsper ou as funções mediadas por este canal em outras espécies (LOUX *et al.*, 2013).

No espermatozoide do garanhão, o RNAm de Catsper1 foi identificado e a proteína Catsper 1 foi localizada na peça principal da cauda do espermatozoide. No entanto, as análises da proteína Catsper 1 equina revelaram diferenças espécie-específica na estrutura da região do sensor de pH (LOUX *et al.*, 2013). Isto indica que, apesar da presença do canal no espermatozoide equino, a relação entre motilidade hiperativada e o influxo de cálcio provavelmente seja fraca (LEEMANS *et al.*, 2019).

A falha do espermatozoide equino em sofrer hiperativação sob condições que induzem capacitação para outras espécies pode estar relacionada a diferenças espécie-específicas na presença ou na função dos canais Catsper (LOUX, 2013).

Não está claro quando ocorre a abertura dos canais Catsper em espermatozoides de garanhões ou se um aumento de Ca^{2+} intracelular é necessário para o início da motilidade hiperativada nesta espécie. A falha na estimulação ou na motilidade hiperativada do espermatozoide equino sob condições que capacitam espermatozoides de outras espécies pode estar relacionada a uma janela estreita de

pH e Ca^{2+} intracelular na qual ocorre a motilidade hiperativada no cavalo (LOUX *et al.*, 2013).

A inquestionável importância dos canais Catsper é determinada pelo fato de que os camundongos nulos, sem qualquer isoforma de catsper, são inférteis (REN *et al.*, 2001; QI *et al.*, 2007) e de que as mutações nos Castper 1 em humanos está associada com infertilidade (AVENARIUS *et al.*, 2009).

O gene Catsper humano é um alvo potencial para a triagem e o tratamento da infertilidade masculina (REN *et al.*, 2001). Além disso, Nikpoor *et al.* (2004) encontraram expressão gênica de Catsper diminuída em homens subférteis com baixa motilidade espermática e concluíram que isso pode contribuir para o diagnóstico e o tratamento de casos de infertilidade atribuídos a motilidade espermática deficiente.

A compreensão dos RNAs presentes no espermatozoide equino, permitirá um aprofundamento no conhecimento da fisiologia e descoberta de marcadores de qualidade seminal para esta especializada célula. O que promoverá uma fonte de recurso teórico para aplicação nas biotécnicas do sêmen equino.

3. ARTIGO

Artigo para publicação na Theriogenology

PROTAMINE 1, 2 AND CATSPER 1: QUALITY INDICATORS OF SPERM AND FERTILITY IN STALLIONS

Marília Marcolla de Figueiredo¹, Henrique Boll de Araujo Bastos¹, Verônica La Cruz Bueno^{1,2}, Sandra Fiala Rechsteiner², Rodrigo Costa Mattos¹

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

²HISTOREP - Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas,RS. Brazil.

ABSTRACT: The genes identification involved in male reproduction and the evaluation of its functions improve the comprehension about spermatogenesis molecular bases, fertilization, embryos early cleavage, spermatid quality and male infertility. The present study aimed to verify the PRM1, PRM2 and Catsper 1 genes expression into the equine sperm and their relations with the stallions spermatid quality and fertility. Semen collections were realized in eighteen stallions, which were divided in two groups, fertile and subfertile, based on the pregnancy rate per cycle. The semen analysis was realized by Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision®. The mRNA was extracted from the spermatozoa and the PRM1, PRM2 and Catsper 1 gene expression verification in the spermatid cell was conducted by the qPCR technique. The results present a higher expression of PRM1 and Catsper 1 in the fertile stallions group than subfertile group; there was no correlation of PRM1 and PRM2 expression with spermatid quality parameters; there was correlation of the Catsper 1 expression with morphology and motility parameters. Negative correlation was found between the PRM1/PRM2 ratio, fertility and motility parameters. The present research demonstrates that the PRM1 and Catsper 1 genes are related to stallions fertility and spermatid quality, and they may work as genetic markers.

KEY WORDS: PRM1, PRM2, Catsper1, stallion, fertility

1. Introduction

In equine production, the stallion represents half of the breeding equation, however, a single stallion usually breeds with several mares, so its fertility is a critical factor in the success of a breeding program (COLENBRANDER et al., 2003). Subfertility or infertility in breeding stallions contributes to low pregnancy rates per cycle and low pregnancy rates per season, resulting in substantial financial losses in the equine industry (ROSER, 2011).

Current semen assays are useful predictors of sperm quality, and the combination of many sperm function tests improves reliability in fertility estimation, however, they may fail to identify some subfertile stallions (COLENBRANDER et al., 2003). Studies in humans have revealed a large number of genes that may be involved in male reproductive mechanisms and in the fertilization cascade that could serve as fertility markers (OSTERMEIER et al., 2005; AOKI et al., 2006; DAS et al., 2010). In addition, identifying these genes and the evaluation of their functions would improve our understanding of spermatogenesis molecular basis, fertilization, early embryo cleavage, sperm quality, and male infertility (GANGULY et al., 2013).

The spermatid cell may be considered as a specialized and differentiated one, with maximum ergonomics to delivery haploid genome to oocyte. For that, the spermatid cell minimized its intern volume, it eliminated all of its redundant organelles and silenced all of its non-relevant cellular processes for that task (BOERKE et al., 2007). The spermatozoa represented the final stage in the spermatogenic differentiation and they work as a vehicle to transmit the paternal genomic content, transcriptomic and proteomic accumulated to the oocyte (ANTON e KRAWETZ, 2012).

Protamine 1 (PRM1) and protamine 2 (PRM2) genes codify the PRM1 and PRM2 proteins, that are inside the nucleus and are specific to the sperm. They bind to DNA to produce a highly condensed chromatin that results in a compact nucleus, with about 5% of the somatic nucleus size (LEE et al, 2011). This strong condensation is necessary to minimize the nuclear volume, improve sperm ergonomics and also to protect genetic material against nucleases, mutagenesis, toxic components and free radicals (BALHORN et al., 2000). The products of PRM1 and PRM2 genes are one of the most studied in human sperm, and many studies have related these genes to fertility (STEGER et al., 2003; AOKI et al., 2006; ZHANG et al., 2006; STEGER et al., 2008; DEPA-MARTINOW et al., 2011).

Cation Channel Sperm Associated 1 (Catsper 1) gene codifies a calcium channel protein that plays a vital role in sperm motility and male fertility (REN et al., 2001), and is essential for hyperactivated sperm motility (DARSZON et al., 2011). Ren et al. (2001) knocked out Catsper 1 gene from mice, which resulted in poor sperm motility and infertility. Catsper channels are also necessary to allow the sperm to penetrate the zona pellucida (REN et al. 2001). The general trigger for catsper opening is alkaline depolarization caused by the change in the oviduct ionic environment (CARLSON et al., 2003). The sperm contact with the alkaline environment increases intracellular pH that activates Catsper channels (LEEMANS et al., 2019). Nikpoor et al. (2004) found decreased catsper gene expression in subfertile men with low sperm motility and conclude that this may contribute to the diagnosis and treatment of infertility cases attributed to problems in sperm motility. The presence of Catsper 1 mRNA was identified in stallion sperms (LOUX, 2010), but it is still unclear when these channels open in stallion sperms. The failure in stimulation or in hyperactivate motility of equine sperm under standard capacitation conditions for other species may be related to species-specific differences in the presence or function of catsper channels (LOUX, 2013). Studies on human fertility, as well as that of other mammals, have advanced considerably in recent years, but there are few researches about the molecular mechanisms that affect stallion fertility. The present study aimed to investigate the expression of PRM1, PRM2 and Catsper 1 genes in equine sperm and their relationship with sperm quality and fertility in stallions.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The present experiment was conducted during the southern hemisphere breeding season (November to March) in the south of Brazil (30° S, 51° W).

All experimental procedures are in accordance with the guidelines of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and approved by the Committee of Ethics and Experimentation (CEEAA) of the Federal University of Pelotas (number 2753-2018).

Eighteen criollo stallions aged between 3 to 24 years old and weighing between 450 and 500 kg were used, they were fed daily with concentrate and alfalfa hay, with water and mineral salt *ad libitum*. One ejaculate was collected from each stallion that came from breeding centers.

The fertility of each stallion was defined by calculating the pregnancy rate per cycle using data of 30 mares / horse. The rates of the reproductive season in which the collections were performed were taken into account. Fertility rates ranged from 20 to 90%. Based on fertility rates the stallions were divided into two groups: fertile (with pregnancy rate per cycle $\geq 70\%$, $n = 11$) and subfertile (with pregnancy rate per cycle $\leq 40\%$, $n = 7$).

2.2. Semen Analysis

The semen collects were realized in artificial vagina, Hannover model. After collecting, the samples were stored in Falcon tube and sent to the Animal Reproduction Laboratory of the Veterinarian College in the Federal University of Rio Grande do Sul, with a maximum transport limit of 2 hours. Each sample was separated in two fractions, one to evaluate the semen parameters and the other to later mRNA extraction.

The sperm concentration was evaluated with a hemocytometer (Neubauer chamber) (BRITO, 2007). The evaluations of Total Motility (%) (TM); Progressive Motility (%) (PM); Fast Motility (%) (FM); Slow Motility (%) (SM); Local Motility (%) (LM); Average Path Velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$); Straight Line Velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$); Curvilinear Velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$); Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH, μm); Beat Cross Frequency (BCF, Hz); Straightness (STR, %) (VSL/VAP); Linearity (LIN, %) (VSL/VCL) was performed using the Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) system, Tiefenbach, Germany, AndroVision®, Minitube).

To the plasma membrane physical integrity analysis, 400 μl semen were incubated with 3 μl of propidium iodide (PI) and 2 μl of carboxyfluorescein diacetate (CFDA) at 37°C for eight minutes. The sample was evaluated by epifluorescence microscopy at 1000x magnification. A total amount of 100 cells per sample were evaluated. The cells steined green were considered intact and cells stained partially or totally stained in red are considered damaged sperm (GARNER et al., 1986).

The plasma membrane functional integrity was evaluated by hyposmotic test, in which 200 μL of distilled water were added to 100 μL of semen and incubated at 37° C for eight minutes. After that, the samples were analysed in a phase contrast microscope at 400x magnification. A hundred cells were analysed and considered positive reacted (HOST +) when the tail was coiled (LAGARES et al., 1998).

Panoptic® kit (Laborclin) was used to evaluate sperm morphology, the semen smear slide was dipped for 20 seconds in the dyes, and immediately after drying the slide was taken to a microscope in an immersion objective (1000x) for analysis, 100 sperm cells were counted from each sample (CBRA, 2013).

The semen fraction which would be used later for extracting mRNA was centrifuged at 600x g for 10 minutes. This procedure was repeated 3 times. After each centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in PBS medium. After the third centrifugation the pellet was resuspended in 2 ml of RNAlater® (Life Technologies) in free RNA cryotube and stored in a freezer at -80°C to later mRNA extraction.

2.3. Extraction of mRNA

The mRNA extraction was made by the Comercial Kit SV RNA Total Isolation System® (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer instructions. The samples RNA concentration was evaluated with Nanovue and they were stored in a freezer at -80°C.

After the extraction, the mRNA was quantified by spectrophotometry (NanoVue Plus, GE Healthcare). In order to minimize adverse effects of protein contamination, only RNA samples with 260/280 ratio between 1.9 and 2.1 and 260/230 ratio >2.0 were used for the analysis.

2.4. cDNA e qPCR

Reverse transcription of mRNA to cDNA was performed using the GoScript Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer instructions. The cDNA concentration of the samples was evaluated with NanoVue Plus, GE Healthcare and the samples were stored in a freezer at -20°C.

The expression of PRM1, PRM2 and Catsper 1 genes in the sperm cell was verified by qPCR technique. The amplification of the cDNA was performed by a primer designed specifically for an amplicon (sequence of interest) using the BRYT Green fluorophore from the kit qPCR Master Mix 2X GoTaq® (Promega Wisconsin, USA). The primers were obtained from Integrated DNA Technologies (IDT®) and the sequences used are listed in Table 1.

Relative quantitation was performed and the mRNA levels of the target genes (PRM1, PRM2 and Catsper 1) were normalized against β -actin mRNA levels. The endogenous β -actin

gene was used to normalize the amount of RNA added in the reactions. To determine the assay amplification efficiency a 5x serial dilution was performed, starting at a concentration of 242.5 ng/ml to 0.0024 ng/ml, with one sample for each gene used to perform the standard curve. For results normalization and accuracy in comparing gene expression between samples, the RNA concentration of 1ng/ml was used for all samples. Threshold cycle (CT) method of comparison was used to calculate the relative mRNA expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

The program profile used for amplification was 95 °C for 2 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 3 seconds, annealing for 30 seconds and extension at 60 °C for 30 seconds. The amplification was performed using the thermal cycler StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the data were processed using StepOnePlus™ Software v2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Table 1. Sequences details used for stallion sperm mRNA quantitative polymerase chain reaction

Gene	Primer	Annealing temperature	Referências
PRM1	F: 5' – CGATAGTGCACGAGACAGCAA – 3' R: 5' – ATGGTGGCATTTC AAGATGTG – 3'	58°C	(ING <i>et al.</i> , 2014)
PRM2	F: 5' – CACACCCCGGAGAATATCGA – 3' R: 5' – CGTCGTCTGTAGCGGTAGTAGCT – 3'	58°C	(ING <i>et al.</i> , 2014)
Catsper 1	F: 5' – GGTGCTGCGAGCCTTGTT – 3' R: 5' – TGAATATGGTCGTGAAGATGTTCTG – 3'	60°C	(ING <i>et al.</i> , 2014)
β-actina	F: 5' - CGA CAT CCG TAA GGA CCT GT - 3' R: 5' - GTG GAC AAT GAG GCC AGA AT - 3'	60°C	(COYNE <i>et al.</i> , 2009)

Abbreviation: PRM1, Protamine 1; PRM2, Protamine 2; Catsper 1, Cation Channel Sperm Associated 1; F, forward; R, reverse.

2.6. Statistical analysis

The analyses were performed using Statistix 8 software. The variables were assessed for normality by the Shapiro – Wilk test. The data were considered non-parametric and was

performed the Kruskal Wallis Test. Gene expression of PRM1, PRM2 and Catsper 1 were considered as dependent variables. The groups of stallions fertile and subfertile were considered as independent variables. Data are presented as means \pm standard deviation. Differences $P \leq 0.05$ were considered significant. Pearson's simple correlation was performed to verify relationships between the studied characteristics. With a significance level of $P < 0.05$, medium and high intensity correlations were considered, which comprised values between 0.40 and 0.60 and > 0.60 respectively.

3. Results

The results of semen analysis are shown in Table 2. The differences between the groups to the expression of PRM1 ($p = 0.039$) and Catsper 1 ($p = 0.046$) gene are shown in figures 3 and 4, respectively. We found a trend between the groups to express PRM2 gene ($p = 0.08$), as shown in Figure 3.

Table 2. Semen analysis

	Fertile (mean \pm SEM)	Subfertile (mean \pm SEM)
Sperm concentration ($\times 10^6/\text{mL}$)	106,500 \pm 0,707	180,00 \pm 212,132
Hyposmotic (%)	69,000 \pm 8,485	52,500 \pm 2,121
Fluorescence (%)	90,000 \pm 9,899	49,500 \pm 19,092
Normal morfology (%)	73,500 \pm 19,092	69,650 \pm 0,919
Minor defects (%)	8,250 \pm 1,061	8,800 \pm 1,131
Major defects (%)	18,250 \pm 18,031	21,650 \pm 1,909
Fertility (%)	70,500 \pm 0,707 ^a	30,000 \pm 14,142 ^b
TM (%)	76,500 \pm 4,950 ^a	33,650 \pm 9,263 ^b
PM (%)	49,500 \pm 16,970	16,450 \pm 2,616
FM (%)	9,750 \pm 6,293	3,300 \pm 4,667
SM (%)	36,450 \pm 23,264	10,800 \pm 2,546
LM (%)	27,400 \pm 21,355	17,250 \pm 6,576
Imobile (%)	14,100 \pm 17,112 ^a	66,350 \pm 9,263 ^b
VCL ($\mu\text{m/s}$)	122,23 \pm 22,062	66,291 \pm 25,037
VSL ($\mu\text{m/s}$)	43,780 \pm 8,487 ^a	25,479 \pm 7,168 ^b
VAP ($\mu\text{m/s}$)	54,258 \pm 6,018 ^a	32,215 \pm 8,895 ^b
LIN (%)	0,329 \pm 0,005	0,326 \pm 0,220
BCF (Hz)	18,349 \pm 1,736 ^a	9,832 \pm 1,353 ^b
ALH (μm)	1,221 \pm 0,177	0,669 \pm 0,202

Abbreviations: Total Motility (TM); Progressive Motility (PM); Fast Motility (FM); Slow Motility (SM); Local Motility (LM); Curvilinear Velocity (VCL); Straight Line Velocity (VSL); Average Path Velocity (VAP); Linearity (LIN) (VSL/VCL); Beat Cross Frequency (BCF); Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH).

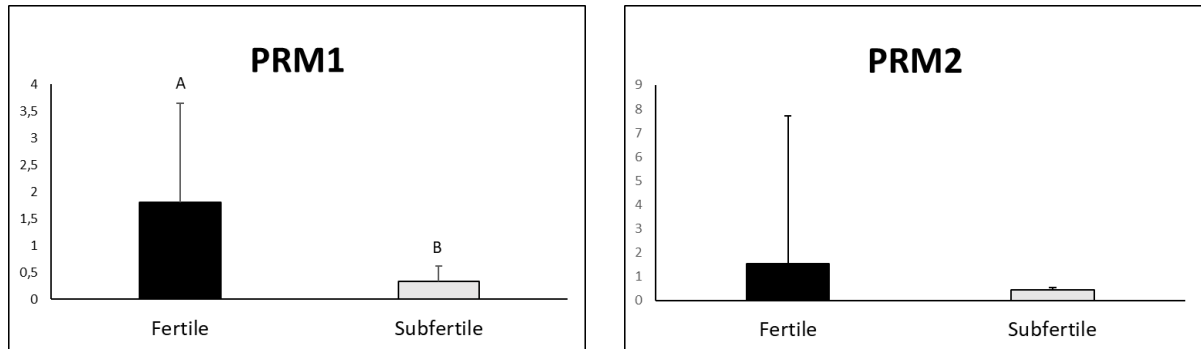


Figure 3. Mean (\pm SEM) of PRM1 and PRM2 gene expression of sperm from fertile and subfertile stallions. Different letters (A, B) indicate significant difference ($P \leq 0.05$).

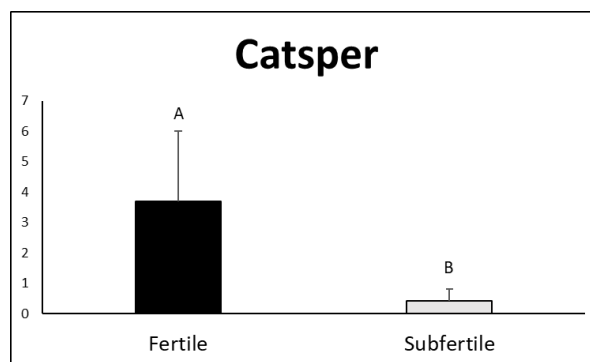


Figure 4. Mean (\pm SEM) of Catsper 1 gene expression of sperm from fertile and sub-fertile stallions. Different letters (A, B) indicate significant difference ($P \leq 0.05$).

Correlation results between PRM1 / PRM2 ratio and sperm quality data are shown in Table 3. The results of the correlations found between Catsper1 gene expression and sperm kinetic analysis are shown in Table 4.

Table 3. Pearson coefficient of correlation between seminal parameters and the PRM1 / PRM2 ratio.

	Membrane integrity	Fertility	Total motility	Imobile	VCL	VAP	BCF	ALH
R	-0.8575	-0.8130	-0.8904	0.9096	-0.8521	-0.7294	-0.9259	-0.8530
P	0.0065	0.0141	0.0030	0.0017	0.0072	0.0400	0.0010	0.0071

Abbreviations: VCL, curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$); VAP, average path velocity ($\mu\text{m/s}$); BCF, beat cross frequency (Hz); ALH, amplitude of lateral head displacement (μm).

Table 4. Pearson coefficient of correlation between seminal variables and Catsper1 gene.

	Minor defects	PM	FM	BCF
R	-0.6916	0.8671	0.9698	0.6894
P	0.0390	0.0025	0.0000	0.0399

Abbreviations: PM, progressive motility (%); LM, local motility (%); FM, fast motility (%); LIN, linearity (%); BCF, beat cross frequency (Hz).

4. Discussion

The present study demonstrated the genetic expression of PRM1, PRM2 and Catsper 1 in sperm of fertile and subfertile stallions. Several studies related protamines mRNA levels to fertility (STEGER et al., 2003; AOKI et al., 2006; ZHANG et al., 2006; STEGER et al., 2008).

In the present study, PRM1 mRNA levels were higher in the group of fertile stallions compared to subfertile stallions. These results agree with the findings of Pardede et al. (2022) that demonstrated a higher expression of PRM1 mRNA and more abundant PRM1 protein in high fertile bulls than in low fertile bulls; and with the findings of Depa-Martinow et al. (2011) that found a correlation between mRNA levels and PRM1 protein concentration, where both would be increased in sperm from men who were successful in vitro fertilization.

The results of this research demonstrate the difference in expression of PRM1 between the groups; the changes in protamine expression probably originate from spermatogenesis as demonstrated by Steger et al. (2003) who observed a significant decrease of mRNA levels in PRM1 in the groups of patients with compromised spermatogenesis. According to Paradowska-Dogan et al. (2014), the protamines expression in stallions as well as in humans constitutes a checkpoint of spermatogenesis and the protamine mRNA level may reflect spermatogenesis quality and sperm fertilization capacity.

The PRM1 expression findings of the present study disagree with Ing et al. (2014) who submitted stallion ejaculates to density gradient centrifugation and created two groups, one with the dense sperm and the other with the less dense sperm. They found no differences in PRM1 mRNA levels between the two groups. We believe that this divergence between studies is due to the methodology used, since the sperm selection of the same ejaculate does not reflect problems in the spermatogenesis. Another work that disagrees with the present findings is the one of Aoki et al. (2006) who evaluated mRNA levels and PRM1 protein concentrations in infertile men and found higher PRM1 mRNA levels related to lower PRM1 protein concentrations in infertile men, the hypothesis mentioned is that there was an error during translation with consequent retention of mRNA.

There is no consensus between protamine levels and sperm kinetics correlation (KEMPSTY et al., 2007; DEPA-MARTINOW et al., 2011; JODAR et al., 2012; GANGULY et al., 2013; HAMAD et al., 2019). The present study found no positive correlation between PRM1 gene expression and sperm quality evaluations. These findings are consistent with researches that found no correlation between PRM1 expression and sperm quality (HAMAD et al., 2019), Jodar et al. (2012) found no significant differences between protamine gene levels in sperm of asthenozoospermic infertile men compared to normozoospermic infertile men. According to these authors, the results suggest that differences in protamines quantity are more correlated with fertility than with motility parameters. Other studies have shown a relationship between expression and sperm motility. Ganguly et al. (2013) compared PRM1 mRNA levels in bulls with high and low sperm motility. They observed high levels of PRM1 mRNA expression in good quality semen compared with the low quality. Kempsty et al. (2007) found a higher level of PRM1 mRNA in sperm from normozoospermic men compared to asthenozoospermic men. Depa-Martinow et al. (2011) found a positive correlation with sperm quality and PRM1 mRNA levels.

The present research did not identify difference in PRM2 expression between groups. These findings are according to the study that evaluated the PRM2 mRNA levels in fertile and

infertile men and found higher levels, but with no statistical difference in fertile men (AOKI et al., 2006), and agree to Avedaño et al. (2008) that found no differences in PRM2 mRNA between the fertile men groups in comparison to the infertile ones and also agree from studies that could not find any difference in PRM2 mRNA level among the analyzed groups (STEGER et al., 2003; GANGULY et al., 2013).

In this research wasn't verified correlations between PRM2 and sperm quality, what agrees with Ganguly et al. (2013) that compared the PRM2 mRNA levels in bulls with high and low sperm motility and didn't find relation to sperm quality. These current results differ from the researches that had found positive correlation between the sperm quality and PRM2 mRNA levels (DEPA-MARTINOW et al., 2011; HAMAD et al., 2019) and from Kempsty et al. (2007) that had found higher levels of PRM2 mRNA in normozoospermic men's sperm in relation to the asthenozoospermic ones.

Most protamine researches were conducted in humans, and in these studies, subfertility was correlated with abnormal histone persistence (ZHANG et al., 2006; HAMAD et al., 2019) or an abnormal PRM1/PRM2 ratio in protein concentrations in sperm and in mRNA levels in spermatids and sperm (STEGER et al., 2003; AOKI et al., 2006; DEPA-MARTYNOW et al., 2012; ROGENHOFER et al., 2013). In humans, protein expression has a PRM1/PRM2 ratio of approximately 1.0 (AOKI et al., 2005). Sperm from infertile men show altered PRM1/PRM2 ratio or undetectable PRM2 in mature sperm (SHARMA; AGARWAL, 2011), with a PRM1/PRM2 >1 ratio (CARREL et al., 2001) and embryos derived from sperm deficient in PRM2 had their development affected (CHO et al., 2003). Several authors (CARREL; LIU, 2001; AOKI et al., 2005; ROGENHOFER et al., 2013) have suggested the protamine ratio could be used as a potential clinical parameter for evaluating fertility in humans. Paradowska-Dogan et al. (2014) correlated the PRM2/PRM1 ratio in stallions with different fertility rates and concluded that protamine gene levels in equine may reflect spermatogenesis quality and sperm fertilizing capacity. The current study found a negative correlation between the PRM1/PRM2 ratio with fertility, which agrees with other studies that identified a higher value of the PRM1/PRM2 ratio in subfertile groups.

The present study found correlation between PRM1/PRM2 ratio and sperm quality data, which agrees with the findings of Rogenhofer et al. (2013) and Depa-Martinow et al. (2011) and disagrees with studies that found no correlations between the PRM1/PRM2 ratio with sperm number, motility and sperm morphology (HAMAD et al., 2017; 2019).

In the present work it was found differences in the levels of *catsper1* gene expression between groups, where the expression was higher in fertile horses group compared to the

subfertile one. The Catsper 1 gene encodes a calcium channel protein that is unique to the sperm (LOUX et al., 2013). This protein is necessary for normal sperm motility and sperm penetration into the zona pellucida (REN, 2001). Mice without any Catsper isoform are infertile (REN et al., 2001; IQ et al., 2007), and mutations in human castper 1 genes are associated with infertility (AVENARIUS et al. al., 2009). The human Catsper gene is a potential target for male infertility screening (REN et al. 2001). This gene was identified in stallion sperm (LOUX et al., 2013) and was studied in stallion semen submitted to density gradient selection where it was found lower Catsper 1 mRNA concentrations in dense sperm (ING et al., 2014).

The higher Catsper 1 expression in the present study agrees with the study that verified reduced Catsper 1 protein expression in normospermic, asthenozoospermic and oligozoospermic infertility men compared to fertile normospermic men (AL-MSAID; AL-SALLAMI, 2018). Several correlations were found between Catsper1 expression and sperm quality parameters in the present study. Positive correlation was found with progressive, circular, slow motility and morphology which agrees with AL-Msaid and AL-Sallami (2018) who found positive correlation between Catsper 1 protein expression and sperm concentration, progressive motility, and sperm with normal morphology in infertile men with no diagnosed cause.

A group of researcher supplemented young and old mice with selenium (MOHAMMADI et al., 2009) and vitamin E (MOHAMMADI et al., 2013) and evaluated their effects on Catsper 1 and 2 gene expression and sperm parameters. There was an increase in Catsper gene expression, mainly 1, and an improvement in seminal parameters. Results were more expressive in older animals. They concluded that both selenium treatment and vitamin E treatment increased Catsper 1 and 2 gene expression and improved sperm parameters (concentration, morphology, motility, and viability rates). Subsequently, the same group administered lead and mercury (MOHAMMADI et al., 2018) in adult mice and evaluated the effects on Catsper 1 and 2 gene expression, in seminiferous tubules and sperm parameters. They found degeneration of seminiferous tubules and decreased of sperm parameters in both treatments. Catsper 1 and 2 gene expression decreased in both treatments, the improvement and worsening relation of the sperm quality and the Catsper expression agrees with the correlation findings of the present experiment. Both studies agree with the present results, we found correlation between Catsper1 expression and sperm morphology, progressive motility, slow motility and BCF.

Tamburrino et al. (2014) found lower levels of Catsper 1 protein expression in asthenozoospermic men compared to normozoospermic men and that this expression is highly

correlated with the percentage of progressive motility in semen samples. They demonstrated that an in vitro treatment with Catsper inhibitors strongly affected sperm kinetic parameters and reduced total, progressive and rapid motility. The authors suggest there is a strong indication of the connection between Catsper channel expression and function and sperm motility, which agrees with the findings of the progressive motility correlation of the present experiment.

In conclusion, PRM1, PRM2 and Catsper 1 genes are expressed in equine sperm and are related to fertility in stallions. Protamine 1 is probably more related to spermatogenesis problems, while Catsper 1 gene expression seems to be more related to sperm quality. PRM1 / PRM2 ratio has been shown to be positively related to sperm quality data. We suggest that PRM1 and Catsper genes may be used as markers of fertility and sperm quality.

Conflicts of interest

None.

References

- AL-MSAID, H.; AL-SALLAMI, A. Study of catsper1 protein levels in unexplained and idiopathic infertile men. **International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance**. v. 9, n. 2, p. 195-198, 2018.
- AOKI, V.; LIU, L.; CARRELL, D. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. **Human Reproduction**. v. 20, n. 5, p. 1298–1306, 2005.
- AOKI, V.; LIU, L.; CARRELL, D. A novel mechanism of protamine expression. Deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. **Molecular Human Reproduction**. v. 12, n.1, p. 41-50, 2006.
- AVENARIUS, M. *et al.* Human Male Infertility Caused by Mutations In the CATSPER1 channel protein. **The American Journal of Human Genetics**. v. 84, p. 505-510, 2009.
- AVEDAÑO, C. FRANCHI, A. OEHNINGER, S. Human sperm mRNA: differential expression between fertile and infertile men and maintenance of transcripts after fertilization. **Fertility and Sterility**. v. 90, p. S194-S195, 2008.
- BALHORN, R.; BREWER, L.; CORZETT, M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. **Molecular Reproduction and Development**. v. 56, p. 230-234, 2000.
- BRAUN, R. Packaging paternal chromosomes with protamine. **Nature Genetics**. v.28, p.10-12, 2001.

BRITO, L. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 249-264, 2007.

CARRELL, D; LIU, L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. **Journal of Andrology**. v. 22, n.4, p. 604-610, 2001.

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

CHO, C. et al. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. **Biology of Reproduction**. v. 69, p. 211–217, 2003.

COYNE et al. Cloning and expression of ADAM-related metalloproteinases in equine laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.129, p.231-241, 2009.

CARLSON, A. et al. CatSper1 required for evoked Ca^{2+} entry and control of flagellar function in sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 100, n. 25, p. 14864-14868, 2003.

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.; STOUT, T. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reproduction in Domestic Animals**. v.38, n.4, p.305-311, 2003.

DARSZON, A. et al. Calcium channels in the development, Maturation, and function of spermatozoa. **Physiological Reviews**. v. 91, n. 4, p. 1305-1355, 2011.

DAS, P. et al. Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. **Theriogenology**. v. 74, p. 1099-1106, 2010.

DEPA-MARTYNOW, M. et al. Impact of protamine transcripts and their proteins on the quality and fertilization ability of sperm and the development of preimplantation embryos. **Reproductive Biology**. v. 12, n.1, p. 57-72, 2011.

GANGULY, I. et al. Differential expression of protamine 1 and 2 genes in mature spermatozoa of normal and motility impaired sêmen producing crossbred Frieswal (HF Sahiwal) bulls. **Research in Veterinary Science**. v. 94, p. 256-262, 2013.

GARNER, D. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**. 34 p. 12-138, 1986.

HAMAD, M. et al. The impact of cigarette smoking on protamines 1 and 2 transcripts in human spermatozoa. **Human Fertility**, v. 22, n. 2, p. 104-110, 2017.

HAMAD, M. Quantification of histones and protamines mRNA transcripts in sperms of infertile couples and their impact on sperm's quality and chromatin integrity. **Reproductive Biology**. v. 19, p. 6-13, 2019.

ING, N. et al. Dense spermatozoa in stallion ejaculates contain lower concentrations of mRNAs encoding the sperm specific calcium channel 1, ornithine decarboxylase antizyme 3,

aromatase, and estrogen receptor alpha than less dense spermatozoa. **Theriogenology**. v. 82, p. 347-353, 2014.

JODAR, M. et al. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. **Human Reproduction Update**. v. 19, n. 6, p. 604-624, 2013.

KEMPSTY, B. et al. Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. v.45, p.109-113, 2007.

LEEMANS, B. et al. Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species? **Reproduction**. v. 157, p. R181-197, 2019.

LISHKO, P. et al. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. **Annual Review of Physiology**. v. 74, p. 453-475, 2012.

LAGARES M. 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.

LEE, T. et al. RNA Expression in male germ cells during spermatogenesis (male germ cell transcriptome). In: ZINI, A. AGARWAL, A. **Sperm Chromatin**. London: Springer, 2011. p. 107-121.

LOUX, S. et al. Catsper and the relationship of hyperactivated motility to intracellular calcium and pH kinetics in equine sperm. **Biology of Reproduction**. v. 89, n. 5, p 1-15, 2013.

LOUX, S. et al. The CatSper ion channel and hyperactivated motility of horse spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 121S, p. S180, 2010.

LOUX, S. **Hyperactivated motility of stallion spermatozoa**. 2013. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Texas A&M University, Texas, 2013.

MOHAMMADI, S.; MOVAHEDIN, M.; MOWLA, S. Up-regulation of CatSper genes family by selenium. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 7, n. 126, p. 1-6, 2009.

MOHAMMADI, S. et al. Effects of Vitamin-E treatment on CatSper genes expression and sperm quality in the testis of the aging mouse. **International Journal of Reproductive Biomedicine**. v. 11. n. 12. P. 989-998, 2013.

MOHAMMADI, S. et al. Down-regulation of CatSper 1 and CatSper 2 genes by lead and mercury. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 59, p. 82-86, 2018.

NIKPOOR, P. et al. CatSper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility. **Human Reproduction**, v. 19, n. 1, p. 124-128, 2004.

OSTERMEIER, C. et al. A suite of novel human spermatozoal RNAs. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 1, p. 70-74, 2005.

PARADOWSKA-DOGAN, A. et al. Protamine mRNA ratio in stallion spermatozoa correlates with mare fecundity. **Andrology**. v.2, p. 521-530, 2014.

PARDEDE, B. et al. PRM1 gene expression and its protein abundance in frozen-thawed spermatozoa as potential fertility markers in breeding bulls. **Veterinary Sciences**. V.9, n.3, p1-15, 2022.

QI, H. et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 104, n. 4, p. 1219-1223, 2007.

REN, D. et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. **Nature**. v. 413, p. 604-609, 2001.

ROGENHOFER, N. et al. The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. **Human Reproduction**. v. 28, n.4, p. 969–978, 2013.

ROSER, J. Diagnostics and therapeutics for stallions with declining fertility: an endocrine–paracrine–autocrine approach. In: MCKINNON, A. et al. **Equine Reproduction**. 2.ed. West Sussex: Wiley-Blackwell. 2011. P. 1435-1447.

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis: an overview. In: ZINI, A. AGARWAL, A. **Sperm Chromatin**. London: Springer, 2011. p. 19-44.

STEGER, K. et al. Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. **Molecular Human Reproduction**. v. 9, n. 6, p. 331-336, 2003.

STEGER, K. et al. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. **Human Reproduction**. v. 23, n. 1, p.11-16, 2008.

TAMBURRINO, L. et al. The CatSper calcium channel in human sperm: relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. **Human Reproduction**. v. 29, n. 3, p. 418–428, 2014.

ZHANG, X.; GABRIEL, M.; ZINI, A. Sperm Nuclear Histone to Protamine Ratio in Fertile and Infertile Men: Evidence of Heterogeneous Subpopulations of Spermatozoa in the Ejaculate. **Journal of Andrology**. v. 27, n. 3, p. 414-420, 2006.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem inúmeras pesquisas sobre transcriptômica associada à reprodução em humanos, e já houve bastante avanço na identificação de genes com importância na reprodução e suas respectivas funções nessa espécie. Existem poucas pesquisas nesta área relacionadas à reprodução em equinos. Este estudo avaliou se três genes, com importância e função conhecida na reprodução humana, poderiam servir como marcadores de fertilidade e qualidade espermática de garanhões.

Os resultados deste estudo são promissores, e sugerem que o gene PRM1 poderia ser utilizado como marcador de fertilidade em garanhões, enquanto o gene Catsper 1 poderia servir como marcador de fertilidade e de qualidade espermática. Os genes PRM1 e PRM2 estariam relacionados com a espermatogênese, enquanto o Catsper1 estaria relacionado com motilidade espermática. Seria interessante realizar novas pesquisas com esses genes, incluindo também a avaliação das proteínas traduzidas por eles, em animais férteis e animais com problemas de fertilidade conhecidos, tanto relacionados com a espermatogênese quanto relacionados a motilidade espermática.

Como existem várias causas de subfertilidade e infertilidade no garanhão, a realização de mais estudos, com a inclusão de outros genes que já foram relacionados com a reprodução e com a fertilidade, poderiam contribuir para o desenvolvimento de um painel de marcadores que englobem as mais diversas causas de diminuição de fertilidade.

5. REFERÊNCIAS

- ALLAN, F. A landscaping analysis of working equid population numbers in LMICs, with policy recommendations. **Brooke/University of Edinburgh**, 2021. Disponível em: https://www.thebrooke.org/sites/default/files/Images/Equid_Population_Landscaping_Analysis.pdf. Acesso em 09/08/2023.
- ALMEIDA, F.; SILVA, V. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 39, p. 119-129, 2010.
- ALTMÄE, S.; SALUMETS, A. A novel genomic tool for sperm quality? **Reproductive BioMedicine Online**. v. 22, p. 405-407, 2011.
- ANTON, E.; KRAWETZ, S. Spermatozoa as biomarkers for the assessment of human male infertility and genotoxicity. **Systems Biology in Reproductive Medicine**. v. 58, p. 41-50, 2012.
- AOKI, V.; LIU, L.; CARRELL, D. A novel mechanism of protamine expression. Deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. **Molecular Human Reproduction**. v. 12, n.1, p. 41-50, 2006.
- AVENARIUS, M. *et al.* Human Male Infertility Caused by Mutations In the CATSPER1 channel protein. **The American Journal of Human Genetics**. v. 84, p. 505-510, 2009.
- AVEDAÑO, C. FRANCHI, A. OEHNINGER, S. Human sperm mRNA: differential expression. between Fertile and infertile men and maintenance of transcripts after fertilization. **Fertility and Sterility**. v. 90, p. S194-S195, 2008.
- BALHORN, R.; BREWER, L.; CORZETT, M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. **Molecular Reproduction and Development**. v. 56, p. 230-234, 2000.
- BISSONNETTE, N. *et al.* Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. **Reproduction Research**. v. 138, p. 65-80, 2009.
- BOERKE, A.; DIELEMAN, S.; GADELLA, B. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**. v. 68S, p.S147-155, 2007.
- BRAUN, R. Packaging paternal chromosomes with protamine. **Nature Genetics**. v.28, p.10-12, 2001.
- CARLSON, A. *et al.* CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 100, n. 25, p. 14864-14868, 2003.

CARREL, D.; EMERY, B.; HAMMOUD, S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? **Human Reproduction Update**. v. 13, n. 3, p. 313-327, 2007.

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.; STOUT, T. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reproduction in Domestic Animals**. v.38, n.4, p.305-311, 2003.

CORZETT, M.; MAZRIMAS, J.; BALHORN, R. Protamine1: Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. **Molecular Reproduction and Development**. v. 61, p. 519-527, 2002.

DADOUNE, J. The nuclear status of human sperm cells. **Micron**. v.26, n. 4, p. 323-345, 1995.

DARSZON, A. et al. Calcium channels in the development, Maturation, and function of spermatozoa. **Physiological Reviews**. v. 91, n. 4, p. 1305-1355, 2011.

DAS, P. et al. Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. **Theriogenology**. v. 74, p. 1099-1106, 2010.

DAS, P. et al. Stallion sperm transcriptome comprises functionally coherent coding and regulatory RNAs as revealed by microarray analysis and RNA-seq. **PLOS ONE**. v. 8, n. 2, p. 1-15, 2013.

DEPA-MARTYNOW, M. et al. Impact of protamine transcripts and their proteins on the quality and fertilization ability of sperm and the development of preimplantation embryos. **Reproductive Biology**. v. 12, n.1, p. 57-72, 2011.

FUENTES-MASCORRO, G.; SERRANO, H.; ROSADO, A. Sperm chromatin. **Archives of Andrology**, v. 45, p. 215-225, 2000.

GANGULY, I. et al. Differential expression of protamine 1 and 2 genes in mature spermatozoa of normal and motility impaired sêmen producing crossbred Frieswal (HF Sahiwal) bulls. **Research in Veterinary Science**. v. 94, p. 256-262, 2013.

GARRIDO, N. et al. Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. **Fertility and Sterility**. v. 91, n.4, p.1307-1310, 2009.

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.

GOTTSCHALK, M. et al. Genome-wide association study for semen quality traits in German Warmblood stallions. **Animal Reproduction Science**. v. 171, p. 81-86, 2016.

GOVINDARAJU, A. et al. Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, p. 1-10, 2012.

GUR, Y.; BREITBART, H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. **Genes and Development**. v. 20, p. 411-416, 2006.

HAMANN, H. et al. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. **Animal Genetics**. v. 38, p. 259-264, 2007.

HAMATANI, T. Human spermatozoal RNAs. **Fertility and Sterility**. v. 97, n.2, p.275-281, 2012.

HOSKEN, D.; HODGSON, D. Why do sperm carry RNA? Relatedness, conflict, and control. **Trends in Ecology and Evolution**. v.29, n. 8, p. 451-455, 2014.

IBGE. Rebanho de Equinos. 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br> Acesso em: 09/08/2023.

ING, N. et al. Dense spermatozoa in stallion ejaculates contain lower concentrations of mRNAs encoding the sperm specific calcium channel 1, ornithine decarboxylase antizyme 3, aromatase, and estrogen receptor alpha than less dense spermatozoa. **Theriogenology**. v. 82, p. 347-353, 2014.

ING, N. et al. Functional rnas in stallion sperm: potential indicators of sperm quality and contributors to fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 66, p. 31, 2018.

JODAR, M. et al. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. **Human Reproduction Update**. v. 19, n. 6, p. 604-624, 2013.

KEMPSTY, B. et al. Analysis of selected transcript levels in porcine spermatozoa, oocytes, zygotes and two-cell stage embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 513-518, 2008.

KIRICHOK, Y.; NAVARRO, B.; CLAPHAM, D. Whole-cell patch clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca channel. **Nature**. v. 439, n. 9, p. 737-740, 2006.

KRAWETZ, S. et al. A survey of small RNAs in human sperm. **Human Reproduction**. v. 26, n.12, p. 3401-3412, 2011.

LEE, T. et al. RNA Expression in male germ cells during spermatogenesis (male germ cell transcriptome). In: ZINI, A. AGARWAL, A. **Sperm Chromatin**. London: Springer, 2011. p. 107-121.

LEEMANS, B. et al. Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species? **Reproduction**. v. 157, p. R181-197, 2019.

LISHKO, P. et al. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. **Annual Review of Physiology**. v. 74, p. 453-475, 2012.

- LOUX, S. et al. Catsper and the relationship of hyperactivated motility to intracellular calcium and pH kinetics in equine sperm. **Biology of Reproduction**. v. 89, n. 5, p 1-15, 2013.
- LOUX, S. et al. The CatSper ion channel and hyperactivated motility of horse spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 121S, p. S180, 2010.
- LOUX, S. **Hyperactivated motility of stallion spermatozoa**. 2013. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Texas A&M University, Texas, 2013.
- LOVE, C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**. v.76, p. 547-557, 2011.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio Caval**. Brasília/DF, 2016. 56p.
- MILLER, D. et al. A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. **Gene**. v. 237, p. 385-392, 1999.
- MILLER, D.; OSTERMEIER, C.; KRAWETZ, S. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. **Molecular Medicine**. v. 11, n. 4, p. 156-163, 2005.
- NIKPOOR, P. et al. CatSper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility. **Human Reproduction**, v. 19, n. 1, p. 124-128, 2004.
- NISHIMURA, R.; DODE, M. RNAs de espermatozoide: qual a sua função fisiológica? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 38, n. 1, p. 32-36, 2004.
- OSTERMEIER, C. et al. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. **Lancet**. v. 360, p. 772-777, 2002.
- OSTERMEIER, C. et al. Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**. v. 429, p. 154, 2004.
- OSTERMEIER, C. et al. A suite of novel human spermatozoal RNAs. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 1, p. 70-74, 2005.
- PARADOWSKA-DOGAN, A. et al. Protamine mRNA ratio in stallion spermatozoa correlates with mare fecundity. **Andrology**. v.2, p. 521-530, 2014.
- QI, H. et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 104, n. 4, p. 1219-1223, 2007.
- REN, D. et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. **Nature**. v. 413, p. 604-609, 2001.

REN, D.; XIA, J. Calcium signaling through catsper channels in mammalian fertilization. **Physiology**, v. 25, p. 165-175, 2010.

ROSER, J. Diagnostics and therapeutics for stallions with declining fertility: an endocrine–paracrine–autocrine approach. In: MCKINNON, A. et al. **Equine Reproduction**. 2.ed. West Sussex: Wiley-Blackwell. 2011. P. 1435-1447.

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis: an overview. In: ZINI, A. AGARWAL, A. **Sperm Chromatin**. London: Springer, 2011. p. 19-44.

SIEME, H.; DISTL, O. Genomics and fertility in stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 32, p. 467-470, 2012.

SQUIRES, E. Changes in equine reproduction: have they been good or bad for the horse industry? **Journal of Equine Veterinary Science**. v.29, p. 268-273, 2009.

STEGER, K. et al. Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. **Molecular Human Reproduction**. v. 9, n. 6, p. 331-336, 2003.

STEGER, K. et al. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. **Human Reproduction**. v. 23, n. 1, p.11-16, 2008.

SULIMAN, Y.; BECKER, F.; WIMMERS, K. Implication of transcriptome profiling of spermatozoa for stallion fertility. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 30, p. 1087-1098, 2018.

SUN, X. et al. The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 15, n. 1, p. 1-12, 2017.

TORRES-FLORES, V. et al. Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. **Human Reproduction**, v.26, n.10, p. 2626-2635, 2011.

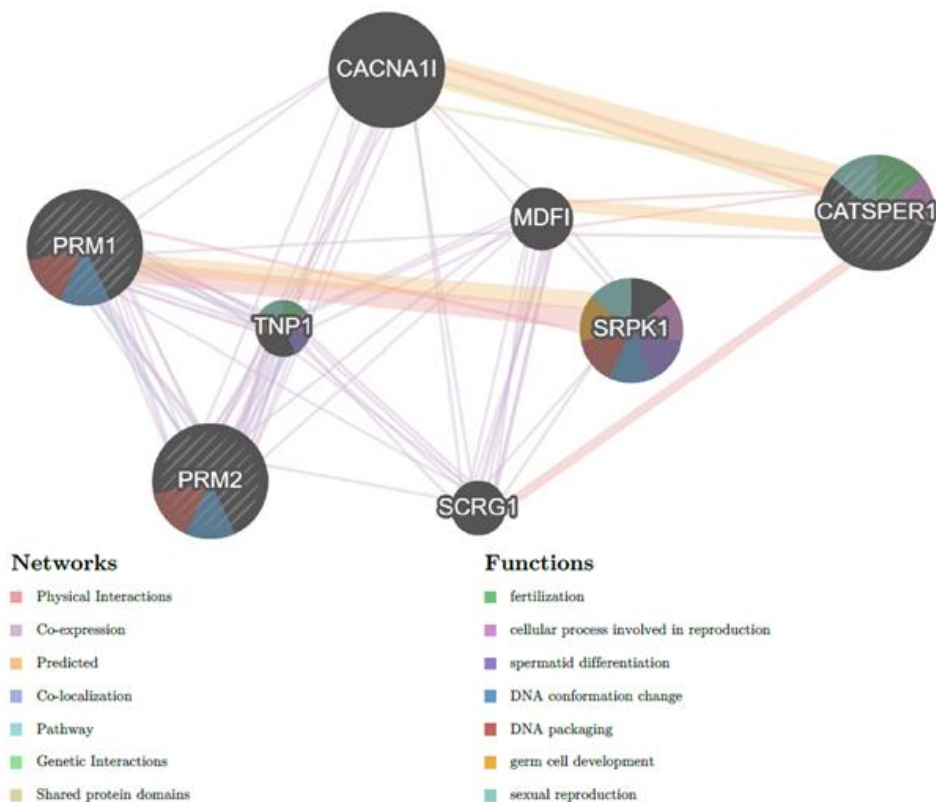
VARNER, D.; JOHNSON, L. From a sperm's eye view: revisiting our perception of this intriguing cell. In: MCKINNON, A. et al. **Equine Reproduction**. 2.ed. West Sussex: Wiley-Blackwell. 2011. p. 909-990.

VOSS, L.; PICKETT, W.; SQUIRES, E. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 178, p. 287–289, 1981.

ZHANG, X.; GABRIEL, M.; ZINI, A. Sperm Nuclear Histone to Protamine Ratio in Fertile and Infertile Men: Evidence of Heterogeneous Subpopulations of Spermatozoa in the Ejaculate. **Journal of Andrology**. v. 27, n. 3, p. 414-420, 2006.

APÊNDICE I – FIGURA DAS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES ENTRE OS GENES ESTUDADOS

A figura abaixo mostra a rede de interação entre os cinco principais genes que exibem as maiores correlações com os genes alvo - PRM1 (protamine 1), PRM2 (protamine 2) e CATSPER1 (cation channel sperm associated 1). Cada círculo representa um gene. O tamanho do círculo representa a força das interações. As cores do círculo representam possíveis funções do gene. As linhas de conexão entre os círculos representam a interação entre os genes e a cor da linha representa os tipos de interação. Os cinco genes que apresentaram as maiores correlações com os genes alvo foram: CACNA11 (calcium voltage-gated channel subunit alpha1 I); SRPK1 (SRSF protein kinase 1); MDFI (MyoD family inhibitor); TNP1 (transition protein 1); SCRG1 (stimulator of chondrogenesis 1).



Fonte: <https://genemania.org>