



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES PRM-1, TNP-2, 17 β -HSD3, LHR, MHC-I,
MIC-B, NC1 E NC3 NA ESPERMATOGÊNESE BOVINA**

Mestranda: Daniele Rosa Xavier

SÃO LUÍS-MA
2016

DANIELE ROSA XAVIER

**PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES PRM-1, TNP-2, 17 β -HSD3, LHR, MHC-I,
MIC-B, NC1 E NC3 NA ESPERMATOGÊNESE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Curso: Mestrado em Ciência Animal

Área de Concentração: Sanidade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta - UEMA

SÃO LUÍS – MA

2016

DANIELE ROSA XAVIER

**PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES PRM-1, TNP-2, 17 β -HSD3, LHR, MHC-I,
MIC-B, NC1 E NC3 NA ESPERMATOGÊNESE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual do Maranhão, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Alcina Vieira de Carvalho Neta, Dsc - UEMA
(Orientadora)

Profa. Ana Lúcia Abreu Silva, Dsc - UEMA
(1º Membro)

Prof. Auricélio Alves de Macedo, Dsc - UEMA
(2º Membro)

*A todos que contribuíram para sua realização e
especialmente à minha família.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha família, pela força e amparo.

À minha orientadora profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta, pelos conhecimentos transmitidos e por ter auxiliado em minha formação profissional e pessoal.

À equipe e amigos do Laboratório de Patologia Molecular, Larissa Sarmiento dos Santos, Taynan Dulce da Silva Rosa, Ellainy Maria C. Silva, Mayra da Silva Oliveira, Auricélio Macedo e Rayule Cristina de Ribeiro Lopes pelo auxílio na execução deste projeto e pela força.

Aos meus amigos da turma de Mestrado em Ciência Animal 2015, especialmente Karina Silva Cordeiro e Lorena Stephanie Freitas Souto pelo apoio e momentos de diversão.

Aos amigos do Ministério Universidades Renovadas, do Grupo de Partilha de Profissionais (GPP Felicidade de Sião) e Grupo de Profissionais do Reino (GPR Imaculado Coração de Maria) pelas orações e palavras de incentivo.

Ao professor Paulo de Vasconcelos Brito, à profa. Dra. Maria do Socorro Costa Oliveira Braga e à Francisca Silva Araújo pelo apoio no momento que mais precisei e por acreditarem em mim.

Aos amigos Aline Saldanha, Cícero Soares, Alessandra Lima, Flávio Almeida, Luciana Veloso, Danila Ferreira, Sr. Francisco e Samaria Maria pelo apoio durante esses dois anos.

A todos aqueles que confiaram em meu trabalho e que contribuíram para que ele fosse concluído.

À CAPES pela concessão da bolsa de Pós-Graduação.

*“O anjo disse-lhe: Não temas, Maria, pois
encontraste graça diante de Deus”.*

(Lc 1, 30)

RESUMO

A espermatogênese consiste em um processo de modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas complexas que ocorrem nos testículos, baseado em uma série de divisões (mitóticas e meióticas), que resultam na formação de espermatozoides nos túbulos seminíferos. Qualquer alteração ao longo desse processo pode determinar distúrbios reprodutivos variados que determinam subfertilidade até a infertilidade. O objetivo desta pesquisa foi analisar a expressão dos genes Protamina tipo 1 (PRM-1), Proteína de Transição Nuclear do tipo 2 (TNP-2), enzima 17 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase tipo 3 (17 β -HSD3), Receptor do Hormônio Luteinizante (LHR), Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe I (MHC-I), MIC-B, NC1 e NC3 na espermatogênese de bovinos, correlacionando os resultados ao nível de maturação histológica do epitélio seminífero. Foram utilizados testículos de 36 bovinos, sem padrão racial e independente da idade. À luz do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em bovinos que utiliza os critérios de Johnsen para correlacionar os escores médios à expressão diferencial dos genes envolvidos no processo de espermatogênese. O RNA extraído do parênquima testicular foi submetido ao RT-PCR em tempo real, sendo os genes (PRM-1, TNP-2, 17 β -HSD3, LHR, MHC-I, MIC-B, NC1, NC3) avaliados com base na análise histológica. Constatou-se que os indivíduos avaliados pertenciam aos escores médios: seis, sete e oito, e que não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) nos escores da espermatogênese entre os testículos direito e esquerdo de cada animal. Os resultados obtidos da análise do qRT-PCR demonstraram que todos os genes avaliados foram expressos no testículo bovino nos diferentes escores estudados, embora a magnitude de expressão de cada gene tenha sido extremamente variável dentro do mesmo escore e somente para alguns genes quando comparados entre os escores. Houve diferença estatística significativa ($p<0,05$) para a expressão do gene TNP-2 quando comparados os níveis de expressão entre os escores sete e oito, assim como para o gene 17 β -HSD3, quando comparados os escores seis e oito. O gene PRM-1 foi o mais expresso nos três escores encontrados, no entanto, não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) quando comparado entre eles. Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) na expressão dos genes MHC-I genérico e o MHC-Ib (MIC-B, NC1 e NC3) quando comparada as médias dos três escores avaliados, podendo-se sugerir que estas moléculas tem ação indireta na espermatogênese bovina. Houve correlação positiva significativa ($p<0,05$) entre os níveis de transcrição dos genes 17 β -HSD3 e LHR, assim como entre PRM-1 e TNP-2, no escore oito. A partir dos resultados obtidos foi possível observar que a avaliação histopatológica do testículo bovino aliada a técnicas moleculares são importantes na qualificação da espermatogênese, podendo auxiliar no prognóstico de animais com produção espermática normal a anormal; os genes MHC-I genérico, MHC-Ib e LHR foram pouco expressos, sugerindo que estas moléculas atuam indiretamente na espermatogênese; os níveis de transcrição dos genes PRM-1, TNP-2 e 17 β -HSD3 foram relativamente altos, demonstrando que os animais apresentavam boa espermatogênese; os genes PRM-1, TNP-2, 17 β -HSD3 e LHR atuam diretamente no desenvolvimento diferencial das células germinativas durante a espermatogênese e que alterações durante o processo transcricional podem interferir na capacidade reprodutiva dos machos.

Palavras-chave: bovino, espermatogênese, MHC-I, PRM-1, qPCR, TNP-2.

ABSTRACT

The spermatogenesis consists of a number of divisions (mitotic and meiotic) and morphological, physiological and biochemical complex, resulting in the formation of sperm cells in the seminiferous tubules, and any changes in the process can lead to reproductive disorders such as infertility. The objective of this research was to analyze the expression of genes protamine type 1 (PRM-1), transition protein nuclear type 2 (TNP-2), 17 β -hydroxysteroid enzyme dehydrogenase type 3 (17 β HSD-3), luteinizing hormone receptor (LHR), Major Histocompatibility Complex class I (MHC-I), MIC-B, NC1 and NC3 spermatogenesis cattle, correlating the results to histological maturation level of the seminiferous epithelium. Testis of 36 cattles without racial standard and independent of age were used. In the light of our knowledge, this is the first study in cattle using the criteria of Johnsen to correlate the average scores for differential expression of genes involved in spermatogenesis process. The RNA extracted from the testicular parenchyma was subjected to RT-PCR in real time, and genes (PRM-1, TNP-2, 17 β -HSD3, LHR, MHC-Ib, MIC-B, NC1, NC3) evaluated based on histological analysis. It was found that the evaluated individuals belonged to the mean scores: six, seven and eight, and that there was no significant statistical difference ($p>0.05$) in the spermatogenesis scores between the right and left testicles of each animal. The results obtained from the qRT-PCR analysis demonstrated that all the evaluated genes were expressed in the bovine testis in the different scores studied, although the magnitude of expression of each gene was extremely variable within the same score and only for some genes when compared between the scores. There was a significant statistical difference ($p<0.05$) for TNP-2 gene expression when comparing the levels of expression between scores seven and eight, as well as for the 17 β -HSD3 gene, when scores six and eight were compared. The PRM-1 gene was the most expressed in the three scores found, however, there was no statistically significant difference ($p>0.05$) when compared between them. There was no statistically significant difference ($p>0.05$) in the expression of the generic MHC-I and MHC-Ib genes (MIC-B, NC1 and NC3) when compared to the means of the three evaluated scores, suggesting that these molecules have an indirect effect on bovine spermatogenesis. There was a significant ($p<0.05$) positive correlation between the transcription levels of the 17 β -HSD3 and LHR genes, as well as between PRM-1 and TNP-2 in score eight. From the obtained results it was possible to observe that the histopathological evaluation of the bovine testis allied to molecular techniques are important in the qualification of the spermatogenesis, being able to aid in the prognosis of animals with normal to abnormal sperm production; the generic MHC-I, MHC-Ib and LHR genes were poorly expressed, suggesting that these molecules act indirectly on spermatogenesis; the transcription levels of PRM-1, TNP-2 and 17 β -HSD3 genes were relatively high, demonstrating that the animals had good spermatogenesis; the genes PRM-1, TNP-2, 17 β -HSD3 and LHR act directly on the differential development of germ cells during spermatogenesis and that changes during the transcriptional process may interfere with the reproductive capacity of males.

Keywords: bovine, spermatogenesis, MHC-I, PRM-1, qPCR, TNP-2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento da espermatogênese.	16
Figura 2. Controle da expressão dos genes PRM e TNP durante a espermatogênese.....	18
Figura 3. Rebanho bovino em período de descanso e dieta hídrica.	25
Figura 4. Testículo bovino após antissepsia. A. Corte transversal do testículo bovino. B. Retirada de fragmentos para análise histológica.	26
Figura 5. Fotomicrografia representativa de um testículo bovino utilizado no estudo. A. Túbulos seminíferos (1) e espaço intersticial contendo células de Leydig (2) (10x). B. Túbulo seminífero apresentando espermatogônias (3), espermatócitos primário (4), espermátides arredondadas (5) e espermátides alongadas (6). HE (40x).....	31
Figura 6. Comparação dos escores médios de bovinos dos testículos direitos e esquerdos. Colunas representam a média aritmética (n=36) e erro padrão.	32
Figura 7. Expressão dos genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I clássico (MHC-I genérico), MHC classe I não clássico (MIC-B, NC1 e NC3), Receptor de Hormônio Luteinizante (LHR), Enzima 17 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase tipo III (17 β -HSD3), Protamina tipo 1 (PRM-1) e Proteína de Transição Nuclear tipo 2 (TNP-2) nas 36 amostras testiculares analisadas. Colunas representam média aritmética (n=36) e erro padrão.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de avaliação espermática segundo a pontuação de Johnsen.	27
Tabela 2. Sequências dos <i>primers</i> para amplificação do mRNA dos genes envolvidos na espermatogênese bovina e normalizadores GAPDH e β -actina, tamanho do produto pB para as reações de RT-PCR em tempo real.	29
Tabela 3. Frequência do escore médio das amostras testiculares de bovinos obtidos em matadouro comercial, São Luís-MA, Brasil.	32
Tabela 4. Correlação entre os níveis de transcrição dos genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I clássico (MHC-I genérico), MHC classe I não clássico (MIC-B, NC1 e NC3), Receptor de Hormônio Luteinizante (LHR), Enzima 17 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase tipo III (17 β -HSD3), Protamina tipo 1 (PRM-1) e Proteína de Transição Nuclear tipo 2 (TNP-2) nos três escores estudados (valores de r).	34
Tabela 5. Correlação entre os níveis de transcrição dos genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I clássico (MHC-I genérico), MHC classe I não clássico (MIC-B, NC1 e NC3), Receptor de Hormônio Luteinizante (LHR), Enzima 17 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase tipo III (17 β -HSD3), Protamina tipo 1 (PRM-1) e Proteína de Transição Nuclear tipo 2 (TNP-2) em parênquima testicular bovino, nos escores 6, 7 e 8.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

17 β -HSD3: enzima 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo III

ABIEC: Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne

BoLA: Antígeno Leucocitário Bovino

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

CCS: Contagem de Células Somáticas

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

HE: Hematoxilina-Eosina

HLA: Antígeno Leucocitário Humano

HLA-G: Antígeno Leucocitário Humano grupo G

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LH: Hormônio Luteinizante

LHR: Receptor do Hormônio Luteinizante

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal

MHC-Ia: Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe I clássica

MHC-Ib: Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe I não clássicas

MHC-II: Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II

NK: Natural Killer

PRMs: Protaminas

PRM-1: Protamina do tipo 1

PRM-2: Protamina do tipo 2

PT: Proteína de Transição

qRT-PCR: PCR quantitativa em Tempo Real

Th1: células T auxiliares tipo 1

Th2: células T auxiliares tipo 2

TNPs: Proteínas de Transição Nuclear

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Bovinocultura.....	14
2.2. Espermatogênese.....	14
2.2.1. Controle neuroendócrino da espermatogênese	16
2.2.2. Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC)	19
2.2.2.1. Complexo de Histocompatibilidade Principal em bovinos	20
3. OBJETIVOS	24
3.1. Geral.....	24
3.2. Específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Colheita de amostras	25
4.2. Análise histopatológica.....	26
4.2.1. Avaliação da espermatogênese	27
4.3. Análise molecular.....	28
4.3.1. Extração de RNA.....	28
4.3.2. Síntese de cDNA.....	28
4.3.3. PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR).....	29
5. RESULTADOS	31
5.1. Análise histopatológica e da espermatogênese do testículo bovino	31
5.2. Expressão gênica de MHC-I genérico, MIC-B, NC1, NC3, LHR, 17β-HSD3, PRM-1 E TNP-2 no parênquima testicular bovino	32
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2014, o efetivo do rebanho bovino brasileiro totalizava 212.343.932 cabeças, sendo no estado do Maranhão, 7.758.352 cabeças.

Segundo Leite, Moraes e Pimentel (2001) taxas reprodutivas deficientes podem promover prejuízos econômicos na propriedade rural, devido ao maior intervalo entre partos e, conseqüentemente menor produção de leite e de bezerros, despesas com manutenção de fêmeas secas, alta taxa de descarte e de doses de sêmen/concepção.

O testículo é um importante órgão do sistema reprodutivo, onde complexas divisões mitóticas e meióticas, além de modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas resultam na formação de espermatozoides posteriormente observados no interior dos túbulos seminíferos, processo este denominado de espermatogênese (JOHNSON et al., 2000; GAO et al., 2014).

Essas transformações sincronizadas que promovem a multiplicação e diferenciação das células germinativas dependem da ação de gonadotrofinas: Hormônio Luteinizante (LH), encontrados primariamente nas células de Leydig, assim como em células da linhagem espermatogênicas; e Hormônio Folículo Estimulante (FSH) com receptores restritos às células de Sertoli (GRISWOLD, 1995).

Adicionalmente, a testosterona também possui um importante papel na manutenção da meiose e espermiogênese (COURROT; ORTAVANT, 1981). A importância deste hormônio consiste na participação da enzima 17 β -Hidroxiesteroide Desidrogenase tipo III (17 β -HSD3) que tem a função de converter a androstenediona em testosterona (LACROIX; GARNIER; PELLETIER, 1977). O aumento na circulação de androstenediona, produz redução nos níveis de testosterona e conseqüentemente um “feedback” negativo à secreção de GnRH e redução na liberação de LH (MCCARTHY; CONVEY; HAFS, 1979), promovendo deficiência na produção de espermatozoides e conseqüentemente infertilidade (WALKER, 2008; SHUPE et al., 2011).

Outras proteínas também participam do processo de espermiogênese, são elas as Proteínas de Transição Nuclear (TNPs) e Protaminas (PRMs). As TNPs, principalmente a do tipo 1, estimulam o relaxamento da fita do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) pela ação da enzima topoisomerase I (MEISTRICH et al., 2003) e conseqüentemente facilitam a substituição das histonas por PRMs. Nas espermátides redondas haploides, as PRMs se ligam

no sulco menor da fita do DNA, promovendo a neutralização dos grupos fosfato da cadeia de DNA, determinando na condensação da cromatina (SOUZA, 2014). Assim, as PRMs têm alta capacidade de compactação da cromatina, garantindo integridade do genoma paterno e proteção contra ação de nucleases e agentes mutagênicos durante o transporte do espermatozoide no trato genital feminino e masculino (KUSSLER, 2012), além de conferir estabilidade do núcleo do espermatozoide, devido sua forma pequena e hidrodinâmica, facilitando deslocamento da célula espermática pelo trato feminino (OLIVA, 2006; SHARMA; AGARWAL, 2011).

Os genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) codificam dois tipos de proteínas de superfície celulares, MHC de classe I e II, as quais apresentam antígenos peptídicos específicos para ligação aos linfócitos T (KELLEY; WALTER; TROWSDALE, 2005), sendo que as de classe I são subdivididas em moléculas clássicas (MHC-Ia) e não clássicas (MHC-Ib) (HUNT; ANDREWS; WOOD, 1987; GOGOLIN-EWENS et al., 1989; DONALDSON et al., 1990; DAVIES, 2007). O MHC-Ib possui expressão celular restrita, podendo atuar como ligantes para receptores de leucócitos, incluindo os receptores inibitórios codificados nos complexos da família NK2G de células Natural Killer (NK) (SHIROISH et al., 2003; LEMAOULT et al., 2004; WADA et al., 2004; PARHAM, 2005), no entanto, sua expressão no sistema reprodutivo masculino é pouco estudada em outras espécies.

Sabe-se que em humanos, o Antígeno Leucocitário Humano grupo G (HLA-G) é expresso no espermatozoide (CHIANG et al., 1994), na próstata (LANGAT et al., 2006), em tecidos testiculares e no plasma seminal (LARSEN et al., 2011). Yao et al. (2014) demonstraram que há expressão diferencial de mRNA de HLA-G em tecidos testiculares humanos com diferentes capacidades espermatogênicas e que desempenha um papel importante na regulação da fertilidade masculina. Em animais, o MHC-Ib (Mamu-AG) já foi descrito em tecidos testiculares do Macaco-Rhesus (RYAN et al., 2002).

Este é o primeiro trabalho que relata a expressão dos genes MHC-Ia e -Ib no testículo bovino e sua correlação com a espermatogênese. O objetivo deste estudo foi avaliar a espermatogênese no parênquima testicular bovino, através da avaliação histológica dos túbulos seminíferos e do nível de maturação do epitélio germinativo de acordo com a pontuação de Johnsen (1970), correlacionando estes resultados à expressão de genes com ação direta na atividade espermatogênica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Bovinocultura

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), estima-se que o efetivo bovino brasileiro no ano de 2016 totalizava 216.926.500 cabeças, sendo a quantidade de animais abatidos de 21.264.482, aproximadamente (CONAB, 2016). O valor bruto da produção de carne e leite, estimado em R\$ 67 bilhões, aliado a presença da atividade em todos os estados brasileiros, demonstram a importância econômica e social da bovinocultura no país (MAPA, 2016). Em 2014, o efetivo bovino no estado do Maranhão era de aproximadamente 7.758.352 cabeças (IBGE, 2014) e a quantidade de bovinos abatidos em 2016 foi de 371.973 (MAPA, 2016).

As dimensões territoriais do Brasil colaboram para esse resultado, uma vez que favorecem a criação da maioria do gado em pastagens. Fatores como: o investimento em tecnologia e capacitação profissional; o desenvolvimento de políticas públicas, que permitam que o animal seja rastreado do seu nascimento até o abate; o controle da sanidade animal e segurança alimentar contribuíram para que o país atendesse às exigências dos mercados rigorosos e conquistasse espaço no cenário mundial (ABIEC, 2016).

Segundo Leite, Moraes e Pimentel (2001) taxas reprodutivas deficientes podem promover prejuízos econômicos na propriedade rural, devido ao maior intervalo entre partos e, conseqüentemente menor produção de leite e de bezerros, despesas com manutenção de fêmeas secas, alta taxa de descarte e de doses de sêmen/concepção.

2.2. Espermatogênese

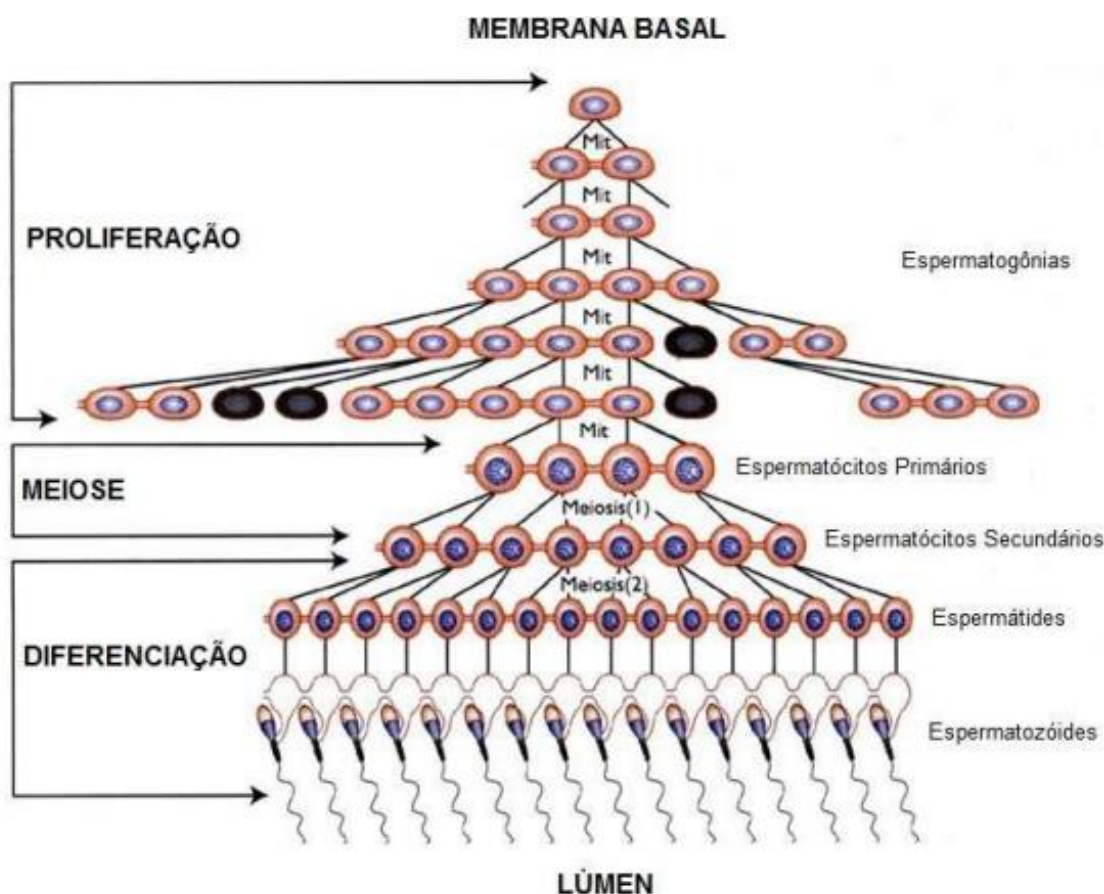
A espermatogênese consiste em um processo de modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas complexas que ocorrem nos testículos, baseado em uma série de divisões (mitóticas e meióticas), que resultam na formação de espermatozoides nos túbulos seminíferos (COUROT; HOCHEREAU-de RIVIERES; ORTAVANT, 1970; ORTAVANT, 1977; JOHNSON et al., 2000; GAO et al., 2014), onde um inadequado desenvolvimento diferencial das células germinativas interfere na capacidade reprodutiva (OLIVEIRA-COELHO, 2007), determinando em uma subfertilidade até a infertilidade.

O epitélio seminífero é composto de células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos e espermatídes, que arranjadas ordenadamente em estádios, formam ciclos nas

secções transversais do túbulo seminífero (ANDREUSSI, 2013), sendo assim, o conhecimento destes ciclos pode ser útil em técnicas para quantificação da espermatogênese e coordenação das ondas do epitélio (BERNDTSON, 1977). Estas transformações iniciam no compartimento basal, onde há divisão e proliferação das espermatogônias até espermatócitos primários pré-leptóteno, e posterior migração pelo compartimento adluminal, no qual há continuação da fase meiótica após migração dos espermatócitos primários e espermiogênese (RUSSELL; PETERSON, 1984; ANDREUSSI, 2013). A divisão do epitélio germinativo em dois compartimentos é feita por uma barreira hematotesticular formada por junções entre as células de Sertoli adjacentes (ANDREUSSI, 2013) que confere um microambiente privilegiado às células germinativas contra exposição ao sistema imunológico durante o processo de migração celular na porção adluminal (WONG et al., 2005; YAN; CHENG, 2005). Além disso, estudos em ratos descreveram que as células de Sertoli são responsáveis pela produção local de citocinas imunossupressoras e fatores proapoptóticos (células T auxiliares, Th1 e Th2, Galectin 1, entre outras) que controlam a formação excessiva de espermatócitos em pré-leptóteno, além de atuarem na eliminação de células defeituosas (DETIN et al., 2003). Pesquisas de Setchell (2008) também relatam a possibilidade de atuação das células endoteliais e peritubulares na restrição da entrada de substâncias nos testículos, como hormônios peptídeos como Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), vitamina A, entre outras.

Nos mamíferos, a espermatogênese consiste em três fases distintas: (a) Mitótica ou espermatogonial: os gonócitos ou espermatogônias tronco sofrem divisões mitóticas até a formação dos espermatócitos primários; (b) Meiótica ou espermatocitária: os espermatócitos sofrem divisões reducionais resultando na formação de espermátides; (c) Espermiogênese ou de diferenciação: ocorrem alterações morfológicas e funcionais das espermátides até sua liberação para o lúmen do túbulo seminífero, quando passam a ser espermatozoides (CURTIS; AMANN, 1981; GRIFFIN, 1988; RUSSELL; FRANÇA, 1995) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento da espermatogênese.



Fonte: Ferraz (2011) adaptado de Senger (2002).

Em bovinos, a espermatogênese tem duração de 61 dias e seu desenvolvimento normal depende da interação de fatores nutricionais, genéticos e ambientais (luminosidade, temperatura e estresse) (COSTA MELLO et al., 2016).

2.2.1. Controle neuroendócrino da espermatogênese

O sistema reprodutivo nos machos é formado por dois testículos, dois epidídimos, dois ductos deferentes, glândulas sexuais acessórias e o pênis, sendo que o testículo é um dos órgãos mais importantes deste sistema e possui duas funções primordiais: (a) produção de espermatozoides nos túbulos seminíferos e (b) secreção de esteroides pelas células de Leydig (MURTA; GOMES; MARTINEZ, 2013), que dependem da ação de duas gonadotrofinas, LH e FSH (AMANN; SCHANBACHER, 1983).

O controle endócrino da espermatogênese depende da atividade do eixo hipotâmico-hipofisário-testicular, onde o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) estimula a adeno-hipófise a liberar o LH e FSH (ROSER, 2001), que por sua vez irão estimular a produção de esteroides gonadais e desenvolvimento das células germinativas (GRISWOLD, 1995). Os receptores do hormônio LH (LHR) tem como função estimular a esteroidogênese (COONCE et al., 2009) e atuar no desenvolvimento e manutenção da espermatogênese e das características sexuais masculinas (O'DONNELL et al., 2001), sendo crucial para a fertilidade em mamíferos, e sua expressão ocorre nas células de Leydig (GRISWOLD, 1995; COONCE et al., 2009), sendo também relatados em espermatogônias e espermátides de ratos (HÄMÄLÄINEN; POUTANEN; HUHTANIEMI, 2001) e no espermatozóide humano (EBLEN et al., 2001); em relação ao hormônio FSH sabe-se que a expressão de seus receptores se restringe às células de Sertoli (GRISWOLD, 1995).

Em bovinos, a habilidade das células de Leydig em responder ao estímulo do LH tem início na puberdade (BOOCKFOR; BARNES; DICKEY, 1983), com produção de crescentes quantidades de testosterona, que atuam no controle da diferenciação das células de Sertoli e consequentemente no crescimento das células germinativas (GRIFFIN, 1988). Qualquer alteração ou interrupção ocorrida durante o processo espermatogênico pode causar modificações no padrão normal do desenvolvimento celular e na capacidade reprodutiva dos animais (SHARPE et al., 2003).

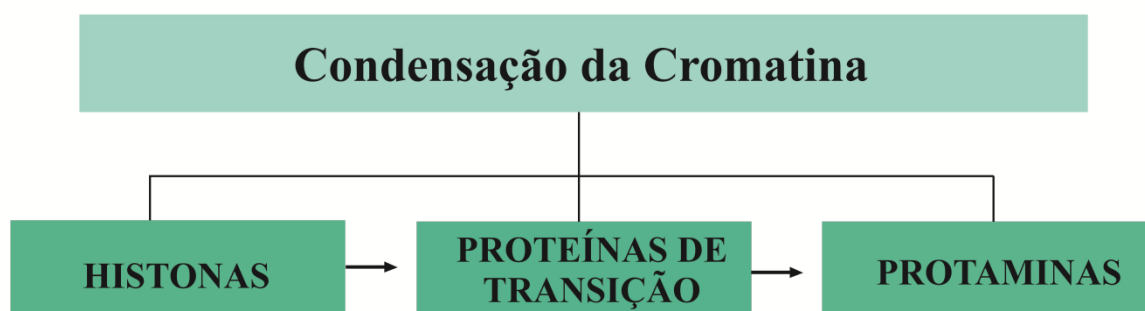
Assim, a ausência do esteróide testosterona causa deficiência na produção de espermatozoides e consequentemente infertilidade (WALKER, 2008; SHUPE et al., 2011) e sua depleção, falha na espermição em ratos e humanos (HAYWOOD et al., 2003; CHANG et al., 2004). Algumas transformações são necessárias para que a célula de Leydig responda ao LH sintetizando preferivelmente testosterona em altas concentrações como o incremento da prolactina em detrimento da androstenediona, devido ao aumento da atividade da 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase III (17 β -HSD3), enzima que converte androstenediona em testosterona (LACROIX; GARNIER; PELLETIER, 1977).

Adicionalmente, a testosterona também possui um importante papel na manutenção da meiose e espermiogênese (COURROT; ORTAVANT, 1981). Uma das enzimas que participam na conversão da androstenediona em testosterona é a 17 β -Hidroxiesteroide Desidrogenase tipo III (17 β -HSD3) (LACROIX; GARNIER; PELLETIER, 1977). Estudos de Luu-The, Belanger e Labrie (2008) identificaram 15 tipos de 17 β -HSD em vertebrados, sendo a sua maioria pertencente à família desidrogenase/reductase de cadeia curta. Em homens, a perda da

isoforma 17 β -HSD3 é responsável pela falha na masculinização durante o desenvolvimento (GEISSLER et al., 1994; ANDERSSON et al., 1996). O eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular apresenta um mecanismo de “feedback negativo” da testosterona sobre o GnRH hipotalâmico, quando há um aumento na circulação de androstenediona, promovendo a regulação da secreção das gonadotrofinas, com redução da frequência e pulsos de LH e FSH pela adenohipófise (SOUZA, 2004). Distúrbios nesse mecanismo regulatório, causados por estresse crônico, idade e espécie animal, podem desencadear em uma deficiência na produção de espermatozoides e consequentemente infertilidade masculina (MARIC; KOSTIC; KOVACEVIC, 1996; WALKER, 2008; SHUPE et al., 2011).

Durante a espermiogênese, a cromatina dos espermatozoides sofre várias modificações, entre elas a hiperacetilação das histonas (remodelação do DNA espermático) para facilitar a desmontagem do nucleossoma pela ação das Proteínas de Transição (PTs), ricas em arginina e lisina (OLIVA, 2006) que são codificadas por cópias únicas dos genes TNP-1 (função de desestabilizar o DNA) e TNP-2 (intimamente ligado aos dois genes da protamina) (SAILER; JOST; EVENSON, 1995). Ao final deste processo, as PTs são substituídas pelas protaminas (em maior quantidade no espermatozoide) (KUSSLER, 2012) (Figura 2).

Figura 2. Controle da expressão dos genes PRM e TNP durante a espermatogênese.



O processo de protaminação produz uma alta compactação cromatínica, a fim de proteger a integridade do genoma paterno da ação de nucleases e agentes mutagênicos durante o transporte dos espermatozoides no trato genital masculino e feminino, além de facilitar o transporte da célula espermática pelo aparelho genital da fêmea (OLIVA, 2006; SHARMA; AGARWAL, 2011). A família das protaminas do tipo 1 (PRM-1) já foi estudada em todas as espécies animais (vertebrados) e a do tipo 2 (PRM-2) estão presentes em alguns mamíferos

como camundongos e humanos (OLIVA, 2006; BALHORN, 2007; VRIES et al., 2012) e em bovinos sua expressão é considerada baixa (FERRAZ et al., 2013). As PRM são expressas nas espermatídes arredondadas (STEGER et al., 1998, 2000, 2002; AOKI; LIU; CARRELL, 2005). Segundo Steger (1999), a transcrição e conversão do mRNA das PRMs são temporalmente suspensas na espermatíde em alongamento. Este fato pode contribuir para a não transcrição da proteína durante a espermiogênese (LEE et al., 1995; STEGER, 1999; KLEENE, 2003) e alterações em sua expressão têm sido associadas à infertilidade masculina (CHEVAILLIER et al., 1987; AOKI; CARRELL, 2003; AOKI; LIU; CARRELL, 2005; AOKI et al., 2005, 2006; RAVEL et al., 2007). Assim, uma baixa expressão deste gene pode indicar um baixo índice de fertilidade em bovinos (PEDDINTI et al., 2008; FEUGANG et al., 2010).

2.2.2. Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC)

Os genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) codificam dois tipos de proteínas de superfície celulares extremamente polimórficas, as quais apresentam antígenos peptídicos específicos para ligação aos linfócitos T: MHC de classe I, expresso na superfície das células nucleadas e faz apresentação dos antígenos peptídeos endógenos digeridos no citosol às células T citotóxicas (CD8+); e MHC de classe II, expresso principalmente nas células apresentadoras de antígenos e apresenta os antígenos exógenos processados às células T auxiliares (CD4+) (KELLEY; WALTER; TROWSDALE, 2005).

Existem dois grupos de MHC de classe I, clássicos (MHC-Ia) e não clássicos (MHC-Ib). As moléculas clássicas são expressas na maioria das células somáticas e apresentam peptídeos derivados do próprio animal ou de proteínas de patógenos intracelulares para linfócitos T citotóxicos. Em algumas espécies de mamíferos, células trofoblásticas não expressam moléculas clássicas nos primeiros meses de gestação (HUNT; ANDREWS; WOOD, 1987; GOGOLIN-EWENS et al., 1989; DONALDSON et al., 1990). Adicionalmente, os genes de MHC-Ib são monomórficos ou oligomórficos e possuem expressão celular restrita (DAVIES, 2007). Além disso, os produtos destes parecem ter diversas funções, dentre elas, atuar como ligantes para receptores de leucócitos, incluindo os receptores inibitórios codificados nos complexos da família NK2G de células natural killer (SHIROISH et al., 2003; LEMAOULT et al., 2004; WADA et al., 2004; PARHAM, 2005).

O MHC humano ou Antígeno Leucocitário Humano (HLA) foi descoberto por Dausset, Payne e Van Rood na década de 50, quando verificaram diferenças entre leucócitos de diferentes indivíduos ao realizarem estudos sorológicos em pacientes transfundidos (LAMM; OLASEN, 1985). O HLA possui aproximadamente 4.000kb de comprimento e localiza-se no braço curto do cromossomo 6 (LAMM; OLASEN, 1985; BELL, 1989; HYLENIUS et al., 2004). Este sistema gênico apresenta três regiões distintas: HLA-I e HLA-II que codificam as proteínas HLA apresentadoras de antígenos para linfócitos T; e HLA-III, que codifica outras proteínas não apresentadoras de antígenos, com ou sem participação na resposta imunológica (FERNANDES et al., 2003).

2.2.2.1. MHC em bovinos

Em bovinos, o MHC é conhecido como Antígeno Leucocitário Bovino (BoLA), presente no braço curto do cromossomo 23 dessa espécie (FRIES et al., 1988; WU et al., 2010) e consiste de vários *locus* fortemente ligados entre si, cujos genes codificam moléculas da superfície celular relacionadas à resposta imunológica (ALIZADEH; KARROW; MALLARD, 2003). A estrutura genética do BoLA foi descrita pela primeira vez por Spooner em 1978 e funcionam de forma análoga à de humanos e de camundongos (AMILLS et al., 1998). O complexo BoLA subdivide-se em três regiões: BoLA-I, importante no processo de destruição de células infectadas por vírus; BoLA-II, com ação na apresentação de antígenos, na regulação da interação entre células imunocompetentes e no início da resposta imunológica; BoLA-III participando do sistema complemento e envolvimento em imunocomplexos, fagocitose, reação inflamatória e citotoxicidade (SINGH et al., 1997).

O MHC de classe I bovino (BoLA-I) possui moléculas clássicas e não clássicas (BABIUK et al., 2007) que desempenham papel importante na regulação da resposta imunológica, por sua atuação na apresentação de antígenos às células T citotóxicas (CD8+) (ZINKERNAGEL; DOHERTY, 1975). Os *loci* não clássicos possuem alelos de 1 a 4: BoLA-NC1, NC2, NC3 e NC4 (DAVIES et al., 2006; BIRCH et al., 2008). O *locus* BoLA-NC1 é oligomórfico ou polimórfico, com cinco alelos e ausência do domínio transmembrana, devido a completa deleção do exon 5; o NC2 e NC3 são monomórficos e expressos em altas concentrações no trofoblasto; o NC4, igualmente ao *locus* NC1, é oligomórfico, mas é expresso em baixos níveis no trofoblasto (BIRCH et al., 2008).

As proteínas do MHC-Ib são expressas em tecidos específicos e sob condições específicas (BIRCH et al., 2008). Como resultado de um “splicing” alternativo, estas proteínas são produzidas como isoformas transmembranares e solúveis (HUNT et al., 2005), determinando sua natureza segregada ou ligada ao lipídeo de algumas moléculas de classe Ib, tais como HLA-G (HLA-G2) e Qa-2 (HUNT et al., 2006).

Genes relacionados à cadeia do MHC-Ib (MIC-B) foram identificados dentro da região de MHC de um determinado número de espécies de mamíferos, incluindo humanos e outros primatas, suínos e bovinos (BAHRAM et al., 1994). A similaridade de tamanhos de intron e sequência dentro das regiões codificadoras de bovinos MIC-1, MIC-2, MIC-3, MIC-4 e sua proximidade, sugerem que estes podem ter surgido por duplicação de um gene ancestral (BIRCH et al., 2008). Esses genes codificam glicoproteínas com estrutura de domínio semelhante às moléculas do MHC-I clássico, no entanto, apresentam algumas diferenças: não se associam com microglobulina $\beta 2$, possuem padrão diferente de polimorfismo e não tem uma região de ligação ao peptídeo (HOLMES et al., 2002). Os padrões de expressão também são diferentes, sendo induzidas pelo estresse celular, principalmente em células epiteliais e endoteliais (incluindo tumores), embora a indução da expressão em outros tipos de células também tem sido relatada (COLLINS, 2004).

O MHC de classe II bovino (BoLA-II) é expresso em células especializadas do sistema imunológico, como os linfócitos e foi subdividido em BoLA-IIa e -IIb, com base no mapeamento genético (AMORENA; STONE, 1980; LEVEZIEL; HINES, 1984; VAN EIJK; STEWART-HAYNES; LEWIN, 1992; DAVIES et al., 1997; MOTA, 2003). As sub-regiões BoLA-IIa e BoLA-IIb estão a aproximadamente 15 centímetros de distância, sendo que o segmento BoLA-IIa contém o conjunto de genes DR e DQ (SCOTT; CHOI; BRANDON, 1987). O gene BoLA-DRB3 tem sido amplamente estudado por seu grande polimorfismo (TAKESHIMA; AIDA, 2006; WU et al., 2010), em especial no éxon 2 (BoLA-DRB3.2) por possuir associação com a contagem de células somáticas (CCS) (SHARIF et al., 1998) e alguns aspectos produtivos (NASCIMENTO et al., 2006). Já a sub-região BoLA-IIb inclui os genes DMA, DMB, LMP2, LMP7 e TAP moléculas que estão envolvidas no processamento, transporte e carregamento de peptídeos antigênicos. (LEWIN, 1996; DAVIES et al., 1997).

A região BoLA-III é constituída por um conjunto heterogêneo de genes relacionados com a Imunologia, tais como fatores do complemento C4 e BF, esteroide 21-hidroxilase (CYP21), proteína de choque térmico 70 (HSP70) e o fator de necrose tumoral (TNF α e TNF β) que não são considerados parte do MHC (ANTCZAK et al., 1982; LEWIN, 1996).

Quando comparado com as fêmeas, considerando que em bovinos a expressão de antígenos MHC classe I (principalmente não clássicos) nas células trofoblásticas da região intercotiledonária da placenta durante o terceiro trimestre de gestação (DAVIES; FISHER; SCHLAFFER, 2000; DAVIES et al., 2006; SHU et al., 2012; SANTOS et al., 2015) e durante a pré-implantação (NAIB et al., 2011) foi bem analisada, a sua expressão no sistema reprodutivo masculino permanece obscura. Nas fêmeas, acredita-se que essas diferenças na expressão do MHC não possuam efeito adverso na gestação, pelo contrário, são provavelmente benéficos para o estabelecimento da gestação em bovinos (JOOSTEN; SANDERS; HANSEN, 1991). Em tecido testicular bovino, sua expressão nunca fora estudada anteriormente, entretanto, já se sabe que em humanos o HLA-G já foi descrito no espermatozoide (CHIANG et al., 1994), na próstata (LANGAT et al., 2006), em tecidos testiculares e no plasma seminal (LARSEN et al., 2011) e em tecidos testiculares humanos com diferentes capacidades espermatogênicas (YAO et al., 2014); em Macaco-Rhesus, o gene Mamu-AG, homólogo do HLA-G humano, já foi estudado em tecidos testiculares (RYAN et al., 2002).

Estudos de outros autores sugerem que o HLA-G está presente nos tecidos reprodutivos masculinos por dois motivos:

a) Esta molécula já foi detectada em locais imunoprivilegiados, como a placenta e o olho (LE DISCORDE et al., 2003), podendo também ser verificado nos testículos, por estes serem considerados um local imunologicamente privilegiado. Logo, falhas em desencadear respostas imunológicas nestes locais podem estar relacionadas, em parte, devido à presença de citocinas inibitórias, as quais inibem respostas inflamatórias (FIJAK; MEINHARDT, 2006). Dessa forma, sugere-se que o MHC-Ib atue nesse tecido para inibindo a atividade das células NK.

b) O plasma seminal parece ter um efeito imunológico na mulher antes da implantação do embrião (ROBERTSON, 2005). Portanto, pode-se supor que moléculas HLA paternos, talvez incluindo HLA-G, no plasma seminal, podem estar envolvidas na indução de tolerância materna aos antígenos paternos. Esta indução de tolerância alélogênica às moléculas de HLA paternos no feto pode ser importante para o sucesso da gravidez (LARSEN et al., 2011).

Assim, neste estudo será avaliada a espermatogênese de acordo com a pontuação de Johnsen (1970), por meio da avaliação histológica dos túbulos seminíferos e classificação entre 1 e 10 do nível de maturação do epitélio germinativo (REIS, 2012).

Neste caso, o conhecimento da espermatogênese e fisiologia testicular é fundamental para a identificação de causas potenciais de infertilidade e subfertilidade e a compreensão dos processos que definem a capacidade de produção espermática. Adicionalmente, foi realizada avaliação da expressão de genes relacionados à atividade espermatogênica em tecidos do sistema reprodutor de bovinos, correlacionando os dados histológicos de diferenciação celular à resposta dos principais genes com ação na espermatogênese.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Analisar a expressão dos genes Protamina tipo 1 (PRM-1), Proteína de Transição Nuclear (TNP-2), enzima 17 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase tipo 3 (17 β -HSD3), Receptor do Hormônio Luteinizante (LHR), Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe I (MHC-I), MIC-B, NC1 e NC3 relacionados à espermatogênese no testículo bovino.

3.2. Específicos

- Avaliar histologicamente os níveis de espermatogênese no parênquima testicular bovino.
- Observar o perfil de expressão de genes relacionados à espermatogênese no tecido testicular (Protamina, Proteína de Transição Nuclear, enzima 17 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase tipo III, Receptor do Hormônio Luteinizante, Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I clássico e não clássico).
- Correlacionar as análises histopatológicas à expressão diferencial dos genes envolvidos no processo de espermatogênese.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Colheita de amostras

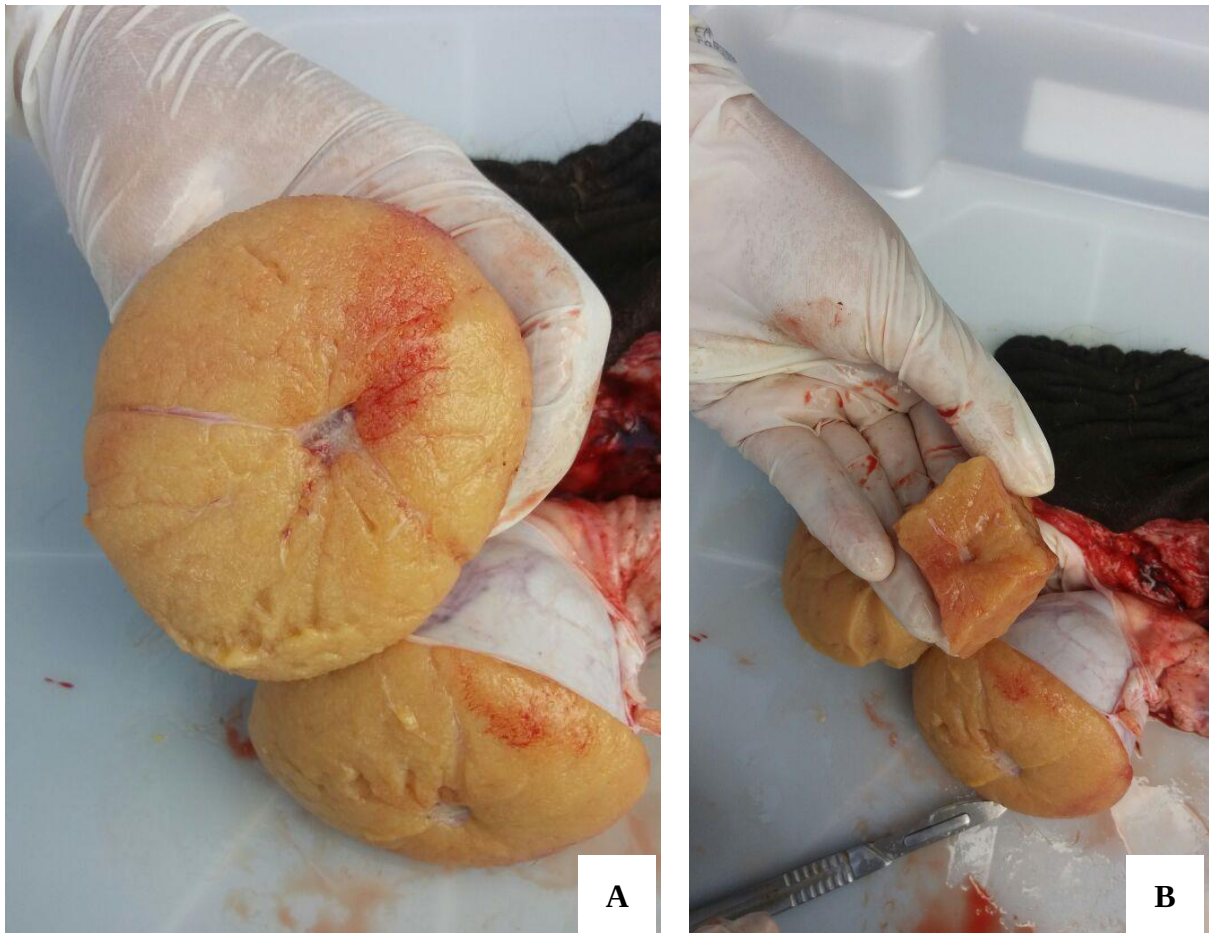
A colheita das amostras foi realizada em matadouro do município de São Luís, Maranhão, de acordo com o número de animais inteiros disponíveis (Figura 3). Foram utilizados ambos os testículos de 36 bovinos, sem padrão racial e independente da idade.

Figura 3. Rebanho bovino em período de descanso e dieta hídrica.



Imediatamente após o abate, foi feita antissepsia cuidadosa dos testículos utilizando-se álcool 70%, seguida da abertura e retirada de fragmentos do parênquima testicular (direito e esquerdo) (Figura 4A e B). Para a análise histológica, as amostras foram acondicionadas em formalina tamponada a 10% e processadas em Laboratório de Anatomopatologia da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Para os testes moleculares, os fragmentos foram acondicionados em criotubos estéreis, livres de nucleases, contendo a solução de estabilização RNAlater® (Life Technologies), mantidas sob refrigeração por 24 horas, seguida de armazenamento a -20°C até a realização da qRT-PCR no Laboratório de Patologia Molecular da UEMA.

Figura 4. Testículo bovino após antissepsia. A. Corte transversal do testículo bovino. B. Retirada de fragmentos para análise histológica.



4.2. Análise histopatológica

Os tecidos foram desidratados, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina histológica pela técnica de rotina histológica. Os blocos foram cortados em micrótomo de rotação a cinco micrômetros ($5\ \mu\text{m}$) de espessura e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), seguindo-se a montagem das lâminas. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (LEITE, 2009).

Segundo Johnsen (1970) e McLachlan et al. (2007), inclui a observação de características gerais das células testiculares, com verificação de uniformidade e/ou heterogeneidade da morfologia espermática, diâmetro dos túbulos seminíferos, com ou sem fibrose, avaliação de células de Sertoli e de Leydig. Nesta classificação histopatológica podem ser identificados cinco padrões da espermatogênese:

- a. Normal: calibre regular dos túbulos seminíferos, presença de todas as células espermáticas (células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides maduros no tecido testicular).

- b. Síndrome das células de Sertoli ou aplasia germinativa: somente células de Sertoli nos túbulos seminíferos.
- c. Espermatogênese incompleta ou Parada de Maturação de Células Germinativas: há interrupção completa e uniformidade da evolução dos grupos celulares em todos os túbulos seminíferos. Comumente associada a espermatócitos primários.
- d. Hipoespermatogênese: presença de todos os tipos celulares em menor número.
- e. Hialinização tubular: há fibrose peritubular com ausência de células germinativa e de Sertoli.

4.2.1. Avaliação da espermatogênese

Foram analisados ambos os testículos de 36 animais, totalizando 72 lâminas histológicas de parênquima testicular. Para a classificação da espermatogênese, foram analisados 40 túbulos seminíferos/lâmina por microscopia óptica com aumento de 40x e posterior realização de cálculo do escore médio segundo recomendação de Johnsen. Verificaram-se os cortes transversais dos túbulos que se apresentavam íntegros (não danificados) e aqueles completamente hialinizados quando possível identificação. Os túbulos seminíferos foram classificados entre 1 e 10, conforme o nível de maturação do epitélio germinativo, considerando o grupo celular mais avançado no túbulo (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios de avaliação espermática segundo a pontuação de Johnsen.

PONTUAÇÃO DE JOHNSEN	CÉLULAS ENCONTRADAS
Escore 10	Espermatogênese completa com muitas espermátides alongadas. Epitélio germinativo organizado com espessura preservada e a luz do túbulo livre.
Escore 9	Presença de muitas espermátides alongadas, com epitélio germinativo desorganizado, descamação ou obliteração da luz do túbulo.
Escore 8	Menos de cinco espermátides alongadas no corte transversal do túbulo seminífero.
Escore 7	Ausência de espermátides alongadas e presença de muitas espermátides em alongamento e arredondadas.
Escore 6	Ausência de espermátides alongadas e menos de cinco espermátides em alongamento e arredondadas.
Escore 5	Ausência de espermátides e presença de muitos espermatócitos.
Escore 4	Presença de menos de cinco espermatócitos e ausência de espermátides.
Escore 3	Somente espermatogônias no túbulo seminífero.
Escore 2	Ausência de células germinativas e presença de apenas células de Sertoli.
Escore 1	Ausência de células no corte transversal do túbulo seminífero.

Fonte: Johnsen (1970).

Após o reconhecimento morfológico dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero, os túbulos classificados foram multiplicados pela sua nota e a esta somada, a pontuação total de Johnsen foi determinada dividindo o valor total obtido pelo número de túbulos avaliados:

$$\text{Escore médio} = \frac{(\text{Túbulos seminíferos classificados} \times \text{Nota dos túbulos})}{\text{Número de túbulos avaliados/lâmina}}$$

4.3. Análise molecular

4.3.1. Extração de RNA

Após análise histopatológica quantitativa dos túbulos seminíferos e classificação dos escores médios, selecionaram-se ao acaso 12 fragmentos de testículo de cada escore para realização do estudo descritivo do perfil de expressão gênica. Para a extração de RNA, primeiramente o tecido coletado foi macerado e adicionado 1mL de Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) em microtubo livre de nucleases. Em seguida, foram adicionados 200µL de clorofórmio, homogeneizado vigorosamente e incubado em temperatura ambiente por três minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000xg por 15 minutos a 4°C, para separação em três fases (fenol-clorofórmio inferior; interfase; fase aquosa superior incolor).

O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, adicionado 500µL de isopropanol (para precipitação do RNA), armazenado em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 12.000xg por 10 minutos a 4°C. O pellet foi lavado com 1mL de etanol 70%, homogeneizado em vórtex e centrifugado a 7.500xg por cinco minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o microtubo deixado secar à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. O RNA foi re-hidratado em 30µL de água livre de RNase.

4.3.2. Síntese de cDNA

O RNA (1,5µg) obtido da extração pelo método do Trizol, foi retrotranscrito em cDNA utilizando-se o kit comercial *Super Script III First-Strand Synthesis System* para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), com reação de volume final de 20µL. Para a síntese foram utilizados 3,0µL de água DEPC, 1,0µL de *Random Hexâmero* (50µg/µL), 1,0µL de *Annealing Buffer*, 2,0µL de RNase OUTTM *Enzyme Mix*, 10,0µL de *2x First-Strand Reaction*

Mix. Os parâmetros utilizados para a síntese do cDNA foram: 65°C por cinco minutos, incubado em gelo por um minuto, 25°C por 10 minutos, 50°C por 50 minutos. Terminada a reação a 85°C por cinco minutos, incubou-se em gelo por um minuto. Posteriormente o cDNA foi armazenado a -20°C, até realização da qRT-PCR.

4.3.3. PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)

Nas reações de qRT-PCR foram utilizados sequências de *primers* genéricos de MHC-I, denominado Bov 7 e 11 (BIRCH et al., 2006), que amplificam uma sequência de MHC-I clássico e alelos não clássicos do locus NC1; *primers* específicos para MHC-I não clássicos, NC1, NC3 e MIC-B (SHU et al., 2012); Protamina tipo 1 (PRM-1) e Proteína de Transição Nuclear tipo 2 (TNP-2) (FERRAZ et al., 2013). Os *primers* específicos para 17β-hidroxiesteróide desidrogenase tipo III (17β-HSD3) e Receptor de Hormônio Luteinizante (LHR) foram delineados com o auxílio do programa Primer 3. O GAPDH e a β-actina foram utilizados como normalizadores das reações. Na tabela 2 são descritos os *primers* testados.

Tabela 2. Sequências dos *primers* para amplificação do mRNA dos genes envolvidos na espermatogênese bovina e normalizadores GAPDH e β-actina, tamanho do produto pB para as reações de RT-PCR em tempo real.

Gene	Primers (5'-3')	pB	NCBI	Referência
MHC-I genérico	GGCTACGTGGACGACACG (F) CCCTCCAGGTAGTTCCT (R)	410	NM_001105651.1	Birch et al. (2006)
MIC-B	AGAAAGGAGGCTTACATTCCC (F) GCCTGGTAATGCTTGCTTAAC (R)	199	NM_001127317	Shu et al. (2012)
NC1	AGTATTGGGATCAAGAGACGC (F) ATAGGCGTGCTGATTATACCC (R)	181	BC109706	Shu et al. (2012)
NC3	AGATGACACGAGATGCCAAG (F) TCGTTCAAGGCGATGTAA (R)	198	DQ140378	Shu et al. (2012)
PRM-1	AGATACCGATGCTCCTCACC (F) GCAGCACACTCTCCTCCTG (R)	112	BC108207	Ferraz et al. (2013)
TNP-2	GGTCTACGGGAGGACTCACA (F) TCCTCCTCCTCCTCATCCTT (R)	100	BC109800	Ferraz et al. (2013)
LHR	TCCCTGGAGCTGAAGGAAAAT (F) CGGAAGGGCGTCGTTGTG (R)	199	NM_174381	Próprio
17β-HSD3	TGGTTCTCAAGCTGGCTTCCT (F) TGCCCCACCTATTCTCCTAGAC (R)	187	NM_001076439	Próprio
GAPDH	GAGAAGGCTGGGGCTCACTTG (F) GCTGACAATCTTGAGGGTGTG (R)	195	NM_001034034.2	Davies et al. (2006)
β-actina	GTCCACCTTCCAGCAGATGT (F) GTCACCTTACCGTTCCAGT (R)	245	BT030480	Ferraz et al. (2013)

*MHC-I (Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I), PRM-1 (Protamina tipo 1), TNP-2 (Proteína de Transição Nuclear tipo 2), LHR (Receptor de Hormônio Luteinizante), 17β-HSD3 (Enzima 17β Hidroxiesteróide Desidrogenase tipo 3)

Para a realização do qRT-PCR, foi utilizado 1µL de cDNA, 0,5µL do par de *primers* de cada gene alvo a 10µM, 3µL de água DEPC, 5µL do kit PowerUp™ SYBER® Green Master Mix (2X) (Applied Biosystems by Life Technologies) e em um volume final de 10µL por reação. As amostras foram preparadas em placas de 96 poços e acondicionadas em termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems) para amplificação do cDNA. As placas foram submetidas a 50°C durante dois minutos (incubação) e 95°C por dois minutos (ativação das reações), e em seguida, a 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante um minuto (desnaturação, anelamento e extensão das fitas de DNA).

4.3.4. Análise estatística

Os resultados histopatológicos foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney, fixando-se em 0,05 ou 5% ($p < 0,05$) o nível para rejeição da hipótese de nulidade, conforme utilizado por Alves, Tubino e Goldenberg (1997).

Os dados moleculares foram avaliados utilizando-se o método Ct comparativo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e normalizados com base na expressão dos genes endógenos GAPDH e β -actina.

Correlações não paramétricas de Spearman foram utilizadas para verificar a relação entre a expressão diferencial dos genes envolvidos no processo de espermatogênese com o nível de maturação histológica do epitélio germinativo.

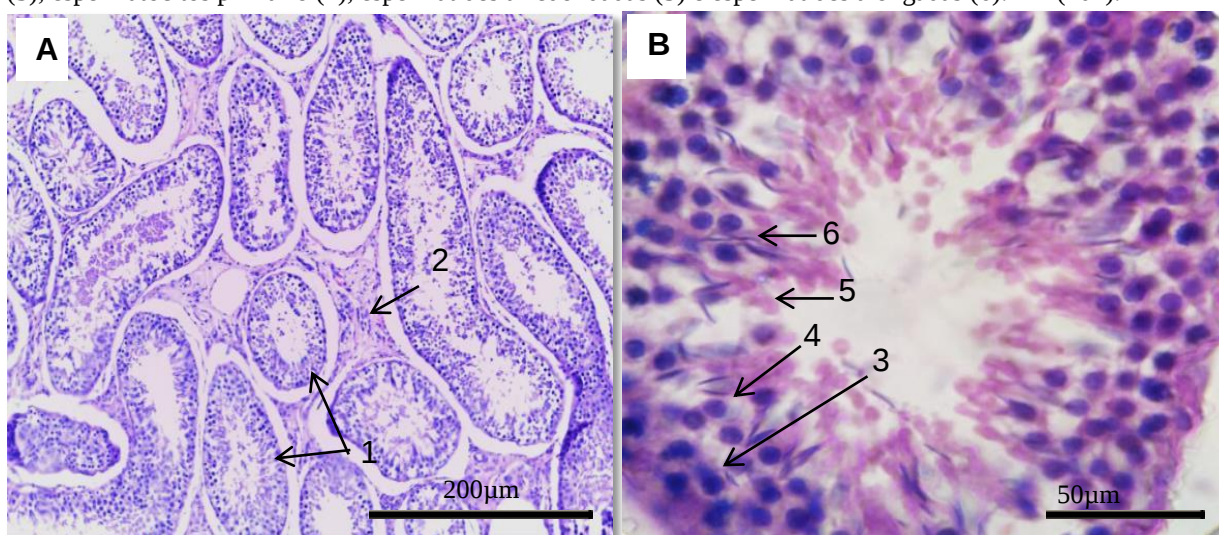
O programa GraphPad Prism 5 foi utilizado para realização das análises estatísticas. O nível de significância considerado para todos os testes foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Análise histopatológica e da espermatogênese do testículo bovino

Testículos bovinos foram coletados e avaliados quanto à classificação histopatológica da espermatogênese. Verificou-se que os animais apresentavam espermatogênese normal de acordo com os parâmetros descritos por Johnsen (1970) e McLachlan et al. (2007), pois os tecidos avaliados neste trabalho apresentavam diâmetro regular da luz tubular e ocorrência de todos os tipos celulares na maioria dos túbulos seminíferos analisados (Figura 5).

Figura 5. Fotomicrografia representativa de um testículo bovino utilizado no estudo. **A.** Túbulos seminíferos (1) e espaço intersticial contendo células de Leydig (2) (10x). **B.** Túbulo seminífero apresentando espermatogônias (3), espermatócitos primário (4), espermatídes arredondadas (5) e espermatídes alongadas (6). HE (40x).

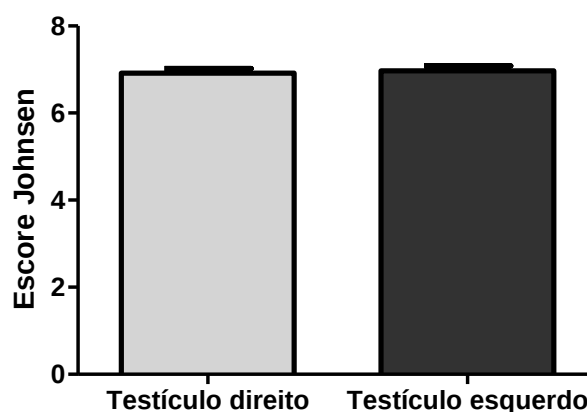


Durante a avaliação histopatológica do testículo foi realizada uma análise quantitativa através da atribuição de escores médios para avaliação da espermatogênese bovina, baseada na verificação morfológica dos túbulos seminíferos (células de Leydig, espermatogônias, espermatócitos, espermatídes arredondadas e/ou em alongamento e alongadas). Na amostragem alcançada de 36 animais, os testículos avaliados foram classificados nos escores médios: seis, sete e oito. Sendo o escore sete o mais frequente ($n=46/72$, 63,89%), seguido dos escores seis ($n=14/72$; 19,44%) e oito ($n=12/72$; 16,67%) (Tabela 3). Deve-se destacar que, não houve diferença estatística significativa quando comparados os escores médios dos testículos direito e esquerdo (média aritmética dos escores obtidos de todos os testículos direitos e esquerdos) dos animais utilizados nesse estudo (Figura 6).

Tabela 3. Frequência do escore médio das amostras testiculares de bovinos obtidos em matadouro comercial, São Luís-MA, Brasil.

Escore Médio	N	Frequência (%)
6	14	19,44
7	46	63,89
8	12	16,67
Total	72	100,00

Figura 6. Comparação dos escores médios de bovinos dos testículos direitos e esquerdos. Colunas representam a média aritmética (n=36) e erro padrão.



Não foram observadas alterações patológicas, tais como, testículos ectópicos, orquite uni ou bilateral, torção testicular ou criptorquidismo.

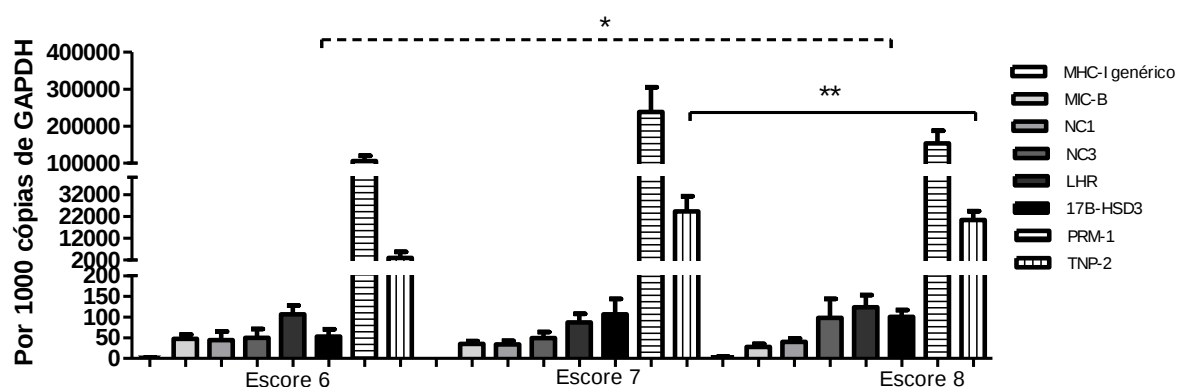
5.2. Expressão gênica de MHC-I genérico, MIC-B, NC1, NC3, LHR, 17 β -HSD3, PRM-1 E TNP-2 no parênquima testicular bovino

Após análise histopatológica quantitativa da espermatogênese, selecionaram-se ao acaso 12 fragmentos de testículo de cada escore (6, 7 e 8) para realização do estudo descritivo do perfil de expressão gênica. Como os valores de Ct do GAPDH apresentaram maior estabilidade quando comparados aos valores de Ct da β -actina, o gene GAPDH foi escolhido como normalizador para o cálculo da transcrição relativa dos genes envolvidos na espermatogênese bovina.

Os resultados obtidos demonstraram que todos os genes avaliados (MHC-I genérico, MIC-B, NC1, NC3, LHR, 17 β -HSD3, PRM-1 e TNP-2) foram expressos no testículo bovino nos diferentes escores estudados, embora a magnitude de expressão de cada gene tenha sido extremamente variável dentro do mesmo escore e somente para alguns genes quando comparados entre os escores (Figura 7). Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

para a expressão do gene TNP-2 quando comparados os níveis de expressão entre os escores sete e oito, assim como para o gene 17 β -HSD3, quando comparados os escores seis e oito. O gene PRM-1 foi o mais expresso nos três escores encontrados, no entanto, não houve diferença estatística significativa quando comparado entre eles. Não houve diferença estatística significativa na expressão dos genes MHC-I genérico e o MHC-Ib (MIC-B, NC1 e NC3) quando comparada as médias dos três escores avaliados. Além disso, nossas análises demonstraram que quando comparadas as médias dentro do mesmo escore (6, 7 ou 8) houve diferença estatística significativa entre os genes MHC-I genérico, MIC-B, NC1, NC3, LHR e 17 β -HSD3 quando comparados tanto ao gene PRM-1 ($p<0,05$) quanto ao gene TNP-2 ($p<0,05$). Interessantemente, os níveis de expressão do gene PRM-1 foi significativamente maior que o nível de expressão do gene TNP-2 ($p<0,05$) (Figura 7).

Figura 7. Expressão dos genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I clássico (MHC-I genérico), MHC classe I não clássico (MIC-B, NC1 e NC3), Receptor de Hormônio Luteinizante (LHR), Enzima 17 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase tipo III (17 β -HSD3), Protamina tipo 1 (PRM-1) e Proteína de Transição Nuclear tipo 2 (TNP-2) nas 36 amostras testiculares analisadas. Colunas representam média aritmética ($n=36$) e erro padrão.



Ao correlacionar os níveis de transcrição dos genes estudados e os escores encontrados, observou-se apenas correlação positiva significativa ($p<0,05$) e alta ($r\geq 0,70$) somente para o gene MHC-I genérico em relação ao escore seis. Os demais genes apresentaram correlações não significativas ($p>0,05$), médias ($0,40<r<0,70$) ou baixas ($r\leq 0,40$) em relação aos diferentes escores estudados (Tabela 4).

Tabela 4. Correlação entre os níveis de transcrição dos genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I clássico (MHC-I genérico), MHC classe I não clássico (MIC-B, NC1 e NC3), Receptor de Hormônio Luteinizante (LHR), Enzima 17 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase tipo III (17 β -HSD3), Protamina tipo 1 (PRM-1) e Proteína de Transição Nuclear tipo 2 (TNP-2) nos três escores estudados (valores de r).

Genes	Escore 6	Escore 7	Escore 8
MHC-I genérico	0,8407*	0,3162	-0,1149
MIC-B	0,0838	0,1976	0,3001
NC1	0,5214	-0,4634	0,3715
NC3	-0,4412	-0,3274	0,4930
LHR	0,1641	0,3341	0,5144
17β-HSD3	0,3573	0,1473	0,3208
PRM-1	-0,0255	-0,2622	0,4787
TNP-2	-0,2261	-0,1652	0,4894

(*) Correlação de Spearman significativa ($p < 0,05$).

Nas correlações entre as transcrições dos genes estudados dentro do mesmo escore encontrado (6, 7 e 8), obtiveram-se algumas correlações significativas ($p < 0,05$). Em relação ao escore seis, observou-se correlação média significativa ($0,40 < r < 0,70$) entre a expressão dos genes LHR e PRM-1, e entre 17 β -HSD3 e PRM-1. No escore sete, nossas análises demonstraram correlação baixa significativa ($r \leq 0,40$) do gene MIC-B em relação a PRM-1 e TNP-2; correlação alta significativa ($r \geq 0,70$) entre a expressão dos genes PRM-1 e TNP-2 em relação aos genes NC1 e 17 β -HSD3. Já no escore oito, observou-se que o gene LHR demonstrou correlação alta significativa ($r \geq 0,70$) em comparação aos genes MIC-B e 17 β -HSD3; quando comparado o gene PRM-1 verificou-se correlação média significativa entre os genes NC1 e LHR e alta significativas em comparação ao gene MIC-B; entre o gene TNP-2 verificaram-se correlação média significativa entre os genes MIC-B, LHR e 17 β -HSD3, e correlação alta significativa entre os genes NC1 e PRM-1 (Tabela 5).

Tabela 5. Correlação entre os níveis de transcrição dos genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I clássico (MHC-I genérico), MHC classe I não clássico (MIC-B, NC1 e NC3), Receptor de Hormônio Luteinizante (LHR), Enzima 17 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase tipo III (17 β -HSD3), Protamina tipo 1 (PRM-1) e Proteína de Transição Nuclear tipo 2 (TNP-2) em parênquima testicular bovino, nos escores 6, 7 e 8.

Transcrição gênica em parênquima testicular no escore 6 ®							
	MIC-B	NC1	NC3	LHR	17β-HSD3	PRM-1	TNP-2
MHC-I genérico	0,6000	0,4286	0,1429	-0,2571	0,3714	-0,6000	-0,0286
MIC-B		0,3077	0,2797	0,0979	-0,1958	-0,2028	-0,0489
NC1			-0,0069	0,3427	0,4965	0,2517	-0,1469
NC3				-0,3776	-0,1888	-0,2657	0,4336
LHR					0,4825	0,5944*	-0,1329
17β-HSD3						0,6643*	0,4476
PRM-1							0,2727
Transcrição gênica em parênquima testicular no escore 7 (r)							
	MIC-B	NC1	NC3	LHR	17β-HSD3	PRM-1	TNP-2
MHC-I genérico	0,8000	-0,6000	-0,3162	-0,8000	-0,8000	-0,8000	-0,8000
MIC-B		-0,4545	-0,1436	0,1608	-0,3287	-0,6014*	-0,7273*
NC1			0,3398	0,0909	0,5524	0,8671*	0,7692*
NC3				-0,1506	-0,0980	-0,0035	-0,0210
LHR					0,4825	0,1678	0,1119
17β-HSD3						0,7762*	0,7622*
PRM-1							0,9510*
Transcrição gênica em parênquima testicular no escore 8 (r)							
	MIC-B	NC1	NC3	LHR	17β-HSD3	PRM-1	TNP-2
MHC-I genérico	0,5714	-0,6667	-0,1190	0,1190	0,3832	0,3810	0,2857
MIC-B		0,2727	0,1259	0,7483*	0,4597	0,7273*	0,6503*
NC1			0,3636	0,3986	0,1860	0,6993*	0,7203*
NC3				0,3077	0,0561	0,1888	0,2657
LHR					0,7860*	0,6783*	0,6573*
17β-HSD3						0,5333*	0,6105*
PRM-1							0,9510*

(*) Correlação de Spearman significativa ($p < 0,05$).

Não houve correlações significativas ($p > 0,05$) do gene NC3 em relação à expressão dos demais genes em todos os escores estudados.

6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo em bovinos que correlaciona escore médio à expressão diferencial dos genes envolvidos na espermatogênese, tais como LHR, 17 β -HSD3, PRM-1 e TNP-2. Avaliou-se também a expressão do gene MHC-I genérico e não clássico (MIC-B, NC1 e NC3) a fim de verificar sua atuação no parênquima testicular bovino e possível utilização como marcador molecular de fertilidade.

Os testículos dos animais utilizados em nosso estudo apresentaram atividade espermatogênica classificada como normal, com ocorrência de todos os tipos celulares na maioria dos túbulos seminíferos analisados, o que permite uma avaliação preliminar satisfatória de fertilidade dependendo ainda de outros índices para sua completa determinação. Em estudos de Garcia (2004) e Dutra (2005), a análise histopatológica de Johnsen foi utilizada em homens sub-férteis para auxiliar em avaliações prognósticas e na identificação de produção espermática anormal.

Na Tabela 3, observou-se que os animais avaliados pertenciam aos escores médios seis, sete e oito. Diferentes fatores podem estar relacionados à proximidade desses resultados, podemos citar: homogeneidade dos animais, jovens, submetidos ao mesmo manejo sanitário e categorias da espermatogênese variando de moderada (com escores 6 e 7) à boa (escore 8). Estudo sobre evolução histológica entre homens saudáveis e com câncer de células germinativas do testículo realizado por Dieckmann et al. (2007) sugeriu a condensação das pontuações dos escores médios em três categorias da espermatogênese, a fim aperfeiçoar a avaliação de Johnsen, sendo, portanto, a espermatogênese classificada em: pobre, com escores variando de 1 a 4; moderada, com variação de 5 a 7; boa, do escore 8 ao 10.

Patologias macroscópicas e/ou microscópicas não foram observadas durante análise histopatológica dos testículos que causassem alterações orgânicas e consequentemente em distúrbios reprodutivos. Costa Mello et al. (2016) relataram que diversos fatores podem interferir na Fisiologia reprodutiva dos machos dentre eles: o estresse fisiológico e crônico, a superpopulação ou isolamento, exposição a um ambiente desconhecido, transporte, confinamento, contenção ou imobilização, calor ou frio intenso, intervenções cirúrgicas e a dor.

Os dados da análise do qRT-PCR demonstraram não haver diferença estatística significativa na expressão dos genes MHC-I genérico e MHC-Ib (MIC-B, NC1 e NC3) nos escores avaliados e que estas moléculas são pouco expressas na espermatogênese bovina

(Figura 7). No entanto, conforme ilustrado na tabela 4, verificou-se que o nível de transcrição do gene MHC-I genérico no escore seis apresentou correlação positiva significativa ($p < 0,05$) e alta ($r \geq 0,70$), apesar de não se observar correlação significativa para o gene NC1, o que pode sugerir que neste escore avaliado a expressão correspondeu ao MHC-I clássico. Em pesquisa realizada com macaco-Rhesus, Ryan et al. (2002) verificaram moderada expressão da molécula Mamu-AG do MHC-Ib em tecidos não placentários, como por exemplo, o testículo, embora com atuação aparentemente célula-seletiva. Resultados distintos foram obtidos em tecidos testiculares humanos por Yao et al. (2014), onde verificaram aumento significativo da expressão de mRNA para o gene HLA-G em diferentes capacidades espermatogênicas, principalmente nos últimos estágios. A partir destes resultados podemos sugerir que estas moléculas atuam de forma indireta sobre a espermatogênese em bovinos, mas que podem ser importantes em outros processos fisiológicos, com ação na resposta imunológica destes indivíduos em relação à proteção das células espermáticas durante processo de maturação e movimentação entre os compartimentos basal e adluminal, sem exposição a auto-antígenos do macho (CURTIS; AMANN, 1981). Kurpisz et al. (1987) indicaram a possibilidade de indução do MHC em células gametogênicas de homens com azoospermia, possivelmente devido a fatores que ativam a resposta imunológicas, como vírus ou citocinas. Estudos de Davies et al. (2006) em células trofoblásticas de fêmeas bovinas, também tem relatado a importância dos genes MHC-I clássicos e não clássicos à imunotolerância em bovinos. Fijak e Meinhardt (2006) afirmaram que esta falha em desencadear respostas imunológicas no testículo ocorre devido à presença de citocinas inibitórias contra respostas inflamatórias, além da restrição da ação citotóxica das células NK. Portanto, faz-se necessário estudos adicionais em animais com distúrbios reprodutivos e baixa espermatogênese (escores entre 1 e 4), a fim de verificar a associação dessas alterações à um perfil de expressão dos genes do MHC-I genérico e não clássico. Além de pesquisas utilizando outras moléculas que podem estar envolvidas no controle e maturação celular ao longo da espermatogênese, como proteínas e citocinas.

Como ilustrado na figura 7, os níveis de transcrição dos genes PRM-1 e TNP-2 foram maiores em comparação às demais moléculas estudadas nos três escores (6, 7 e 8), sendo relativamente alto nos escores sete e oito, onde há ação direta destas proteínas e início da diferenciação de espermátides em alongadas e consequentemente em espermatozoides (SOUZA, 2014). Este resultado também pode ser ratificado com os dados apresentados na tabela 5, onde no escore oito se verifica correlação positiva alta e

significativa ($p < 0,05$) entre a expressão dos referidos genes, bem como demonstra que esses animais apresentavam boa espermatogênese, com normozoospermia e ausência de distúrbios reprodutivos. Pesquisas de Fortes et al. (2014) e Dogan et al. (2015) em touros *Bos indicus* verificaram que baixos índices de PRM's podem afetar a integridade do DNA espermático, causando subfertilidade. Ganguly et al. (2013), analisando a expressão do gene PRM-1 em sêmen de touros mestiços Frieswal (HF x Sahiwal), verificaram uma maior expressão do mRNA em animais com boa qualidade do sêmen. Steger e colaboradores, em estudos realizados nos anos de 2003 e 2008, observaram diminuição significativa deste transcrito em homens com espermatogênese prejudicada e com elevado nível de apoptose, causando má compactação da cromatina espermática e consequentemente danos no DNA do espermatozoide. Em relatos sobre humanos e equinos, nota-se uma correlação negativa entre os fatores de fertilidade e integridade de DNA (SAKKAS et al., 1999; MORRELL et al., 2008; SAKKAS; ALVAREZ, 2010; SCHULTE et al., 2010).

Ao correlacionar o nível de transcrição dos genes 17 β -HSD3 e LHR observou-se correlação positiva significativa ($p < 0,05$) e alta somente no escore oito (Tabela 5), onde há dependência da testosterona para conversão de espermátides arredondadas em espermátides alongadas (O'DONNELL et al., 1994). Na figura 7, também foi possível observar diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na expressão do gene 17 β -HSD3 nos escores seis e oito, podendo estar associada à idade destes animais e importância na conversão da androstenediona em testosterona, e esta fundamental na regulação e manutenção da espermatogênese (O'DONNELL et al., 2001). Em testículo de camundongos, Baker, Sha e O'Shaughnessy (1997) e O'Shaughnessy et al. (2000) verificaram que a isoforma do tipo 3 da enzima 17 β -HSD possui uma elevada afinidade para a androstenediona. Coonce et al. (2009), utilizando o rato como modelo experimental, relataram que o gene LHR tem por função primordial a estimulação da esteroidogênese e sua expressão ocorre em células de Leydig, sendo, portanto, essencial na fertilidade em mamíferos; Hämäläinen, Poutanen e Huhtaniemi (2001) também verificaram que a ativação do gene promotor desta molécula acontece nas espermatogônias e espermátides.

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que a avaliação histopatológica do testículo bovino aliada a técnicas moleculares são importantes na qualificação da espermatogênese, podendo auxiliar no prognóstico de animais com produção espermática normal a anormal. Vale salientar que este trabalho é pioneiro na espécie bovina a correlacionar a diferenciação das células germinativas a partir do método de Johnsen à

expressão gênica de MHC-I genérico, MHC-Ib, LHR e 17 β -HSD3. Além disso, estudos moleculares adicionais se fazem necessários a fim de propor marcadores específicos de qualidade espermatogênica que auxiliem na avaliação reprodutiva dos machos.

7. CONCLUSÃO

- A avaliação da espermatogênese bovina variou dos escores seis a oito e permitiu a confirmação dos critérios de Johnsen como uma ferramenta fundamental para qualificação da espermatogênese em bovinos;
- Os genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) de classe I genérico, MHC-I não clássico e LHR foram pouco expressos no tecido testicular de bovinos, o que sugere sua atuação de forma indireta na espermatogênese;
- Os níveis de transcrição dos genes PRM-1, TNP-2 e 17 β -HSD3 foram relativamente altos nos escores avaliados, demonstrando que os animais apresentavam boa espermatogênese, com normozoospermia e ausência de distúrbios reprodutivos;
- As correlações entre as análises histopatológicas e transcrições relativas dos genes envolvidos no processo de espermatogênese indicam que os genes PRM-1, TNP-2, 17 β -HSD3 e LHR atuam diretamente no desenvolvimento diferencial das células germinativas durante a espermatogênese e que alterações durante o processo transcricional podem interferir na capacidade reprodutiva dos machos.

REFERÊNCIAS

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Rebanho Bovino Brasileiro**. Disponível em <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em: 04 dez. 2016.
- ALIZADEH, Z.; KARROW, N.; MALLARD, B. A. Biological effect of varying peptide binding affinity to the BoLA-DRB3*2103 allele. **Genetics Selection Evolution**, v. 35, Suppl. 1, p. S51-S65, 2003.
- ALVES, E.; TUBINO, P.; GOLDENBERG, S. Avaliação dos efeitos da ciclofosfamida nos testículos escrotal e retido em ratos jovens submetidos à criptorquia unilateral. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 1997.
- AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 57, suppl. 2, p. 380-403, 1983.
- AMILLS, M. et al. The major histocompatibility complex of ruminants. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 17, n. 1, p. 108-120, 1998.
- AMORENA, B.; STONE, W.H. Bovine lymphocyte antigens (BoLA): a serologic, genetic and histocompatibility analysis. **Tissue Antigens**, v. 16, n. 3, p. 212-225, 1980.
- ANDERSSON, S. et al. Molecular genetics and pathophysiology of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, p. 130-136, 1996.
- ANDREUSSI, P. A. T. **Avaliação do processo espermatogênico de touros de diferentes raças zebuínas**. 2013. 79 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.
- ANTCZAK, D. F. Structure and function of the major histocompatibility complex in domestic animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 10, p. 1030-1036, 1982.
- AOKI, V. W.; CARRELL, D. T. Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 5, p. 315-324, 2003.
- AOKI, V. W.; LIU, L.; CARRELL, D. T. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. **Human Reproduction**, v. 20, p. 1298-1306, 2005.
- AOKI, V. W. et al. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, p. 741-748, 2005.
- AOKI, V. W. et al. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 890-898, 2006.

- BABIUK, S. et al. BoLA class I allele diversity and polymorphism in a herd of cattle. **Immunogenetics**, v. 59, p. 167-176, 2007.
- BAKER, P. J.; SHA, J. H.; O'SHAUGHNESSY, P. J. Localisation and regulation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 mRNA during development in the mouse testis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 133, p. 127-133, 1997.
- BAHRAM, S. et al. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 14, p. 6259-6263, 1994.
- BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome Biology**, v. 8, p. 227.1-227.8, 2007.
- BELL, J. Chromosome crawling in the MHC. **Trends in Genetics**, v. 5, n. 9, p. 289-290, 1989.
- BERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **Journal of Animal Science**, v. 44, n. 5, p. 818-883, 1977.
- BIRCH, J. et al. Generation and maintenance of diversity in the cattle MHC Class I region. **Immunogenetics**, v. 58, n. 8, p. 670-679, 2006.
- BIRCH, J. et al. Genomic location and characterisation of nonclassical MHC class I genes in cattle. **Immunogenetics**, v. 60, p. 267-273, 2008.
- BOOCKFOR, F. R.; BARNES, M. A.; DICKEY, J. F. Effects of unilateral castration and unilateral cryptorchidism of the Holstein bull on *in vitro* Leydig cell response. **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 1386-1392, 1983.
- CHANG, C. et al. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 6876-6881, 2004.
- CHEVAILLIER, P. et al. Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men. **Lancet**, v. 2, p. 806-807, 1987.
- CHIANG, M. H. et al. Detection of human leukocyte antigen class I messenger ribonucleic acid transcripts in human spermatozoa via reverse transcription-polymerase chain reaction. **Fertility and Sterility**, v. 61, p. 276-280, 1994.
- COLLINS, R. W. M. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. **European Journal of Immunogenetics**, v. 31, n. 3, p. 105-114, 2004.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Indicadores da Agropecuária: Quadro de Suprimentos**. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1538&t=2>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

COONCE, M. M. et al. Impact of a Constitutively Active Luteinizing Hormone Receptor on Testicular Gene Expression and Postnatal Leydig Cell Development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 298, n. 1-2, p. 33-41, 2009.

COSTA MELLO, R. R. et al. Influência do manejo na fisiologia reprodutiva do macho bovino. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 19, n. 1, p. 57-63, 2016.

COUROT, M.; HOCHEREAU-de RIVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES W. R.; VANDEMARK, N. L. (Eds.) **The testis**. New York and London: Academic Press, 1970. v. 1, p. 339-432.

COUROT, M.; ORTAVANT, R. Endocrine control of spermatogenesis in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Grã-Bretanha, v. 30, p. 47-60, 1981. Supplement.

CURTIS, S. K.; AMANN, R. P. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 6, p. 1645-1657, 1981.

DAVIES, C. J. Why is the fetal allograft not rejected? **Journal of Animal Science**, v. 85, p. E32-E35, 2007.

DAVIES, C. J.; FISHER, P. J.; SCHLAFFER, D. H. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. **Placenta**, v. 21, n. 2-3, p. 194-202, 2000.

DAVIES, C. J. et al. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. **Animal Genetics**, v. 28, n. 3, p. 159-168, 1997.

DAVIES, C. J. et al. Evidence for expression of both classical and non-classical major histocompatibility complex class I genes in bovine trophoblast cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 55, p. 188-200, 2006.

DETIN, L. et al. Regulated expression and ultrastructural localization of Galectin-1, a proapoptotic β -Galactoside-Binding Lectin, during spermatogenesis in rat testis. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 51-59, 2003.

DIECKMANN, K.-P. et al. Spermatogenesis in the contralateral testis of patients with testicular germ cell cancer: histological evaluation of testicular biopsies and a comparison with healthy males. **British Journal of Urology International**, v. 99, n. 5, p. 1079-1085, 2007.

DOGAN, S. et al. Sperm Protamine-Status Correlates to the Fertility of Breeding Bulls. **Biology of reproduction**, v. 92, n. 4, p. 1-9, 2015.

DONALDSON, W. L. et al. Invasive equine trophoblast expresses conventional class I major histocompatibility complex antigens. **Development**, v. 110, p. 63-71, 1990.

DUTRA, R. T. **Padrão histológico testicular como valor prognóstico da melhora da capacidade reprodutiva em pacientes submetidos à varicocelectomia microcirúrgica.** 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Urologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

EBLEN, A. et al. The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 6, p. 2643-2648, 2001.

FERNANDES, A. P. M. et al. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 5, 2003.

FERRAZ, H. T. **Histomorfometria testicular e sua associação com a qualidade seminal em machos Nelore.** 2011. 68 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiás, 2011.

FERRAZ, M. A. M. M. et al. Gene expression profile of Protamines and Transition Nuclear Proteins in bovine testis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 4, p. 316-322, 2013.

FEUGANG, J. M. et al. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 21, n. 3, p. 312-324, 2010.

FIJAK, M.; MEINHARDT, A. The testis in immune privilege. **Immunological Reviews**, v. 213, n. 1, p. 66-81, 2006.

FORTES, M. R. S. et al. Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in *Bos indicus* bulls. **Andrology**, v. 2, p. 370-378, 2014.

FRIES, R. et al. The bovine gene map. **Animal Genetics**, v. 20, p. 3-29, 1988.

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

GAO, Q. et al. Association of TNP2 Gene Polymorphisms of the bta-miR-154 Target Site with the Semen Quality Traits of Chinese Holstein Bulls. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e84355, 2014.

GARCIA, A. R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental (*Bos taurus taurus*).** 2004. 258 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

GEISSLER, W. M. et al. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase-3. **Nature Genetics**, v. 7, p. 34-39, 1994.

GOGOLIN-EWENS, K. J. et al. Site-directed differences in the immune response to the fetus. **Immunology**, v. 66, p. 312-317, 1989.

GRIFFIN, J. E. Male reproductive function. In: GRIFFIN, J. E.; OJEDA, S. R (Eds.). **Textbook of endocrine physiology**. New York: Oxford University Press, 1988. p. 165-185.

GRISWOLD, M. D. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 211-216, 1995.

HÄMÄLÄINEN, T.; POUTANEN, M.; HUHTANIEMI, I. Promoter function of different lengths of the murine luteinizing hormone receptor gene 5'-flanking region in transfected gonadal cells and in transgenic mice. **Endocrinology**, v. 142, n. 6, p. 2427-2434, 2001.

HOLMES, M. A. et al. Structural studies of allelic diversity of the MHC class I homolog MIC-B, a stress-inducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 3, p. 1395-1400, 2002.

HUNT, J. S.; ANDREWS, G. U.; WOOD, G. W. Normal trophoblasts resist induction of class I HLA. **Journal of Immunology**, v. 138, p. 2481-2487, 1987.

HUNT, J. S. et al. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 7, p. 681-693, 2005.

HUNT, J. S. et al. The role of HLA-G in human pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 1, p. 1, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Pecuária. Efetivo/rebanhos. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u2=17>>. Acesso em: 26 set. 2016.

JOHNSEN, G. J. Testicular Biopsy Score Count – A method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 1, n. 1, p. 2-25, 1970.

JOHNSON, L. et al. Efficiency of spermatogenesis: A comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 180-471, 2000.

JOOSTEN, I.; SANDERS, M. F.; HANSEN, E. J. Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the etiology of bovine retained placenta. **Animal Genetics**, v. 22, p. 455-463, 1991.

KELLEY, J.; WALTER, L.; TROWSDALE, J. Comparative genomics of major histocompatibility complexes. **Immunogenetics**, v. 56, p. 683-695, 2005.

KLEENE, K. C. Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 103, p. 217-224, 2003.

KURPISZ, M. et al. HLA expression on human germinal cells. **International Journal of Immunogenetics**, v. 14, n. 1, p. 23-32, 1987.

KUSSLER, A. P. S. **Fragmentação de DNA em espermatozoides humanos com diferentes viscosidades no plasma seminal**. 2012. 117 f. Dissertação (Mestrado em Medicina: Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Porto Alegre, 2012.

HAYWOOD, M. et al. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. **Endocrinology**, v. 144, p. 509-517, 2003.

HYLENIUS, S. et al. Association between HLA-G genotype and risk of preeclampsia: a case-control study using family triads. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 237-246, 2004.

LACROIX, A.; GARNIER, D. H.; PELLETIER, J. Temporal fluctuations of plasma LH and testosterone in charolais bull calves during the first year of life. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 17, n. 6, p. 1013-1019, 1977.

LAMM, L. U; OLASEN, B. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 5 and 6. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 40, p. 128, 1985.

LANGAT, D. K. et al. Differential expression of human leukocyte antigen-G (HLA-G) messenger RNAs and proteins in normal human prostate and prostatic adenocarcinoma. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 71, p. 75-86, 2006.

LARSEN, M. H. et al. Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma. **Molecular Human Reproduction**, v. 17, p. 727-738, 2011.

LE DISCORDE, M. et al. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1039-1044, 2003.

LEE, K. et al. Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 12451-12455, 1995.

LEITE, D. K. V. H. **Avaliações das características histológicas, citológicas, clínicas e seminais de felinos domésticos (*Felis catus*, Linnaeus, 1758) e selvagens (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775), *Leopardus geoffroyi*, d'Orbign & Gervais, 1843 e *Puma yagouaroundi*, E. Geoffroy, 1803). Felidae carnívora**. 2009. 146 f. Tese (Doutorado em Anatomia Patológica Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.

LEITE, T. E.; MORAES, J. C. F.; PIMENTEL, C. A. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 467-472, 2001.

LEMAOULT, J. et al. HLA-G expressing antigen presenting cells induce immunosuppressive CD4⁺ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 7064-7069, 2004.

LEVEZIEL, H.; HINES, H. C. Linkage in cattle between the major histocompatibility complex (BoLA) and the M blood group system. **Genetics Selection Evolution**, v. 16, n. 4, p. 405-416, 1984.

LEWIN, H. A. Genetic organization, polymorphism, and function of the bovine major histocompatibility complex. In: Schook L.B.; Lamont S.J. (eds.), **The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species**. Florida: CRC Press, p. 65-98, 1996.

LIVAK, J.; SCHMITTGEN, D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LUU-THE, V.; BELANGER, A.; LABRIE, F. Androgen biosynthetic pathways in the human prostate. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 2, p. 207-221, 2008.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Bovinos e Bubalinos**. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 02 dez. 2016.

MARIC, D.; KOSTIC, T.; KOVACEVIC, R. Effects of acute and chronic immobilization stress on rat Leydig cell steroidogenesis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 58, n. 3, p. 351-355, 1996.

MCCARTHY, M. S.; CONVEY, E. M.; HAFS, H. D. Serum hormonal changes and testicular response to LH during puberty in bulls. **Biology of Reproduction**, v. 20, p. 1221-1227, 1979.

MCLACHLAN, R. I. et al. Histological evaluation of the human testis- approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. **Human Reproduction**, v. 22, n. 1, p. 2-16, 2007.

MEISTRICH, M. L. et al. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. **Chromosoma**, v. 111, n. 8, p. 483-488, 2003.

MORRELL J. M. et al. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, 2008.

MOTA, A. F. **Descobrimos genes expressos na glândula mamária e relacionados à ocorrência e controle da mastite bovina**. 2003. 170 f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2003.

MURTA, D. V. F.; GOMES, V. C. L.; MARTINEZ, L. C. R. A organização celular dos testículos de mamíferos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano XI, n. 20, 2013.

- NAIB, A. et al. Regulation of non-classical major histocompatibility complex class I mRNA expression in bovine embryos. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 91, n. 1-2, p. 31-40, 2011.
- NASCIMENTO, C. S. et al. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 641-647, 2006.
- O'DONNELL, L. et al. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. **Endocrinology**, v. 135, p. 2608-2614, 1994.
- O'DONNELL, L. et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001.
- O'SHAUGHNESSY, P. J. et al. Localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis: androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal Leydig cells. **Endocrinology**, v. 141, p. 2631-2637, 2000.
- OLIVA, R. Protamines and male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 4, p. 417-435, 2006.
- OLIVEIRA-COELHO, D. F. B. **Atividade nucleolar durante a espermatogênese de bovinos (*Bos indicus*)**. 2007. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.
- ORTAVANT, R. Photoperiodic regulation of reproduction in the sheep. In: MANAGEMENT AND REPRODUCTION IN SHEEP AND GOATS. **Symposium**. Madison (USA): University of Wisconsin, 1977. p. 58-71.
- PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 201-214, 2005.
- PEDDINTI, D. et al. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BioMed Central Systems Biology**, v. 2, p. 19, 2008.
- RAVEL, C. et al. Mutations in the protamine 1 gene associated with male infertility. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, p. 1-4, 2007.
- REIS, A. B. **Estudo comparativo entre diferentes processamentos histológicos na interpretação de biópsias testiculares**. 2012. 93 f. Doutorado (Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

- RYAN, A. F. et al. A soluble isoform of the rhesus monkey nonclassical MHC class I molecule Mamu-AG is expressed in the placenta and the testis. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 673-683, 2002.
- ROBERTSON, S. A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. **Cell and Tissue Research**, v. 322, n. 1, p. 43-52, 2005.
- ROSER, J. F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 139-151, 2001.
- RUSSELL, L. D.; PETERSON, R. N. Determination of the elongate spermatid- Sertoli cell ratio in various mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 635-641, 1984.
- RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. Building a testis. **Tissue and Cell**, v. 27, n. 2, p. 129-146, 1995.
- SAILER, B. L.; JOST, L. K.; EVENSON, D. P. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 80-87, 1995.
- SAKKAS, D. et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. **Reviews of Reproduction**, v. 4, n. 1, p. 31-37, 1999.
- SAKKAS, D.; ALVAREZ, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 4, 2010.
- SANTOS, L. S. et al. Transcription of non-classic major histocompatibility complex (MHC) class I in the bovine placenta throughout gestation and after *Brucella abortus* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 167, p. 166-170, 2015.
- SCHULTE, R. T. et al. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, n. 1, p.3-12, 2010.
- SCOTT, P. C.; CHOI, C. L.; BRANDON, M. R. Genetic organization of the ovine MHC class II region. **Immunogenetics**, v. 25, n. 2, p. 116-122, 1987.
- SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Washington: Washington State University, 2002. p. 368.
- SETCHELL, B. P. Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. In: CHENG, C. Y. **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. Series: Adv. Exp. Med. Biol., v. 636, p. 212-233, 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-0-387-09597-4_12?LI=true#>. Acesso em: 26 set. 2016.
- SHARIF, S. et al. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v. 29, p. 185-193, 1998.

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis: an overview. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1. ed., USA: Springer, 2011. cap. 2, p. 19-44.

SHARPE, R. M. et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, n. 6, p. 769-784, 2003.

SHIROISHI, M. et al. Human inhibitory receptors IgG-like transcript (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA G. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 8856-8861, 2003.

SHU, L. et al. Non-classical major histocompatibility complex class makes a crucial contribution to reproduction in the dairy cow. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 5, p. 569-575, 2012.

SHUPE, J. et al. Regulation of sertoli-germ cell adhesion and sperm release by FSH and nonclassical testosterone signaling. **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 238-252, 2011.

SINGH, R. P. S. et al. Effect of lead on nitrate reductase activity and alleviation of lead toxicity by inorganic salts and 6-benzylaminopurine. **Biologia Plantarum**, v. 40, n. 3, p. 339-404, 1997.

SOUZA, L. W. O. **Efeitos da somatotropina recombinante bovina sobre as características espermáticas, concentrações de testosterona e IGF1 no plasma seminal de touros (*Bos taurus taurus*) submetidos à degeneração testicular**. 2004. 183 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

SOUZA, E. T. **Localização de alterações cromatínicas em espermatozoides de touro e sua relação com a marcação imunocitoquímica de protamina**. 2014. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

STEGER, K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. **Anatomy and Embryology**, v. 199, n. 6, p. 471-487, 1999.

STEGER, K. et al. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 939-945, 1998.

STEGER, K. et al. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, p. 219-225, 2000.

STEGER, K. et al. Protamine-1 and -2 mRNA in round spermatids is associated with RNA-binding proteins. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 117, p. 227-234, 2002.

STEGER, K. et al. Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. **Molecular Human Reproduction**, v. 9, 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.

TAKESHIMA, S. N.; AIDA, Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. **Animal Science Journal**, v. 77, n. 2, p. 138-150, 2006.

VAN EIJK, M. J. T.; STEWART-HAYNES, J. A.; LEWIN, H. A. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. **Animal Genetics**, v. 23, n. 6, p. 483-496, 1992.

VRIES, M. D. et al. Chromatin remodeling initiation during human spermiogenesis. **Biology Open**, v. 1, p. 446-457, 2012.

ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P. C. H-2 compatability requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D. **The Journal of experimental medicine**, v. 141, n. 6, p. 1427-1436, 1975.

WADA, H. et al. The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 1, p. 81-90, 2004.

WALKER, W. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. **Steroids**, v. 74, p. 602-607, 2008.

WONG, C. -H. et al. Blood-testis barrier dynamics are regulated by α 2-Macroglobulin via the c-Jun N-Terminal Protein Kinase pathway. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1893-1908, 2005.

WU, X. X. et al. Restriction fragment length polymorphism in the exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in Chinese Holstein of the South China. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 3, n. 2, p. 221-225, 2010.

YAN, H. H. N.; CHENG, C. Y. Blood-testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 11722-11727, 2005.

YAO, G. D. et al. Expression and potential roles of HLA-G in human spermatogenesis and early embryonic development. **PLoS One**, v. 9, n. 3, 2014.