

**UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ - UVA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA - PPGZ**  
**MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**A PROTEÔMICA NA SELEÇÃO DE REPRODUTORES OVINOS (*Ovis aries*)  
DA RAÇA MORADA NOVA**

**FRANCISCO CAIO VASCONCELOS**

**SOBRAL - CE**

**ABRIL - 2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ - UVA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA - PPGZ**  
**MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**A PROTEÔMICA NA SELEÇÃO DE REPRODUTORES OVINOS (*Ovis aries*)  
DA RAÇA MORADA NOVA**

**FRANCISCO CAIO VASCONCELOS**

**SOBRAL - CE**

**ABRIL - 2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual Vale do Acaraú

Sistema de Bibliotecas

Vasconcelos, Francisco Caio

A proteômica na seleção de reprodutores ovinos (*Ovis aries*) da raça Morada Nova [recurso eletrônico] / Francisco Caio

Vasconcelos. -- Sobral, 2017.

1 CD-ROM: il. ; 4 <sup>3</sup>/<sub>4</sub> pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato pdf do trabalho acadêmico com 63 folhas.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ângela Maria Xavier Eloy.

Co-Orientação: Prof. Dr. Diônes Oliveira Santos.

Dissertação (Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas

1. Eletroforese 2DE. 2. Fertilidade. 3. Plasma Seminal. I. Título.

FRANCISCO CAIO VASCONCELOS

A PROTEÔMICA NA SELEÇÃO DE REPRODUTORES OVINOS (*Ovis aries*) DA  
RAÇA MORADA NOVA

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual Vale do Acaraú, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.**

**Área de Concentração: Reprodução Animal**

**Orientadora:**

Dra. Ângela Maria Xavier Eloy

**Co-Orientador:**

Dr. Diônes Oliveira Santos

SOBRAL - CE

ABRIL – 2017

**FRANCISCO CAIO VASCONCELOS**

**A PROTEÔMICA NA SELEÇÃO DE REPRODUTORES OVINOS (*Ovis aries*)  
DA RAÇA MORADA NOVA**

Dissertação defendida e aprovada em: 04 / 04 / 2017 pela Comissão Examinadora:

---

**PROFa. DRa. ALINE VIEIRA LANDIM**  
**Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA**  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - PPGZ**

---

**DR. DIÔNES OLIVEIRA SANTOS**  
**Embrapa Caprinos e Ovinos**  
**Pesquisador**

---

**DR. KLEIBE DE MORAES SILVA**  
**Embrapa Caprinos e Ovinos**  
**Pesquisador**

---

**DRa. ÂNGELA MARIA XAVIER ELOY**  
**Embrapa Caprinos e Ovinos**  
**Pesquisadora**

SOBRAL - CE

ABRIL – 2017

As minhas queridas mães, Gorete Vasconcelos e Vanda Vasconcelos, pela grande ajuda, incentivo e apoio. À minha amada avó (*in memoriam*) pelo exemplo de vida e pelos valiosos ensinamentos deixados.

**Dedico**

“Se você quer ser bem sucedido precisa ter dedicação total, buscar seu último limite e dar o melhor de si.”

**Ayrton Senna**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por ter me concebido a vida e por me orientar, principalmente, nos momentos mais difíceis.

À Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA por oferecer o curso de Pós-Graduação em Zootecnia e por disponibilizar a estrutura física e os profissionais necessários.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Caprinos e Ovinos por disponibilizar os animais e a estrutura laboratorial para execução do Projeto de Mestrado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudos.

À Dra. Ângela Maria Xavier Eloy, pela orientação no Curso de Pós-Graduação e pelos ensinamentos acadêmicos e ao Dr. Diônes Oliveira dos Santos, pela Co-orientação no Curso de Pós-Graduação e pela disponibilidade quando necessário.

A minha família que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal, especialmente minhas mães Gorete e Vanda.

Aos meus irmãos, Augusto Neto e Júlio César, pela paciência, compreensão e ajuda financeira quando necessário e também minha namorada, Suyane Pereira, pelo companheirismo, atenção e dedicação

À todos os meus professores da Graduação e do Mestrado pelos conhecimentos e pela ajuda em minha formação profissional e pessoal.

À todos os funcionários da Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA em parceria com a Embrapa Caprinos e Ovinos.

Ao laboratorista João Ricardo Furtado, ao estatístico Adrino Lima e ao Analista Alexandre Weick, todos da Embrapa Caprinos e Ovinos, pela paciência, ensinamentos e apoio sempre que preciso.



## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
RESUMO GERAL.....	XIII
GENERAL ABSTRACT.....	XIV
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	XV
CAPÍTULO 1- REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
Referências Bibliográficas.....	25
CAPÍTULO 2 – APLICAÇÃO DA PROTEÔMICA NA SELEÇÃO DE REPRODUTORES OVINOS ( <i>Ovis aries</i> ) DA RAÇA MORADA NOVA .....	30
Resumo.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	35
Resultados e Discussão.....	41
Conclusões.....	52
Referências Bibliográficas.....	53
ANEXO I .....	60

## LISTA DE ABREVIACOES

**µg** - Micrograma

**µL** - Microlitro

**µm** - Micrmetro

**µM** - Micromolar

**µmol** – Micromole

**2D** – Eletroforese bidimensional

**CHAPS** - 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato.

**DTT** – Ditioneitol

**IAA** – Iodoacetamida

**IPG** – Immobilized pH gradient

**kDa** - QuiloDalton

**M** - Molar

**mA** - MiliAmpere

**mL** – Mililitro

**ng** - Nanograma

**° C** - Graus Celsius

**PAGE** - Eletroforese em gel de poliacrilamida

**pI** – Ponto isoelétrico

**PS** – Plasma seminal

**SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio

**SDS/PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

**TEMED** – N,N,N',N' - Tetrametilenodiamina

**Tris** - 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

**V** – Volt

**cm** – Centímetro

**%** - Percentual

**LTS** - Laboratório de Tecnologia de Sêmen

**CBRA** - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

**NaCl** - Cloreto de Sódio

**ECP** - Cipionato de Estradiol

**mg** – Miligrama

**g** – Grama

**nm** - Nanômetros

**h** – Hora

**min** – Minuto

**Vh** – Volt/hora

**BSA** – Albumina Sérica Bovina

**IPA** – Instituto Agronômico de Pernambuco

**CBB** - Comassie Brilliant Blue

**ECC** – Escore de Condição Corporal

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

- TABELA 1** - Número de fêmeas cobertas, diagnóstico de prenhez e taxa fertilidade de animais da raça Morada Nova no período de 2014 a 2016 ..... 37
- TABELA 2** - Média dos Parâmetros espermáticos e proteínas totais, obtidos antes da realização da Estação de Monta (EM) em reprodutores Morada Nova..... 41
- TABELA 3** - Presença dos *spot's* e das prováveis proteínas e sua relação com a fertilidade nos grupos de Alta e Moderada fertilidade de ovinos da raça Morada Nova ..... 43
- TABELA 4** - Prováveis proteínas encontradas no grupo fertilidade alta (FA) identificadas pelo Banco de Dados *Uniprot* ..... 47

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- FIGURA 1** - Diagrama representando a distribuição em percentual dos *spot's* expressos nos grupos de fertilidade alta, fertilidade moderada e em ambos, encontrados no plasma seminal de ovinos Morada Nova ..... 43
- FIGURA 2** - Perfil proteico dos reprodutores ovinos Morada Nova com alta (FA) e moderada fertilidade (FM). À esquerda (vertical) valores de massa molecular (MW), que variam de 97 kDa a 14 kDa e acima (horizontal), valores do ponto isoelétrico (pI), variando de 4 a 7..... 44
- FIGURA 3** - Comportamento dos *spot's* e sua influência sobre a eficiência reprodutiva, parâmetros seminais e condição corporal dos reprodutores Morada Nova, através da análise de componentes principais, SAS (2012) ..... 46

## RESUMO GERAL

Estudos realizados atualmente buscam identificar nos animais domésticos marcadores moleculares proteicos de fertilidade, de modo a contribuir para os programas de melhoramento genético, embora poucos ainda sejam realizados em ovinos deslanados, como os da raça Morada Nova. Portanto, este trabalho teve como objetivo identificar possíveis proteínas seminais relacionadas à fertilidade de ovinos da raça Morada Nova, utilizando-se a técnica de Eletroforese Bidimensional (2DE). Seis reprodutores da raça Morada Nova, na faixa etária de quatro a seis anos e peso médio de 42 kg foram submetidos à coleta de sêmen, antes da estação de monta, para obtenção do plasma seminal e, posterior, análise eletroforética. As estações de monta tiveram duração de 45 dias e o diagnóstico de prenhez realizado 60 dias após o início das coberturas, mediante a ultrassonografia por imagem, onde foram classificados em dois grupos: Fertilidade Alta (FA) e Fertilidade Moderada (FM), com base na taxa de fertilidade média (82,65%). A 2DE foi conduzida de março a agosto/2016. Logo após esta etapa, os géis foram escaneados e comparados através do *Software ImageMaster 2D Platinum 7.0*, buscando quantificar e identificar os *spot's* presentes. Foi realizada Análise de Componentes Principais (ACP) e também da distribuição dos *spot's* presentes nos animais estudados, utilizando o programa estatístico SAS 9.3. Com o auxílio dessa análise foram detectados 160 *spot's* com maior expressão nos seis animais, os quais foram analisados pelo banco de dados *Uniprot*. Dentre os *spot's* mais expressivos encontrou-se 15% em ambos os grupos e 85% se apresentaram diferencialmente expressos (presentes ou ausentes) entre os grupos. Entre os *spot's* identificados, 26,88% foram encontrados nos dois reprodutores do grupo FA, enquanto que os quatro carneiros do grupo FM, apresentaram 58,12%. Entre os *spot's* observados no FA, constatou-se uma concentração de massas moleculares de baixo peso (8 kDa a 60 kDa), como também a identificação de proteínas ligadas exclusivamente à reprodução, como: Dynein light chain Tctex-type 3; Interferon tau-1 e Osteopontin. Possivelmente, uma ou mais das proteínas desse grupo possam vir a ser caracterizadas como marcadores de fertilidade, sobressaindo-se a Osteopontina.

**Palavras-chave:** Eletroforese 2DE; Fertilidade; Plasma Seminal

## GENERAL ABSTRACT

Current studies are aimed at identifying genetic markers of fertility in domestic animals, so contributing to genetic breeding programs, although few are still carried out on sheep such as the Morada Nova breed. Therefore, the objective of this work was to identify possible seminal proteins related to the fertility of Morada Nova sheep, using the technique of Two-dimensional Electrophoresis (2DE). Six breeders of Morada Nova breed, aged 4 to 6 years and mean weight of 42 kg were submitted to semen collection, before the breeding season, to obtain seminal plasma and, later, electrophoretic analysis. Mating seasons lasted 45 days and the diagnosis of pregnancy, at 60 days after the beginning of the mating, was performed by ultrasound imaging, identifying two groups: High Fertility (FA) and Moderate Fertility (FM), based on the mean fertility rate (82.65%). The 2DE was conducted from March to August / 2016. Soon after this step, the gels were scanned and compared through ImageMaster 2D Platinum 7.0 Software, seeking to quantify and identify the present spots. Principal Components Analysis (PCA) and also the distribution of the spots present in the animals were performed using the statistical program SAS 9.3. This analysis detected 160 spots with greater expression in the six animals, which were analyzed by the Uniprot database. Among the most expressive spots, 15% were found in both groups and 85% presented differentially expressed (present or absent) between groups. Among the spots identified, 26.88% were found in two animals from FA group, while the four sheep from FM group presented 58.12%. Among the spots observed in FA, a concentration of low molecular masses (8 kDa to 60 kDa) was observed, as well as the identification of proteins exclusively related to reproduction, such as: Dynein light chain Tctex-type 3; Interferon tau-1 and Osteopontin. Possibly, one or more of these proteins of this group can be characterized as markers of fertility, highlighting the protein Osteopontin.

**Keywords:** 2DE electrophoresis; Fertility; Seminal Plasma

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nos últimos anos vem ocorrendo uma crescente preocupação quanto a preservação, conservação e exploração das raças localmente adaptadas, presentes no Nordeste brasileiro. Isto se deve a presença de várias raças e/ou tipos raciais adaptados às condições climáticas da região. A elevada utilização de cruzamentos indiscriminados com raças exóticas em nossa região, buscando o aumento produtivo é um dos fatores responsáveis pela diminuição do efetivo desses animais, pois essas vão caindo no esquecimento dos produtores e isso pode acelerar a perda da variabilidade genética podendo até levar a extinção de algumas raças.

Os ovinos da raça Morada Nova se enquadram perfeitamente neste cenário. Estes animais apresentam relevante destaque devido a prolificidade e rusticidade, caracterizando-se dessa forma como uma boa alternativa para o Nordeste do Brasil na produção animal. Surge então as ferramentas biomoleculares para investigar essas características nestas raças sob o ambiente de exploração com destaque para o quadro espermático e suas correlações com a fertilidade.

Somando-se a esses fatores, a bioquímica espermática e seu metabolismo proporcionam conhecimentos importantes sobre os processos envolvidos na fertilização. Através de estudos moleculares, com ênfase na proteômica, pretende-se identificar no plasma seminal de ovinos da raça Morada Nova alguns componentes/proteínas relacionados à fertilidade.

Cabe aos profissionais da área buscar ferramentas para a utilização nos diversos sistemas de produção desta raça por meio da aplicação da biologia molecular. E, no caso em questão, a proteômica, buscando a sua caracterização, identificando marcadores eficientes para a escolha de animais com produtividade comprovada, agregando valor e conseqüentemente sua importância no mercado.

Na primeira etapa deste estudo foi realizada uma abordagem referencial sobre os principais tópicos relacionados à linha de pesquisa do Projeto: 1. Caracterização da raça Morada Nova; 2. Composição do plasma seminal e funções das proteínas presentes neste; 3. Descrição da técnica proteômica Eletroforese Bidimensional (2DE). Neste contexto, foi abordada a função de biomarcadores e sua importância na produção animal.

E na segunda etapa foram executadas as análises eletroforéticas do plasma seminal e posterior análise dos géis através do *Software ImageMaster 2D Platinum 7.0*. Em seguida foi utilizado o banco de dados *Uniprot* para catalogação dos principais *spot's*, utilizando-se o ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MW) dos mesmos para



identificação das possíveis proteínas encontradas nos animais estudados. Ao final, foi realizado uma relação/paralelo entre as possíveis proteínas encontradas e os valores para taxa de fertilidade, parâmetros seminais e de condição corporal.

Este estudo teve como objetivo relacionar a fertilidade de ovinos da raça Morada Nova com a presença de possíveis proteínas através da técnica de Eletroforese Bidimensional (2DE).

**CAPÍTULO 1**  
**REFERENCIAL TEÓRICO**

## **Descrição e Caracterização dos Ovinos da raça Morada Nova**

São animais que pesam em média 30 kg, com perímetro torácico entre 65-78 cm e altura da cernelha de 60-65 cm. Apresentam pelagem que varia do vermelho ao preto e podem ser encontrados também na cor branca. Os machos podem ou não possuir chifres e as fêmeas são mochas (DOMINGUES, 1954).

É uma raça que demonstra relevância social e econômica dentre as outras raças localmente adaptadas de ovinos do Nordeste brasileiro. Segundo Sousa *et al.* (2003), a raça Morada Nova se sobressai pela aclimação ao ambiente tropical, além de apresentar características importantes para o seu desenvolvimento em nossa região, como: precocidade sexual, fertilidade, prolificidade, habilidade materna, a não estacionalidade reprodutiva, rusticidade e pequeno porte.

Segundo Machado *et al.* (1999), as ovelhas deslanadas exibem uma capacidade reprodutiva excepcional por serem fêmeas poliétricas anuais, não estacionais, manifestam estro, ovulam e parem durante o ano inteiro. Esses animais apresentam bons índices de prolificidade por exibir uma elevada concepção, baixa mortalidade embrionária, reduzida taxa de abortos e partos normais. De acordo com Muniz *et al.* (2010), a média para prolificidade da raça Morada Nova estaria em torno de 1,38 crias por parto. Devido a essas particularidades importantes, pode-se falar que a raça Morada Nova demonstra recurso genético para aplicação em sistemas de produção animal no Brasil, especialmente no Nordeste (FACÓ *et al.*, 2009).

O desempenho reprodutivo dos carneiros na região Nordeste do Brasil sofre interferência, sobretudo, do sistema de exploração (predominantemente extensivo) e da nutrição deficiente fornecida. Outros aspectos, tais como: saúde, raça e idade também influenciam no desempenho reprodutivo da espécie. Nos ovinos deslanados a puberdade é atingida muito cedo, entre o quarto e sexto mês de vida, sendo o peso corporal um fator importante para o início da vida reprodutiva desses animais. Logo após a puberdade, culminando com a espermatogênese, ocorre a melhoria da qualidade seminal de forma gradativa, fazendo o animal alcançar rapidamente a maturidade sexual (MOREIRA *et al.*, 2001).

No Nordeste brasileiro, onde o clima tropical é predominante, a elevada temperatura ambiental, observada no segundo semestre do ano, é um fator que influencia à eficiência reprodutiva, uma vez que afeta o processo de termorregulação testicular, agindo negativamente sobre a espermatogênese e, dessa forma, diminui a qualidade

seminal. As principais características seminais afetadas pelas elevadas temperaturas são a morfologia, a concentração, o vigor e a motilidade espermática (CHEMINEAU *et al.*, 1991).

As características seminais apresentam peculiaridades, podendo ainda influenciar sobre essas raças os fatores ambientais e nutricionais. A cor predominante do sêmen do carneiro apresenta tonalidade pérola ou marfim e o ejaculado exhibe um volume oscilando de 0,5 a 2,0 mL. A concentração espermática por sua vez oscila entre dois e cinco bilhões de espermatozoides/mL. Animais com bom estado de saúde e bem alimentados apresentam facilmente ejaculados com 90% para motilidade e concentração espermática superior a três bilhões de espermatozoides/mL (MOREIRA *et al.*, 2001).

### **Composição e Função do Plasma Seminal**

De acordo com Mann (1978) o plasma seminal pode ser definido como um fluido fisiológico proveniente das glândulas sexuais acessórias (Próstata, Glândulas Vesiculares, Ampola e Bulbouretrais), com funções essenciais na fisiologia espermática. Moura *et al.* (2007) relatam ainda que o plasma seminal dos ruminantes é uma secreção complexa formada por diferentes fluidos encontrados em vários segmentos do trato reprodutivo do macho, tais como testículos e epidídimos (Cabeça, Corpo e Cauda).

O líquido seminal é composto por diversas substâncias, dentre elas as proteínas, que apresentam importantes funções nos mecanismos ligados à integridade dos espermatozoides quando armazenados no epidídimo e também quando depositados no trato genital feminino (KRAUS *et al.*, 2005). Todo esse trânsito pode desencadear distúrbios e alterações na formação e na manutenção da qualidade dos espermatozoides (HINTON *et al.*, 1995). Devido a isto, o estudo funcional das proteínas é importante para a eficiência reprodutiva do macho. O plasma seminal dos ruminantes apresenta sua composição proteica variável, sendo a espécie e a estação do ano fatores de maior relevância (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Estudos de Maxwell e Johnson (1999) relataram que este fluido apresenta ação tamponante para as células espermáticas, atuando ainda como meio nutritivo. Além do mais, o líquido seminal possui uma diversidade de componentes moleculares que compreendem minerais, nucleotídeos, ácido cítrico, aminoácidos livres, açúcares, prostaglandinas e proteínas (SHIVAJI *et al.*, 1990).

A grande maioria das proteínas seminais tem origem no epidídimo e nas glândulas sexuais acessórias que se relacionam com os componentes da membrana espermática envolvidos em vários processos regulatórios integrados, e demais vertentes da capacidade fertilizante do macho (MOURA *et al.*, 2007). Estas funções englobam proteção das células espermáticas, motilidade, capacitação dos espermatozoides, reação acrossômica, fecundação e desenvolvimento embrionário (MOURA *et al.*, 2010), podendo ainda precaver e contornar efeitos negativos na membrana espermática causados pelo choque térmico (BARRIOS *et al.*, 2000; PÉREZ-PÉ *et al.*, 2001).

Inúmeras proteínas agem juntamente com o plasma seminal beneficiando os parâmetros espermáticos, as ações desses polímeros de aminoácidos apresentam diversas funções importantes em vários aspectos reprodutivos envolvendo o fluído seminal (BANERJEE e GANGULI, 1971).

A Glutathione Peroxidase (GSHPx) é uma proteína enzimática que age reduzindo os impactos negativos das toxinas sobre as substâncias provenientes do epidídimo (DACHEUX *et al.*, 2005). Esta enzima demonstrou importante função ao combater, em carneiros, o estresse oxidativo do plasma seminal, mantendo assim a qualidade dos gametas masculinos (CASAO *et al.*, 2010).

A Albumina Seminal apresenta uma predisposição para remover os peróxidos de lipídios da membrana espermática, ajudando na proteção dos espermatozoides (ALVAREZ e STOREY, 1983), além de apresentar uma relação integrada entre a quantidade de espermatozoides viáveis e normais em ejaculado de bovinos (ELZANATY *et al.*, 2007).

A Clusterina por sua vez apresenta correlação positiva com o líquido seminal e a criopreservação do sêmen, propondo que essa proteína apresenta efeito sobre o trajeto e distribuição de lipídios no plasmalema (membrana plasmática), propiciando uma queda acentuada nos danos à membrana espermática durante a congelação do sêmen (JOBIM *et al.*, 2004). Esta proteína se destaca por preconizar funções protetoras importantes aos gametas masculinos que agem como chaperona (proteínas expressas em resposta a elevação de temperatura), diminuindo a citotoxicidade da precipitação proteica induzida por estresses celulares e solubilizando proteínas desestruturadas de forma parcial (HUMPHREYS *et al.*, 1999).

Também, a Clusterina apresenta funções relacionadas ao epidídimo, como à maturação espermática (TENNISWOOD *et al.*, 1992) e o remodelamento da membrana espermática (HUMPHREYS *et al.*, 1999).

As proteínas vinculadas aos espermatozoides (BSP's) são moléculas que se ligam aos fosfolipídios e são encontradas com frequência no plasma seminal de diversas espécies, como bovinos, caprinos e ovinos (REGO *et al.*, 2010). As BSP's são liberadas pelas glândulas sexuais acessórias e compreendem cerca de 35% do total de proteínas produzidas pelos ruminantes domésticos (LIMA *et al.*, 2011). Várias pesquisas relatam que as BSP's no ato da ejaculação se unem aos espermatozoides, proporcionando a retirada dos fosfolipídios e colesterol, aumentando dessa forma a capacitação dos espermatozoides, pois ocorre a redução da relação colesterol:fosfolipídio (THÉRIE *et al.*, 1999). Além do mais, as BSP's ligam-se à membrana espermática no decorrer do percurso até o trato reprodutor da fêmea (SOUZA *et al.*, 2008), e chegando ao oviduto, contribuem na interação entre os espermatozoides e o epitélio do oviduto (GWATHMEY *et al.*, 2006).

A proteína seminal Osteopontina (OPN) expressa uma associação relevante com os índices de fertilidade analisados por meio das taxas de não retorno ao estro em vacas *Bos taurus* inseminadas (KILLIAN *et al.*, 1993; MOURA *et al.*, 2006). A OPN se destaca em várias funções, dentre as quais podemos citar a sua forte adesão celular, o que explica sua atração na relação entre os espermatozoides e os oócitos (GONÇALVES *et al.*, 2007).

A suposta ação funcional provocada pela OPN sobre a fertilidade (MOURA, 2005) é sustentada pelo fato de que no decorrer do processo de ejaculação esta proteína, oriunda do fluido das glândulas sexuais acessórias, junta-se à membrana espermática através das integrinas, formando um grupo OPN-Integrinas que funciona juntamente com os receptores na membrana oocitária (D'CRUZ, 1996). Além de agir fortemente sobre a interação dos gametas sexuais no processo de fertilização é possível que a OPN estimule ondas sinalizadoras no interior das células, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento embrionário (MOURA, 2005).

E ainda há um grupo de enzimas conhecido pelo nome de Calicreína-Cininas que provoca uma melhora na motilidade das células espermáticas em bovinos e ovinos (BRATANOV *et al.*, 1978) por intermédio da atuação das cininas que é originada através do produto final da relação da enzima calicreína com o cininogênio encontrado no fluido seminal (FINK *et al.*, 1990). Essa carboxipeptidase acarreta a criação da angiotensina II que se une com receptores existente no fragmento mediano e fundamental dos espermatozoides, impulsionando dessa forma a motilidade espermática (VINSON *et al.*, 1996).

## Proteômica

A palavra proteína foi utilizada pela primeira vez pelo químico sueco Jons Jacob Berzelius no ano de 1938 para relatar um tipo específico de macromoléculas composta por uma cadeia linear de aminoácidos e que se apresentava em grandes quantidades nos organismos vivos (TWYMAN, 2004).

As proteínas podem ser definidas como um conjunto de polímeros de aminoácidos resultantes da tradução das informações genéticas inseridas no DNA das células. O termo proteína vem do grego “*proteios*” e significa “a mais importante”. Sem dúvida, as proteínas compõem um grupo de moléculas indispensáveis para todos os seres vivos. Por conta da sua diversidade funcional, as proteínas exercem um importante papel em diversos fenômenos biológicos, como a produção de energia, a defesa imunológica, a contração muscular, a atividade neuroquímica e a reprodução (SOUZA *et al.*, 2008).

As moléculas de proteínas podem ser descritas também como co-polímeros de condensação de até 20 aminoácidos de formação natural, apresentando diferenças, apenas entre suas cadeias laterais. Existem milhares de tipos distintos de proteínas e bilhões de combinações possíveis, onde cada uma irá desempenhar uma função específica no organismo (ATKINS e JONES, 2001).

A proteômica utiliza diversos métodos bioquímicos para estudar as proteínas em larga escala. O termo proteômica vem sendo associado, rotineiramente, a identificação e caracterização de um enorme número de proteínas de uma linhagem celular ou organismo por meio de suas ferramentas, sendo os géis bidimensionais uma das mais utilizadas (GALDOS, 2009). Isso influenciou diretamente na criação de um banco de dados para registro e catalogação das proteínas visualizadas e identificadas por meio dessas técnicas moleculares.

O termo proteoma foi proposto por Bergey e Holt em 1994, definido como sendo o conteúdo total de proteínas encontradas em um genoma ou, no caso de organismos multicelulares, ao complemento proteico expresso por um tecido ou células diferenciadas (WILKINS *et al.*, 1996). Depois do sequenciamento do genoma de diversos organismos o meio acadêmico percebeu que, para o entendimento da função gênica em sua plenitude, era preciso o estudo aprofundado e em larga escala das proteínas expressas. Foi verificado que, além de muito importante, o estudo das sequências de nucleotídeos nem sempre retrata uma relação direta com os níveis de proteínas expressas e, conseqüentemente, de atividade biológica (GYGI *et al.*, 1999).

De acordo com Wasinger *et al.* (1995), o proteoma é composto por um conjunto de proteínas exibidas por um organismo em um determinado momento. Abrange desde técnicas destinadas para o estudo em larga escala de expressões proteicas (proteoma) como para técnicas empregadas nas análises das imperfeições biológicas. Existe uma elevada correlação entre os conhecimentos proteômicos e genômicos, visto que analisam a distribuição das proteínas presentes em um determinado sequenciamento de genes (SOUZA *et al.*, 2012).

Inúmeras pesquisas a respeito do proteoma sustentam-se em técnicas de separação e localização simultânea de proteínas usando ferramentas modernas como a 2DE e cromatografias, vinculados a mecanismos cada vez mais sensíveis e eficazes na quantificação de proteínas como a espectrometria de massas (WITTMANN-LIEBOLDET *et al.*, 2006).

O genoma de um organismo permanece relativamente estável ao longo da vida. No entanto o proteoma é extremamente dinâmico e variável. A análise proteômica permite saber como determinado gene está sendo expresso, a concentração relativa desse produto e, por fim, as variações que podem ocorrer nessas proteínas após a sua tradução (GALDOS, 2009). Dessa forma, o desenvolvimento impulsiona o crescimento de novas tecnologias para o estudo deste conjunto de proteínas expressas. Estas técnicas passaram então, a ser denominadas ferramentas da proteômica (AEBERSOLD *et al.*, 2000).

A proteômica pode ser dividida em três principais áreas: 1. Microcaracterização proteica na determinação em larga escala de proteínas e suas variações pós-traducionais; 2. Manifestação da diferença entre as comparações dos níveis de proteína com aplicação potencial em uma ampla faixa de doenças; e 3. Estudos das interações proteína-proteína usando diferentes técnicas, a exemplo a espectrometria de massa (PANDEY; MANN, 2000).

A utilização de *softwares* especializados proporcionam a comparação de diferentes géis por meio do cruzamento de bases de dados detalhadas do proteoma disponibilizadas na internet. Com isso, um processo de subtração é realizado de maneira automática, onde as diferenças, como a presença, ausência, ou intensidade das proteínas entre amostras de animais sadios e doentes podem ser expressas.



## **Eletroforese Bidimensional (2DE)**

A eletroforese unidimensional (SDS-PAGE), consiste numa ferramenta que propicia a separação dos polipeptídios levando em consideração os seus pesos moleculares. Essa técnica é conduzida em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS) (BERKELMAN e STENSTEDT, 2002). Enquanto a Eletroforese Bidimensional (2DE) demonstra uma maior precisão para separar misturas complexas, sendo mais eficiente que o processo de SDS-PAGE onde as bandas proteicas tendem a se sobrepor. Dessa forma, as técnicas unidimensionais de separação podem diferenciar uma quantidade relativamente pequena de proteínas onde na maioria das vezes, não ultrapassa 50 *spot's*.

A 2DE teve seus fundamentos introduzidos em 1975, por Klose, na Alemanha, e O'Farrell, nos Estados Unidos. Essa técnica combina a focalização isoeétrica e a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida. Nesse processo as proteínas são separadas em duas etapas: na primeira, a focalização isoeétrica irá utilizar o ponto isoeétrico (pI) para a divisão e, na segunda, as proteínas são separadas de acordo com sua massa molecular (MW), a qual é obtida através da eletroforese em gel de poliacrilamida na separação e no mapeamento proteico (GALDOS, 2009).

Esta ferramenta integra dois diferentes processos de separação, apresentando a capacidade de separar mais de 1.000 proteínas num único gel (ANDERSON e ANDERSON, 1996; GALDOS, 2009). Devido a este fato, sua utilização ocorre de forma ampla e acontece, principalmente em experimentos qualitativos. Este método se destaca pelo alto poder de resolução e por sua boa reprodutibilidade quando usado para separar soluções complexas de proteínas, capaz de detectar estas macromoléculas mesmo em baixa abundância e hidrofóbicas (BALTIMORE, 2001; ALAOUJ-JAMALI e XU, 2006).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBERSOLD, R.; HOOD, L. E.; WATTS, J. D. Equipping scientists for the new biology. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 359, 2000.
- ALAOUI-JAMALI, M. A.; XU, Y. J. Proteomic technology for biomarker profiling in cancer: an update. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 7, p. 411-420, 2006.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O<sub>2</sub> toxicity due to lipid peroxidation. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 1129-1136, 1983.
- ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L. Twenty years of Two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**, v. 17, p. 443-453, 1996.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o médio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, p. 914, 2001.
- BALTIMORE, D. "Our genome unveiled". **Nature**, v. 409, p. 814-816, 2001.
- BANERJEE, A. K.; GANGULI, N. C. Differentiation of semen from *Bos bubalus* and *Bos Taurus indicus* by starch gel electrophoresis. **Journal of Animal Science**. Stanford, v. 32, 1971.
- BARRIOS, B.; PEREZ-PE, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIÁN PÉREZ, J. A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1531-1537, 2000.
- BERGEY, D. H.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Williams e Wilkins, 9<sup>a</sup> Edição, 1994.
- BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T. 2-D Electrophoresis using Immobilized pH Gradients: Principles & Methods. 2<sup>o</sup> edition. Uppsala, Sweden, **Amersham Biosciences**. p. 220, 2002.
- BRATANOV, K.; SOMLEV, B.; DOYCHEVA, M.; TORNYOV, A.; EFREMOVA, V. Effect of kallikrein on the motility of bull and ram spermatozoa after deep freezing. **Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences**, v. 31, p. 1337-1338, 1978.
- CASAO, A.; CEBRIÁN, I.; ASUMPCÃO, M. E.; PÉREZ-PÉ, R.; ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 11, p. 59, 2010.
- CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. Rome: FAO, p. 222, 1991. (FAO Animal Production and Health, n.83).

DACHEUX, J. L.; CASTELLA, S.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 63, p. 319-341, 2005.

D'CRUZ, O. J. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevant to infertility. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 161-176, 1996.

DOMINGUES, O. Sobre a origem do carneiro deslanados do Nordeste. Fortaleza: Seção do Fomento Agrícola no Ceará, p. 24, 1954. (**Seção de fomento agrícola no Ceará**. Publicação, 3).

ELZANATY, S.; ERENPREISS, J.; BECKER, C. Seminal plasma albumin: origin and relation to the male reproductive parameters. **Andrologia**, v. 39, p. 60-65, 2007.

FACÓ, O.; LOBO, R. N. B.; BOMFIM, M. A. D.; DE LIMA JÚNIOR, F. E. B.; SILVA, D. C. C.; NOBRE, J. A. Teste de desempenho individual de reprodutores da raça Morada Nova: resultados da prova em Morada Nova, CE-2008. Sobral: Embrapa Caprinos, 2009. On line. (**Embrapa Caprinos. Documentos, 91**).

FINK, E.; SCHILL, W. B.; MISKA, W. Kinin-containing kininogen activity in blood plasma, urine and saliva. **Advances in Experimental Medical Biology**, v. 247, p. 311-316, 1990.

GALDOS, A. C. R.; REZENDE, L. C.; PESSOLATO, A. G. T.; MIGLINO, M. A. A relação biológica entre o saco vitelino e o embrião. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 6, p. 1-13, 2010.

GONÇALVES, R. F.; WOLINETZ, C. D.; KILLIAN, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins ( $\alpha v$  and  $\alpha 5$ ) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 67, p. 468-474, 2007.

GYGI, S. P.; RIST, B.; GERBER, S. A.; TURECEK, F.; GELB, M. H.; AEBERSOLD, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 994-999, 1999.

GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; MUELLER, J. L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S. S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 501-507, 2006.

HINTON, B. T.; PALLADINO, M. A.; RUDOLPH, D.; LABUS, J. C. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, p. 731-745, 1995.

HUMPHREYS, D. T.; CARVER, J. A.; EASTERBROOK-SMITH, S. B.; WILSON, M. R. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 6875-6881, 1999.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel

electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with sêmen freezability. **Theriogenology**, v. 61, p. 255-266, 2004.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. **Human Genetic**, v. 26, p. 231-243, 1975.

KRAUS, M.; TICHÁ M.; ZELEZNÁ, B. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, p. 33-46, 2005.

LIMA, I. C.; ROCHA, D. R.; SALLES, M. G.; MARTINS, J. A.; SOUZA, M.; SOUZA, C. E.; OLIVEIRA, J. T. A.; ARAÚJO A. A.; MOURA, A. A. Reproductive criteria and seminal plasma proteins in rams and goats raised under conditions of heat stress in the Brazilian Northeast. In: North American Testis Workshop, 21, Montreal, QC, Canada. Schaumburg IL: **American Society of Andrology**, 2011.

MACHADO, J. B. B.; FERNANDES, A. A. O.; SELAIVE-VILLAROEL, A. B.; COSTA, A. L.; LIMA, R. N.; LOPES, E. A. Parâmetros reprodutivos de ovinos deslanados Morada Nova e Santa Inês mantidos em pastagem cultivada, no estado do Ceará. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 1, p. 205-210, 1999.

MANN, T. Experimental approach to the study of semen and male reproductive function. **Interlational Journal of Fertility and Sterility**, v. 23, p. 133-137, 1978.

MAXWELL, W. M. C. & JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, p. 1353-1362, 1999.

MOREIRA, E. P.; MOURA, A. A. A.; ARAÚJO, A. A. Efeito da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1704-1711, 2001.

MOURA, A. A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontina. **Animal Reproduction Science**, v. 2, p. 3-10, 2005.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididimal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 214-222, 2006.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 169-188, 2007.

MOURA, P. P.; FRANCO, M. M.; SILVA, T.; ROCHA, T. L.; LEAL, D. R.; PASSOS, P. I. B.; NEVES, J. P. Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do semen criopreservado em ovinos. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1154-1159, 2010.

MUNIZ, M. M. M.; SANTOS, T. N. M.; MELO NETO, F. V. O.; QUEIRÓZ, S. S. FACÓ, O. LOBO, R. N. B. Desempenho produtivo e reprodutivo de ovinos da raça morada nova no semiárido do ceará. In: VI Congresso Nordestino de Produção Animal. **Anais ... Mossoró – RN**, 2010.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, Massachusetts, v. 405, p. 837-846, 2000.

PÉREZ-PÉ, R.; BARRIOS, B.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. **Journal Chromatography B**, v. 760, p. 113-121, 2001.

REGO, J. P. A.; SOUSA, F.; SOUZA, C. E. A.; SOUZA, A. L.; GOZZO, F. C.; OLIVEIRA, J. T. A.; ARAÚJO, A. A.; MENEZES, E. S. B.; OLIVEIRA, R. V.; MOURA, A. A. Reproductive criteria of tropically-adapted Morada Nova Rams from Brazil. In: Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 43, **Portland, OR. Madison**, WI: SSR, 2010.

SHIVAJI, S.; SCHEIT, K. H.; BHARGAVA, P. M. **Proteins of seminal plasma**. New York: John Wiley, 1990. 526p.

SILVA, N. M. M. Proteínas do plasma seminal de ovinos da raça Morada Nova. **Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**, Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, Sobral, 2010.

SOUSA, W. H. de; LÔBO, R. N. B.; MORAIS, O. R. Ovinos Santa Inês: estado de arte e perspectivas. In: Simpósio Internacional Sobre O Agronegócio Da Caprinocultura Leiteira, 1.; Simpósio Internacional Sobre Caprinos E Ovinos De Corte, 2.; Espaço Aprisco Nordeste, 1., 2003, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, 2003. p. 501 - 522.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A.; MONACO, E.; KILLIAN, G. J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 72-89, 2008.

SOUZA, C. E. A.; REGO, J. P. A.; LOBO, C. H.; OLIVEIRA, J. T. A.; NOGUEIRA, F. S.; DOMONT, G. B.; MOURA, A. A. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Journal of Proteomics**. Article in press, 2012.

TENNISWOOD, M. P.; GUENETTE, R. S.; LAKINS, J.; MOOIBROEK, M.; WONG, P.; WELSH, J. E. Active cell death in hormone-dependent tissues. **Cancer Metastasis Review**, v. 11, p. 197-220, 1992.

TEIXEIRA, A. V. C.; ELOY, A. M. X.; FURTADO, J. R.; PINHEIRO, R. R.; PONTES, M. S. 1D mapping of seminal plasma proteins in Anglo-Nubian goats. **Animal Reproduction Science**, v. 6, p. 516-525, 2009.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid binding Proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 590-598, 1999.

TWYMAN, R. M. Strategies for protein identification. Principles of proteomics. York, UK. **BIOS Scientific Publishers**. Cap.3, p. 49-65, 2004.

VINSON, G. P.; MEHTA, J.; EVANS, S.; MATTHEWS, S.; PUDDEFOOT, J. R.; SARIDOGAN, E.; HOLT, W. V.; DJAHANBAKHCH, O. Angiotensin II stimulates sperm motility. **Regulatory Peptides**, v. 67, p. 131-135, 1996.

WASINGER, V. C.; CORDWELL, S. J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN J. X.; GOOLEY A. A.; WILKINS M. R.; DUNCAN M. W.; HARRIS R.; WILLIAMS K. L.; HUMPHERY-SMITH I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1090-1094, 1995.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 17, p. 830-838, 1996.

WITTMANN-LIEBOLDET, B.; GRAACK, H. R.; POHL, T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, p. 4688-4703, 2006.

## **CAPÍTULO 2**

### **APLICAÇÃO DA PROTEÔMICA NA SELEÇÃO DE REPRODUTORES OVINOS (*Ovis aries*) DA RAÇA MORADA NOVA**

## RESUMO

Estudos realizados atualmente buscam identificar nos animais domésticos marcadores moleculares proteicos de fertilidade, de modo a contribuir para os programas de melhoramento genético, embora poucos ainda sejam realizados em ovinos deslanados, como os da raça Morada Nova. Portanto, este trabalho teve como objetivo identificar possíveis proteínas seminais relacionadas à fertilidade de ovinos da raça Morada Nova, utilizando-se a técnica de Eletroforese Bidimensional (2DE). Seis reprodutores da raça Morada Nova, na faixa etária de quatro a seis anos e peso médio de 42 kg foram submetidos à coleta de sêmen, antes da estação de monta, para obtenção do plasma seminal e, posterior, análise eletroforética. As estações de monta tiveram duração de 45 dias e o diagnóstico de prenhez, realizado 60 dias após o início das coberturas, mediante a ultrassonografia por imagem, onde foram classificados em dois grupos: Fertilidade Alta (FA) e Fertilidade Moderada (FM), com base na taxa de fertilidade média (82,65%). A 2DE foi conduzida de março a agosto/2016. Logo após esta etapa, os géis foram escaneados e comparados através do *Software ImageMaster 2D Platinum 7.0*, buscando quantificar e identificar os *spot's* presentes. Foi realizada Análise de Componentes Principais (ACP) e também da distribuição dos *spot's* presentes nos animais estudados, utilizando o programa estatístico SAS 9.3. Com o auxílio dessa análise foram detectados 160 *spot's* com maior expressão nos seis animais, os quais foram analisados pelo banco de dados *Uniprot*. Dentre os *spot's* mais expressivos encontrou-se 15% em ambos os grupos e 85% se apresentaram diferencialmente expressos (presentes ou ausentes) entre os grupos. Entre os *spot's* identificados, 26,88% foram encontrados nos dois reprodutores do grupo FA, enquanto que os quatro carneiros do grupo FM, apresentaram 58,12%. Entre os *spot's* observados no FA, constatou-se uma concentração de massas moleculares de baixo peso (8 kDa a 60 kDa), como também a identificação de proteínas ligadas exclusivamente à reprodução, como: Dynein light chain Tctex-type 3; Interferon tau-1 e Osteopontin. Possivelmente, uma ou mais das proteínas desse grupo possam vir a ser caracterizadas como marcadores de fertilidade, sobressaindo-se a Osteopontina.

**Palavras-chave:** Eletroforese 2DE; Fertilidade; Plasma Seminal



## ABSTRACT

Current studies are aimed at identifying genetic markers of fertility in domestic animals, so contributing to genetic breeding programs, although few are still carried out on sheep such as the Morada Nova breed. Therefore, the objective of this work was to identify possible seminal proteins related to the fertility of Morada Nova sheep, using the technique of Two-dimensional Electrophoresis (2DE). Six breeders of Morada Nova breed, aged 4 to 6 years and mean weight of 42 kg were submitted to semen collection, before the breeding season, to obtain seminal plasma and, later, electrophoretic analysis. Mating seasons lasted 45 days and the diagnosis of pregnancy, at 60 days after the beginning of the mating, was performed by ultrasound imaging, identifying two groups: High Fertility (FA) and Moderate Fertility (FM), based on the mean fertility rate (82.65%). The 2DE was conducted from March to August / 2016. Soon after this step, the gels were scanned and compared through ImageMaster 2D Platinum 7.0 Software, seeking to quantify and identify the present spots. Principal Components Analysis (PCA) and also the distribution of the spots present in the animals were performed using the statistical program SAS 9.3. This analysis detected 160 spots with greater expression in the six animals, which were analyzed by the Uniprot database. Among the most expressive spots, 15% were found in both groups and 85% presented differentially expressed (present or absent) between groups. Among the spots identified, 26.88% were found in two animals from FA group, while the four sheep from FM group presented 58.12%. Among the spots observed in FA, a concentration of low molecular masses (8 kDa to 60 kDa) was observed, as well as the identification of proteins exclusively related to reproduction, such as: Dynein light chain Tctex-type 3; Interferon tau-1 and Osteopontin. Possibly, one or more of these proteins of this group can be characterized as markers of fertility, highlighting the protein Osteopontin.

**Keywords:** 2DE electrophoresis; Fertility; Seminal Plasma

## INTRODUÇÃO

Os ovinos da raça Morada Nova apresentam elevada prolificidade aliada a uma boa habilidade materna (SOUZA *et al.*, 2003). Dessa forma, é possível produzir um maior número de cordeiros de forma econômica e sustentável, até mesmo em épocas do ano que apresentam condições menos favoráveis à produção animal. A eficiência reprodutiva é o principal fator para o aumento da lucratividade do rebanho, sendo a taxa de fertilidade, em grande parte, influenciada pelo macho. A fertilidade do reprodutor é avaliada pela capacidade de fecundar um maior número de fêmeas, variando entre os animais domésticos, de 50 a 80%, valor esse que vai depender da capacidade funcional do sêmen ejaculado e também das condições das fêmeas na Estação de Monta (LOVE e KENNEY, 1998).

O potencial reprodutivo dos ovinos, em geral é estimado a partir de parâmetros da qualidade do sêmen após avaliações *in vitro*. Essas avaliações incluem métodos convencionais, como estimativas de motilidade e vigor, morfologia espermática ou aspectos ligados à atividade funcional da célula, tais como a capacitação espermática e a reação acrossômica. Aliado a isso, diversas proteínas do plasma seminal exercem funções distintas em diferentes estágios do processo de fertilização. Além de influenciar no equilíbrio osmótico e na inibição imunológica, algumas proteínas, especialmente enzimas catalíticas estão envolvidas no metabolismo espermático.

O plasma seminal tem sido objeto de estudo de várias linhas de pesquisa, sob a justificativa da sua importância na viabilidade espermática, principalmente em relação às proteínas, por estarem em maior concentração do que outros componentes e, por participarem ativamente do processo de fecundação (BELLIN *et al.*, 1998). Durante muitos anos ele foi considerado apenas como um meio de transporte e sustentação dos espermatozoides, desde a ejaculação até a fertilização (KRAUS, 2005; TROEDSSON *et al.*, 2005). Porém, Wolfe *et al.* (1993), baseando-se nas diferenças apresentadas na qualidade seminal com o uso de bovinos férteis e com degeneração testicular experimental, sugeriram que os componentes do plasma seminal influenciavam na fertilidade do macho.

De acordo com Gasset (1997), Mortarino (1998) e Roncoletta *et al.* (1999), os perfis eletroforéticos do plasma seminal auxiliam na avaliação clínica em casos de infertilidade em touros. Já as proteínas solúveis e estruturais têm um importante papel no metabolismo

do espermatozoide, com interferência na fertilidade dos touros (KILLIAN, 1999; RONCOLETTA et al., 1999).

A descoberta da influência da composição proteica seminal sobre o desempenho reprodutivo observado por pesquisadores utilizando técnicas proteômicas já difundidas na medicina humana para identificar, quantificar e estudar as alterações constantes ocorridas na composição proteica das células, tecidos ou ainda organismos, ajudaram a caracterizar e selecionar animais com o perfil proteico desejável. A análise proteômica abrange os mais diferentes segmentos da pesquisa, tendo atuação no reconhecimento da expressão proteica em animais submetidos a uma determinada condição e também na identificação do nível da expressão proteica quando ocorre modificações nas condições de exploração animal (VISPO, 2004).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi identificar proteínas do plasma seminal ligadas à fertilidade através da utilização da proteômica em ovinos da raça Morada Nova.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local de Execução e Período Experimental

O experimento foi realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada na Estrada Sobral/Groaíras, km 4, Sobral-CE, na região Norte do Ceará, semiárido nordestino.

Os animais utilizados foram acompanhados de 2014 a 2016 quanto ao exame andrológico e avaliação da fertilidade através das Estações de Monta (EM). Concomitantemente, o plasma seminal foi obtido e armazenado para posterior realização da proteômica, que teve duração de seis meses (Março à Agosto/2016). Nesta etapa houve coleta de material quanto aos parâmetros reprodutivos, andrológicos e seminais dos reprodutores analisados no presente estudo.

### Animais experimentais e Manejo nutricional

Foram utilizados o plasma seminal, os parâmetros espermáticos e a taxa de fertilidade de seis reprodutores (33, 220, 231, 237, 319 e 740) da raça Morada Nova. Os exames andrológicos foram realizados 45 dias antes do início da EM, sendo esta com a mesma duração.

Todos os reprodutores utilizados no estudo são ovinos (*Ovis aries*) da raça Morada Nova pertencentes ao plantel da Embrapa Caprinos e Ovinos.

Os reprodutores apresentaram peso vivo de  $42,0 \pm 4,0$  kg, estavam clinicamente saudáveis, maduros sexualmente e com idade de quatro a seis anos. Durante o período do estudo os animais foram explorados de forma semi-intensiva, recebendo feno e 300 g de ração concentrada, composta de 70% de milho, 28% de farelo de soja e 2% de calcário, no cocho, pela manhã, além de sal mineral e água *ad libitum*. Em seguida, os reprodutores eram liberados no pasto nativo, sendo recolhidos no final da tarde.

### Execução do Experimento

#### ✓ Exame andrológico e Coleta de sêmen

Consistiu na avaliação do sistema reprodutor do macho e da qualidade do sêmen, o qual foi colhido em vagina artificial, modelo curto (MIES FILHO, 1962), no período da manhã, entre às 08:00 e 10:00 horas, utilizando uma fêmea como “manequim,” estroginada com aplicação intramuscular de 1 mL de Cipionato de Estradiol (ECP). Após a coleta, foram feitas as anotações do volume do ejaculado (mL); do aspecto (Aquoso;

Leitoso; Leitoso espesso; Cremoso; Cremoso espesso); da concentração espermática ( $\times 10^9$ /espermatozoides/mL); da motilidade individual progressiva (MIP, %) e do vigor (1-5), segundo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Em seguida o sêmen foi centrifugado a 1500 g, a 4 °C, durante 30 min para separação do plasma seminal e seu armazenamento, em freezer - 80 °C.

Na avaliação da concentração espermática, 20  $\mu$ l de sêmen foi diluído em 8 mL de solução de Cloreto de Sódio (NaCl) a 3%. O tubo foi levado ao espectrofotômetro e realizada a leitura em absorvância no comprimento de onda de 595 nanômetros (nm).

#### ✓ **Estação de monta**

As estações de monta (EM) foram realizadas no período seco, entre novembro e dezembro com duração de 45 dias, evitando-se o efeito EM sobre o desempenho reprodutivo dos animais estudados. As fêmeas, também foram submetidas a uma avaliação clínica.

Os reprodutores foram levados ao Centro de Manejo onde as fêmeas se encontravam uma semana antes do início das coberturas, para que houvesse uma adaptação ao local e também provocar nas fêmeas o efeito macho, o que influenciou no aparecimento do estro destas, facilitando a realização das coberturas. Para isso, os reprodutores ficaram em baias individuais, tendo contato visual com as fêmeas para estimular o aparecimento do estro.

O processo de cobertura das fêmeas era iniciado com a passagem do rufião, macho vasectomizado, com libido ativa, mas impossibilitado de fertilizar as fêmeas, visando a identificação do estro. A fêmea quando identificada no estro pela manhã era coberta no período da tarde, e se a identificação fosse feita à tarde, a mesma deveria ser coberta na manhã do dia seguinte. Após um período de 24 horas da primeira cobertura era feito uma repetição com o intuito de garantir a fertilização efetiva da fêmea. Aliado a isso, um “repasso” de cobertura foi realizado em fêmeas que ainda estivessem receptivas ao macho.

A relação macho-fêmea foi variável de acordo com a disponibilidade dos animais. Essa variação se deu devido a vários fatores, podendo-se citar como principal o fato do rebanho pertencer ao núcleo de conservação de raças localmente adaptadas, sendo necessário a utilização de uma quantidade expressiva de reprodutores com o objetivo de aumentar a variabilidade genética (Tabela 1).

**Tabela 1:** Número de fêmeas cobertas, diagnóstico de prenhez e taxa fertilidade de animais da raça Morada Nova no período de 2014 a 2016.

<b>Reprodutor</b>	<b>Estação de Monta (EM)</b>	<b>Fêmeas Cobertas</b>	<b>Fêmeas Prenhas</b>	<b>Taxa de Fertilidade (%)</b>
<b>33</b>	2014	9	6	66,6
	2015	4	3	75
	2016	7	7	100
<b>220</b>	2014	---	---	---
	2015	11	8	72,7
	2016	19	17	89,47
<b>231</b>	2014	7	6	85,7
	2015	5	4	80
	2016	6	4	66,6
<b>237</b>	2014	---	---	---
	2015	8	7	87,5
	2016	---	---	---
<b>319</b>	2014	6	5	83,3
	2015	6	4	66,6
	2016	---	---	---
<b>740</b>	2014	---	---	---
	2015	9	8	88,9
	2016	4	4	100

Ao término da EM, após 30 dias foi realizado o diagnóstico de prenhez, através da ultrassonografia por imagem. A taxa de fertilidade de cada animal foi calculada dividindo-se o número de matrizes prenhez pelo número de matrizes cobertas, multiplicando-se esse resultado por 100 para se obter o percentual. Com base na taxa de fertilidade média (82,65%) os reprodutores foram classificados em dois grupos: Fertilidade Alta (FA) e Fertilidade Moderada (FM).

#### ✓ **Análise das proteínas totais**

Para a quantificação das proteínas totais do ejaculado, o sêmen foi centrifugado a 1500 g a 4 °C durante 30 min, para obtenção do plasma seminal. As proteínas totais do plasma seminal foram quantificadas seguindo a metodologia de Bradford (1976). Esse estudo foi preciso ser feito, pois a partir do mesmo se calculou a quantidade de amostra a ser utilizada no gel de eletroforese bidimensional (2DE).

## ✓ Eletroforese Bidimensional (2DE)

### ➤ *Focalização Isoelétrica*

Uma vez preparada a solução de reidratação das “tiras” (pH 4 – 7) iniciado com a descongelação da solução uréia/tiouréia 9 M e depois adição de 5 µl de IPG buffer, seguido de 10 mg de DTT e 10 mg de CHAPS. Ao final desse processo ter-se-á: uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 65 mM, CHAPS 1 % p/v, IPG buffer 0,5 % v/v e azul de bromofenol 0,002 % p/v em um volume de 1 mL. Essa quantidade de 1 mL foi utilizada na reidratação de quatro tiras, sendo duplicatas de dois animais. Foi pipetado 250 µl da solução de reidratação em cada slot (canaleta) espalhando lentamente no tamanho semelhante da tira.

O filme que protege o gel da tira foi removido e logo em seguida esta foi colocada no slot do IPG Box com o lado do gel voltado para baixo. Posteriormente o slot contendo a tira foi coberto com cerca de 3 mL de *cover fluid* começando da extremidade em direção ao centro. A reidratação com a amostra ocorreu por 16 h durante a noite (overnight).

As tiras foram colocadas no *manifold* (suporte que recebe as tiras) que por sua vez se encaixa na plataforma do IPGphor III. Logo após, foi posicionado os eletrode pads nas extremidades das tiras de forma que eles avancem o gel cerca de meio centímetro, estes foram colocados úmidos com cerca de 70 µl de água milli-Q.

O programa *IPGphor* instalado no computador seguiu as seguintes configurações: etapa 1 (500 V por 0:30h); etapa 2 (4.000 V por 2:30h) e etapa 3 (10.000 V até atingir 18.000 Vh totais). A corrida foi monitorada pelo computador, sendo visualizada graficamente por uma linha vermelha que sobrescreveu a linha azul (teoricamente) no gráfico de voltagem pelo tempo, ao final as tiras foram guardadas dentro de tubos de ensaio e acondicionadas em freezer – 80 °C para posterior corrida de segunda dimensão.

### ➤ *Segunda Dimensão*

Esta fase do processo de Eletroforese Bidimensional (2DE) se inicia com o equilíbrio das tiras, o qual foi feito em duas etapas, na primeira foi colocado 3 mL de solução de equilíbrio, acrescentando 57,8 mg de DTT. Na segunda etapa ao final dos 15 minutos de agitação da etapa 1, a tira foi mergulhada por 10 segundos em bécher com água milli-Q para retirar o excesso da primeira solução, em seguida a tira foi colocada em um outro tubo de ensaio com 3 mL de solução de equilíbrio, mas dessa vez acrescentando 69,3 mg de iodoacetamida, novamente foi agitado levemente por 15 minutos, em seguida a mesma foi colocada sobre o gel de poliacrilamida a 12% para a corrida eletroforética.

Para a “selagem” da tira IPG no gel foi necessária fazer uma solução de agarose (0,5 % de agarose com traços de azul de bromofenol). A solução de agarose levemente aquecida fundiu a tira ao gel e permitiu formar um “poço” para aplicação do marcador de peso molecular. No “poço” feito para o marcador, foi aplicado uma mistura de 20 µl de marcador com 180 µl de tampão de amostra (pesos moleculares de referência: 97 kDa; 66 kDa; 45 kDa; 30 kDa; 20 kDa e 14 kDa).

#### ➤ **Montagem do Sistema, Coloração e Digitalização**

A corrida eletroforética foi feita em duas etapas: Programa 1 (30 mA, 100 W por 15 minutos); Programa 2 (50 mA, 100 W por 8 horas).

Após a separação das proteínas de acordo com o Ponto Isoelétrico (pI) e Massa Molecular (MW), os géis foram retirados das placas com cuidado e levados para cubas de vidro, onde passaram por agitação lenta à 25 rpm por um período de 12 horas, mergulhado numa solução contendo *Comassie Brilliant Blue* – CBB.

Ao final desse período foi retirada a solução de CBB e foi colocada a solução de revelação por um período de cerca de 10 horas, com o intuito de visualizar os *spot's* presentes.

#### ✓ **Análise dos Géis Bidimensionais**

A análise dos géis bidimensionais foi feita através da digitalização das imagens captadas em *ImageScanner II*. Os géis foram comparados e os *spot's* de proteína tiveram seus atributos determinados (Ponto Isoelétrico - pI e Massa Molecular - MW) com o emprego do *Software ImageMaster 2D Platinum 7.0*.

Com a determinação do pI e da MW dos *spot's* encontrados nos géis, esses valores foram levados para o Banco de Dados UniProtKB/Swiss-Prot localizado no link <http://web.expasy.org/tagident/> para a identificação das prováveis proteínas.

Nos *spot's* que apresentaram a mesma MW e que o pI demonstrou pequenas variações foi feita uma aproximação de 0,5 para mais e para menos sobre o valor obtido no pI. A partir desse valor máximo e mínimo sobre o valor original do pI e com o valor da MW foram encontradas prováveis proteínas, sendo escolhida a que mais se aproximou dos valores de pI e MW.



### **Análise Estatística**

Foi feita a classificação dos dados em dois grupos (ALTA e MODERADA), de acordo com a média geral da taxa de fertilidade dos reprodutores, sendo que os casos identificados como MODERADA taxa de fertilidade foram os que tiveram a fertilidade abaixo da média (82,65%) e os que ficaram acima da média foram considerados com ALTA taxa de fertilidade. A Análise da distribuição das prováveis proteínas se deu através de estatística descritiva (porcentagem), enquanto que, para a análise das variáveis relacionadas à eficiência reprodutiva (Fertilidade e Proteínas totais), aos parâmetros seminais (Concentração e motilidade espermática e Volume seminal) e à condição corporal (Escore, FAMACHA e Peso), foi feita uma Análise de Componentes Principais (ACP).

O software estatístico utilizado para as análises foi o SAS 9.3: STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS (2012).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes às características espermáticas dos reprodutores avaliados, de acordo com os grupos de fertilidade, estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Média dos parâmetros espermáticos e proteínas totais antes da realização da estação de monta (EM) em reprodutores Morada Nova.

Grupos	Animais	*Vol. (mL)	Aspecto	*Conc. (x10 <sup>9</sup> /mL)	*Mot. (%)	Proteínas totais (µg/µl)
<b>Fertilidade Alta (&gt; 82,65%)</b>	237	0,6	Leitoso	2,54	90	18,56
	740	0,7	Leitoso espesso	2,70	90	10,20
	33	1,2	Leitoso espesso	2,86	90	11,69
<b>Fertilidade Moderada (&lt; 82,65%)</b>	220	0,6	Leitoso espesso	2,23	92	7,77
	231	1,0	Cremoso	3,74	90	4,71
	319	1,98	Leitoso	1,98	70	12,30
<b>Média</b>		1,01		2,68	87,00	10,87

\*Vol. (Volume); Conc. (Concentração); Mot. (Motilidade)

Encontrou-se valores médios de 1,01 mL, 2,68x10<sup>9</sup>/mL e 87% para volume, concentração e motilidade espermática, respectivamente. Silva (2015), testando níveis crescentes de suplementação com ração concentrada em carneiros da raça Morada Nova observou valores de 0,8 mL para ejaculado, 1,5x10<sup>9</sup>/mL para concentração espermática e motilidade de 72%, valores estes inferiores aos identificados neste estudo. Isso pode ter ocorrido pois este autor trabalhou com carneiros com idade média de 10 meses, enquanto que nesta pesquisa a idade dos reprodutores variou entre quatro e seis anos, tendo estes um sistema reprodutor mais desenvolvido, uma vez que já foi atingida a maturidade sexual. Souza *et al.* (2012), trabalhando com ovinos da raça Santa Inês com idade de 10 meses, encontraram concentração espermática de 1,87x10<sup>9</sup>/mL, apresentando valores abaixo dos obtidos neste estudo. De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), o valor de referência para motilidade deve ser igual ou superior a 70%, valor este atingido por todos os animais avaliados. A concentração espermática de

acordo com Tardif *et al.* (1999) e Christensen *et al.* (2011), os quais trabalharam com bovinos, não representa um ponto essencial para eliminação de reprodutores, a não ser em situações muito abaixo do limite previsto, quando pode ser comprovada a relação entre concentração e fertilidade. Neste trabalho o número de espermatozoides encontra-se de acordo com o estipulado pelo CBRA (1998), daí o alto índice de fertilidade observado.

As proteínas totais apresentaram valores de 4,71 µg/µl a 18,56 µg/µl, obtendo um valor médio de 10,87 µg/µl. Silva (2010) trabalhando com ovinos Morada Nova encontrou concentrações proteicas variando de 9,8 µg/µl a 18,3 µg/µl, com média de 14,4 µg/µl. Provavelmente, a média deste trabalho seja mais elevada devido a realização do estudo ter ocorrido nos períodos seco e chuvoso, enquanto que no trabalho em análise, foi realizado no período seco. É sabido que na região Nordeste, a qualidade alimentar no período seco é deficiente, levando a um baixo consumo proteico que poderá influenciar nos níveis de proteínas.

A fertilidade dos animais é influenciada por diversos fatores, tais como: alimentação, clima e raça. Portanto, boa adaptação à região onde está inserida possibilita uma maior expressão de seu potencial reprodutivo do rebanho (SOUZA, 1992). Neste contexto, a Morada Nova é uma raça que consegue demonstrar sua capacidade produtiva mesmo em condições adversas, apresentando taxa de fertilidade superior a 70%, contribuindo para uma produção animal eficiente (FACÓ *et al.*, 2008).

Constatou-se que os seis reprodutores estudados apresentaram 75,0% ou mais de taxa de fertilidade, com variação de 75,0% a 94,5%, valores estes que se assemelham aos dados estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Fernandes Júnior (2010), trabalhando com ovinos da raça Morada Nova, encontrou valor inferior (60,53%) aos identificados no presente estudo quando analisou a fertilidade ao parto. Já Selaive Villarroel *et al.* (2005) observaram taxa de fertilidade de 97% em ovinos de mesma raça, valor este superior aos identificados neste trabalho, e concluíram que esta raça é bem adaptada ao clima semiárido da região Nordeste.

De acordo com Macedo *et al.* (2006), os parâmetros de qualidade do sêmen utilizados para avaliações *in vitro* apresentam importante relevância para estimar o desempenho reprodutivo. Essas análises fazem parte de métodos já aprovados e corriqueiramente utilizados como avaliação da motilidade, do vigor e da morfologia espermática, como também capacitação espermática, reação acrossômica e capacidade de ligação e penetração no oócito. A capacidade reprodutiva, tendo o macho como fator

essencial, apresenta importância para a rentabilidade das propriedades rurais. Sendo assim, as características espermáticas devem ser utilizadas como parâmetros de seleção (MORAES *et al.*, 1981). Portanto, os parâmetros espermáticos encontrados neste trabalho condizem com a taxa de fertilidade obtida após as estações de monta.

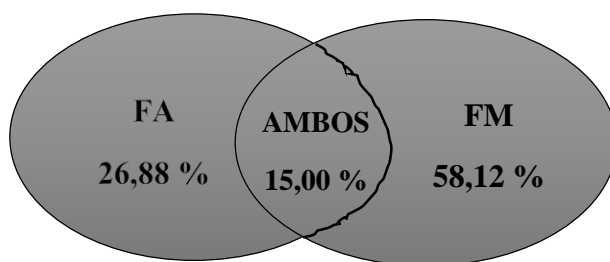
Encontrou-se uma associação entre os dois grupos que foram constituídos de acordo com a taxa de fertilidade, à expressão dos *spot's* e das prováveis proteínas que foram identificadas através do banco de dados *Uniprot* (Tabela 3), mostrando a ação específica de alguns *spot's* sobre a eficiência reprodutiva dos animais.

**Tabela 3:** Presença dos *spot's* e das prováveis proteínas e sua relação com a fertilidade nos grupos de Alta e Moderada fertilidade de ovinos da raça Morada Nova.

Grupos	Animais	Taxa de Fertilidade Individual (%)	Quantidade <i>Spot's</i>	Quantidade Prováveis Proteínas	Porcentagem Prováveis Proteínas (%)
<b>Fertilidade Alta</b> (> 82,65%)	237	87,5	136	43	26,88
	740	94,5			
<b>Fertilidade Moderada</b> (< 82,65%)	33	80,5	392	93	58,12
	220	81			
	231	77,4			
	319	75			
<b>Ambos Grupos</b>				24	15
<b>TOTAL</b>			528	160	100

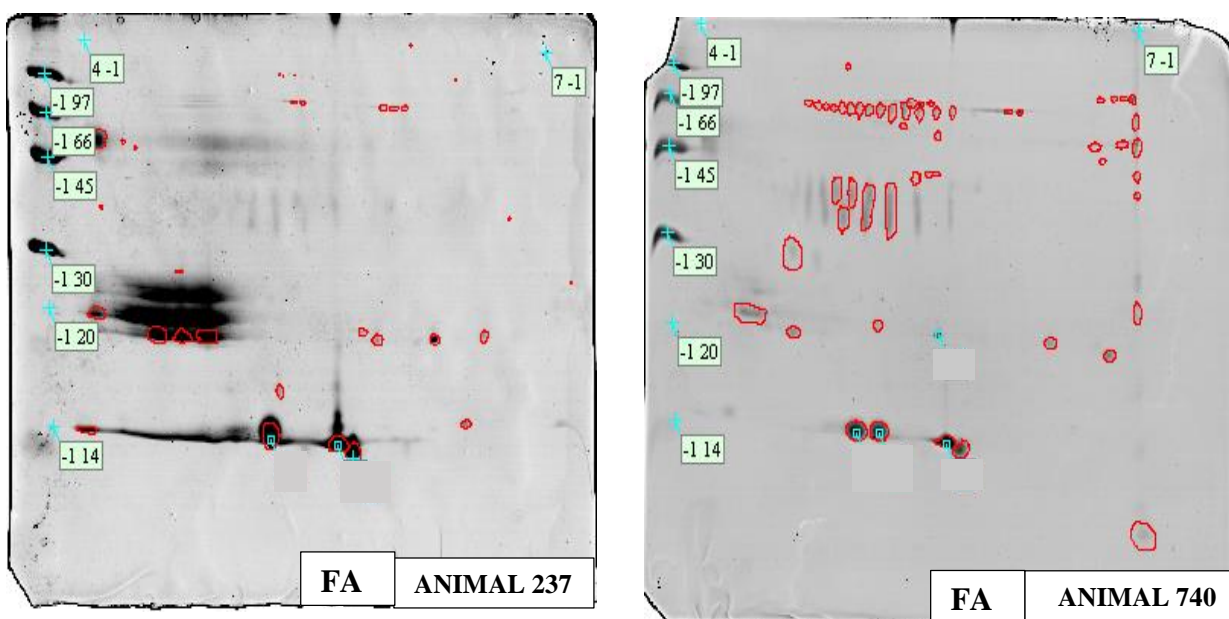
De um modo geral, foram identificados 528 *spot's* pelo *Software ImageMaster 2D Platinum 7.0*, dos quais 160 foram analisados pelo banco de dados *Uniprot* devido à sua maior expressão podendo, portanto, vir a serem proteínas. Dentre os *spot's* mais expressivos encontrou-se 15% em ambos os grupos e 85% se apresentaram diferencialmente expressos (presentes ou ausentes) entre os grupos de fertilidade alta (FA) e fertilidade moderada (FM). Dos *spot's* identificados, 26,88% foram encontrados nos reprodutores do grupo FA, enquanto que os reprodutores do grupo FM, apresentaram

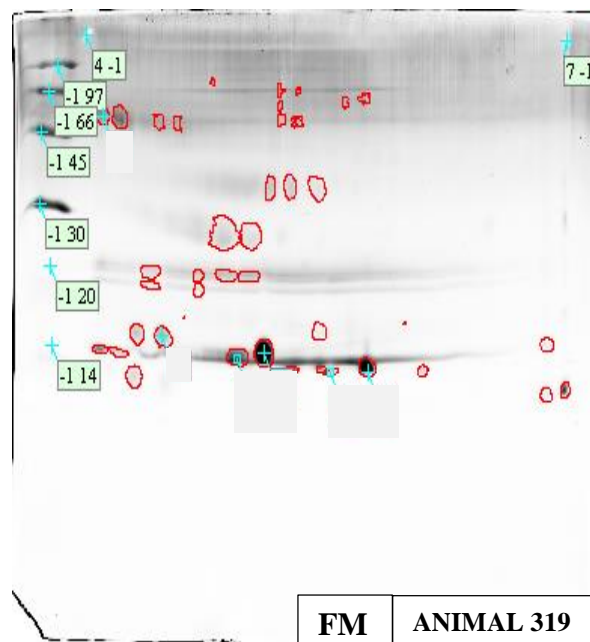
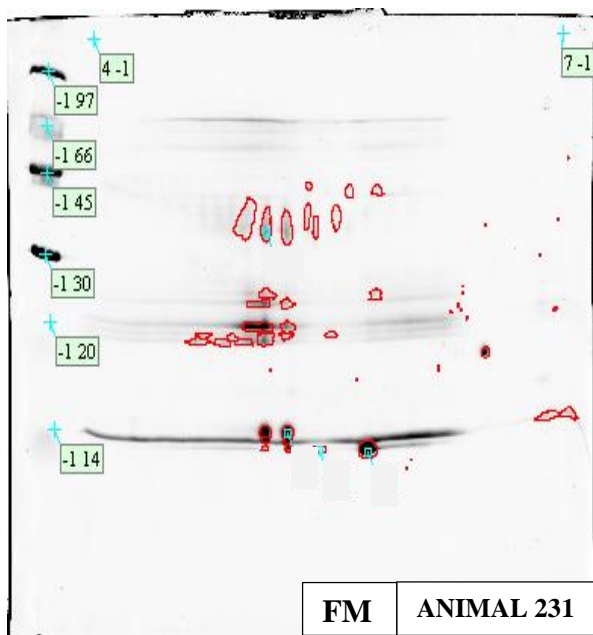
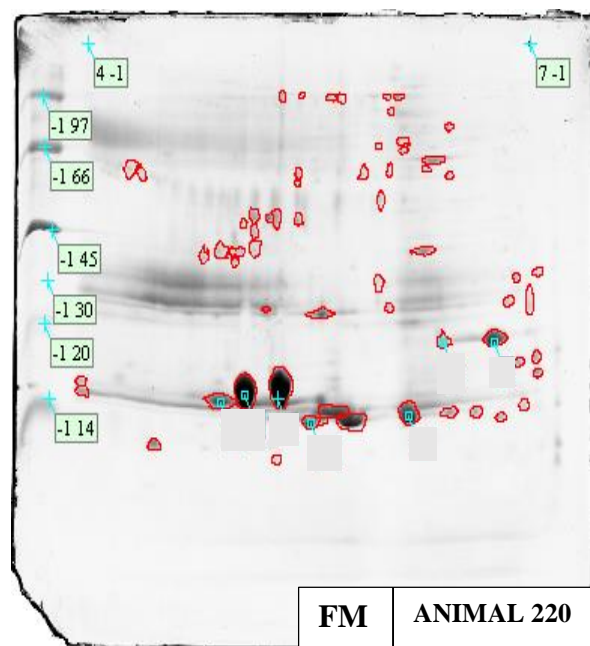
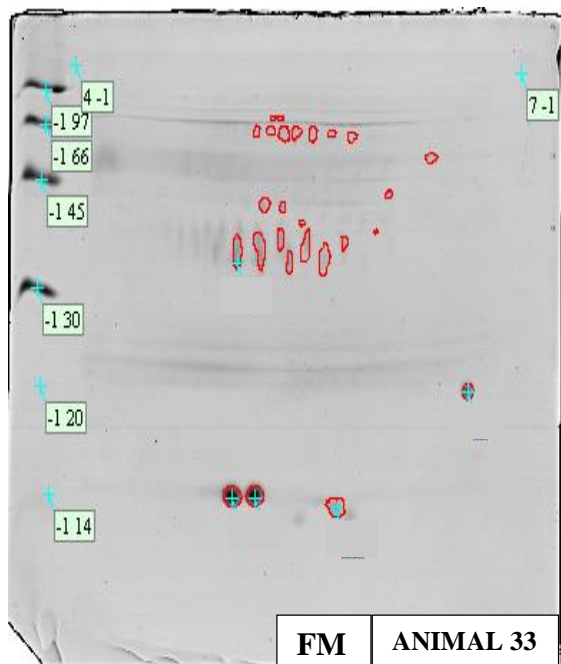
58,12% (Figura 1). O diagrama abaixo foi feito com base no trabalho de Peddinti (2008), o qual utilizou esse método para analisar, em bovinos, a distribuição proteica nos grupos de alta e baixa fertilidade, relatando que 20,4% das proteínas estavam presentes em ambos os grupos e as 79,6% diferentemente distribuídas. Portanto, estes resultados expressos pelo comportamento proteico mostram consonância com os percentuais encontrados neste trabalho.



**Figura 1:** Diagrama representando a distribuição em percentual dos *spot's* expressos nos grupos de fertilidade alta (FA), fertilidade moderada (FM) e em ambos os grupos, encontrados no plasma seminal de ovinos Morada Nova.

A eletroforese bidimensional possibilitou a identificação de vários *spot's* proteicos nítidos, como mostrado na figura 2. Com o auxílio desta técnica e, posteriormente, do *Software ImageMaster 2D Platinum 7.0*, foi possível identificar a quantidade de *spot's* presentes em cada animal (Tabela 5). JOBIM *et al.* (2005) estudando o plasma seminal de ovinos através da 2DE detectaram 21 *spot's* em média por repetição.





**Figura 2:** Perfil proteico dos reprodutores ovinos Morada Nova com alta (FA) e moderada (FM) fertilidade. À esquerda (vertical) valores de massa molecular (MW), que variam de 97 kDa a 14 kDa e acima (horizontal), valores do ponto isoelétrico (pI), variando de 4 a 7.

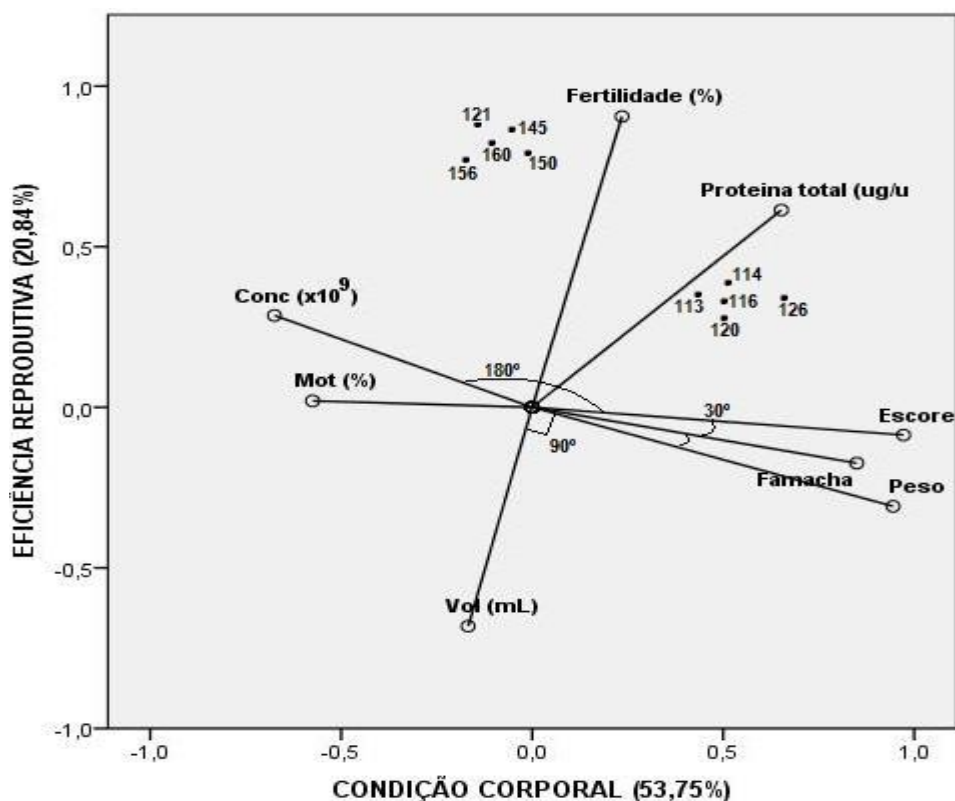
Para a identificação das prováveis proteínas (*spot's*) foram usados seus valores de ponto isoelétrico (pI) com uma variação de  $0,5 \pm$  e de massa molecular (MW) com uma variação de 5%. Quando não encontrado proteínas nesse intervalo era usado 10% de variação (Anexo I).

Foi possível observar interações entre as variáveis estudadas com base no comportamento dos *spot's* (Figura 3), utilizando a análise de componentes principais (ACP). Quando analisados os *spot's* identificados no grupo FA, observou-se uma relação estreita destes com a fertilidade e proteínas totais, cuja massa molecular situou-se entre 8 kDa e 60 kDa. As variáveis com pequenos ângulos de  $30^\circ$  apresentaram correlação positiva, com as variáveis escore de condição corporal (ECC), FAMACHA e peso, as quais apresentam relação com o estado geral dos animais. Foi possível identificar também variáveis com ângulos próximos a  $180^\circ$ , evidenciando uma correlação negativa entre estas (concentração espermática X peso) e (motilidade X ECC) e, ainda, observou-se variáveis com ângulo próximo a  $90^\circ$ , as quais apresentaram correlação mínima (volume do sêmen X FAMACHA).

Gaviraghi *et al.* (2010) utilizando a ACP observaram que a proteômica comparativa consegue demonstrar a expressão de diversas proteínas envolvidas na alta e baixa fertilidade, comprovando que a 2DE é uma ferramenta importante para caracterizar o perfil proteico de touros, podendo vir a ajudar na identificação de biomarcadores de fertilidade nesses animais. Também, de acordo com Mateo *et al.* (2007), alterações na expressão proteica nas análises proteômicas utilizando a 2DE podem explicar a redução da fertilidade de touros.

As prováveis proteínas (*spot's*) nos géis 2DE foram identificadas no plasma seminal dos ovinos Morada Nova com uma boa reprodutibilidade, levando em consideração a porcentagem do volume expresso pelos *spot's* proteicos. Observou-se no grupo FA a presença e expressão de *spot's* específicos ligados a reprodução, tais como: motilidade espermática, reação acrossômica, ativação da libido, espermatogênese, entre outras (Tabela 4). As proteínas mencionadas nesta tabela, possivelmente, podem vir a ser marcadores de fertilidade. De acordo com achados de Peddinti *et al.* (2008) touros de alta fertilidade têm maior expressão de proteínas nos espermatozoides envolvidas no metabolismo energético, na comunicação, na espermatogênese e na motilidade celular. Embora este trabalho tenha sido realizado em espermatozoides, vem a corroborar com os resultados obtidos nesse estudo, no qual o grupo FA apresentou proteínas relacionadas com o processo reprodutivo, enquanto o grupo FM apresentou proteínas relacionadas com

processos e reações não específicas ligadas ao metabolismo, de um modo geral, tais como: respiração celular, transporte de minerais e nutrientes, regulação de processos biológicos, dentre outras.



**Figura 3:** Comportamento dos *spot's* e sua relação com a eficiência reprodutiva, parâmetros seminais e condição corporal dos reprodutores Morada Nova, através da Análise de Componentes Principais (ACP), SAS (2012).

O grupo FA apresentou um número expressivo de possíveis proteínas com peso molecular variando de 8 kDa a 60 kDa, enquanto que o FM exibiu um maior número de *spot's* com massa molecular entre 61 kDa e 110 kDa. De acordo Baas *et al.* (1983), as proteínas presentes naquela faixa de peso estão relacionadas com o aumento da atividade espermática, e Roncoletta (1999) afirmou ainda que as cadeias polipeptídicas em maior concentração no plasma seminal são encontradas em proteínas de baixo peso molecular. Portanto, este é mais um indício que poderá explicar a maior fertilidade do grupo FA.



**Tabela 4:** Prováveis proteínas encontradas no grupo fertilidade alta (FA) identificadas pelo Banco de Dados *Uniprot*.

Proteínas	Spot's	MW (kDa)	pI	Função	Referências
Cadeia de Dineína Tctex-tipo 3	113	13	5,21	Modula a sinalização de orexina	Duguay <i>et al.</i> (2011)
Fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos	114	15	5,28	Atua na resposta imune do sistema reprodutor	Michelin <i>et al.</i> (2008)
Interferon tau-1	116	20	5,17	Inibe a expressão de receptores de estrógenos e de oxitocina	Destro <i>et al.</i> (2014)
Osteopontina	120	30	4,42	Melhora o processo de fertilização e o desenvolvimento embrionário	Monaco <i>et al.</i> (2009)
40S ribossomal proteína SA	121	31	4,83	Auxilia na fertilidade de garanhões	Guasti (2014)
Queratina, tipo I citoesquelético 15	126	49	4,33	Tem ação sobre a organogênese e diferenciação celular	Mançanares (2013)
Fator de crescimento tipo insulina I	145	8	7,67	Modula a função da próstata	Cohen (1994)
Proteína de ligação cálcio-integrina 1	150	21	4,33	Previne o estresse oxidativo nos espermatozóides	Macleod (1943)
Globulina de ligação aos corticosteróides	156	45	6,89	Auxilia na proteção da membrana espermática	Humphreys (1999)
Proteína 18 contendo domínio de zinco e BTB	160	58	6,10	Envolvido na espermatogênese	Henkel <i>et al.</i> (2003)

A maior fertilidade do grupo FA poderá ser justificada pela presença da proteína Osteopontina (OPN), uma vez que, de acordo com GERENA (2000) e CANCEL *et al.* (1997) esta proteína tem ação sobre algumas características da membrana das células espermáticas e, ainda, sobre a capacitação do espermatozoide, propiciando maiores taxas

de fertilidade. Monaco *et al.* (2009) observaram o aumento da capacitação dos espermatozoides incubados com OPN purificada do leite, resultados estes que mostraram influência sobre o processo de fertilização. Esses autores observaram que a inclusão da OPN purificada do leite bovino aumentou a taxa de fertilização, clivagem e desenvolvimento embrionário em touros, sugerindo que esta proteína poderá aumentar a eficiência reprodutiva dos animais.

Além desta, foi observado proteínas relacionadas a processos biológicos e reproduzíveis como é o caso da Interferon tau-1, a 40S ribossomal proteína SA e a cadeia Dineína Tctex-tipo 3. A Interferon tau-1 inibe a expressão dos receptores de estrógenos e de oxitocina (DESTRO *et al.*, 2014) e, de acordo com Spencer e Bazer (1996) é um hormônio parácrino responsável pelo reconhecimento materno da gestação, a mesma tem ação importante na reprodução, prevenindo a degradação do corpo lúteo e, desta forma vem sendo utilizada na produção animal como marcador para o diagnóstico de prenhez em ovinos (CHON e BIXLER, 2010). Esses autores também mencionam a função antiviral desta proteína no tratamento de infecções humanas *in vitro*, também sendo observado por Martin *et al.* (2016) que esta proteína impede a replicação do vírus hv-PR8 da gripe.

Já a 40S ribossomal proteína SA auxilia na fertilidade de garranhões (GUASTI, 2014), como também em humanos age nos receptores da glicoproteína laminina, a qual tem ação sobre o desenvolvimento embrionário e também nos processos de diferenciação e adesão celular (DIGIACOMO e MERUELO, 2016). Esta proteína vem sendo utilizada na mediação da expressão do mRNA por RT-PCR em tempo real (QRT-PCR), sendo este um método importante e eficaz para a investigação de doenças inflamatórias e reguladas pelo sistema imune em diferentes espécies, como cães, roedores, além dos seres humanos, nos quais os estudos são mais avançados (PETERS *et al.*, 2007). Enquanto que a cadeia de Dineína Tctex-tipo 3 é um grupo de multiunidade de proteínas que produzem a força para o movimento do axonema e do citoplasma (KAGAMI *et al.*, 1998), como também apresenta estreita relação com a precipitação de orexina, a qual é um neurotransmissor que controla a excitação e o apetite, processos esses importantes para a reprodução e desenvolvimento dos animais (NAGLER *et al.*, 2016).

Também encontrou-se proteínas ligadas ao sistema de defesa, como o fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos, o qual atua na resposta imune do sistema reprodutor (MICHELIN *et al.*, 2008), e promove ainda a proliferação e maturação dos neutrófilos, especialmente macrófagos e eosinófilos (ROOT e DALE, 1999). Ganser

*et al.* (1989) utilizando esta proteína em pacientes com síndromes mielodisplásicas e citopenia, dependentes de transfusões contínuas, observaram estimulação da hematopoiese. Outra proteína deste grupo, a globulina de ligação aos corticosteroides, auxilia na proteção da membrana espermática (HUMPHREYS, 1999), atuando também no transporte de glicocorticoides e progesterona no sangue, regulando a disponibilidade de tecido para estes hormônios (GARDILL *et al.*, 2012). De acordo com Anzali *et al.* (1996), esta proteína pode ser usada para analisar características de superfícies moleculares, como a forma e o potencial eletrostático molecular, permitindo, desta forma sua aplicação na identificação das características essenciais necessárias para a atividade biológica.

Identificou-se, ainda, proteínas ligadas a processos estruturais como a queratina, tipo I citoesquelética 15 com ação sobre a organogênese e a diferenciação celular (MANÇANARES, 2013), também sendo responsável pela integridade estrutural das células epiteliais (SPERLING *et al.*, 2011). Desta forma, de acordo Werner *et al.* (2004), esta proteína vem sendo utilizada no estudo de mutações de queratina dominantes que provocam a epidermólise bolhosa simples, transformando filamentos de queratina em agregados. Também encontrou-se a proteína 18 contendo domínio de zinco e BTB que está envolvida na espermatogênese (HENKEL *et al.*, 2003), e tem papel chave na formação muscular ou miogênese. Outra função importante desta proteína, de acordo com Aoki *et al.* (1998), é seu envolvimento no controle das células matrizes e na regulação da sobrevivência dos neurônios corticais, esta proteína ainda estimula a interação proteína-proteína, sendo encontrada em toda a classe eucariota. São também usadas no controle de processos celulares que vão desde a dinâmica da contração muscular até a regulação do ciclo celular (PEREZ-TORRADO *et al.*, 2006).

Ainda no grupo FA, também foi observado a presença da proteína fator de crescimento tipo insulina I, a qual regula, em humanos, a função da próstata (COHEN, 1994) e tem um papel importante no crescimento da criança, continuando a ter efeito anabólico em adultos (KEATING, 2008). Existem evidências de que a presença e/ou sinalização de insulina podem ser relevantes para os fatores dietéticos e de estilo de vida que influenciam o risco e o prognóstico de câncer (POLLAK, 2008). A proteína de ligação cálcio-integrina 1 atua na prevenção do estresse oxidativo nos espermatozoides (MACLEOD, 1943) e também participa na regulação de numerosos processos celulares, como: divisão celular, proliferação celular, migração celular, trombose, angiogênese, hipertrofia cardíaca e na morte programada das células em humanos (ARMACKI *et al.*,

2014), além de seu envolvimento no processo de agregação de plaquetas através da ligação da cauda citoplasmática da subunidade da integrina plaquetária (BLAMEY *et al.*, 2005).

## CONCLUSÕES

Sugere-se que a presença de massas moleculares de baixo peso (8 kDa a 60 kDa) estejam envolvidas na ativação da atividade espermática, influenciando a fertilidade;

A presença de *spot's* encontrados exclusivamente no grupo FA, provavelmente tem influência na eficiência reprodutiva de machos ovinos Morada Nova, além de apresentar enzimas ligadas ao sistema imunológico, processos biológicos e estresse;

Provavelmente, as proteínas identificadas no grupo FA, com destaque para a Cadeia de Dineína Tctex-tipo 3, Interferon tau-1 e a Osteopontina, venham a ser biomarcadores de fertilidade na raça Morada Nova.

A escassez de dados em ovinos nos leva a sugerir que mais estudos sejam realizados na área de proteômica visando esclarecer o processo de fertilização nesta raça.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZALI, S.; BARNICKEL, G.; KRUG, M.; SADOWSKI, J.; WAGENER, M.; GASTEIGER, J.; POLANSKI, J. The comparison of geometric and electronic properties of molecular surfaces by neural networks: Application to the analysis of corticosteroid-binding globulin activity of steroids. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 10, p. 521-534, 1996.

AOKI, K.; MENG, G.; SUZUKI, K.; TAKASHI, T.; KAMEOKA, Y.; NAKAHARA, K.; ISHIDA, R.; KASAI, M. RP58 associates with condensed chromatin and mediates a sequence-specific transcriptional repression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p.26698-26704,1998.

ARMACKI, M.; JOODI, G.; NIMMAGADDA, S. C.; KIMPE, L. de; PUSAPATI, G. V.; VANDONINCK, S.; VAN LINT, J.; ILLING, A.; SEUFFERLEIN, T. A novel splice variant of calcium and integrin-binding protein 1 mediates protein kinase D2-stimulated tumour growth by regulating angiogenesis. **Oncogene**, v. 33, p. 1167-1180, 2014.

BAAS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 68, p. 275-280, 1983.

BELLIN, M. E.; OYARZO, J. N.; HAWKINS, H. E.; ZHANG, H.; SMITH, R. G.; FORREST, D. W.; SPROTT, L. R.; AX, R. L. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 2032-2039, 1998.

BLAMEY, C. J.; CECCARELLI, C.; NAIK, U. P.; BAHNSON, B. J. The crystal structure of calcium- and integrin-binding protein 1: Insights into redox regulated functions. **Protein Science**, v. 14, p. 1214-1221, 2005.

BLUM, H.; BEIER, B.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-Kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1293-1301, 1997.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. 2. Ed. – Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CHON, T. W.; BIXLER, S. Interferon-tau: current applications and potential in antiviral therapy. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 30, p. 477-485, 2010

CHRISTENSEN, P.; LABOURIAU, R.; BIRCK, A.; BOE-HANSEN, G. B.; PEDERSEN, J.; BORCHERSEN, S. Relationships among seminal quality measures and

field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p.1744-1754, 2011.

COHEN, D. W.; SIMAK, R.; FAIR, W. R. Expression of transforming growth factor receptor in human prostate tissues. **Journal of Urology**, v. 152, p. 2120-2124, 1994.

DESTRO, F. C.; OCHOA, J. C.; TREVISOL, E.; FERREIRA, J. C. Papel de interferon tau em el reconocimiento materno de a gestacion. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 9, p. 338-347, 2014.

DIGIACOMO, V.; MERUELO, D. Looking into laminin receptor: critical discussion regarding the non-integrin 37/67-kDa laminin receptor/RPSA protein. **Biological Reviews**, v. 91, p. 288–310, 2016.

DOMINGUES, O. Carneiro deslanado de Morada Nova. **Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia**, v. 4, p. 122, 1941.

DOMINGUES, O. Os carneiros deslanados de Morada Nova. **Revista de Agronomia**, v. 9, p. 257-259, 1950.

FACÓ, O.; PAIVA, S. R.; ALVES, L. R. N.; LÔBO, R. N. B.; VILLELA, L. C. V. Raça Morada Nova: origem, características e perspectivas. **Embrapa Caprinos e Ovinos**, 2008.

FERNANDES, F. M. N. **Situação da ovinocultura de São Paulo**. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINOCULTURA. 1, 1988, Botucatu. Campinas, Fundação Cargil, 1989.

FERNANDES, A. A. O. Genetic and phenotypic parameter estimates for growth, survival and reproductive traits in Morada Nova hair sheep. Texas: Oklahoma State University, 1992. 183p. **Tese Doutorado**, 1992.

FERNANDES, A. A. O.; BUCHANAN, D.; SELAIVE-VILLAROEL, A. B. Avaliação dos fatores ambientais no desenvolvimento corporal de cordeiros desmamados da raça Morada Nova. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1460-1465, 2001.

FERNANDES JUNIOR, G. Desempenho produtivo e qualidade da carne de ovinos terminados em pastagem irrigada no semiárido nordestino. **Dissertação de Mestrado**, UFC. 2010.

GANSER, A.; VOLKERS, B.; GREHER, J. OTTMANN, O. G.; WALTHER, F.; BECHER, R.; BERGMANN, L.; SCHULZ, G.; HOELZER, D. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with myelodysplastic syndromes-a phase I/II trial. **Blood Journal**, v. 73, p. 31-37, 1989.

GARDILL, B. R.; VOGL, M. R.; LIN H-Y; HAMMOND, G. L.; MULLER, Y. A. Corticosteroid-Binding Globulin: Structure-Function Implications from Species Differences. **PLoS ONE**, v. 7, e. 52759, 2012.

GASSET, M. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorycholine-bound complexes. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 250, p. 735-744, 1997.

GAVIRAGHI, A.; DERIU, F.; SOGGIU, A.; GALLI, A.; BONACINA, C.; BONIZZI, L.; RONCADA, P. Proteomics to investigate fertility in bulls. **Veterinary Research Communication**, v. 34, p. 33-36, 2010.

GERENA, R. L. Immunocytochemical localization of lipocalin. Type prostaglandin D, synthase in the bull testis and epididymis and on ejaculated sperm. **Biology of Reproduction, Pennsylvania**, v. 62, p. 547-556, 2000.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1037-1053, 2000.

GUASTI, P. N.; PAPA, F. O. Avaliação dos Constituintes Proteicos do Plasma Seminal e da Membrana Plasmática de Espermatozoides e sua Correlação Com a Fertilidade de Garanhões. **Universidade Estadual Paulista (UNESP)**, 2014.

GURGEL, M. A.; SOUZA, A. A. de; LIMA, F. de A. M. Avaliação do feno de leucena no crescimento de cordeiros Morada Nova em confinamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 1519-1526, 1992.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM J. K.; NOLAN J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**. v. 11, p. 73- 88, 1990.

HENKEL, R.; BALDAUF, C.; SCHILL, W. B. Resorption of the element zinc from spermatozoa by the epididymal epithelium. **Reprod Domest Anim**, v. 38, p. 97-101, 2003.

HUMPHREYS, D. T.; CARVER, J. A.; EASTERBROOK-SMITH, S. B.; WILSON, M. R. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **Journal Biology Chemistry**, v. 274, p. 6875-6881, 1999.

HUTT, D. M.; BALTZ, J. M.; NGSEE, J. K. Synaptotagmin VI and VIII syntaxin 2 are essential for the mouse sperm acrosome reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 20197-20203, 2005.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; WALD, V. B.; HORN, E. R.; MATTOS, R. C. BSP A1/A2like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 63, p. 2053–2062, 2005

KAGAMI, O.; GOTOH, M.; MAKINO, Y.; MOHRI, H.; KAMIYA, R.; OGAWA, K. A dynein light chain of sea urchin sperm flagella is a homolog of mouse Tctex 1, which is encoded by a gene of the t complex sterility locus. **Gene**, v. 211, p. 383–386, 1998.

KEATING, G. M. Mecasermin. **BioDrugs**, v. 22, p. 177–88, 2008.



- KILLIAN, G.J. The role of marker protein in reproductive efficiency. Pennsylvania. **Veterinary Science Extension**, Pennsylvania, v. 29, p. 1112-1120, 1999.
- KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B.; PEKNIČOVÁ, J.; JONÁKOVÁ, V. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**. v. 65, p. 33–46, 2005.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.15, p.680-685, 1970.
- LLOYD, C.; YU, Q. C.; CHENG, J.; TURKSEN, K.; DEGENSTEIN, L.; HUTT, E.; FUCHS, E. The basal keratin network of stratified squamous epithelia: defining K15 function in the absence of K14. **Journal Cell Biol**, v. 129, p. 1344, 1995.
- LOVE, C. C.; KENNEY, R. M. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. **Theriogenology**, v. 50, p. 955-972, 1998.
- MACEDO Jr., M. C.; DESCHAMPS, J. C.; LUCIA Jr., T.; BORDIGNON, J.; SERRET C. G., RAMBO, G.; PIVATO, I.; SCHMITT, E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 334–348. 2006.
- MACLEOD, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of the human spermatozoa. **Am Journal Physiol**, v. 138, p. 512-518, 1943.
- MANÇANARES, C. A. F.; LEISER, R.; FAVARON, P. O.; CARVALHO, A. F.; OLIVEIRA, V. C.; SANTOS, J. M.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. A Morphological analysis of the transition between the embryonic primitive intestine and yolk sac in bovine embryos and fetuses. **Microscopy Research and Techniques**, v. 76, n. 7, 2013.
- MARTÍN, V.; PASCUAL, E.; AVIA, M.; RANGEL, G.; MOLINA, A.; ALEJO, A.; SEVILLA, N. A. Recombinant Adenovirus Expressing Ovine Interferon Tau Prevents Influenza Virus-Induced Lethality in Mice. **Journal of Virology**, v. 90, p. 3783-3788, 2016.
- MATEO, S. DE; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M.; DOMÍGUEZ-FANDOS, D.; VIDAL-TABOADA, J. M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. **Proteomics**, v. 7, p. 4264–4277, 2007.
- MEDEIROS, A. S. L.; GOMES, G. M.; CARMO, M. T.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Cryopreservation os stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, p. 1-4, 2002.
- MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M. E.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N.

Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Revista Brasileira Farmacogn**, v. 18, p. 690-695, 2008.

MIES FILHO, A. Novo modelo de vagina artificial para ovinos. **Revista da Faculdade de Agronomia do Rio Grande do Sul**, v. 5, p. 187-193, 1962.

MONACO, E.; GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; DE ROSA, A.; ATTANASIO, L.; ZICARELLI, L.; KILLIAN, G. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, v.71, p.450-457, 2009.

MORAES, L. C. F., PIEGAS, M. S.; SILVA, J. F.; MARTINS, S. C. R. Considerações sobre o exame andrológico em carneiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 5, p. 9-15, 1981.

MORTARINO, M. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis map of Bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis**, Milano, v. 19, p. 797-801, 1998.

NAGLER, M.; PALKOWITSCH, L.; RADING, S.; MOEPPS, B.; KARSAK, M. Cannabinoid receptor 2 expression modulates G $\beta$  $\gamma$ <sub>2</sub> protein interaction with the activator of G protein signalling 2/dynein light chain protein Tctex-1. **Biochemical Pharmacology**, v. 99, p. 60-72, 2016.

PEDDINTI, D.; NANDURI, B.; KAYA, A.; FEUGANG, J. M.; BURGESS, S. C.; MEMILI, E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BMC Systems Biology**, v. 19, p. 512-530, 2008.

PEREZ-TORRADO, R.; YAMADA, D.; DEFOSSEZ, P. A. Born to bind: the BTB protein–protein interaction domain. **BioEssays**, v. 28, p. 1194-1202, 2006.

PETERS, I. R.; PEETERS, D.; HELPS, C. R.; DAY, M. J. Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, p. 55-66, 2007.

POLLAK, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 915-928, 2008.

RONCOLETTA, M., FRANCESCHINI, P. H., LIMA, V. F. M. H., RODRIGUES L. H., OLIVEIRA, M. A., SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, p. 36-42, 1999.

ROOT, R. K.; DALE, D. C. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: comparisons and potential for use in the treatment of infections in nonneutropenic patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p. 342–352, 1999.

SAÍRAM, M. R.; SEIDAH, N. G.; CHRETIEN, M. Primary structure of the ovine pituitary follitropin beta-subunit. **Journal Biochemistry**, v. 197, p. 541-552, 1981.

SELAIVE-VILLARROEL, A. B.; MACIEL, M. B.; OLIVEIRA, N. M.; COSTA, R. G.; NUNES, J. F. Efeito do peso ao desmame no crescimento posterior de cordeiros da raça Morada Nova mantidos em sistema extensivo de criação no Estado do Ceara. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, p. 382-385, 2005.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SILVA, N. M. M. Proteínas do plasma seminal de ovinos da raça Morada Nova. **Dissertação de Mestrado**. UVA/Embrapa. 2010.

SILVA, T. A. Aspectos reprodutivos e produtivos de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação concentrada. **Dissertação de Mestrado**. UFC. 2015.

SPENCER T. E.; BAZER F. W. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. **Endocrinology**, v. 137, p. 1144-1147, 1996.

SPERLING, L. C.; HUSSEY, S.; WANG, J. A.; DARLING, T.; PATHOL, J. C. Cytokeratin 15 expression in central, centrifugal, cicatricial alopecia: new observations in normal and diseased hair follicles. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 38, p. 407-414, 2011.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS. SAS OnlineDoc. 9.3. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2012.

SOUZA, W. H. **Melhoramento genético de ovinos da raça Santa Inês**. João Pessoa: EMEPA, 1992.

SOUZA, W. H. de; LÔBO, R. N. B.; MORAIS, O. R. Ovinos Santa Inês: Estado de Arte e Perspectivas. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE**, 2003.

SOUZA, C. E. A.; REGO, J. P. A.; LOBO, C. H.; OLIVEIRA, J. T. A.; NOGUEIRA, F. C. S.; DOMONT, J. B.; FIORAMONTE, M.; GOZZO, F. C.; MORENO, F. B. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 4436-4456, 2012.

TARDIF, S.; LAFOREST, J. P.; CORMIER, N.; BAILEY, J. L. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 447-459, 1999.

TROEDSSON, M.H.T.; ALGHAMDI, A.S.; MATTISEN, J. Equine seminal plasma protects the fertility of spermatozoa in an inflamed uterine environment. **Theriogenology**, v. 58, p. 453-456, 2005.

VISPO, N. S. **Combinatória Molecular**. Elfos Scientiae. La Habana 10600, Cuba. 405p, 2004.

WERNER, N. S.; WINDOFFER, R.; STRNAD, P.; GRUND, C.; LEUBE, R. E.; MAGIN, T. M. Epidermolysis Bullosa Simplex-Type Mutations Alter the Dynamics of the Keratin Cytoskeleton and Reveal a Contribution of Actin to the Transport of Keratin Subunits. **Molecular Biology of The Cell**, v. 15, p. 990-1002, 2004.

WOLFE, D. F.; BRADLEY, J. T.; RIDDELL, M. G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology**, v. 40, p. 1083-1091, 1993.

## ANEXO I

Mapeamento das proteínas expressas no plasma seminal dos reprodutores ovinos da raça Morada Nova, utilizando o Banco de Dados *Uniprot*.

<b>GRUPO FERTILIDADE ALTA – FA</b>			
<b>Spot's</b>	<b>pI</b>	<b>MW</b>	<b>Provável Proteína</b>
<b>110</b>	4,07	12	Protein LBH
<b>111</b>	6,97	12	Natriuretic peptides B
<b>112</b>	4,07	13	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3
<b>113</b>	5,21	13	Dynein light chain Tctex-type 3
<b>114</b>	5,28	15	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
<b>115</b>	4,48	18	UPF0669 protein C6orf120 homolog
<b>116</b>	5,17	20	Interferon tau-1
<b>117</b>	5,17	22	Hippocalcin-like protein 1
<b>118</b>	7,17	24	Alpha-S2-casein
<b>119</b>	4,11	26	Clathrin light chain A
<b>120</b>	4,42	30	Osteopontin
<b>121</b>	4,83	31	40S ribosomal protein SA
<b>122</b>	5,59	38	Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3
<b>123</b>	4,52	39	UV excision repair protein RAD23 homolog A
<b>124</b>	6,85	39	Rhodopsin
<b>125</b>	6,63	40	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2
<b>126</b>	4,33	49	Keratin, type I cytoskeletal 15
<b>127</b>	4,26	51	Hemogen
<b>128</b>	4,10	52	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1
<b>129</b>	4,52	62	Mesoderm induction early response protein 2
<b>130</b>	5,42	72	Protein-arginine deiminase type-3
<b>131</b>	4,21	90	Low-density lipoprotein receptor
<b>132</b>	6,42	91	Signal transducer and activator of transcription 5 <sup>a</sup>
<b>133</b>	4,06	94	PGC-1 and ERR-induced regulator in muscle protein 1
<b>134</b>	5,37	96	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13
<b>135</b>	4,15	108	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein componente
<b>136</b>	6,13	128	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4
<b>145</b>	7,67	8	Insulin-like growth factor I
<b>146</b>	7,03	9	ATPase inhibitor, mitochondrial
<b>147</b>	6,84	11	Natriuretic peptides B
<b>148</b>	7,67	19	Protein MAL2
<b>149</b>	7,67	20	Transmembrane protein 70, mitochondrial
<b>150</b>	4,33	21	Calcium and integrin-binding protein 1

<b>151</b>	6,99	21	U8 snoRNA-decapping enzyme
<b>152</b>	4,62	27	14-3-3 protein sigma
<b>153</b>	6,99	35	Carbonic anhydrase 6
<b>154</b>	5,56	39	Dipeptidase 1
<b>155</b>	6,75	42	Cellular tumor antigen p53
<b>156</b>	6,89	45	Corticosteroid-binding globulin
<b>157</b>	5,62	48	Myc proto-oncogene protein
<b>158</b>	5,38	52	Ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain-containing protein 1
<b>159</b>	5,84	56	Activin receptor type-2A
<b>160</b>	6,10	58	Zinc finger and BTB domain-containing protein 18

#### **GRUPO FERTILIDADE MODERADA – FM**

<b>Spot's</b>	<b>pI</b>	<b>MW</b>	<b>Provável Proteína</b>
<b>4</b>	6,72	20	Alpha-crystallin B chain
<b>5</b>	5,23	33	Troponin T, cardiac muscle
<b>6</b>	4,97	35	T-cell surface glycoprotein CD1b-2
<b>7</b>	4,78	36	Alpha-2-HS-glycoprotein
<b>9</b>	4,35	42	Actin, cytoplasmic 1
<b>10</b>	5,12	44	Thyroxine-binding globulin
<b>11</b>	5,88	49	Antithrombin-III
<b>17</b>	6,44	77	Follicle-stimulating hormone receptor
<b>18</b>	4,63	8	Metallothionein-3
<b>19</b>	4,24	9	Oxytocin-neurophysin 1
<b>20</b>	5,27	10	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4L
<b>21</b>	5,06	11	Thioredoxin
<b>22</b>	4,97	13	Transthyretin
<b>24</b>	4,95	14	Galectin-1
<b>26</b>	6,89	15	Growth/differentiation factor 9
<b>27</b>	5,27	16	T-cell surface glycoprotein CD3 delta chain
<b>28</b>	6,71	16	Hemoglobin subunit beta
<b>29</b>	6,48	17	Cytochrome b6-f complex subunit 4
<b>30</b>	5,08	17	Beta-lactoglobulin-1/B
<b>31</b>	5,79	18	Prostaglandin-H2 D-isomerase
<b>35</b>	4,50	20	Interferon tau-4
<b>37</b>	4,47	22	Calcium and integrin-binding family member 4
<b>38</b>	5,48	23	Beta-casein
<b>39</b>	5,01	24	Pulmonary surfactant-associated protein A
<b>40</b>	4,82	26	Cytochrome c oxidase subunit 2
<b>41</b>	4,50	27	14-3-3 protein zeta/delta
<b>42</b>	5,02	31	Elongation factor 1-delta
<b>43</b>	5,29	35	Apolipoprotein E
<b>45</b>	5,15	42	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic
<b>46</b>	5,79	51	Perilipin-5
<b>48</b>	6,59	56	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5
<b>50</b>	5,67	86	Integrin beta-1

52	6,27	105	Up-regulator of cell proliferation
53	5,10	108	General transcription factor II-I repeat domain-containing protein 2
54	4,44	11	Small cell adhesion glycoprotein
55	4,53	12	Follitropin subunit beta
56	6,18	13	Serum amyloid A protein
58	5,54	14	Phospholipase A2
60	5,35	15	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
62	5,58	22	Prolactin
63	6,04	23	Alpha-S1-casein
64	6,85	24	Interleukin-34
65	4,92	27	Growth hormone receptor
66	5,96	30	Cytochrome c oxidase subunit 3
67	5,07	32	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B
68	7,06	32	Isochorismatase domain-containing protein 1
69	5,28	34	Myoblast determination protein 1
70	4,99	35	T-cell surface glycoprotein CD1b-1
71	5,93	36	Fructose-1,6-bisphosphatase 1
72	5,03	38	Protein delta homolog 2
73	5,12	39	Hsp90 co-chaperone Cdc37-like 1
74	4,28	40	N-terminal EF-hand calcium-binding protein 3
75	4,42	41	GPN-loop GTPase 1
76	5,85	41	Uroporphyrinogen decarboxylase
77	6,02	42	Cellular tumor antigen p53
78	5,05	46	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit
79	5,42	47	Synaptosomal-associated protein 47
80	5,27	48	Myc proto-oncogene protein
81	5,98	52	Sorting nexin-4
82	5,41	56	Activin receptor type-2A
83	5,86	58	Zinc finger and BTB domain-containing protein 18
84	6,45	58	Cytochrome P450 1A1
85	4,28	60	Uromodulin
86	6,34	62	RING finger protein 207
87	6,13	65	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
88	6,12	69	Suppressor of tumorigenicity 7 protein
89	6,05	86	Actin filament-associated protein 1-like 1
90	5,63	96	cTAGE family member 5
91	6,03	97	Glycogen phosphorylase, liver form
92	5,45	98	Oxidation resistance protein 1
93	7,45	179	Cortactin-binding protein 2
94	6,00	12	Beta-2-microglobulin
95	5,74	14	Bone morphogenetic protein 15
96	5,13	17	Tumor necrosis factor
97	6,39	21	Interleukin-12 subunit alpha
98	5,23	22	Hippocalcin-like protein 1
99	6,95	22	Calcipressin-1

<b>100</b>	5,80	24	Steroidogenic acute regulatory protein, mitochondrial
<b>101</b>	6,35	25	Tumor necrosis factor
<b>103</b>	6,49	39	Rhodopsin
<b>104</b>	5,38	40	Dipeptidase 1
<b>105</b>	5,80	41	Uroporphyrinogen decarboxylase
<b>106</b>	6,82	43	Cytochrome b
<b>107</b>	7,03	51	Hyaluronidase-2
<b>108</b>	6,51	55	Keratin, type II microfibrillar, component 5
<b>109</b>	5,52	76	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1
<b>138</b>	4,72	19	Cathepsin L1
<b>139</b>	5,58	19	Interferon tau-7
<b>140</b>	4,34	20	Interferon tau-11
<b>141</b>	5,90	53	Ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain-containing protein 1
<b>142</b>	5,96	60	Natural resistance-associated macrophage protein 1
<b>143</b>	6,72	73	Amiloride-sensitive sodium channel subunit beta
<b>144</b>	6,81	87	Toll-like receptor 2

#### AMBOS OS GRUPOS

<b>Spot's</b>	<b>pI</b>	<b>MW</b>	<b>Provável Proteína</b>
<b>1</b>	4,97	13	Interleukin-15
<b>2</b>	4,38	14	Alpha-lactalbumin
<b>3</b>	6,26	19	T-cell surface glycoprotein CD3 epsilon chain
<b>8</b>	5,51	37	Renin
<b>12</b>	5,49	57	Cytochrome c oxidase subunit 1
<b>13</b>	4,80	61	Interferon alpha/beta receptor 1
<b>14</b>	5,82	63	Prolactin receptor
<b>15</b>	5,27	65	Serum albumin
<b>16</b>	5,63	68	Brain-enriched guanylate kinase-associated protein
<b>23</b>	6,01	13	Interleukin-5
<b>25</b>	6,48	14	Vascular endothelial growth factor A
<b>32</b>	4,63	19	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6
<b>33</b>	5,63	19	Kappa-casein
<b>34</b>	6,11	18	Keratin, high-sulfur matrix protein, B2D
<b>36</b>	5,21	20	Ferritin heavy chain
<b>44</b>	4,27	36	Chymosin
<b>47</b>	4,86	55	Interferon alpha/beta receptor 2
<b>49</b>	5,26	84	Integrin beta-6
<b>51</b>	5,00	93	Calpain-3
<b>57</b>	3,95	14	Adrenodoxin
<b>59</b>	4,19	15	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog
<b>61</b>	6,80	18	Keratin, high-sulfur matrix protein, B2A
<b>102</b>	5,10	33	Syntaxin-1B
<b>137</b>	4,19	51	Keratin, type I cuticular Ha5



