

**UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAU – UVA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA**

CONTRIBUIÇÃO PARA O PERFIL PROTEICO DA RAÇA SANTA INÊS

MARIA GEYSILLANE CASTRO MATOS

**SOBRAL – CE
MARÇO - 2022**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAU – UVA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA**

CONTRIBUIÇÃO PARA O PERFIL PROTEICO DA RAÇA SANTA INÊS

MARIA GEYSILLANE CASTRO MATOS

**SOBRAL – CE
MARÇO – 2022**

MARIA GEYSILLANE CASTRO MATOS

CONTRIBUIÇÃO PARA O PERFIL PROTEICO DA RAÇA SANTA INÊS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual Vale do Acaraú.

Área de Concentração: Reprodução Animal

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Ângela Maria Xavier Eloy

CO-ORIENTADORA:

Dra. Ana Milena César Lima

SOBRAL – CE
MARÇO - 2022

MARIA GEYSILLANE CASTRO MATOS

CONTRIBUIÇÃO PARA O PERFIL PROTEICO DA RAÇA SANTA INÊS

Dissertação defendida e aprovada em: ____ / ____ / ____ pela Comissão
Examinadora:

Profa. Dra. Cláudia Goulart de Abreu,
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora

Dra. Ângela Maria Xavier Eloy
Embrapa Caprinos e Ovinos
Presidente

Dra. Alice Andrioli Pinheiro
Embrapa Caprinos e Ovinos

Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Embrapa Caprinos e Ovinos

Dra. Fátima Révia Granja Lima
Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA

Dra. Ana Milena César Lima
Universidade Federal do Piauí - UFPI

SOBRAL – CE
MARÇO - 2022

AGRADECIMENTOS

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.

A 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.

À Dra. Ângela Maria Xavier Eloy, pela orientação no Curso de Pós-Graduação e pelos ensinamentos acadêmicos.

Ao laboratorista da Embrapa Caprinos e Ovinos, João Ricardo Furtado, pela paciência, ensinamentos e apoio sempre que preciso.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	VIII
RESUMO GERAL.....	IX
GENERAL ABSTRACT.....	X
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	XI
CAPÍTULO 1	13
REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
1. Importância da espécie ovina.....	14
2. Características reprodutivas da espécie.....	14
3. Plasma seminal e suas características proteicas.....	15
4. Perfil bioquímico do plasma seminal.....	16
5. Qualidade do sêmen criopreservado.....	16
6. Proteômica do sêmen ovino.....	17
7. Eletroforese bidimensional.....	18
8. Referências.....	19
..	
CAPÍTULO 2	23
PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN DA RAÇA SANTA INÊS.....	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
ANEXOS.....	45

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1** - Valores médios e desvio padrão do volume e concentração do sêmen fresco de cinco reprodutores ovinos Santa Inês.....33
- Tabela 2** - Valores médios e desvio padrão do volume e concentração do sêmen fresco de cinco reprodutores ovinos Santa Inês. Letras diferentes em colunas do mesmo horário indicam diferença significativa na probabilidade de $p \leq 0,05$ 33
- Tabela 3** – Valores percentuais de motilidade espermática do sêmen de cinco reprodutores ovinos Santa Inês sob diferentes condições..... 34

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 2

- Figura 1.** Concentração total de proteínas no plasma seminal de ovinos reprodutores da raça Santa Inês. Letras diferentes entre diferentes colunas indicam diferença estatística a probabilidade de $p \leq 0,05$ 35
- Figura 2.** Gel referente ao animal A, com dados relativos ao pI e kDa de acordo com o *match*.....37
- Figura 3.** Gel referente ao animal B, com dados relativos ao pI e kDa de acordo com o *match*.....37
- Figura 4.** Gel referente ao animal C, com dados relativos ao pI e kDa de acordo com o *match*.....38
- Figura 5.** Gel referente ao animal D, com dados relativos ao pI e kDa de acordo com o *match*.....39
- Figura 6.** Gel referente ao animal E, com dados relativos ao pI e kDa de acordo com o *match*.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentual
2D – Eletroforese bidimensional
BSA – Albumina Sérica Bovina
CBB - Comassie Brilliant Blue
CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CHAPS - 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato.
cm – Centímetro
DTT – Ditioneitol
ECP - Cipionato de Estradiol
g – Grama
h – Hora
IAA – Iodoacetamida
IPG – Immobilized pH gradient
kDa - QuiloDalton
LTS - Laboratório de Tecnologia de Sêmen
M - Molar
mA - MiliAmpere
mg – Miligrama
min – Minuto
mL – Mililitro
MW - Massa Molecular
NaCl - Cloreto de Sódio
ng - Nanograma
nm -Nanômetros
° C - Graus Celsius
PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida
pI – Ponto isoelétrico
RPM -
PS – Plasma seminal
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SDS/PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TEMED – Tetrametilenodiamina
Tris - 2-Amino-2-hidroxi-metil-propano-1,3-diol
V – Volt
Vh – Volt/hora
µg - Micrograma
µL - Microlitro
µm - Micrometro
µM - Micromolar
µmol – Micromole

RESUMO GERAL

O conhecimento dos componentes do plasma seminal, a partir da identificação de marcadores moleculares proteicos, pode representar uma alternativa para avaliação do desempenho reprodutivo dos animais. De modo a auxiliar na análise da qualidade seminal ou de criopreservação, associado a possibilidade dessas estruturas moleculares serem classificadas e consideradas como biomarcadores. Portanto, o objetivo deste estudo foi descrever o procedimento de exames andrológicos em carneiros Santa Inês, relacioná-los a qualidade do sêmen mediante a criopreservação e descongelamento, e traçar o perfil proteômico do sêmen e identificar possíveis biomarcadores de fertilidade nesta raça. Cinco reprodutores da raça Santa Inês, com faixa etária de dois a seis anos, com peso médio de 50 kg foram submetidos a 3 coletas de sêmen através de vagina artificial. Cada amostra de sêmen foi destinada a criopreservação e a separação do plasma. O sêmen utilizado para criopreservação sofreu aferições de vigor, motilidade, volume e concentração, quando ainda fresco, após a diluição, e após o congelamento, nos tempos: 0 minutos; 5 minutos e 24h. O plasma seminal centrifugado foi direcionado a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford, submetendo o material a Eletroforese Bidimensional (2DE). Os géis obtidos foram escaneados e comparados através do *Software ImageMaster 2D Platinum 7.0*, buscando quantificar e identificar os *spot's* presentes. A análise estatística foi feita por meio do teste F de Tukey, adaptado por Bonferroni para os valores de vigor e motilidade do sêmen. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) na motilidade do sêmen. No entanto, para o vigor espermático ($P < 0,05$), no tempo de 24h pós descongelamento, houve diferença estatística entre os animais, com variações durante o tempo analisado. A notável viabilidade pós-congelamento do sêmen dos animais estudados, deve ocorrer em virtude das taxas proteicas no plasma seminal, como característica individual dos animais, apresentando taxas maiores de proteínas protetoras da membrana espermática contra danos oxidativos e térmicos. Contudo, análises mais específicas podem ser realizadas posteriormente para identificação das proteínas observadas, conforme a Massa Molecular (MW) e ponto Isoelétrico (pI) destacadas nos géis bidimensionais das amostras analisadas.

Palavras-chave: Proteômica; ovino; sêmen; congelamento do sêmen

GENERAL ABSTRACT

The knowledge of the components of the seminal plasma, from the identification of protein molecular markers can represent an alternative for the evaluation of the reproductive performance of the animals. In order to assist in the analysis of seminal quality or cryopreservation, associated with the possibility of these molecular structures being classified and considered as biomarkers. Therefore, the objective of this study was to describe the procedure of andrological examinations in Santa Inês rams, to relate them to the quality of the semen through cryopreservation and thawing, and to trace the proteomic profile of the semen and identify possible biomarkers of fertility in this breed. Five Santa Inês bulls, aged between two and four years, with an average weight of 50 kg were submitted to semen collection through an artificial vagina. Each semen sample was destined for cryopreservation and plasma separation. The semen used for cryopreservation underwent vigor, motility, volume and concentration measurements, when still fresh, after dilution, and after freezing, at the following times: 0 minutes; 5 minutes and 24 hours. The centrifuged seminal plasma was directed to the quantification of total proteins by the Bradford method, submitting the material to Two-Dimensional Electrophoresis (2DE). The obtained gels were scaled and compared using the *ImageMaster 2D Platinum 7.0 Software*, seeking to quantify and identify the *spots* present. Statistical analysis was performed using Tukey's F test, adapted by Bonferroni for the values of semen vigor and motility. There was no statistical difference ($P>0.05$) in semen motility. However, for spermatic vigor ($P<0.05$), in the time of 24h, there was a statistical difference between the animals, with variations during the analyzed time. The remarkable post-freezing viability of the semen of the studied animals must occur due to the protein levels in the seminal plasma, as an individual characteristic of the animals, presenting higher rates of protective proteins of the sperm membrane against oxidative and thermal damage. However, more specific analyzes can be performed later to identify the proteins observed, according to the Molecular Weight (MW) and Isoelectric point (Ip) highlighted in the two-dimensional gels of the analyzed samples.

Keywords: Proteomics; ram; spermatozoids; frozen sperm

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A ovinocultura é uma atividade importante da pecuária industrial moderna, na qual os pequenos ruminantes podem prover carne, lã, pele e leite para a sociedade. No entanto, o rápido desenvolvimento da agropecuária moderna intensificada gera a necessidade por métodos de manejo reprodutivos mais eficientes. Incluindo, diluentes seminais que possam melhorar a qualidade espermática, e mais recentemente, a busca pelo melhores resultados e informações por meio da proteômica do plasma seminal.

A criopreservação do sêmen permite que o material genético de alta qualidade seja preservado por longo período, contribua para a adoção de programas de melhoramento genético. Portanto, a identificação de possíveis proteínas relacionadas à criopreservação do sêmen ovino mostra-se indispensável.

Diversos estudos descrevem os componentes proteicos do plasma seminal como como vitais para a funcionalidade, taxa de sobrevivência à congelação, entre outros fatores. No entanto, pouco se sabe sobre a proteômica do plasma seminal ovino, apesar dos diversos estudos realizados e dos esforços, pois há uma grande variedade individual pelos reprodutores nas taxas de cada composto proteico e essas micro alterações são ponto chave na capacidade do sêmen de obter taxas reprodutivas melhores.

A adoção da proteômica proporcionará do ponto de vista econômico, diminuição dos riscos e gastos com aquisição de reprodutores que apresentam sêmen de baixa capacidade de congelabilidade e a disponibilidade de um sêmen congelado de alta qualidade proporcionando um relevante impulso à adoção das biotécnicas reprodutivas.

Diante da importância da eficiência reprodutiva, estudos relacionados ao conhecimento das proteínas presentes no plasma seminal são importantes para conhecer a presença e funções de proteínas e, conseqüentemente, as atuações na fertilidade dos reprodutores. Nisto, o uso das biotecnologias avançadas como a técnica de eletroforese bidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), associada a espectrometria de massa, pode proporcionar a identificação e caracterização das proteínas com resultados interessantes e promissores para a reprodução animal.

O conhecimento sobre a proteômica do plasma seminal de ovinos pode levar ao desenvolvimento de métodos, e identificação de biomarcadores que propiciem uma melhor predição da capacidade fertilizantes de animais mantidos em sistemas de criação diversos.

Portanto, este trabalho visa avaliar a biotécnica da criopreservação do sêmen e seu efeito sobre a qualidade, tais como vigor, motilidade e concentração espermática, como também sobre o perfil proteico do sêmen pós congelamento de ovinos Santa Inês.

O tema abordado neste estudo, foi elaborado e será apresentado em dois capítulos. O capítulo 1, intitulado como referencial teórico, compreende temas relacionados a raça ovina e suas características reprodutivas, com o perfil bioquímico do material de estudo, o plasma seminal. Ainda nesta seção, informações sobre proteômica e a sua relação com a reprodução serão apresentadas. No capítulo 2, serão apresentados os resultados quanto a qualidade seminal de reprodutores Santa Inês e a presença de proteínas no plasma seminal, com a possibilidade de serem identificadas e classificadas para atuarem como biomarcadores. A identificação e caracterização de proteínas envolvidas nestes processos seriam de grande importância para maior compreensão dos mecanismos reprodutivos

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Importância da espécie ovina

Os ovinos foram uma das primeiras espécies domesticadas pela humanidade (BAIRD et al., 2018), servindo primariamente como fonte de alimento (WEYRICH et al., 2017) e foram animais que interferiram na cultura humana nômade, criando grupos pastoralistas (ZHAO et al., 2017).

A produção de pequenos ruminantes tem um significativo impacto socioeconômico em todo o mundo. Tradicionalmente, os pequenos ruminantes são criados em sistemas de pastoreio onde as terras mais produtivas são usadas para alimentar vacas e secundariamente os ovinos (SIMÕES et al., 2021).

No Brasil, o rebanho ovino é constituído por aproximadamente 20,6 milhões de cabeças, um rebanho efetivo que no ano de 2020 sofreu aumento de 3,3% em relação a 2019 (IBGE, 2020). Dentre todos os ovinos presentes no Brasil, 70,6% estão presentes no Nordeste, principalmente nos estados da Bahia e Pernambuco (IBGE, 2020).

A produção ovina no nordeste brasileiro é voltada para a produção de carne e couro, utilizando raças não lanadas (IBGE, 2020) e estes produtos, por sua vez, só são adquiridos uma vez a cada animal produzido, elevando muito a importância de manejo reprodutivo adequado que influencie ao máximo em aumentar a frequência de partos, com inserção de novos animais no rebanho constantemente.

O manejo genético, reprodutivo e o controle zootécnico são essenciais para maximizar a produção, utilizando ao máximo recursos como inseminação, seleção de animais com maior potencial para reprodução são recursos importantes a se utilizar. É possível também utilizar a sincronização de estro com estação de monta planejada ou inseminação artificial com uso do efeito macho (HABEEB & KUTZLER, 2021), visando obter maior frequência de partos e maior rotatividade no rebanho.

2. Características reprodutivas da espécie

Os animais com aproximadamente 6 meses de idade entram na fase pubertária, em que há liberação de GRH pelo hipotálamo, estimulando a hipófise anterior a produzir hormônio luteinizante e hormônio folículo estimulante, os quais atuam nas células de Leydig produzam testosterona, que estimula a produção espermática e o desenvolvimento físico do animal (HOUGH et al., 2019).

Os animais jovens, porém, aptos à reprodução não são utilizados para reprodução até atingirem sua maturidade sexual completa, pois há menores taxas de concentração espermática em animais imaturos. Acredita-se que quando os animais

atingem aproximadamente 70% do peso final adulto eles podem ser inseridos na reprodução (GRANADOS et al., 2006).

Ovinos são animais poliéstricos estacionais (ORTAVANT et al., 1988; HABEEB & KUTZLER, 2021), sendo que a sazonalidade ocorre em virtude da incidência solar, pois a mesma faz com que os animais produzam melatonina em padrões diferentes de acordo com a estação do ano, esses padrões causam feedback negativo na secreção de GRH pelo hipotálamo, reduzindo a atividade sexual (HABEEB & KUTZLER, 2021). Vale salientar também que raças de origem africana não possuem tanto efeito sazonal em seus ciclos estrais e taxas de produção espermática quanto animais de raças europeias (GRANADOS et al., 2006).

3. Plasma seminal e suas características proteicas

O plasma seminal é um fluido composto por uma mistura complexa, que contém diferentes macromoléculas provenientes do epidídimo e glândulas sexuais acessórias com a função de manter a viabilidade dos espermatozoides (CODOGNOTO et al., 2018). Durante a ejaculação, os espermatozoides ganham mais mobilidade, gradualmente conforme estão em contato e se misturando com o plasma seminal (PAUL et al., 2018).

Possui funções de modulação da função dos espermatozoides e do trato feminino através do fornecimento de fatores de sinalização e glicoproteínas com propriedades de ligação do esperma, sendo que a ausência desse conjunto de secreções reduz significativamente a fertilidade do esperma (LEAHY et al., 2019).

As proteínas do plasma seminal possuem diversas funções, sendo elas: Proteínas envolvidas na proteção espermática, na mobilidade espermática; capacitação; fertilização e as responsáveis pela reação do acrossoma (MOURA et al., 2018).

Diversos constituintes do plasma seminal são estudados quanto às suas funções, uma vez que diferentes espécies e raças comumente apresentam diferentes composições do plasma seminal. Um exemplo de proteína de suma importância no plasma seminal é a espermedesina. Em carneiros da raça Texel, Condessa et al. (2018) observaram que essa proteína possui alta capacidade de absorção de calor e neutralização de pH, aumentando consideravelmente a viabilidade do esperma no trato genital da fêmea, pois reduz o estresse que os espermatozoides receberiam pelo calor e pH baixos.

A cisteína e a glutatona são algumas das únicas proteínas capazes de penetrar a membrana celular facilmente, sendo a cisteína conhecida por melhorar a motilidade e

morfologia de sêmen descongelado, além de auxiliar a manter viabilidade, estrutura da cromatina e integridade da membrana (COYAN et al., 2011).

A maioria dos estudos voltados à proteômica buscam conhecer melhor a função de cada proteína e demonstram que as proteínas no plasma seminal alteram a capacidade de congelamento e criopreservação do sêmen. Em virtude das diferenças proteicas entre espécies e raças, estabelecer um método de criopreservação eficiente se torna difícil, apesar da utilização de crioprotetores para aumentar a taxa de sobrevivência espermática (LV et al., 2019).

Existem variações individuais significativas entre o esperma de machos ovinos da mesma raça que alteravam a taxa de sobrevivência espermática ao congelamento (RICKARD et al., 2016). Os mesmos autores também verificaram que o plasma seminal de alta resiliência, proveniente de animais com maiores taxas de sobrevivência espermática afetam positivamente o congelamento, tanto em espermatozoides de alta resiliência quanto de baixa resiliência, demonstrando que a composição do plasma seminal é diretamente relacionada com a capacidade de congelamento e criopreservação.

Estudos para descrever os componentes do plasma seminal são vitais para construir bibliotecas de dados com informações de cada um dos compostos do plasma seminal. Mais de 4.000 proteínas já foram identificadas no plasma seminal humano, no entanto, estipula-se que podem ter até 10.000 proteínas (GILANY et al., 2014).

5. Qualidade do sêmen criopreservado

A criopreservação de sêmen é uma tecnologia essencial na manutenção de recursos genéticos e possibilita a utilização da inseminação artificial com maior facilidade e tem sido aplicada na pecuária diária, especialmente em bovinos (LV et al., 2018).

Criopreservar sêmen, apesar de útil e benéfico às tecnologias reprodutivas, causa danos significativos aos espermatozoides por estresse osmótico, desidratação celular e formação de cristais de gelo no interior celular (GRAHAM & PARKS, 1992). Ao congelar e descongelar o sêmen, os fosfolipídios da membrana dos espermatozoides também sofrem alterações (FANG et al., 2016).

São realizadas diluições no sêmen, utilizando crioprotetor, estabilizante, açúcares, sais, ácidos e antibióticos. No intuito de reduzir os danos causados pela criopreservação aos espermatozoides e aumentar a quantidade de doses por ejaculado,

são utilizados diluentes de diversos tipos, como Egg & Yolk sendo o mais comum, associado com antibióticos, diluentes à base de óleos vegetais, água de coco, lecitina de soja, entre outros tem sido empregado em pequenos ruminantes para obter menores danos aos espermatozoides (CÂMARA et al., 2018).

Após a diluição, o sêmen é refrigerado à temperatura de 0 a 5 °C, sendo este um período de adaptação em que os espermatozoides reduzem seu metabolismo. Após o resfriamento, as doses podem ser congeladas a -120 °C, e armazenadas em nitrogênio líquido a -196 °C (NRC, 2007).

O congelamento, no entanto, é danoso aos espermatozoides, mesmo com utilização de diluentes e outros componentes. Em virtude disto, além da utilização de diluentes, tem sido observado que componentes do plasma seminal também contribuem na redução e/ou aumento nos danos causados pelo congelamento (LEDESMA et al., 2017; LV et al., 2018). Foram verificados spots proteicos do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês apresentando correlação positiva com a integridade da membrana plasmática de espermatozoides criopreservados, por terem função auxiliar na estabilidade da membrana, melhorando a viabilidade de espermatozoides criopreservados (MOURA et al., 2010).

Apesar dos esforços em identificar proteínas específicas que auxiliem em maiores taxas de sobrevivência espermática e menores danos na criopreservação (LV et al., 2018; PINI et al., 2018), a variação individual no plasma seminal causa muita variação na capacidade do ejaculado em ser criopreservado (RICKARD et al., 2016).

6. Proteômica do sêmen ovino

Proteoma é o conjunto de proteínas que são expressas por uma célula, tecido ou organismo. A análise proteômica serve para identificar e caracterizar moléculas endógenas ou exógenas, segregando-as das demais e analisando sua estrutura, tamanho, peso molecular, entre outros fatores e ela consiste no estudo do proteoma, utilizando técnicas de separação e identificação, tais como eletroforese, cromatografia e espectrometria de massas.

Em carneiros, a análise do plasma seminal por eletroforese associada a espectrometria de massas permitiu a identificação de mais de 700 proteínas seminais, incluindo uma alta abundância de proteínas, tais como esperadíssimas (bodhesin2), 'Binder of Sperm' (BSP1, BSP5, SPADH1, SPADH2) e lactoferrina (SOLEILHAVOUP et al., 2014).

A análise proteômica é dividida em identificação das proteínas expressas, identificação das alterações de nível de expressão dessas proteínas, conjuntos de identificação funcionais de proteínas, que são grupos de proteínas localizadas no mesmo sítio celular e por fim a identificação de proteínas que formam organelas, visando mapear as características das mesmas (VISPO, 2004).

7. Eletroforese bidimensional

A técnica de eletroforese é baseada na aplicação de uma corrente elétrica contínua que estimula a migração de íons submetidos à corrente elétrica, em que moléculas com carga positiva migram para o polo negativo, e moléculas com carga negativa migram para o polo positivo.

A eletroforese em gel acrilamida é conhecida como SDS-PAGE, que possui o fracionamento protéico pelas cargas elétricas (PAGE) e a desnaturação das mesmas com uso do SDS (dodecil sulfato de sódio). O gel de poliacrilamida pode ser usado de forma a nivelar faixas de peso molecular, quanto maior a concentração de acrilamida no gel, menores serão os poros e portanto, permitindo a passagem de proteínas menores (NAOUM, 2012).

O SDS interage com os as cadeias peptídicas, promovendo a desnaturação das proteínas, fazendo com que as mesmas desenvolvam carga negativa e sejam atraídas ao polo positivo (OLIVEIRA et al., 2015). A técnica de eletroforese SDS-PAGE é a que apresenta melhores resultados, pela visualização de proteínas, mesmo que em níveis baixos, provendo informações sobre tamanho e número de unidades (OLIVEIRA et al., 2015).

REFERÊNCIAS

- BAIRD, D.; FAIRBAIRN, A.; JENKINS, E.; MARTIN, L.; MIDDLETON, C.; PEARSON, J.; ASOUTI, E.; EDWARDS, Y.; KABUKCU, C.; MUSTAFAOĞLU, G.; RUSSELL, N.; BAR-YOSEF, O.; JACOBSEN, G.; WU, X.; BAKER, A. AND ELLIOTT, S. Agricultural origins on the Anatolian plateau. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 115(14):E3077–E3086. 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800163115>.
- BANJOKO, S.; ADESEOLU, F. Seminal plasma ph, inorganic phosphate, total and ionized calcium concentrations in the assessment of human spermatozoa function. **Journal of Clinical and Diagnostic Research** 7(11):2483-2486. 2013.
- CÂMARA, T. S.; NUNES, T. G. P. AND TONIOLLI, R. DILUENTES SEMINAIS PARA PEQUENOS RUMINANTES. **Ciência Animal**. 28(2):67-83. 2018.
- CODOGNOTO, V. M.; YAMADA, P. H.; SCHMITH, R. A.; RUEDIGER, F. R.; SCOTT, C.; LAINETTI, P. F.; BROCHINE, S.; DE PAULA FREITAS-DELL'AQUA, C.; SOUZA, F. F. AND OBA, E. Functional insights into the role of seminal plasma proteins on sperm motility of buffalo. **Animal Reproduction Science** 195:251-258. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.002>.
- CONDESSA, M. A. K. L.; PIMENTEL, A. L.; SEIXAS, F. A. V. AND MARTINEZ, A. C. Purification, structural and biophysical characterisation of the major seminal plasma protein from Texel rams. **Animal Reproduction Science** 189(1):11-18. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.10.013>.
- DOBRAKOWSKI, M.; KALETKA, Z.; GRECKA, A.; KASPERCZYK, S.; HORAK, S.; BIRKNER, E.; FIOŁKA, J. AND JASPERCZYK, A. The role of oxidative stress, selected metals, and parameters of the immune system in male fertility. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2018:6249536. 2018.
- FANG, Y.; BLAIR, H.; ZHONG, R.; SUN, H. AND ZHOU, D. Optimizing the freezing rate for ovine semen cryopreservation: phospholipid profiles and functions of the plasma membrane and quality and fertilization of spermatozoa. **Small Ruminants Research** 139:46–51. 2016.
- GILANY, K.; MOAZENI-POURASIL, R. S.; JAFARZADEH, N. AND SAVADI-SHIRAZ, E. Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients. **Molecular Reproduction and Development** 81(1):84-6. 2014. <https://doi.org/10.1002/mrd.22284>.
- GRAHAM, J. K. AND PARKS, J. E. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology** 38(2):209–222. 1992.
- GRANADOS, L. B. C.; DIAS, A. J. B. AND SALES, M. P. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. 1.ed. Campos de Goytacazes – RJ: [s.n], 2006. Projeto PROEX/UENF. 54 p.

HABEEB, H. M. H. AND KUTZLER, M. A. Estrus Synchronization in the Sheep and Goat. The Veterinary clinics of North America. **Food Animal Practice** 37(1):125-137. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.10.007>.

HOUGH, D.; ROBINSON, J.; BELLINGHAM, M.; FLEMING, L.; MCLAUGHLIN, M.; JAMA, K.; HARALDSEN, I. R. H.; SOLBAKK, A. K. AND EVANS, N. Peripubertal GnRH and testosterone co-treatment leads to increased familiarity preferences in male sheep. **Psychoneuroendocrinology** 108:70-77. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.06.008>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal 2020. **Produção da Pecuária Municipal**. v. 48, p. 1-12, 2020.

KASPERCZYK, A.; DOBRAKOWSKI, M.; HORAK, S.; FIOŁKA, J. AND BIRKNER, E. The influence of macro and trace elements on sperm quality. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** 30:153-159. 2015.

LEAHY, T.; RICKARD, J. P.; BERNECIC, N. C.; DRUART, X. AND DE GRAAF, S. P. Ram seminal plasma and its functional proteomic assessment. **Reproduction** 157(6):243-256. 2019. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0627>.

LEDESMA, A.; ZALAZAR, L.; FERNÁNDEZ-ALEGRE, E.; HOZBOR, F.; CESARI, A. AND MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma proteins modify the distribution of sperm subpopulations in cryopreserved semen of rams with lesser fertility. **Animal Reproduction Science** 184:44-50. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.06.015>.

LV, C.; WU, G.; HONG, Q. AND QUAN, G. Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. **Biopreservation and Biobanking** 17(2):171-182. 2019. <http://doi.org/10.1089/bio.2018.0113>.

MALIK, M.; JAMIL, H.; QURESHI, Z.; MEHFOOZ, A.; RIZVI, S.; ULLAH, S.; DILSHAD, S.; ZAMAN, A.; ULLAH, N.; SAFDAR, S.; JELANI, G.; MARIS, H.; MAJID, A. AND KHAN, M. Investigation on relationship of hormonal profile and biochemical constituents of seminal plasma with physical characteristics of damani buck. **Pure and Applied Biology** 7(2):6840-691. 2018.

MOURA P. P.; FRANCO, M. M.; SILVA, T. A. S. N.; ROCHA, T. L.; LEAL, D. R. AND PASSOS, P. I. B. Characterization of seminal plasma proteins and its relationship with quality parameters of frozen semen in ram. **Ciencia Rural** 40(5):1154–1159. 2010.

MOURA, A. A.; MEMILI, E.; PORTELA, A. M. R.; VIANA, A. G.; VELHO, A. L. C.; BEZERRA, M. J. B. AND VASCONSELOS, F. R. Seminal plasma proteins and metabolites: effects on sperm function and potential as fertility markers. **Animal Reproduction** 15(1):691-702. 2018. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0029>.

NAOUM, P. C. Eletroforese: Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas, Lipoproteínas e DNA. São Paulo: Editora Santos. 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL-NRC. Nutrient requirements of Sheep. Washington, D.C.: National Academy Press 2007. 362p.

OLIVEIRA, E.; TRENTIN, T. C.; CAMARGO, F.; PINTO, Y. D. P. AND MARTINS, D. B. ELETROFORESE: CONCEITOS E APLICAÇÕES. **Enciclopédia Biosfera** 11(22). 2015. https://doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_149.

PAUL, R. K.; BALAGANUR, K.; KUMAR, D. AND NAQVI, S. M. K. Modulation of seminal plasma content in extended semen improves the quality attributes of ram spermatozoa following liquid preservation at 3-5°C. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene** 53(5):1200-1210. 2018. <https://doi.org/10.1111/rda.13227>.

PINI, T.; RICKARD, J. P.; LEAHY, T.; CROSSETT, B.; DRUART, X. AND DE GRAAF, S. P. Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa. **Journal of Proteomics** 15(181):73-82. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.04.001>.

RICKARD, J. P.; SCHMIDT, R. E.; MADDISON, J. W.; BATHGATE, R.; LYNCH, G. W.; DRUART, X. AND DE GRAAF, S. P. Variation in seminal plasma alters the ability of ram spermatozoa to survive cryopreservation. **Reproduction, Fertility and Development** 28(1):516–523. 2016. <http://dx.doi.org/10.1071/RD14123>.

SIMÕES, J.; ABECIA, J. A.; CANNAS, A.; DELGADILLO, J. A.; LACASTA, D.; VOIGT, K. AND CHEMINEAU, P. Review: Managing sheep and goats for sustainable high yield production. *Animal* 15:e100293. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100293>.

Soleilhavoup, C.; Tsikis, G.; Labas, V.; Harichaux, G.; Kohnke, P. L.; Dacheux, J. L.; Guerin, Y.; Gatti, J. L.; De Graaf, S. P. and Druart, X. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. **Journal of Proteomics** 109:245–260. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.007>.

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

WEYRICH, L. S.; DUCHENE, S.; SOUBRIER, J.; ARRIOLA, L.; LLAMAS, B.; BREEN, J.; MORRIS, A. G.; ALT, K. W.; CARAMELLI, D.; DRESELY, V.; FARRELL, M.; FARRER, A. G.; FRANCKEN, M.; GULLY, N.; HAAK, W.; HARDY, K.; HARVATI, K.; HELD, P.; HOLMES, E. C.; KAIDONIS, J.; LALUEZA-FOX, C.; RASILLA, M.; ROSAS, A.; SEMAL, P.; SOLTYSIAK, A.; TOWNSEND, G.; USAI, D.; WAHL, J.; HUSON, D. H.; DOBNEY, K. AND COOPER, A. Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. **Nature** 544(7650):357-361. 2017. <https://doi.org/10.1038/nature21674>.

ZHAO, Y. X.; YANG, J.; LV, F. H.; HU, X. J.; XIE, X. L.; ZHANG, M.; LI, W. R.; LIU, M. J.; WANG, Y. T.; LI, J. Q.; LIU, Y. G.; REN, Y. L.; WANG, F.; HEHUA, E.; KANTANEN, J.; ARJEN LENSTRA, J.; HAN, J. L. AND LI, M. H. Genomic Reconstruction of the History of Native Sheep Reveals the Peopling Patterns of Nomads and the Expansion of Early Pastoralism in East Asia. **Molecular Biology and Evolution** 34(9):2380-2395. 2017. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx181>.

CAPITULO 2

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN DA RAÇA SANTA INÊS

Artigo elaborado conforme as normas do periódico Semina: Ciência Agrárias

(ISSN -1679-0359) – B2

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN DA RAÇA SANTA INÊS

SEMINAL PLASMA PROTEINS AND THEIR RELATIONSHIP WITH THE FREEZING OF SANTA INES BREED SEMEN

Maria Geysillane Castro Matos¹; Ana Milena César Lima²; Angela Maria Xavier Eloy³

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Av. da Universidade, 850 - Campus da Betânia, Sobral, CE, CEP: 62040-370, Brasil. E-mail: geysillanvet@gmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Universidade Federal do Piauí - UFPI Campus Universitário Ministro Petrônio Portella Bairro Ininga - Teresina - PI - CEP: 64049-550, Basil. E-mail: anamilenalima@yahoo.com.br

³Embrapa Caprinos e Ovinos (CNPACO), Departamento de Sanidade Animal, Estrada Sobral - Groaíras, s/n, Zona Rural, Sobral, CE, CEP: 62010-970, Brasil. E-mail: angela.elay@embrapa.br

Resumo: A ovinocaprinocultura é um dos pilares da agricultura nordestina e é dependente de bons manejos reprodutivos e sanitários para se manter viável. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar o perfil protéico do plasma seminal ovino por meio de eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida (2D-PAGE) e verificar se alguma dessas proteínas está relacionada com a congelabilidade do sêmen, podendo ser utilizadas como marcadores para essa característica. Foram utilizados os ejaculados de cinco reprodutores da raça Santa Inês, animais adaptados ao clima do semiárido brasileiro, nos quais foram realizadas avaliações espermáticas, em que os plasmas seminais obtidos por centrifugação foram submetidos 2D-PAGE em gel a 12% de poliacrilamida. Foram avaliados três géis de ejaculados diferentes no mesmo animal, onde foram identificados spots, considerando todos os animais analisados. Destes, foram realizados match entre os géis do mesmo animal para identificar possíveis proteínas. O software de análise de imagem identificou manchas de proteína, com peso molecular variando de 10 a 75 kDa e pI 3 a 8. As possíveis identificações destas proteínas sugerem que as mesmas desempenham diversas funções como, proteção da membrana espermática, proteção dos efeitos tóxicos e capacitação espermática. Conclui-se que há a possibilidade das proteínas encontradas serem biomarcadores na área de proteômica e possuem correlação positiva com a congelabilidade de semen da raça Santa Inês.

Palavras-chave: Criopreservação; Eletroforese; Proteômica; Sêmen.

Abstract: Sheep and goat farming is one of the pillars of northeastern agriculture and is dependent on good reproductive and sanitary management to remain viable. The objective of this work was to identify and characterize the protein profile of ovine seminal plasma by means of two-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gels (2D-PAGE) and to verify if any of these proteins is related to the freezeability of semen, which can be used as markers for this feature. The ejaculates of five Santa Inês breeders, animals adapted to the Brazilian semi-arid climate, were used, in which sperm evaluations were performed, in which the seminal plasmas obtained by centrifugation were submitted to 2D-PAGE in 12% polyacrylamide gel. Three different ejaculate gels were evaluated in the same animal, where spots were identified, considering all the analyzed animals. Of these, a match was performed between the gels of the same animal to identify possible proteins. The image analysis software identified protein spots, with molecular weight ranging from 10 to 75 kDa and pI 3 to 8. The possible identifications of these proteins suggest that they perform several functions such as protection of the sperm membrane, protection from toxic effects and sperm capacitation. It is concluded that there is a possibility that the proteins found are biomarkers in the area of proteomics and have a positive correlation with the freezeability of Santa Inês breed semen.

Key-words: Cryopreservation; Electrophoresis; Proteomics; Semen.

INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma atividade explorada em várias regiões do Brasil, destacando-se de forma significativa no agronegócio, tendo maior representatividade nos estados das regiões Nordeste e Sul. Assim sendo, o efetivo de rebanho ovino no Nordeste do país, representa 70,59% do rebanho nacional (IBGE, 2021). Por isso, a importância socioeconômica da produção ovina é representativa na região destacada.

Diante do aumento significativo dos rebanhos ovinos, a seleção de reprodutores e matrizes com alta eficiência reprodutiva constitui um dos principais critérios dos sistemas de produção animal, por ser um fator essencial para a lucratividade e aumento na qualidade do rebanho (MATOS et al., 1992).

Os critérios seletivos de reprodutores são utilizados para identificação e adoção de indicadores válidos do potencial reprodutivo dos animais. As práticas utilizadas incluem medições da biometria testicular, avaliação da motilidade e defeitos morfológicos, análise computadorizada do sêmen e testes avançados de função espermática, como a integridade acrossômica ou da cromatina (ROGERS et al. 1983; HOLT et al. 1997; SOUZA et al., 2001). Contudo, apesar destas avaliações definirem critérios mínimos para a seleção de reprodutores, as mesmas não apresentam relação significativa com a fertilidade dos animais (COX; ALFARO, 2007).

Diante disso, a realização de pesquisas relacionadas à identificação de biomarcadores que possam auxiliar na identificação e no maior potencial reprodutivo dos animais são cada vez mais importantes, uma vez que ainda não podem ser expressos apenas por parâmetros reprodutivos. Entretanto, a associação desses parâmetros a análises proteômicas podem gerar resultados mais seguros e confiáveis quanto ao potencial reprodutivo dos animais.

Presume-se que as proteínas encontradas no plasma seminal de ovinos possam ser utilizadas como biomarcadores de qualidade seminal. Uma vez que estas são encontradas em grande quantidade no plasma seminal na forma de complexos associados, desempenhando papel de extrema importância em todos os processos relacionados à fertilidade. Destaca-se que, cada espécie animal possui condições específicas e isso inclui também a conformação e proteínas de tamanhos diferentes (BEZERRA JUNIOR, 2013).

A avaliação da expressão de proteínas no plasma seminal pode ser realizada por meio de técnicas como a proteômica que visam o estudo em larga escala e fundamenta-se, por exemplo, em métodos de separação e detecção simultânea de proteínas,

utilizando técnicas como eletroforese bidimensional (2DE), acompanhadas de métodos cada vez mais eficientes e sensíveis de identificação de novas expressões de proteína por espectrometria de massa (BEZERRA JUNIOR, 2013).

Há também o uso mais comum da técnica proteômica de Eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa, pois esta permite a identificação precisa de valores únicos relativos às proteínas, como pH, peso molecular (kDa) e identificando também as cadeias peptídicas da proteína, identificando verdadeiramente qual proteína está sendo avaliada, fazendo deste método um dos mais eficientes para estudos profundos relativos à proteômica (FLOWERS, 1998; BRANDON et al., 1999).

Considerando a grande relevância econômica que a espécie ovina tem para o Nordeste, aliado ao baixo aproveitamento de sua capacidade reprodutiva, é de grande importância o uso de ferramentas que auxiliem as pesquisas voltadas à análise reprodutiva. Este trabalho objetivou determinar a qualidade espermática de reprodutores da raça Santa Inês, traçando o perfil proteômico do sêmen e possíveis biomarcadores de fertilidade e congelabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

Todos os animais utilizados neste estudo foram conduzidos em estrita conformidade com as normas de conduta para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão preconizados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da EMRAPA CNPC (protocolo N° 001/2020).

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. A 3°42' de latitude Sul e 40°21' de longitude Oeste, e uma altitude de 83 metros. A temperatura média anual é de 28°C, com médias, mínima e máxima, de 22°C e 35°C, respectivamente, e umidade relativa do ar de 69%. O mesmo foi realizado entre março de 2020 a março de 2021.

Animais e experimento

Foram selecionados do rebanho da Embrapa Caprinos e Ovinos, machos ovinos da raça Santa Inês, com idade de 2 a 6 anos, sexualmente maduros e escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 a 3,5. Os animais foram mantidos em regime de confinamento, alimentados de acordo com as exigências do (NRC, 2007).

Inicialmente os animais foram submetidos a exame clínico/andrológico, e depois as coletas de sêmen ocorreram através do uso da vagina artificial e de feita manequim estrogenada com Cipionato de estradiol (ECP) (1 mL) (MIES FILHO, 1987). Seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), para a classificação dos reprodutores, os animais foram analisados e então cada reprodutor foi considerado aprovado (andrológico com motilidade acima de 70%) ou reprovado (andrológico com motilidade abaixo de 70%).

Na fase seguinte, os animais aprovados, foram submetidos a duas coletas, com intervalo de uma semana entre elas. O congelamento de sêmen foi realizado logo em seguida a avaliação da qualidade espermática das amostras. A avaliação e congelamento das amostras coletadas foram realizadas no laboratório de tecnologia do sêmen da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE.

Salienta-se que as análises espermáticas antes do congelamento foram as seguintes: volume do ejaculado (VE) (mL); concentração espermática (CE) ($\times 10^6$ mm³); motilidade progressiva individual (MPI) (%); vigor (V) (0-5) (CBRA, 2013).

Parâmetros seminais analisados no pós-congelamento: motilidade progressiva individual (MPI) e (%); vigor (V).

Após o descongelamento, as doses sêmen avaliadas foram analisadas e classificadas compondo, animais aprovados com motilidade > 30% e vigor > 3.0, de acordo com CBRA, 2013.

Criopreservação

Após a coleta de sêmen e avaliação de volume, concentração e motilidade espermática, turbilhonamento o sêmen foi diluído com Tolera-D® em temperatura de 33°C em banho maria. Logo em seguida, foram avaliadas a motilidade e o vigor espermático, em microscopia óptica e então, o líquido envasado em palhetas de 0,25 mL e lacrada com lacrador específico para palhetas. As mesmas foram previamente identificadas de acordo com as recomendações do CBRA, 2013.

Posteriormente, armazenadas em palhetas (0,25 mL) e congeladas em máquina TK 3000® (TK Tecnologia em congelação Ltda., Uberaba, Brasil), na curva de congelação rápida (-0,25°C/min, de 25°C a 5°C e -20°C/min, de 5°C a -120°C), e, após atingirem -120°C, as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). Para avaliação do sêmen criopreservado, uma palheta de cada ejaculado foi descongelada em banho-maria a 37 °C por 30 segundos. O conteúdo foi alocado em microtubos do tipo Eppendorf® e mantidos em banho-maria, também a 37 °C, o mesmo congelamento foi avaliado pós descongelamento em tempo (T0), após 5 minutos (T5) e após 24 horas (T2) de incubação.

Análise das proteínas totais

Na 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), que consiste em quantificar proteínas baseado na sua ligação com o corante Comassie Brilhante Blue - CBB (G-2050). A coloração através CCB G-250 ocorre pela ligação destes às proteínas deixando o produto de cor azulada. Com a ajuda do

espectrofotômetro é possível medir a absorvância e correlacioná-la com a concentração de proteínas na amostra.

A partir da concentração das proteínas totais, se calculou o volume de amostra a ser utilizada na reidratação das fitas para em seguida o gel de eletroforese bidimensional (2DE).

Eletroforese Bidimensional (2DE)

Esta técnica possibilita a separação das proteínas com base em duas etapas: uma primeira dimensão, de acordo com seu ponto isoelétrico (pI)e, numa segunda dimensão, em gel desnaturante e poliacrilamida (SPS-PAGE), de acordo com sua massa molecular (MM).

Focalização Isoelétrica

Uma vez preparada a solução de reidratação das tiras (pH 3 – 10) 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 das tiras, sendo uma de cada animal em períodos de coletas diferentes. Foram pipetados 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 16h 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 *electrode pads* nas extremidades das tiras de forma que eles avancem o gel cerca de meio centímetro, estes foram colocados úmidos com cerca de 1ml 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) 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 frasco Bécher com água purificada por sistema 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 necessário 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: 200 kDa; 116 kDa; 97 kDa; 66 kDa; 55 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 24 kDa, 20 kDa, 14 kDa, e 6 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. Os spot's que apresentaram mecht foram separados e enviados para análise. Os três géis de cada reprodutor foram avaliados entre si, para identificar spots parecidos, isso de chama *metch*.

Análise estatística

Para a comparação dos animais no que se refere à concentração e volume espermático, aplicou-se teste Exato de Fisher, com significância estatística de 5% ($p < 0,05$), através da análise de variância, seguido o teste de Tukey. Foram realizadas análises de variância, seguindo o teste de Bonferroni para as características vigor e motilidade dos espermatozoides da amostra de sêmen analisada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características do sêmen fresco

O aspecto do sêmen de cada um dos cinco reprodutores analisados variou de leitoso a cremoso. Quanto ao volume e concentração do sêmen, as amostras não diferiram significativamente entre si. Os valores obtidos quanto ao volume, variaram de 0,57 a 1,52 mL (tabela 1). Já a concentração espermática, oscilou de 5,75 a 8,04 x 10⁹ / mL, tendo uma média de 6,5 x 10⁹ /mL. Esses valores diferem dos obtidos por Falleiro et al. (2013) ao analisarem ovinos da raça Dorper, que observaram volume médio de 1,47 mL e concentração média de 4,71 x 10⁹/mL em ovinos da raça Dorper.

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão do volume e concentração do sêmen fresco de cinco reprodutores ovinos Santa Inês.

Variáveis/Animais	A	B	C	D	E
Volume (mL)	0,96 ± 0,29	0,83 ± 0,15	0,84 ± 0,13	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,15
Concentraçãox10 ⁹ /mL	7,08 ± 0,9	5,98 ± 0,11	6,03 ± 0,16	6,83 ± 1,21	6,55 ± 0,25

Análise microscópica do sêmen fresco e pós-congelamento

De acordo com os resultados obtidos quanto ao vigor espermático, as amostras analisadas não apresentaram diferença estatística quanto às etapas equivalentes ao pré-congelamento, pós-diluição, T0 min pós-congelamento e T5 min pós-congelamento. Contudo, observou-se diferença significativa (p<0,05) no T24 h pós-congelamento (tabela 1). Essas diferenças significativas possivelmente ocorreram em virtude das diferenças individuais na expressão de proteínas protetoras de estresse oxidativo e térmico no plasma seminal, tais como a clusterina e albumina, no entanto, estes dados não ainda não foram confirmados,

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão do volume e concentração do sêmen fresco de cinco reprodutores ovinos Santa Inês. Letras diferentes em colunas do mesmo horário indicam diferença significativa na probabilidade de p ≤ 0,05.

Variáveis/Animais	A	B	C	D	E
Volume (mL)	0,96 ± 0,29	0,83 ± 0,15	0,84 ± 0,13	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,15
Concentraçãox10 ⁹ /m	7,08 ± 0,9	5,98 ± 0,11	6,03 ± 0,16	6,83 ± 1,21	6,55 ± 0,25

Foi observado que o animal A, apresentou parâmetros diferente aos demais, visto que o vigor espermático foi diferente dos animais B e E. Logo, apresentando valores maiores de vigor espermático na faixa de 24h após descongelamento.

Na tabela 2, estão dispostos os valores referentes a motilidades espermática. Não foi observada diferença estatística em nenhum dos horários para motilidade (figura 2).

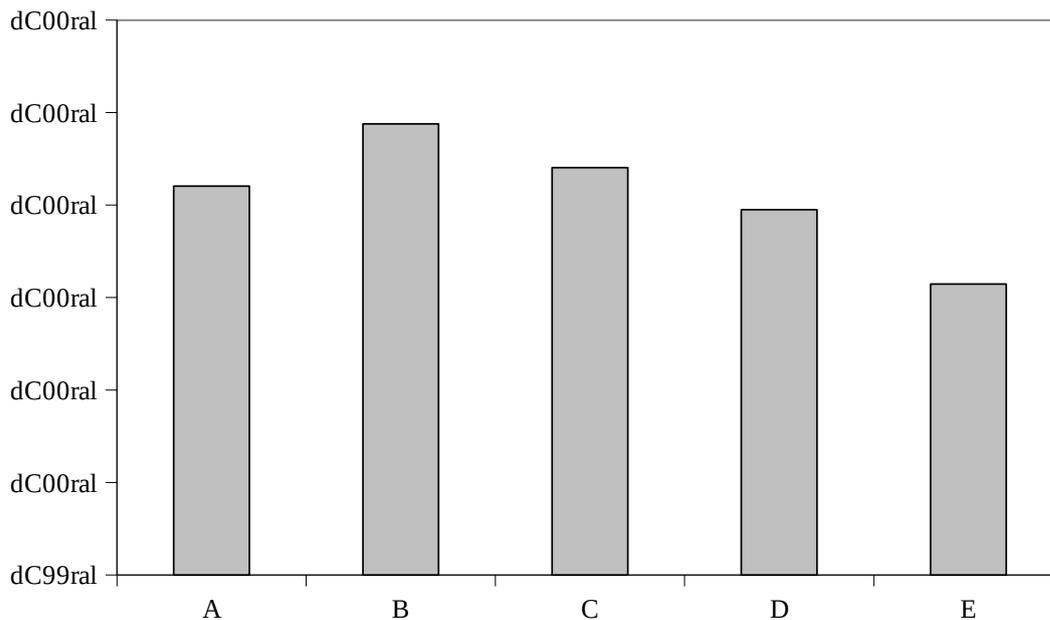
Tabela 3 – Valores percentuais de motilidade espermática do sêmen de cinco reprodutores ovinos Santa Inês sob diferentes condições.

Reprodutor	Sêmen fresco	Pós-diluição	T0 min	T5 min	T24 horas
A	88,00	88,00	22,00	37,00	38,00
B	85,00	88,00	25,00	23,00	20,00
C	90,00	83,00	30,00	30,00	33,00
D	87,00	87,00	30,00	33,00	35,00
E	90,00	87,00	18,00	23,00	28,00

A concentração protéica obtida neste estudo foi de 20,7 $\mu\text{g } \mu\text{L}$; 24,0 $\mu\text{g } \mu\text{L}$; 21,6 $\mu\text{g } \mu\text{L}$; 19,3 $\mu\text{g } \mu\text{L}$ e 15,3 $\mu\text{g } \mu\text{L}$ (figura 3). Foi observada diferença estatística na concentração protéica, em que os animais B e C diferiram estatisticamente do animal E (Tabela 3), diferentemente do encontrado por Moura et al. (2010), que obtiveram valores de concentração protéica entre 32 $\mu\text{g } \mu\text{L}$ e 39 $\mu\text{g } \mu\text{L}$, porém não encontraram diferença estatística entre seus valores de concentração protéica.

Avaliando os géis foi observado que a maioria das proteínas do plasma seminal dos ovinos possuíam peso molecular abaixo de 75 kDa e pI ácido, sendo poucas as que apresentaram pI acima de 8. Em um estudo similar, Moura et al. (2010) obtiveram dados que corroboram com os apresentados neste trabalho, com predominância nos pesos moleculares abaixo de 70 e pI abaixo de 7.

Figura 1: Concentração total de proteínas no plasma seminal de ovinos reprodutores da raça Santa Inês. Letras diferentes entre diferentes colunas indicam diferença estatística a probabilidade de $p \leq 0,05$.



Observou-se neste trabalho oito spots sugestivos para a preteína clusterina, corroborando com o perfil preteico relatado em diversos estudos (SOUZA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017), com kDa entre 31 e 35 e pI entre 4,8 e 5,4. Esta é uma glicoproteína do plasma seminal que pode prevenir contra o dano oxidativo do espermatozoide, se liga e aglutina espermatozoides defeituosos e protege os gametas masculinos dos efeitos tóxicos de precipitação das proteínas.

A albumina é uma proteína secretada pela glândula bulbouretral e presente na porção caudal do epidídimo em ovinos, comumente associada à proteção da membrana espermática contra estresse oxidativo por radicais livres e/ou estresse térmico (ROCHA et al., 2015). Ela apresenta com peso molecular alto, próximo a 70 kDa e pI próximo a 5,8 (ROCHA et al., 2015), valores muito similares aos obtidos em um spot neste trabalho, com 69 kDa e pI 5,2, nas figuras 2, 3 e 5.

A osteopontina, apesar de mais estudada na proteômica seminal bovina (REGO et al., 2016; KUMAR et al., 2017) é correlacionada, juntamente com outras proteínas, como clusterina, albumina e *binder of sperm* com alta congelabilidade, em virtude da capacidade antioxidante e de proteção da membrana espermática dessas proteínas (JOBIM et al., 2009), fazendo com que estas tenham alta importância para criopreservação e inseminação artificial.

Por outro lado, proteínas originadas na vesícula seminal da família BSPs, como bodesinas e *binder of sperm* são as mais comuns no plasma seminal ovino (comumente

acima de 20% das proteínas) (VAN TILBURG et al., 2021) e tem grande importância na capacitação espermática (PLANTE et al., 2016) e interação dos espermatozoides com o oviduto (SUAREZ, 2016). Foram obtidos neste estudo sete *spots* sugestivos para as proteínas.

Nas figuras 4, 5, 6, 7 e 8, logo a seguir, estão dispostos os *spots* protéicos detectados no mapa bidimensional, referentes as eletroforeses bidimensionais (2DE) de cada animal estudado. Conforme os resultados, pode-se observar a presença de possíveis proteínas que estejam relacionadas a qualidade do plasma seminal de ovinos Santa Inês. Contudo, análise mais especializadas devem ser realizadas para melhor identificação e classificação dessas proteínas.

De acordo com que foi observado, ocorre variação na distribuição da expressão dos *spots* protéicos entre os animais, apesar de pertencerem à mesma raça. Portanto, é são importantes para analisar em pesquisas posteriores, as possibilidades destas variações individuais e comuns a espécie ovina estudada.

As proteínas do plasma seminal possuem propriedades inerentes a cada espécie, podendo diferir entre estrutura e função das proteínas espermáticas. Assim, estas podem ser utilizados como bons parâmetros andrológicos. Já que a identificação e caracterização de proteínas envolvidas nestes processos ajudaria a uma maior compreensão dos mecanismos reprodutivos (VILLEMURE et al., 2003).

Nestas condições, a técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), atua como um dos métodos mais utilizados para caracterização do proteoma. Sendo importante para detectar a presença de proteínas que poderão ser analisadas com mais cautela e assim serem caracterizadas.

Neste estudo, a utilização da técnica foi importante para contribuir na construção do perfil proteico do plasma seminal de ovinos Santa Inês. Conforme apresentado nas figuras de número 2, 3, 4, 5 e 6.

Mediante a confirmação da presença de prováveis proteínas na 2D-PAGE, estas poderão ser identificadas de modo mais específico e classificadas da espectrometria de massa (MS), uma técnica altamente sensível.

As análises proteômicas são ferramentas valiosas na determinação da presença de biomarcadores ou no mapeamento de perfil de amostras diferentes, mesmo aquelas com alta e baixa fertilidade ou congelabilidade. Portanto, as proteínas possuem uma grande importância nos processos biológicos e reprodutivos havendo uma grande expectativa na descoberta de muitos biomarcadores protéicos.

Figura 2. Gel referente ao animal A, com dados relativos ao pI e kDa de acordo com o *match*.

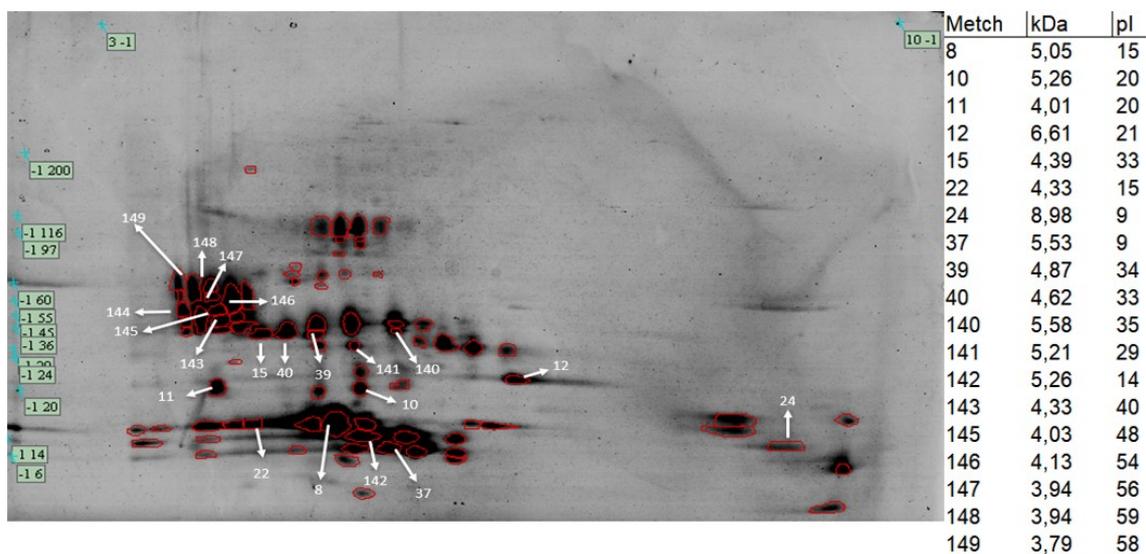


Figura 3. Gel referente ao animal B, com dados relativos ao pI e kDa de acordo com o *match*.

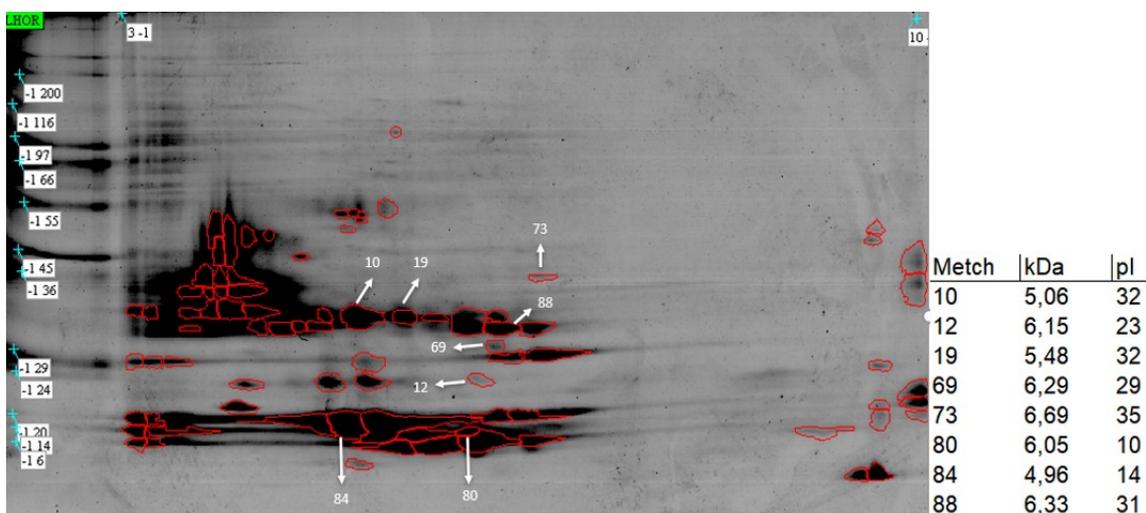


Figura 4. Gel referente ao animal C, com dados relativos ao pI e kDa de acordo com o *match*.

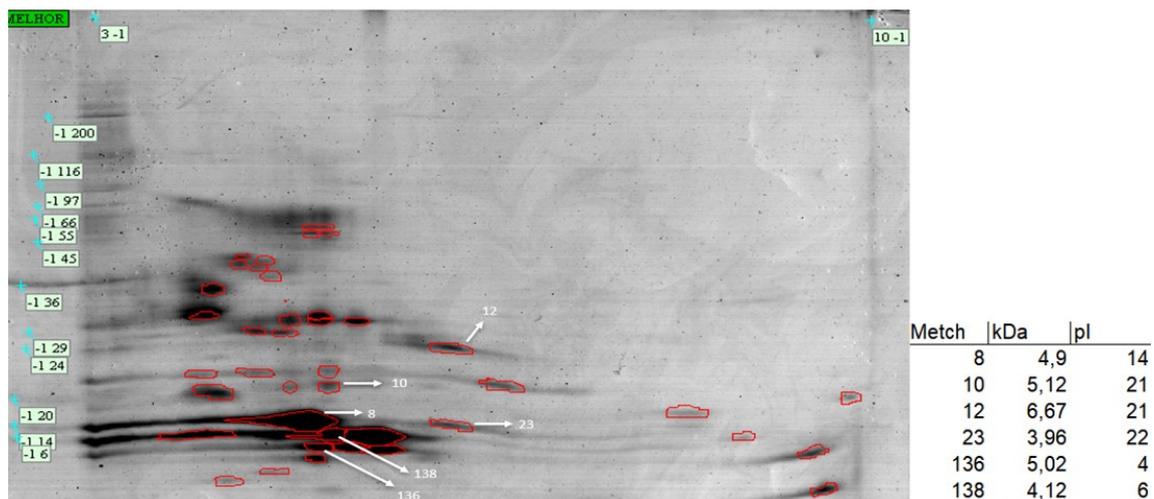


Figura 5. Gel referente ao animal D, com dados relativos ao pI e kDa de acordo com o *match*.

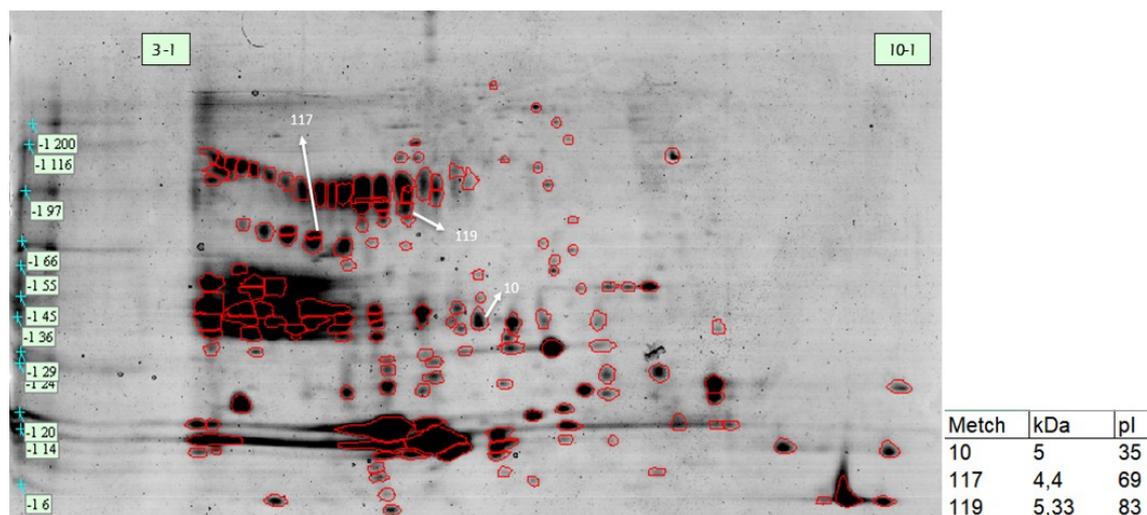
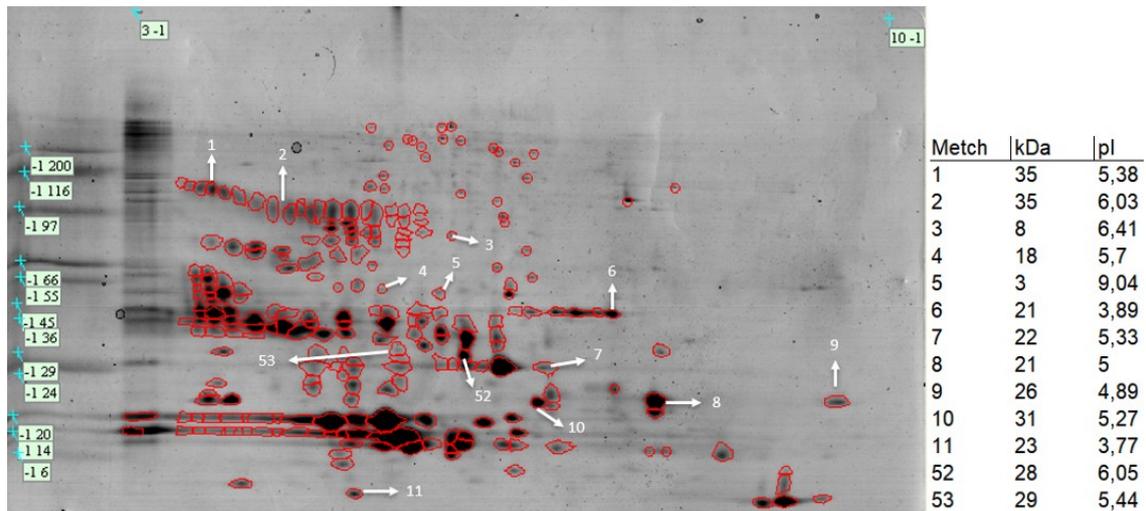


Figura 6. Gel referente ao animal E, com dados relativos ao pI e kDa de acordo com o *match*.



Foi observado que os animais avaliados neste estudo obtiveram altas taxas de vigor e motilidade pós congelamento, isso possivelmente ocorre proteínas presentes no plasma seminal, uma vez que muitas destas estão relacionadas a reduzir estresse oxidativo e térmico, bem como, auxiliar na proteção da membrana espermática. No entanto, para que ocorra uma conclusão é necessária a realização da espectrometria de massa.

CONCLUSÃO

Utilizando o método de eletroforese bidimensional, foi possível a identificação de diversos spots presentes no plasma seminal de reprodutores de alto poder de congelabilidade da raça Santa Inês. A literatura sugere que estas proteínas sugerem que as mesmas desempenham diversas funções como, proteção da membrana espermática, proteção dos efeitos tóxicos e capacitação espermática.

Este estudo identificou através de comparativo bibliográfico de peso isoelétrico e massa molecular as prováveis proteínas do plasma seminal em carneiros da raça Santa Inês, adaptados à região semiárida do nordeste brasileiro.

As proteínas encontradas no presente estudo são possivelmente biomarcadores na área de proteômica e podem ter correlação positiva com a congelabilidade de sêmen da raça Santa Inês.

REFERÊNCIAS

- Bezerra Junior, Q. R.; Martins, G. R.; Barroso I. C., Marinho R. C., Freitas, A. T. D. and Teixeira, M. F. S. Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massa como Ferramentas Proteômicas Aplicadas à Definição de Marcadores Proteicos Associados à Eficiência Reprodutiva de Caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica* 7(1):100–112. 2013.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochem*, v.72, 248–254, 1976.
- Brandon, C. I.; Heusner, G. L.; Caudle, A. B. and Fayer-Hosken, R. A. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 52(1):863-873. 1999.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed. Belo Horizonte, 2013.
- Cox, J. F. and Alfaro, V. In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reproduction of Domestic Animals* 42(1):83-87. 2007.
- Falleiro, M. B.; Bicudo, S. D.; Rodello, L.; Monteiro, C. D.; Sakashita, S. M. and Reiss, R. R. Implicações do uso do extrato de lbd (lipoproteínas de baixadensidade) ou da gema de ovo “purificada”, sobre a motilidade emorfologia espermática no sêmen ovino refrigerado por 24 ou 48 horas. *Veterinária e Zootecnia* 20(2):307-317. 2013.
- Flowers, W. L. Boar fertility and artificial insemination. In: *Proceedings of the 15th IPVSCONGRESS (Birmingham, U.K.)*. pp. 45-52, 1998.
- Holt, C.; Holt, W. V.; Moore, H. D.; Reed, H. C. and Curnock, R. M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *Journal of Andrology* 18(3):312-23. 1997.
- IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal, 2021. Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado> > Acesso em: 24 fev. 2022.
- Jobim, M. I. M.; Gregory, R. M. and Mattos, R. C. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 1(6):25-31. 2009.
- Kumar, P.; Saini, M.; Kumar, D.; Bharadwaj, A. and Yadav, P. S. Estimation of endogenous levels of osteopontin, total antioxidant capacity and malondialdehyde in seminal plasma: Application for fertility assessment in buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Reproduction of Domestic Animals = Zuchtgyiene* 52(2):221-226. 2017. <https://doi.org/10.1111/rda.12882>.
- Matos, C. A.; Thomas, D. L.; Nash, T. G.; Waldron, D. F. and Stookey, J. M. Genetic analyses of scrotal circumference size and growth in Rambouillet lambs. *Journal of Animal Science* 70(1):43-50. 1992. <https://doi.org/10.2527/1992.70143x>.

Mies Filho, A. Inseminação Artificial. 6ª edição. Porto Alegre: Sulina, 1987. 750p

Moura, P. P.; Franco, M. M.; Silva, T. A. S. N.; Rocha, T. L.; Leal, D. R.; Passos, P. I. B. and Neves, J. P. Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado em ovinos. *Ciência Rural* 40(5):1154-1159. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000068>.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL-NRC. Nutrient requirements of Sheep. Washington, D.C.: National Academy Press 2007. 362p.

Oliveira, M. A.; Oliveira, R. P. M.; Lima, A. R.; Andrade, E. V.; Abreu, J. S. L. and Oliveira, F. F. Physical evaluation, morphological and identification of seminal proteins in Santa Ines sheep. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 18(1):211–220. 2017. <https://doi.org/10.1590/s1519-99402017000100020>.

Plante, G.; Prud'homme, B.; Fan, J.; Lafleur, M. and Manjunath, P. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. *Cell and Tissue Research* 363(1):105–127. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2289-2>.

Rego, J. P.; Martins, J. M.; Wolf, C. A.; van Tilburg, M.; Moreno, F.; Monteiro-Moreira, A. C.; Moreira, R. A.; Santos, D. O. and Moura, A. A. Proteomic analysis of seminal plasma and sperm cells and their associations with semen freezability in Guzerat bulls. *Journal of Animal Science* 94(12):5308-5320. 2016. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0811>.

Rocha, D. R.; Martins, J. A. M.; van Tilburg, M. F.; Oliveira, R. V.; Moreno, F. B.; Monteiro-Moreira, A. C. O.; Moreira, R. A.; Araújo, A. A. and Moura, A. A. Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. *Theriogenology* 84(8):1291–1305. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.008>.

Rogers, B. J.; Bentwood, B. J.; Van Campen, H.; Helmbrecht, G.; Soderdahl, D. and Hale, R. W. Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. *Journal of Andrology* 4(2):119-25. 1983. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1983.tb00735.x>.

Souza, C. E. A.; Moura, A. A.; Lima, A. C. B. Circunferência escrotal e características seminais em carneiros Santa Inês. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 25(2):196-198. 2001.

Souza, C. E.; Rego, J. P.; Lobo, C. H.; Oliveira, J. T.; Nogueira, F. C.; Domont, G. B.; Fioramonte, M.; Gozzo, F. C.; Moreno, F. B.; Monteiro-Moreira, A. C.; Figueiredo, J. R. and Moura, A. A. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *Journal of Proteomics* 75(14):4436–4456. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.039>.

Suarez, S. S. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell and Tissue Research* 363:185-194. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2244-2>

Van Tilburg, M.; Sousa, S.; Lobo, M. D. P.; Monteiro-Azevedo, A. C. O. M.; Azevedo, R. A.; Araújo, A. A. and Moura, A. A. Mapping the major proteome of reproductive fluids and sperm membranes of rams: From the cauda epididymis to ejaculation. *Theriogenology* 159(1):98–107. 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.003>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Utilizando o método de eletroforese bidimensional, foi possível a identificação de diversos *spots* presentes no plasma seminal de reprodutores de alto poder de congelabilidade da raça Santa Inês. As possíveis identificações destas proteínas sugerem que as mesmas desempenham diversas funções como, proteção da membrana espermática, proteção dos efeitos tóxicos e capacitação espermática.

Estudos direcionados a proteômica seminal da espécie ovina ainda são considerados escassos. Contudo, o início de pesquisas e obtenção de resultados iniciais tornam-se um feito importante para o direcionamento de mais pesquisas que possam atuar na identificação de possíveis marcadores para fertilidade, prolificidade e congelabilidade do sêmen. Além de auxiliar nos processos e validação de metodologias de processamento de sêmen.

Este estudo identificou através de comparativo bibliográfico de peso isoelétrico e massa molecular as prováveis proteínas do plasma seminal em carneiros da raça Santa Inês, que são animais deslanados e adaptados à região semiárida do nordeste brasileiro.

Ainda são bastante reduzidos o número de trabalhos e de bases de dados com informações confiáveis e direcionadas a identificação, reconhecimento e comparação de proteínas seminais em animais da espécie ovina. Neste caso, a principal ferramenta de consulta que fornece um banco de dados (Uniprot, Expasy, pela ferramenta TagIdent) para identificação, classificação e comparação das proteínas ficou indisponibilidade, por um longo período, para atualização. Impossibilitando assim a comparação dos *spots* protéicos disponíveis no banco de dados com o pI e MW das amostras analisadas neste estudo, para comparação.

As proteínas encontradas no presente estudo são possivelmente biomarcadores na área de proteômica sêmen da raça Santa Inês.

ANEXO



**Comissão de Ética no Uso de
Animais – CEUA / CNPC**

PARECER CEUA – CNPC

Protocolo nº 001/2020

Responsável: Maria Geysillane Castro Matos

Em reunião realizada no dia 10 de março de 2020 a CEUA CNPC analisou o projeto "*Proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de ovinos Santa Inês*". A análise resultou no seguinte parecer: