

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ - UVA

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

MESTRADO EM ZOOCTECNIA

TATIANA MARIA FARIAS PINTO

**Caracterização do perfil proteômico de espermatozoide de caprinos (*Capra hircus*) da
raça Saanen e uma comparação com a raça Moxotó**

SOBRAL/CE

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOCTECNIA

**Caracterização do perfil proteômico de espermatozoide de caprinos (*Capra hircus*) da
raça Saanen e uma comparação com a raça Moxotó**

TATIANA MARIA FARIAS PINTO

SOBRAL-CE

Junho-2014

TATIANA MARIA FARIAS PINTO

Caracterização do perfil proteômico de espermatozoide de caprinos (*Capra hircus*) da raça Saanen e uma comparação com a raça Moxotó

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Zootecnia, da Universidade Estadual Vale do Acaraú, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Reprodução Animal

ORIENTADOR:

Prof. Dr. RODRIGO MARANGUAPE SILVA DA CUNHA

SOBRAL-CE

Junho - 2014

TATIANA MARIA FARIAS PINTO

**Caracterização do perfil proteômico de espermatozoide de caprinos (*Capra hircus*) da
raça Saanen e uma comparação com a raça Moxotó**

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

PROF(A). DR(A). LÚCIA BETÂNIA DA SILVA ANDRADE
UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ

PROF. DR. JOÃO GARCIA ALVES FILHO
UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ

PROF. DR. RODRIGO MARANGUAPE SILVA DA CUNHA
UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PRESIDENTE

PROF(A). DR(A). ÂNGELA MARIA XAVIER ELOY
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS

SOBRAL-CE

Junho - 2014

Aos meus amados pais, Tálita e Francisco José (*in memoriam*), por todos os ensinamentos e dedicação. À minha tia, Lurdes Maria, pelo apoio e incentivo.

Dedico

“Procure a sabedoria e aprenda a escrever os capítulos mais importantes da sua história nos momentos mais difíceis da sua vida”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter me concedido, sabedoria, força, e paciência para vencer todas as dificuldades.

Aos meus pais, razão da minha existência, por todos os ensinamentos éticos e morais, carinho, amor e dedicação e exemplos de humildade.

A toda minha Família pelo apoio e incentivo em especial: Meus irmãos Tânia e João Paulo, que compartilham comigo momentos bons e ruins do nosso dia a dia, minha Tia Lurdes pelo apoio financeiro a meus estudos e minha sobrinha Maria Luiza por muitos momentos de alegria e descontração.

Ao Prof. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, pela sua orientação, oportunidade e confiança de participar da sua equipe, onde adquiri novos conhecimentos e realização profissional, também agradeço pela serenidade, paciência, carinho e amizade que são comuns a todos e por deixar o ambiente de trabalho sempre harmonioso.

A Prof^a Ângela Eloy, pela co-orientação, confiança, carinho, amizade e espontaneidade por sempre se propor a ajudar nos momentos difíceis.

Ao Prof. João Garcia, por todos os ensinamentos práticos e teóricos, por sua amizade, apoio e companheirismo.

Ao Prof. Victor Carneiro, pelos ensinamentos, motivações, incentivos e amizade que mesmo longe, está sempre disponível a ajudar.

A Prof^a Betânia Andrade pela participação como membro da banca.

A Prof^a Révia Granja pelos livros emprestados, e incentivos nos estudos.

A todos os meus professores da graduação e pós - graduação que me proporcionaram base, conhecimento e formação profissional.

A Prof^a Maria Auxiliadora por sua amizade, pelos ensinamentos no laboratório e disponibilidade em ajudar nas correções desse trabalho.

Ao Daniel de Brito pela amizade, ensinamentos práticos e teóricos do laboratório sempre com todo carinho, paciência e incentivo durante esses anos.

Ao Ricardo Bastos pela amizade, ensinamentos, paciência e incentivo, e toda sua contribuição e companheirismo durante a realização desse trabalho.

À Nágila Carneiro por sua amizade, e contribuição na construção desse trabalho, disponibilização de dados experimentais em seus estudos.

À Vitoria Virginia por sua amizade, companhia, incentivo e contribuição na realização desse trabalho nos momento mais difíceis .

Ao Raulzito Moreira, Mônica Valéria e Nayanne Hardy pela amizade, dedicação, apoio e o verdadeiro espírito de equipe que formamos ao longo desse trabalho.

À todos os meus companheiros de trabalho do NUBIS, pela amizade e disposição nos momentos que precisavam, São eles: Aurilene Gomes, Jedson Aragão, Flávia Muniz,

Crislay Fontenele, Bruno Bezerra, Íria Rodrigues, Francisco Souza, Amélia Araujo, Paulo de Tarso, Carlos Moreira, Pedro Cunha, Rafael Bastos, Erivan Alves, Cleane Moreira, Monalysa Neves, Annyta Frota, Kátia Alves, Jackson Costa.

À todos os profissionais da EMBRAPA que me receberam com atenção e carinho e sempre a disposição para ajudar, em especial: João Ricardo, Rosivaldo Junior, Nóbrega, Elizângela Pereira, Leandro, Fábio, Ronaldo, Orlando, Nicke Osmarilda.

A todos os meus colegas de mestrado que dividimos momentos únicos sempre com companheirismo e união que nossa amizade continue crescendo mesmo com a distância após seguirmos caminhos diferentes: Em especial ao Fagner, Cleverton, Clebio, Maximiana, Luana, Priscila, Simone Cléssio, Eliz, Pedro Henrique (*in memoriam*) Vanderlan, Edie, Awdrea, Diego Maicon.

Aos membros da coordenação Ângela Vasconcelos, Aline Landim e Joice Sampaio, pelo Companheirismo e disponibilidade ajudar nos assuntos burocráticos.

À todos os membros do Comitê de ética no Uso de Animais CEUA da Universidade Estadual Vale do Acaraú pela oportunidade e conhecimento adquirido.

A todos os meus amigos de longas datas pelo apoio, incentivo e força nos momentos difíceis em especial: Nilce Canafístula, Edna Rodrigues, Tálita Mello, Leiliane Roques, Roseanny Mota, Samara Pontes, Yana Salles, Keila Davi, Paula Portella, Tamires Rios, Sofia Freire, Criston Apoliano, Thales Guimarães, João Costa, Guilherme Miranda, Jailson Lorenço, Iran Filho, Geilson Mouta e Diego wesceley.

À CAPES pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

Ao FINEP e CNPQ pelo apoio financeiro do projeto.

À Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA e Embrapa Caprinos e Ovinos, através do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização deste trabalho e pelos conhecimentos que me foram proporcionados.

À Embrapa Caprinos e Ovinos pelo uso de seus animais, instalações, recepção e acolhimento durante a realização desse projeto.

Ao Núcleo de biotecnologia de Sobral - NUBIS laboratório de Biologia Molecular por seus equipamentos e instalações indispensáveis na concretização desse trabalho.

E a todos aqueles que mesmo sem seus nomes mencionados, mas contribuíram na minha formação pessoal e acadêmica.

Á todos vocês muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XV
RESUMO GERAL.....	XVIII
GENERAL ABSTRACT.....	XIX
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	20
CAPÍTULO 1- REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
Introdução.....	23
Referencial Teórico.....	25
Características gerais da raça Saanen.....	25
Características gerais da raça Moxotó.....	26
Aspectos morfofisiológicos da espermatogênese.....	26
Espermatogênese.....	28
Espermatozóides.....	30
Maturação Espermática.....	32
Capacitação Espermática.....	32
Reação do acrossoma.....	33
Proteínas do espermatozóide.....	34
Proteínas do plasma seminal.....	35
Abordagem proteômica com eletroforese bidimensional.....	37
Referências Bibliográficas.....	40
CAPÍTULO 2 – PERFIL PROTEÔMICO DO ESPERMATOZOIDE DA RAÇA SAANEN.....	47
Resumo.....	48
Abstract.....	49

Introdução.....	50
Materiais e Métodos.....	52
Animais experimentais e coleta do sêmen.....	52
Avaliações espermáticas.....	52
Extração de proteínas.....	53
Dosagem de proteínas totais.....	53
Eletroforese Unidimensional (SDS-PAGE).....	53
Eletroforese Bidimensional.....	54
Identificação das Proteínas.....	54
Resultados e Discussões.....	55
Parâmetros espermáticos.....	55
Dosagem das proteínas e eletroforese unidimensional.....	56
Eletroforese Bidimensional	57
Identificação de proteínas.....	62
Proteínas mais expressas do perfil proteômico.....	65
Conclusões.....	71
Referencias Bibliográficas.....	72
CAPÍTULO 3 - ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA ENTRE AS RAÇAS SAANEN E MOXOTÓ.....	75
Resumo.....	76
Abstract.....	77
Introdução.....	78
Materiais e Métodos.....	79
Resultados e Discussões.....	80
Parâmetros espermáticos.....	80
Comparação dos geis bidimensional entre as raças Saanen e Moxotó.....	80
Proteínas Exclusivas da raça Saanen.....	82

Proteínas diferencialmente expressa da raça Saanen em comparação com a raça Moxotó.....	88
Poteínas diferencialmente expressa da raça Moxotó em comparação com a raça Saanen.....	91
Conclusões.....	93
Referências Bibliográficas.....	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
APÊNDICES.....	99

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1: Valores médios e desvios padrões da raça Saanen avaliados estatisticamente pelo programa <i>Graphpad prism</i> ® versão 4.0 One-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Considerando $P < 0,05$	55
Tabela 2: Quantificação de proteínas totais de espermatozoides de caprinos da raça Saanen utilizando o método de Bradford.....	56
Tabela 3: Número de <i>spots</i> e <i>spots</i> correspondentes (<i>matches</i>) presentes nos géis bidimensionais em cada animal.....	59
Tabela 4: Coeficientes de correlação linear para as triplicatas por animal.....	61
Tabela 5: Proteínas mais expressas do perfil proteômico da raça Saanen, utilizando o banco de dados do <i>UniProt</i>	66

Capítulo 3

Tabela 1: Análise comparativa dos parâmetros espermáticos da raça Saanen e Moxotó.....	80
Tabela 2: Identificação das proteínas exclusivas da raça Saanen com base no pI e massa, utilizando o banco de dados do <i>Uniprot</i>	82
Tabela 3: Identificação das proteínas exclusivas da raça Moxotó com base no pI e massa, utilizando o banco de dados do <i>Uniprot</i>	85
Tabela 4: Identificação das proteínas diferencialmente expressas da raça Saanen em comparação com a raça Moxotó com base no pI e massa, utilizando o banco de dados do <i>Uniprot</i>	88
Tabela 5: Identificação das proteínas diferencialmente expressas da raça Moxotó em comparação com a raça Saanen com base no pI e massa, utilizando o banco de dados do <i>Uniprot</i>	91

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Reprodutor da raça Saanen.....	25
Figura 2: Reprodutor da raça Moxotó.....	26
Figura 3: Vias hormonais envolvidas na espermatogênese.....	27
Figura 4: Corte histológico dos túbulos seminíferos.....	28
Figura 5: Fases do processo de espermatogênese.....	29
Figura 6: Representação da célula espermática e seus constituintes.....	31
Figura 7: Proteômica como ferramenta de estudo.....	38
Figura 8: Fluxograma das etapas para estudos proteomicos de espermatozóides.....	39

Capítulo 2

Figura 1: Géis bidimensionais das proteínas totais de espermatozóide de caprino da raça Saanen.....	58
--	----

Capítulo 3

Figura 1: Géis bidimensionais das proteínas totais de espermatozóide das raças Saanen e Moxotó.....	81
--	----

Apêndice

Figura 1: Proteínas exclusivas da raça Saanen nos géis bidimensionais em faixa de pH 4-7.....	99
Figura 2: Proteínas exclusivas da raça Moxotó nos géis bidimensionais em faixa de pH 4-7.....	100
Figura 3: Proteínas diferencialmente expressa da raça Saanen em comparação com a raça Moxotó nos géis bidimensionais em faixa de pH 4-7.....	101
Figura 4: Proteínas diferencialmente expressa da raça Moxotó em comparação com a raça Saanen nos géis bidimensionais em faixa de pH 4-7.....	102

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo 2

Gráfico 1: Representação gráfica da quantidade de genes identificados por espécie.....	50
Gráfico 2: Representação comparativa da quantidade de proteínas identificadas por espécie domésticas.....	51
Gráfico 3: Gráfico de dispersão das triplicatas dos géis 2D, contendo proteínas de espermatozóides de caprinos da raça Saanen.....	60
Gráfico 4 - Distribuição dos <i>spots</i> , por Ponto Isoelétrico (pI), de proteínas da células espermáticas da raça Saanen.....	61
Gráfico 5 - Distribuição dos <i>spots</i> , por Massa Molecular (MW), de proteínas da células espermáticas da raça Saanen.....	62
Gráfico 6: Distribuição das proteínas identificadas em géis bidimensionais de Saanen com base em proteínas homólogas de outros organismos.....	63
Gráfico 7: Identificação de proteínas separadas por função molecular, componente celular e processo biológico.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% Vol	Porcentagem de Volume relativo
2D	Eletroforese Bidimensional
2D-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALV	Vírus da leucose aviária
AMP	Adenosina monofosfato
BSA	Albumina sérica bovina
BSPs	Binder Sperm Proteins - Proteínas de ligação ao espermatozóide
CAEV	Artrite encefalite caprina viral
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
cDNA	DNA complementar
CES	Ciclo do Epitélio Seminífero
CHAPS	Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato
CRISPs	Proteínas secretórias ricas em cisteína
CUB	Domínio protéico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ExpASy	Expert Protein Analysis System
Fn-2	Fibronectina tipo II
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HAPs	Proteínas com afinidade à heparina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígenos leucocitários humanos
HSP	Proteínas ligante a heparina

HSPA2	Heat Shock Protein A2 - Proteína de choque térmico A2
IAA	Iodoacetamida
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEF	Focalização isoeletrica
IPG	Immobilized pH gradient - Gradiente de pH imobilizado
kDa	Kilodalton
LH	Hormônio Luteinizante
LMW	Low Molecular Weight - Marcador de baixo peso molecular
MA	Miliampère
MALDI-TOF/TOF	Ionização e desorção a laser assistida por matriz - Tempo de vôo
mg	Miligramas
Mg-ATP	Trifosfato de Adenosina Sal de Magnésio
min	Minutos
mL	Mililitro
MLV	Vírus da leucemia murina
MM ou MW	Massa Molecular
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MS	Espectrometria de massas
NRC	<i>National Research Council</i>
NUBIS	Núcleo de Biotecnologia de Sobral
°C	Grau centígrados
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PH	Potencial hidrogeniônico
PI	Ponto Isoeletrico
PLA2	Fosfolipase A2
PS	Plasma seminal
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio

RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TCA	Ácido Tricloroacético
TRIM	Tripartite motivo
UBDS	Domínios de ligação com a ubiquitina
<i>UNIPROT</i>	Universal Protein Resource
UPS	Sistema de proteossoma ubiquitina
V	Volt
ZP	Zona Pelúcida

RESUMO GERAL

Estabelecer o perfil proteômico de uma determinada raça utilizando células espermáticas é um importante mecanismo para identificar biomarcadores e esclarecer o potencial reprodutivo e/ou econômico. Com a utilização da eletroforese bidimensional, além de detectar o conjunto de proteínas expressas de uma raça, também é possível, quando associada a ferramentas de bioinformática, estabelecer um comparativo quantitativo e qualitativo das proteínas expressas dos grupos em estudos. O objetivo neste trabalho é caracterizar o perfil proteômico do espermatozóide de caprinos da raça Saanen e fazer uma análise comparativa com a raça Moxotó correlacionando biomarcadores de fertilidade que são exclusivas para cada raça. Foram utilizados cinco reprodutores para cada raça e estabelecido condições de manejo e metodologias para estabelecer uma possível comparação das proteínas expressas através de eletroforese bidimensional. As proteínas de cada raça foram identificadas e quantificadas com base no ponto isoelétrico (pI) e massas molecular (MM) no banco de dados UniProt utilizando a ferramenta *TagIdent* do ExPASy. A partir da análise dos resultados foi detectado proteínas exclusivas e diferencialmente expressas para cada raça, bem como, proteínas mais específicas relacionadas à eficiência reprodutiva.

GENERAL ABSTRACT

In order to establish the proteomic profile of a particular breed using sperm cells is an important mechanism to identify biomarkers and clarify the reproductive potential and / or economic. Using two-dimensional electrophoresis, in addition to detecting the set of proteins express in a breed, it is also possible, when associated with bioinformatics tools, establishing a quantitative and qualitative comparison of proteins expressed of groups in study. The objective of this work is to characterize the proteomic profile of the goats spermatozoa from Saanen breed to make a comparative analysis with the Moxotó breed correlating biomarkers of fertility that are unique to each breed. Five breeding were used for each breed, and established conditions of handling and methodologies to establish a possible comparison of the expressed proteins by two-dimensional electrophoresis. The proteins of each breed were identified and quantified based on isoelectric point (pI) and molecular mass (MM) in database UniProt using the tool *TagIdent* of ExPASy. From the analysis of the results it was detected proteins exclusives and differentially expressed for each breed, as well as more specific proteins related to reproductive efficiency.

Keywords: Goats. Proteomics. Electrophoresis. Reproduction.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A caprinocultura desempenha um aspecto socioeconômico relevante para pecuária no Nordeste brasileiro, tornando-se uma atividade acessível ao pequeno produtor rural devido a seus baixos custos e por atender suas necessidades de subsistência e o mercado local. Entretanto, para ser atividade promissora necessita de maiores investimentos nas tecnologias adotadas e na organização da cadeia produtiva para apresentar maior produtividade.

Estudos proteômicos vêm sendo aplicados na reprodução animal, visando identificar proteínas que possam ser usadas como marcadores de fertilidade especializando, assim, seus reprodutores para aumentar o rebanho e a produção. Pesquisas com células espermáticas têm permitido o mapeamento dessas moléculas esclarecendo mecanismos que comprovem a capacidade fertilizante do macho, já que ele contribui significativamente com a herança genética do rebanho e maximiza o sucesso durante a inseminação artificial.

O uso da técnica de eletroforese bidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) juntamente com o uso da bioinformática e espectrometria de massas têm proporcionado a identificação e caracterização das proteínas, com resultados interessantes e promissores para a reprodução.

Outro aspecto interessante é na identificação de proteínas relacionadas a características marcantes de cada raça porque estudaremos duas raças distintas e bem peculiares sendo a primeira a raça exótica Saanen que se destaca como excelente produtora de leite e a segunda Moxotó, raça nativa, e com alta rusticidade que se adaptou bem às condições do semiárido nordestino. Para isso, é imprescindível estabelecer o perfil proteômico da Saanen e comparar quantitativamente com as proteínas da Moxotó e assim, entender o mecanismo de ação que permite desenvolver suas aptidões específicas e identificar proteínas que exercem maior potencial de fertilidade entre seus reprodutores.

Estudos que já foram elucidados mostraram proteínas que desempenham diferentes funções que auxiliam na motilidade, proteção, maturação dos espermatozoides e também na capacitação espermática. Foram estudados os espermatozoides de cada raça, tentando esclarecer uma maior interação ou diferenciação nas proteínas encontradas em ambas.

Realizando análise em banco de dados foi possível observar que, dentre os animais de produção, o caprino (*Capra hircus*) é a espécie que apresenta carência de informações moleculares, tanto na expressão de genes como de proteínas, quando comparados a outras espécies. Os resultados obtidos serão enviados para a formação de um banco de dados relacionado a cada raça estudada e que poderá auxiliar em futuras pesquisas.

Objetivou-se neste trabalho, caracterizar o perfil proteômico do espermatozoide de caprinos da raça Saanen bem como realizar uma análise de expressão quantitativa e comparativa com a raça Moxotó, correlacionando possíveis biomarcadores e proteínas que são exclusivas para cada raça.

CAPÍTULO 1
REFERENCIAL TEÓRICO

Introdução

A caprinocultura é uma das mais antigas atividades pecuárias do Brasil, surgiu desde a ocupação portuguesa e está presente em todas as cinco grandes regiões do país, com maior relevância no Nordeste com 93% (IBGE, 2011).

A maior parte do território da região está sob influência do clima semiárido, caracterizando baixos índices pluviométricos, alta taxa de evaporação, escoamento superficial das águas e temperatura média de 26 °C (EMBRAPA, 2011). No entanto, mesmo na zona semiárida da região Nordeste os caprinos tem potencial para contribuir com a oferta de alimentos atendendo ao consumo e a demanda do mercado local.

As raças naturalizadas são bastante exploradas por apresentar maior rusticidade e adaptação ao clima da região. Entretanto, caprinos de raças exóticas são importadas com a justificativa de apresentar maior especialidade de produção e altos índices produtivos (SANTOS et al., 2005). Uma alternativa explorada é o uso de cruzamentos no melhoramento genético entre as raças, possibilitando maior exploração de heterose e contribuindo para a viabilidade econômica em curto prazo (PIRES, 2009).

Uma das ferramentas importantes para aumentar os índices de produtividade de um rebanho é a utilização de machos geneticamente superiores e de fertilidade comprovada (GUIMARÃES et al., 2011). A busca por marcadores de fertilidade exigem uma série de procedimentos desde a utilização de macro parâmetros, como o diâmetro e o volume do saco escrotral, observações em nível celular, como a motilidade e integridade dos espermatozoides, e reação acrossômica, bem como estudos em nível molecular como genômica e proteômica. Vale salientar que os parâmetros moleculares não substituem os morfofisiológicos, pois eles complementam-se e tornam-se mais um componente desta equação multiparamétrica (DU PLESSIS et al., 2011).

A análise proteômica da célula espermática tem propiciado uma melhor compreensão sobre os processos espermáticos como motilidade, capacitação, reação acrossômica e fertilização. Através das técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa é possível caracterizar e identificar de proteínas específicas do espermatozoide que estão envolvidas desde a formação das células, até em proteínas encontradas durante o seu desenvolvimento e atividade fertilizante (DU PLESSIS et al., 2011).

O uso de animais cujo proteoma ou genoma são conhecidos como modelos de estudo tais como ratos, bovinos e suínos auxiliam em estudos com baixos níveis de proteínas identificadas em bancos de dados.

Em função desta abordagem sobre a fertilidade dos machos, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de identificar marcadores moleculares do processo reprodutivo em animais de produção. Assim, a função espermática, após a espermatogênese, é modulada de forma significativa por alterações pós-traducionais de proteínas celulares. A análise proteômica dos fluidos reprodutivos fornece informações importantes para a compreensão de tais mecanismos que determinam a capacidade fecundante dos gametas masculinos e, conseqüentemente, identificando reprodutores superiores (MOURA et al., 2011).

Referencial Teórico

Características gerais da raça Saanen

A raça de caprinos Saanen é originária da Suíça, do Vale Saanen, é muito explorada na Alemanha, França, Bélgica, Estados Unidos e em outros países por sua alta produção de leite por dia com média de 3,0 kg e período de lactação de 8 a 10 meses com elevado teor de gordura (3,0 a 3,5%). No Brasil, a média de produção diária de leite tem variado de 2,5 kg a 4,9 kg para uma lactação com duração de 260 a 305 dias (LOPES et al., 2012).

É uma raça que se destaca por ser uma das mais utilizadas para produção e melhoramento genético do rebanho de caprinos leiteiros. Os animais apresentam pelagem uniformemente branca, com pelos curtos, o chanfro é retilíneo, com orelhas pequenas e as pontas ligeiramente acima da horizontal, com o pavilhão interno voltado para frente. É muito dócil, com uma conformação tipicamente leiteira: cabeça fina e delicada, pescoço delgado, corpo com formato de cunha, úbere volumoso e bem conformado, angulosa. São animais de grande porte, com as fêmeas pesando de 50 a 90 kg algumas até mesmo ultrapassando os 100 kg e os machos de 80 a 120 kg com indivíduos de até 130 kg podendo ter ou não barba, brincos e chifres (Figura 1) (AIURA; AIURA; SILVA, 2010).

Figura 1: Reprodutor da raça Saanen.



Fonte: (EMBRAPA caprinos e ovinos , 2012).

Características gerais da raça Moxotó

A raça Moxotó é nativa do Nordeste brasileiro e apresenta características adaptativas que permitem sobreviver e reproduzir em regiões semiáridas, principalmente no período de estiagem, o que a torna um recurso genético valioso (OLIVEIRA, 2004).

É a única raça nacional reconhecida oficialmente e que tem registro genealógico. Originária do vale do Rio Moxotó, em Pernambuco Ibimirim-Inajá, possui característica rústica e bastante prolífica, com aproximadamente 40% de partos múltiplos. Tem porte pequeno e pouco produtora de leite, no entanto, possui uma pele de excelente qualidade, além de produzir carne. A altura para os machos varia entre 50 a 70 cm, com peso médio das crias ao nascer variando de 2,0 a 2,3 kg e adulto até 34 kg. Possui pelagem branca ou baia, com uma listra negra descendo da base dos chifres, lateralmente até a ponta do focinho, bem como ao longo do dorso tomando quase toda sua extensão. O ventre, úbere e membros são normalmente pretos, podendo apresentar pequenas manchas brancas. Os pêlos são curtos e brilhantes CAPRIOVIS(2010). (Figura 2).

Figura 2: Reprodutor da raça Moxotó.



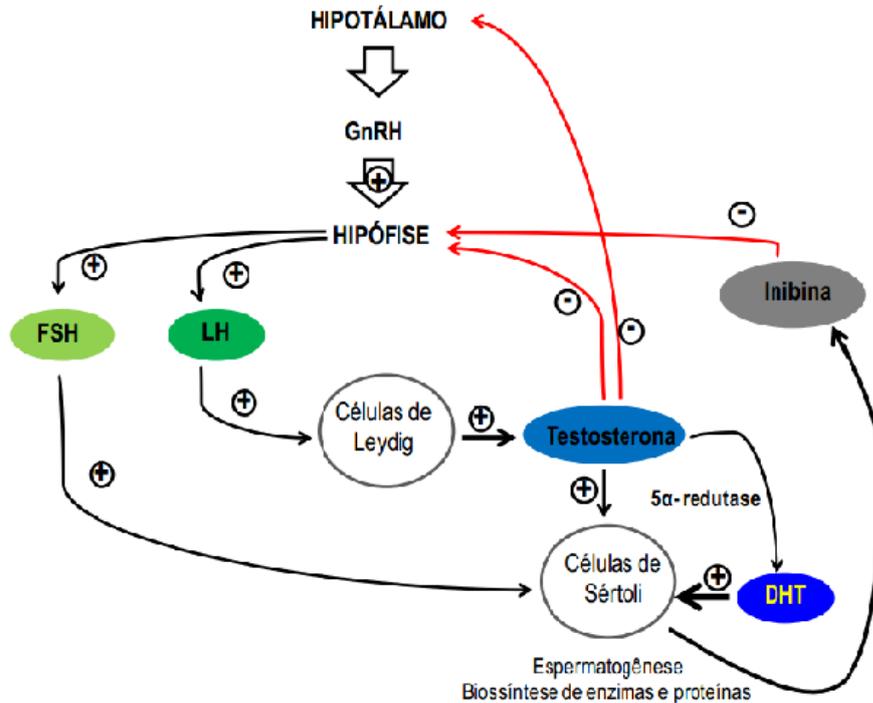
Fonte: (EMBRAPA caprinos e ovinos , 2012).

Aspectos morfofisiológicos da espermatogênese

O hipotálamo age controlando a fertilidade através da liberação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Nos machos este hormônio atua sobre a glândula pituitária para estimular a secreção de dois produtos essenciais para o desenvolvimento de células germinativas, o FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e o LH (Hormônio Luteinizante), sendo este último responsável pelo desenvolvimento testicular das células de Leydig para produzir e secretar a testosterona. O FSH e a testosterona exercem funções são fundamentais

para progressão normal da espermatogênese, diretamente nas células de Sertoli através de seus receptores que têm repercussões na produção normal de espermatozoides (HOGARTH; GRISWOLD, 2010). (Figura 3).

Figura 3: Vias hormonais envolvidas na espermatogênese.



Fonte: (NUNES, 2012).

As células de Leydig iniciam a secreção de testosterona ainda na vida fetal, na diferenciação embriológica dos órgãos genitais masculinos, porém, é durante a puberdade que se tornam mais evidentes e funcionais. A densidade populacional das células de Leydig pode variar entre indivíduos de espécies diferentes e mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Dentre os inúmeros fatores que podem influenciar na sua quantidade por animal, estão a quantidade de LH disponível, o número de seus receptores por célula, a quantidade de testosterona que é capaz de secretar por uma unidade de tempo, a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluidos seminais, o volume sanguíneo do animal e a taxa de metabolismo da testosterona (RUSSELL et al., 1994; RUSSELL, 1996).

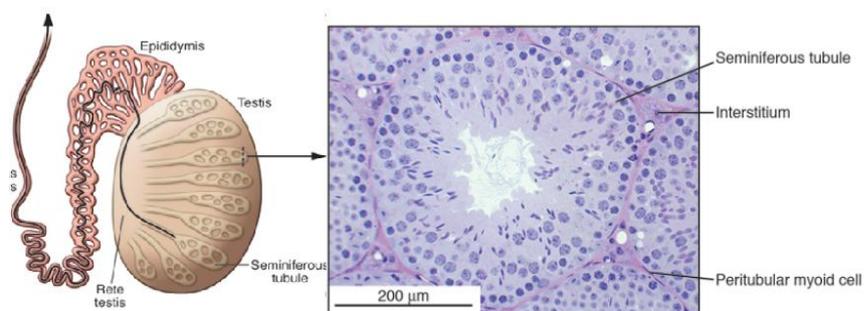
As células de Sertoli desempenham um papel fundamental na interação célula-célula e na síntese de diferentes substâncias essenciais para o desenvolvimento dos espermatozoides,

possuem receptores para testosterona e FSH e, portanto elas são as principais reguladoras da espermatogênese (LOMBARDI et al., 2013).

Estudos indicam que o número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na produção espermática e peso testicular, justificando-se o fato de que essas células têm uma capacidade fixa de suporte para as células germinativas sendo o número de células germinativas, em especial as espermatídes, suportadas por uma única célula de Sertoli torna-se um indicativo da eficiência funcional do testículo e, conseqüentemente, da produção espermática (FRANÇA; RUSSELL, 1998; ROCHA; DEBELJUK; FRANÇA; 1999 apud MACHADO JUNIOR, 2009).

Segundo Lombardi e colaboradores (2013) todo o processo de espermatogênese ocorre no testículo, especificamente no epitélio seminífero observando-se uma organização fixa e bem definida de tipos celulares. O conjunto dos estágios é organizado em seqüência progressiva do desenvolvimento das células germinativas num dado segmento do túbulo seminífero, sendo denominado Ciclo do Epitélio Seminífero (CES). O padrão cíclico é marcado pela evolução progressiva e sincronização das células espermatogênicas individuais e translocação das mesmas do compartimento basal. Estes grupos celulares morfológicamente distintos, podem ser identificados em secções de túbulos histológicos como nos mostra a Figura 4.

Figura 4: Corte histológico dos túbulos seminíferos.



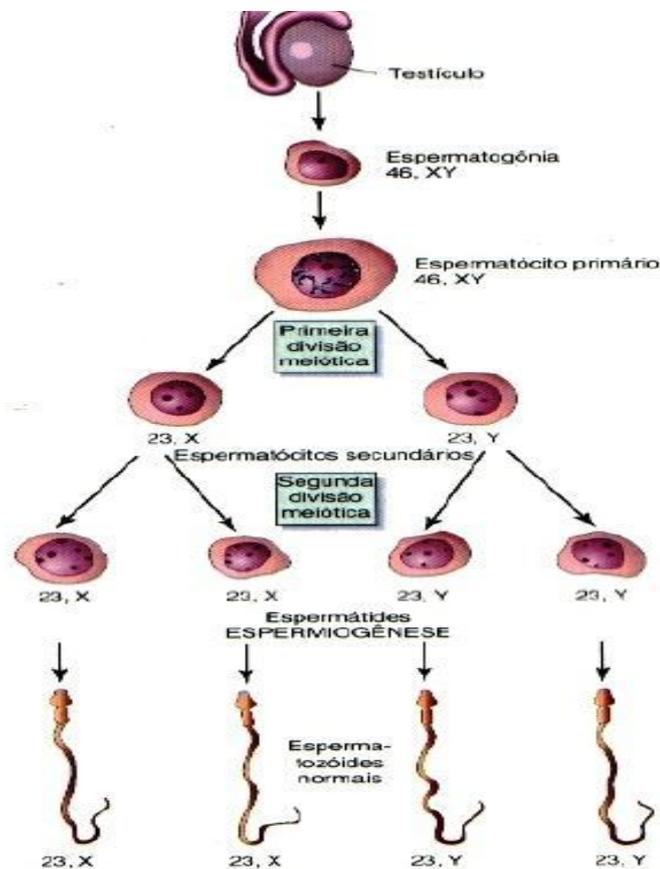
Fonte: (HOGARTH; GRISWOLD, 2010).

Espermatogênese

A espermatogênese é um processo altamente orquestrado que exige a interação correta de todos os constituintes moleculares para produzir espermatozoides funcionais e móveis. Inicia-se com o desenvolvimento das células germinativas indiferenciadas até a produção de espermatozoides altamente especializado e capaz e de fertilizar um oócito (KANIPPAYOOR; ALPERN; MOEHRING, 2013).

Esta diferenciação complexa e organizada envolve três fases: (1) fase proliferativa espermatogonial, na qual as células sofrem rápida e sucessiva divisão mitótica e dão origem aos espermatócitos primários e, ao mesmo tempo, renovam a população espermatogonial necessária para a manutenção do processo; (2) fase meiótica, espermatócitos, onde o material genético é duplicado e passa por recombinação genética com duas divisões celulares sequenciais resultando na formação de células haplóides, as espermatídes; (3) fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermatídes sofrem intensas modificações e se convertem em espermatozoides (Figura 5).

Figura 5: Fases do processo de espermatogênese.



Fonte: BIOMEDICINA-FARMÁCIA, (2011).

A testosterona é o principal hormônio masculino que controla a espermatogênese, o libido e as características sexuais secundárias que aumenta, desde níveis muito baixos no animal pré-púbere até níveis elevados no adulto, em resposta à secreção de gonadotrofinas (GARNER; HAFEZ, 2004) sendo este hormônio essencial à função reprodutiva nos machos. Os testículos secretam maior parte da testosterona circulante, e menos de 1% pode ser produzido pela glândula adrenal. Atua estimulando os estádios finais da espermatogênese,

prolonga a vida útil dos espermatozoides no epidídimo e estimula o desenvolvimento testicular e atividade secretora dos órgãos sexuais do macho (HAFEZ, 2004).

Embora o processo espermatogênico seja essencialmente o mesmo em todos os mamíferos, existem características específicas entre as diferentes espécies. Estas particularidades estão relacionadas com o número de gerações espermatogoniais e as características morfológicas das células germinativas presentes em várias fases do processo espermatogênico, principalmente nas espermátides alongadas. Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas não estão organizadas ao acaso e sim, em associações celulares distintas denominadas de estádios, ordenados de modo espécie-específico (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005).

Espermatozoides

Os espermatozoides foram descritos pela primeira vez há mais de 300 anos por Leeuwenhoek. Ele notou que cada um dos animálculos, como foi denominado os espermatozoides, tinham uma cabeça e uma cauda. Houve grande controvérsia sobre o real significado dos espermatozoides por muitos anos, até que em 1830 eles foram reconhecidos como parte do sêmen e essenciais para fertilidade do indivíduo (SETCHELL et al., 1982).

O espermatozoide é o produto final da espermatogênese, o qual resulta em uma célula altamente diferenciada em sua estrutura e função, capaz de combinar-se com um oócito homólogo e iniciar uma nova geração. Os dois principais componentes do espermatozoide são a cabeça e a cauda, conectados pela peça conectora (EDDY, 2006). (Figura 6).

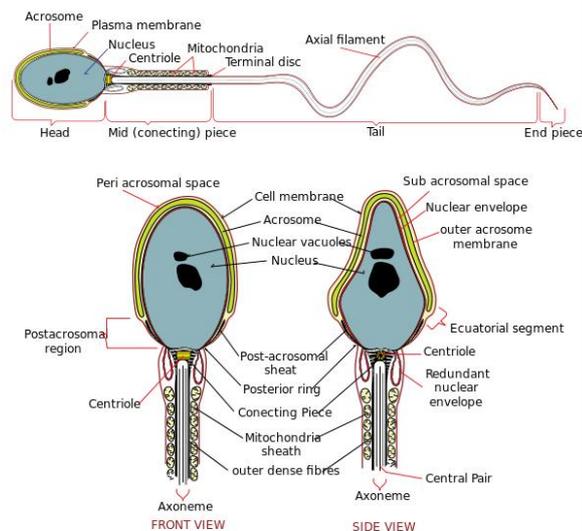
Os espermatozoides têm carga elétrica negativa e repelem um ao outro. Quando perdem sua carga negativa agregam-se, formando aglomerados. Este fenômeno é chamado de aglutinação e pode ocorrer devido a um aumento na acidez do meio, à presença de íons metais, bactérias ou outras impurezas ou à presença de aglutininas no corpo do animal (MAIA;MEDEIROS;LIMA; 2011).

O espermatozoide maduro é composto por três porções especializadas. A cabeça, que contém o núcleo com DNA que durante a condensação da cromatina, as histonas são removidas e substituídas por protaminas estas proteínas carregadas positivamente e ricas em resíduos de arginina e cisteína, que substituem as histonas em cerca de 85% do DNA, resultando em sua condensação. O acrossoma, é formado por uma estrutura vesicular derivada do complexo de Golgi (HERMO et al., 2010), e se sobrepõe à parte apical do núcleo alongado. Contém uma matriz composta de enzimas hidrolíticas e receptores necessários para

a interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida do oócito durante a fertilização. (GADELLA, 2012).

A cauda onde se encontra a peça intermediária revestindo perifericamente o axonema, é uma estrutura formada por α - e β -tubulina e ATPase de fibras densas e uma hélice com mitocôndrias responsáveis pela produção de energia. Além disto, possui um complexo de microtúbulos cercado por fibras densas na peça intermediária, onde são enrolados em espiral em torno do flagelo central que será responsável pelo funcionamento aeróbico do espermatozoide. A área mais distal da cauda do espermatozoide, a peça principal não contém mitocôndrias, mas um conjunto específico de adaptações do citoesqueleto, densa em todo o flagelo central para assegurar as propriedades de movimento (SPERRY, 2012).

Figura 6: Representação da célula espermática e seus constituintes.



Fonte: (WIKIPÉDIA, 2011).

A função dos espermatozoides é transportar o material genético paterno para o óvulo da mãe ocorrendo assim a fertilização. Entretanto, uma série de modificações a nível celular acontece, uma delas é na mudança de concentração dos íons intracelular de cálcio Ca^{2+} e bicarbonato HCO^{3-} (MORÁN, 2013).

Maturação Espermática

À medida que os espermatozoides passam pelo epidídimo eles sofrem importantes alterações morfológicas e fisiológicas. O epidídimo é um órgão alongado localizado na superfície do testículo, dividido-se anatomicamente em três segmentos: a cabeça, onde há absorção de fluidos e aquisição de motilidade progressiva pelos espermatozoides; o corpo, onde os espermatozoides passam a apresentar capacidade fecundante e por último a cauda, cuja função básica é armazenamento e manutenção dos espermatozoides (SULLIVAN et al., 2005).

Para uma fertilização eficiente, os espermatozoides necessitam apresentar características morfofuncionais normais adquiridas em sua formação nos túbulos seminíferos e completadas com a passagem pelo epidídimo e contato com secreções das glândulas acessórias. Além do desenvolvimento da motilidade, os espermatozoides no epidídimo sofrem estabilização da peça intermediária e do acrossoma. Os espermatozoides, ao saírem do epidídimo, sofrem alterações na composição e propriedades da membrana incluindo no teor de lipídios, mudanças superficiais de glicoconjugados nas proteínas de membrana, estabilização da cromatina nuclear, compactação de fibras da cauda e obtenção de novas proteínas (MOURA, 2011).

Entre as macromoléculas, as proteínas que se incorporam à membrana plasmática do espermatozoide podem ser responsáveis pelo agrupamento ou ativação de receptores para o oócito. Em ratos, foram identificadas proteínas da família das glicoproteínas que é secretada pelo epidídimo e que poderia contribuir para o amadurecimento do espermatozoide bem como a maior parte dos antígenos adquiridos no epidídimo, embora alguns já sejam obtidos no túbulo seminífero (PATRIZIO et al., 1992).

Modificações na composição da membrana plasmática contribuem para estas mudanças funcionais que envolvem alterações do padrão de atividade flagelar e habilidade de se ligar à zona pelúcida e reação acrossômica. Elas são refletidas por mudanças na carga elétrica da superfície celular, ligação de lecitinas, distribuição de partículas intramembranas, fluidez da membrana, composição de lipídeos e proteínas e ligação de anticorpos. Portanto, tanto os eventos da espermatogênese quanto a maturação pós-testicular são necessários para a funcionalidade das células espermáticas (GATTI et al., 2004).

Capacitação espermática

A capacitação é um processo que envolve múltiplas etapas, ainda não bem compreendidas, e mudanças bioquímicas e estruturais da membrana plasmática dos

espermatozoides. Estas mudanças afetam a estrutura e a permeabilidade da membrana espermática. Este processo está relacionado com mudanças na concentração iônica intracelular, na fluidez da membrana plasmática, no metabolismo e na motilidade dos espermatozoides (YANAGIMACHI, 1994).

A capacitação espermática é um requisito necessário para que ocorra a fertilização e resulta de alterações na membrana plasmática as quais tornam os espermatozoides capazes de efetuar a reação acrossômica que, em condições fisiológicas, ocorre durante exposição a uma glicoproteína que compõe a zona pelúcida do oócito (GADELLA et al., 2008).

Entre as principais mudanças durante o processo de capacitação estão: redução da relação colesterol/fosfolípido na superfície espermática, maior fluidez da membrana, principalmente determinada pelo aumento da concentração de fosfatidilcolina e pela estabilização da membrana, o Mg-ATP (Trifosfato de Adenosina Sal de Magnésio) que, ligando-se às fibras densas externas do espermatozoide torna flexível o movimento flagelar, alterações nas glicosaminoglicanas, influxo de íons cálcio, aumento da concentração de AMP (adenosina monofosfato) cíclico e modificações de algumas atividades enzimáticas principalmente a proteína quinase C (KOTHARI et al., 2010).

Reação do acrossoma

O acrossoma é sede de uma reação necessária à penetração do espermatozoide pela membrana do oócito e consiste das seguintes etapas: a) Fusão da membrana acrossômica externa com a membrana plasmática; b) Fenestração das membranas; c) Liberação do conteúdo acrossômico e exposição, ao meio ambiente, das proteínas ligadas à membrana acrossômica; d) Fusão da membrana plasmática e membrana acrossômica interna no limite anterior do segmento equatorial e e) Perda das membranas que reagiram (GUERRA; PETERS, 2007).

Os espermatozoides desenvolvem-se como produto de aquisição de novas proteínas do fluido epididimal e modificação de proteínas já existentes, criando sítios de ligação para estruturas oocitárias ou expondo sítios já existentes (BAKER et al., 2005; DACHEUX et al., 2006). A zona pelúcida dos oócitos é formada por uma matriz glicoprotéica denominadas ZP1, ZP2 e ZP3 sendo as duas últimas longas cadeias, interligadas por “pontes” de ZP1 - ZP3 que é o receptor específico no espermatozoide, onde são formadas por 400 aminoácidos (SULLIVAN et al., 2005). Diversos estudos com carboidratos, incluindo a galactose e a N-acetilglicosamina, têm demonstrado estar envolvidos na interação entre gametas (MIRANDA et al., 1997).

A reação do acrossoma envolve a fusão da membrana plasmática do espermatozoide com a membrana externa do acrossoma, liberando enzimas hidrolíticas como a acrosina e a hialuronidase, que resultam na penetração do oócito. A fosfolipase A2 ou PLA2 desempenha papel importante na reação de acrossoma participando da síntese do ácido araquidônico quando ativada pela progesterona, Ca^{2+} e pela proteína kinase C. O ácido araquidônico é então convertido em prostaglandina, a qual induz o influxo de Ca^{2+} através da membrana espermática ocasionando a fusão das membranas e, conseqüentemente, a reação acrossômica (JOBIM; GREGORY; MATTOS, 2009).

Em diversos estudos com diferentes espécies de mamíferos a fertilização depende de uma série de fatores, como o comportamento animal e as características ligadas diretamente ao sêmen, tais como a motilidade e morfologia dos espermatozoides e a composição bioquímica do plasma seminal (MOURA et al., 2010).

Proteínas do espermatozoide

O sêmen é composto por espermatozoides, que compõe menos que 1% do volume total e por plasma seminal que representa secreções do epidídimo e glândulas vesiculares do trato reprodutivo, considerando que 30-60% é secretado pelas glândulas (ASSUMPCÃO et al., 2013).

Diferentes estudos buscam identificar proteínas específicas dos espermatozoides, seja durante sua formação no período da espermatogênese, ou proteínas que são do plasma seminal e que interagem de forma direta sendo adsorvidas pelos espermatozoides e em seguida desempenham suas funções. Segundo Rolland e colaboradores (2007) utilizando a técnica de eletroforese bidimensional seguido por MALDI-TOF/TOF (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz - Tempo de voo) durante a fase da espermatogênese foi identificado cerca de 123 proteínas no testículo de ratos, representando 64 picos de expressão durante a fase de espermatogônias, 17 em espermatócitos e 42 em espermátides.

Govin e colaboradores (2006) estudando proteínas específicas da espermatogênese identificaram a HSPA2 (*Heat Shock Protein*) com função específica no controle de transcrição das histonas e nos fatores relacionados a choque térmico específico do testículo. Outras proteínas identificadas em estudos específicos foram as fosfoproteína que são fosforilada pela caseína quinase 2, que desempenham papéis importantes no desenvolvimento da cabeça do espermatozoide e sua ligação com o cálcio (CALVEL et al., 2009).

Os grupos de proteínas dos espermatozoides mais estudados são as de capacitação espermática e motilidade onde eles adquirem o potencial fertilizante após o contato com os

fluidos das glândulas sexuais acessórias envolvendo alterações bioquímicas e estruturais da membrana, que incluem a perda de componentes adsorvidos, alterações em sua composição lipídica e maior permeabilidade a íons (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002).

Entre as proteínas relacionadas à interação entre os gametas e a reação acrossômica, destacam-se a osteopontina e a prostaglandina D sintetase. A osteopontina é uma molécula de adesão que pode estar associada à fertilidade devido à capacidade de mediar a ligação dos espermatozoides ao oócito (SOUZA, 2007). A prostaglandina D sintetase transporta substâncias hidrofóbicas, como a testosterona e retinóides no trato reprodutor masculino (FOUCHECOURT et al., 2002). A caveolin 2 é uma proteína associada a eficiência da reação acrossômica (MIRANDA et al., 2009).

Outras proteínas são importantes para o espermatozoide, podendo-se citar a PPP1, uma fosfoproteína fosfatase com apenas 4 isoformas que desempenham inúmeras funções em diversos tecidos e mecanismo de controle de atividade catalítica. Foi demonstrado que uma isoforma específica de espermatozoide, a PPP1CC (*protein serine/threonine phosphatase 1*) tem um importante papel na motilidade do espermatozoide, sendo sua atividade maior em espermatozoides móveis quando comparada com os imóveis (FREITAS et al., 2012).

Proteínas do plasma seminal

A interação entre os espermatozoides e o plasma seminal, relacionada com a fertilização, começou a ser estudada na década de 60 para fins de seleção de reprodutores criados em diferentes climas (SKINNER; LOUW, 1966). Agregando-se esses conhecimentos anteriores, sugeriu-se que as proteínas do líquido seminal atuam no metabolismo espermático, os quais relataram a presença de quatro “proteínas associadas com a fertilidade”. São conhecidas as funções de várias proteínas presentes no plasma seminal, como as que colaboram com a capacitação espermática (BERGERON, 2004).

O fato de o plasma seminal desempenhar importante papel na maturação dos espermatozoides faz dele material biológico de uso comum nos muitos trabalhos de proteômica, visando determinar perfil proteico, ou seja, caracterizar e identificar proteínas como, por exemplo: as proteínas de ligação ao espermatozoide (Binder Sperm Proteins - BSPs), metaloproteinases de matriz (MMPs); proteínas com afinidade à heparina (HAPs); espermadesinas; fosfolipase A2 e lactoferrina (BEZERRA JÚNIOR, 2013).

O plasma seminal consiste em um fluido produzido pela rede testis, epidídimo e glândulas acessórias, sendo expelido em frações durante o ejaculado por meio de contrações uretrais e contém diferentes componentes, tais como açúcares, lipídeos, proteínas e íons. A

maioria das proteínas presentes no plasma seminal é proveniente do epidídimo e estão envolvidas na remodelação da membrana espermática, que ocorre durante o trânsito epididimário e após a ejaculação. Sabe-se que as proteínas seminais estão divididas em três grupos: proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (Fn-2), proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs) e as espermadesinas (KARESKOSKI; KATILA, 2008).

Dentre diversos estudos com proteínas do plasma seminal destacamos o grupo “Bind Sperm Proteins” (BSPs) ou Proteínas Ligadas ao Espermatozoide, que representam aproximadamente 30% presentes no Plasma Seminal (PS) e 86% das glândulas acessórias representando assim o maior grupo de proteínas seminais conhecidas (JOBIM et al., 2005).

O Estudo de BSPs em bovinos mostrou que essas proteínas (BSPA1, BSPA2, BSPA3 e BSPA5) são capazes de ser adsorvidas na superfície dos espermatozoides e permanecem durante a capacitação espermática no interior do trato genital da fêmea, contribuindo para a ligação entre o espermatozoide e o oócito durante o armazenamento e reservatório de espermatozóite na capacitação espermática. As BSPs apresentam dois domínios tipo II semelhantes ao da fibronectina, (Fn2), os quais lhes conferem a capacidade de ligarem a fosfolipídios e à heparina. As BSPs ligam-se aos espermatozoides no momento da ejaculação, interagindo com fosfolipídeos contendo colina, abundantes em sua membrana plasmática promovendo a remoção de fosfolipídeos e colesterol (GWATHMEY et al., 2006).

Souza et al (2011), em trabalhos com bovinos, observaram que as BSPs, A1 e A2 são bastante semelhantes na composição de aminoácidos e no peso molecular (16,5 e 16 kDa, respectivamente). Estas moléculas se ligam especificamente a fosfolipídeos, principalmente a colina, que constitui a fração principal dos fosfolipídios da membrana espermática. Como função principal, destacam-se os glicosaminoglicanos, que no trato genital da fêmea, formam complexos que protegem os espermatozoides contra os efeitos oxidativos que ocorrem no trato genital feminino. As BSps A3 (30 kDa) e A5 (28-30 kDa) possuem diferenças quanto a sua cadeia de aminoácidos, não sendo glicoproteínas, já a A3 se liga em todas as regiões do espermatozoide de forma mais intensa na peça intermediária e acrossoma.

A família das proteínas ricas em cisteína (CRISP) inibe a fosforilação da tirosina no processo de capacitação espermática, pelo bloqueio dos canais de íons na membrana plasmática e apresenta capacidade de penetrar através das membranas celulares e atuar como antioxidante (REGHINI et al., 2010). Estudos demonstraram que a cisteína oferece proteção efetiva da integridade funcional do acrossoma e da mitocôndria, melhorando a motilidade (SARIOZKAN et al., 2009) e a integridade da membrana espermática pós-descongelamento sem

eliminar a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MICHAEL et al., 2008). Em suínos, a adição de cisteína ao meio de maturação melhorou a maturação e a fertilização dos oócitos, bem como a taxa de prenhez (SARIOZKAN et al., 2009).

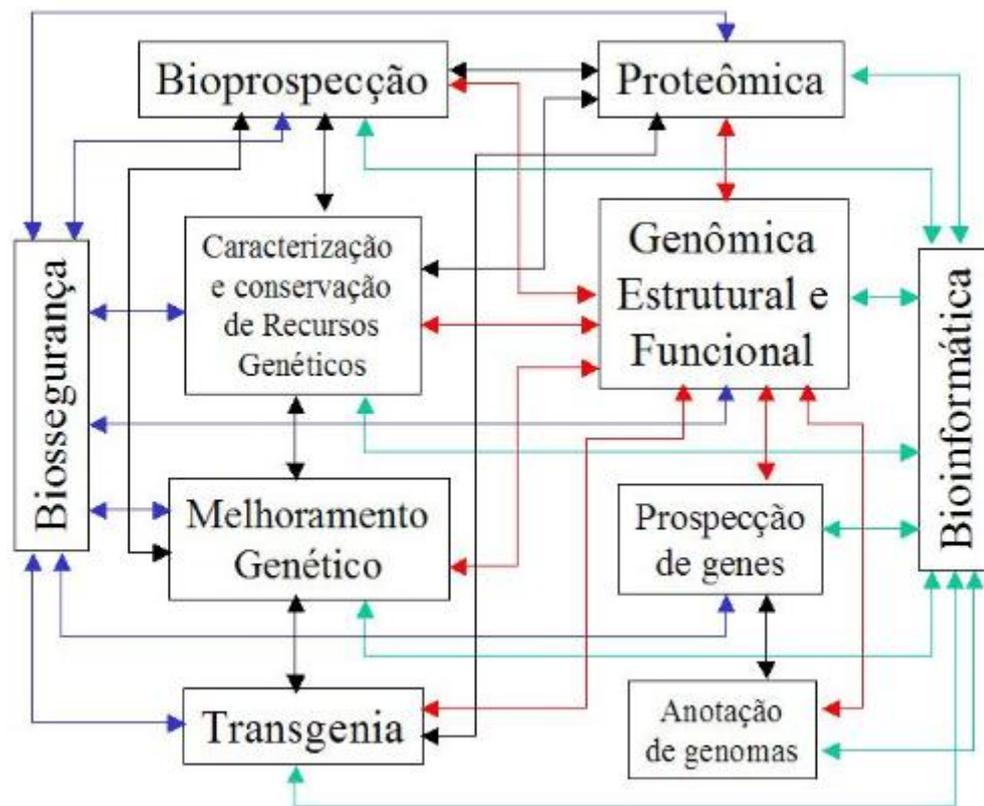
As espermedesinas possuem de 110 a 113 aminoácidos na sua estrutura e compreendem um único domínio CUB (domínio protéico) estabilizado por pontes dissulfídicas. Estas proteínas são multifuncionais e exibem habilidade para se ligar à heparina, aos inibidores de proteinase, fosfolipídeos e os carboidratos. A HSP-7 é a maior representante das espermatodesinas sendo secretada durante o trajeto do espermatozoide pelo ducto epididimário. Esta se liga à zona pelúcida intacta, mostrando seu papel na interação espermatozoide-zona pelúcida (GUASTI; MONTEIRO; PAPA, 2012).

De acordo com a literatura, estudos realizados em javali mostraram que as espermedesinas compunham cerca de 90% do total protéico do plasma seminal (DOSTÀLOVÀ; CALVETE; TÖPFER-PETERSEN, 1995) e contribuíam para a manutenção de espermatozoides com alta viabilidade, motilidade e atividade mitocondrial em temperaturas fisiológicas e também pode modular as respostas imunes no útero de porcas jovens (ASSREUY et al., 2003).

Abordagem proteômica com eletroforese bidimensional

Grandes avanços nas técnicas biomoleculares, bem como na sensibilidade e na precisão dos espectrômetros de massa, estão transformando a paisagem científica através dos progressos que estão sendo obtidos no campo da bioquímica analítica, a chamada revolução “ômica”. Esta revolução nos remete para o estudo dos genes (genômica), das transcrições (transcriptômica), das proteínas (proteômica) e dos seus metabólitos (metabolômica) associadas a bioinformática (Figura 7). Desta forma, atualmente é possível analisar os estoques de lipídios, proteínas, metabólitos e de espécies de RNA em populações de células purificadas e ainda, determinar a relação destes componentes com a função celular (AITKEN; HENKEL, 2011).

Figura 7: Proteômica como ferramenta de estudo.



Fonte: SIDER; ZAROS, (2008)

O termo proteoma foi proposto por Wilkins e Willians, em 1994, para descrever o estudo contendo proteínas expressas por um genoma ou, no caso de organismos multicelulares, ao complemento protéico expresso por um tecido ou por células diferenciadas (WILKINS et al., 1996). Dessa forma, o estudo do proteoma permite a identificação, caracterização funcional e a interação entre proteínas essenciais para a célula.

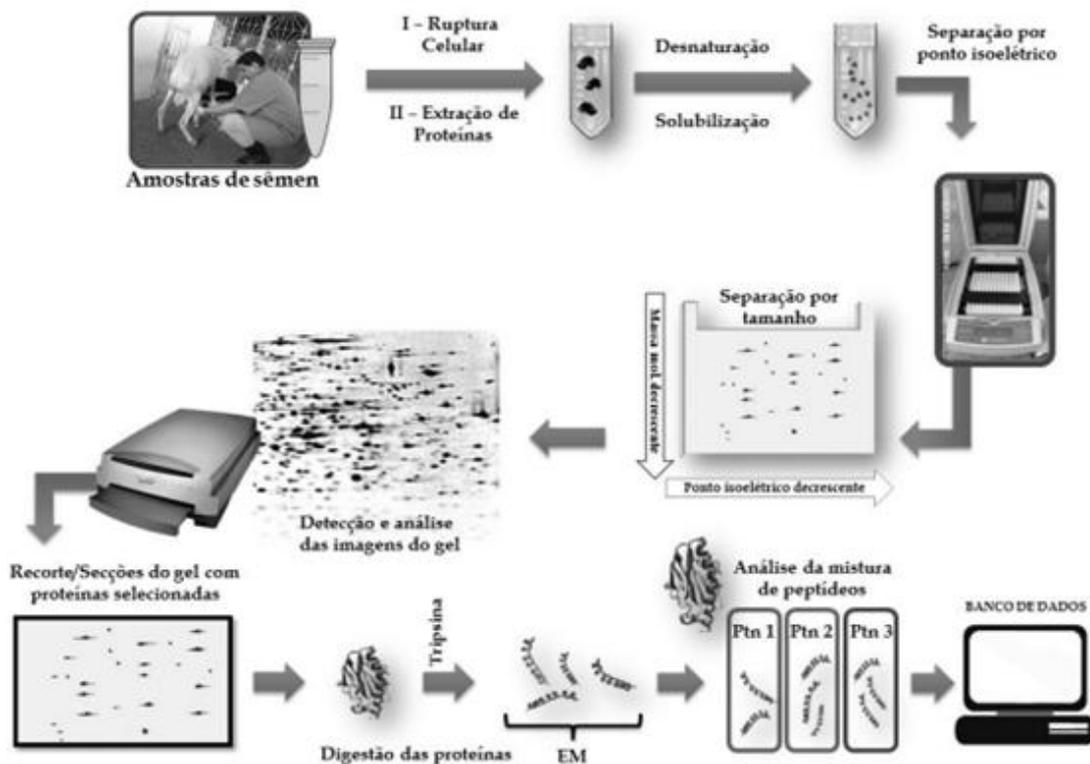
Destacamos assim a eletroforese bidimensional (2D), onde as proteínas são separadas de acordo com o ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM). A 2D resulta da combinação de duas técnicas: a focalização isoelétrica (IEF), seguida de uma separação por SDS-PAGE. Quando bem sucedidas, obtêm-se um gel de poliacrilamida contendo numerosos *spots*, bem separados, cada um correspondendo a uma proteína. Os fundamentos desta abordagem foram apresentados, pela primeira vez, por O'Farrell (1975) e Klose (1975).

Segundo Brewis e Gadella (2010), a importância dos estudos proteômicos de espermatozoides é elevada por esclarecer as alterações sofridas na maturação e capacitação. Vale salientar que as modernas técnicas de criação de animais utilizam métodos de reprodução assistida, principalmente a Inseminação Artificial.

A investigação proteômica do espermatozoide de mamíferos é muito mais recente em humanos esta análise tem identificado 1.760 proteínas do espermatozoide ejaculado, utilizando cromatografia líquida e espectrometria de massas (JOHNSTON et al., 2005).

As etapas de análise de expressão de proteínas por 2DE-PAGE, segundo Vispo (2004), consistem na preparação da amostra, separação por ponto isoelétrico, separação por tamanho ou massa, detecção dos *spots*, análise das imagens da separação, por tamanho ou massa, análise das imagens dos géis identificação usando pI e massa em comparação em banco de dados, e seleção das proteínas de interesse, recortando seções do gel com proteínas selecionadas (Figura 8).

Figura 8: Fluxograma das etapas para estudos proteomicos de espermatozoides.



Fonte: Vispo (2004) adaptado por Bezerra Júnior (2013).

A aplicação da proteômica de espermatozoides maduros tem contribuído significativamente na identificação de marcadores de fertilidade e fornecido maior compreensão do complexo regulador celular e os mecanismos moleculares envolvidos na função reprodutiva do macho (OLIVA et al., 2012).

Referências Bibliográficas

- AITKEN, R.J.; HENKEL, R. R. Sperm cell biology: current perspectives and future Prospects. **Asian Journal Andrology**, v. 13, p. 3-5, 2011.
- AIURA, A. L. O.; AIURA, F. S.; SILVA, R. G. Respostas termorreguladoras de cabra Saanen e Pardo Alpina em ambiente tropical. **Arquivos de Zootecnia**, v. 59, p. 605-608, 2010.
- ASSREUY, A. M. S. et al. Porcine spermadhesins PSP I/PSP II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1836-1841, 2003.
- ASSUMPCÃO, T. I. de et al. Perfil de proteínas e açúcares do plasma seminal e sua relação com os parâmetros andrológicos de touros da raça Nelore. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 4, p. 940-945, 2013.
- BAKER, M. A. et al. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 1003–1012, 2005.
- BERGERON, A. Comparative study on the phospholipid-binding proteins in seminal plasma of different species. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Abstracts..** Belo Horizonte; Brazilian College of Animal Reproduction, 2004, v. 1, p. 226.
- BEZERRA JÚNIOR, R. Q. et al. Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa como ferramentas proteômicas aplicadas à definição de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.100-112, 2013.
- BIOMEDICINA-FARMÁCIA. Embriologia Humana. 2011. Disponível em:<<http://magicnumbers-parussolo.blogspot.com.br/2011/06/embriologia-humana.html>>. Acesso em: Dezembro de 2013.
- BREWIS, I. A.; GADELLA, B. M. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 2, p. 68 – 79, 2010.
- CALVEL, P. et al. CLPH, a novel casein kinase 2-phosphorylated disordered protein, is specifically associated with post meiotic germ cells in rat spermatogenesis. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 2953–2965, 2009.

CAPRIOVIS. **Universidade Federal do Piauí**. 2010. Disponível em: <<http://www.ufpi.br/capriovis/index/pagina/id/231>>. Acesso em: Novembro de 2013.

DACHEUX, J. L. et al. Human epididymal secretome and proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 250, p. 36-42, 2006.

DOSTÀLOVÀ, Z.; CALVETE, J. J.; TÖPFER-PETERSEN, E. Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 376, p. 237-242, 1995.

DU PLESSIS, S. S. et al. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p.36, 2011.

EDDY, E. M. The spermatozoon In: NEILL, J. D. Ed(s). Knobil and Neill'Physiology of Reproduction United States of America: **Elsevier**, p. 3-54, 2006.

EMBRAPA. **Embrapa Caprinos e Ovinos**. 2012. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/>>. Acesso em: Novembro de 2013.

EMBRAPA. SISPRO - **Sistema de Produção de Caprinos e Ovinos de Corte para o Nordeste Brasileiro**. 2011. Disponível em: <http://www.cnpc.embrapa.br/?pg=orientacoes_tecnicas&uiui=mercado>. Acesso em: novembro de 2013.

FOUCHÉCOURT, S. et al. Mammalian lipocalin-type prostaglandin D-2 synthase in the fluids of the male genital Tract: Putative biochemical and physiological functions. **Biology of Reproduction**, Madison, v.66, p.458-467, 2002.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. **The testis of domestic animals**. In:REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA (Ed.). Male Reproduction. Madrid: Churchill Livingstonr, p. 197-219, 1998.

FRANÇA, L.; AVELAR, G.; ALMEIDA, F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, p. 300-318, 2005.

FREITAS, M. J. et al. Identificação de Alvos Terapêuticos e de Diagnóstico Através do Yeast Two Hybrid System: A Biologia Molecular na Medicina. **Acta Médica Portuguesa**, p. 25, n. 6 p. 427-432, 2012.

GADELLA B. M. Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p. 26–37, 2012.

GADELLA, B. M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 229-236, 2008.

GARNER D. L., HAFEZ E. S. E. **Espermatozoides e Plasma Seminal**. In: HAFEZ E. S. E., HAFEZ B. *Reprodução Animal*. São Paulo: Manole. 7. ed. p. 99 - 106, 2004.

GATTI, J. L. et al. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 321-339, 2004.

GOVIN, J. et al. Ost-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse sperm atogenesis. **The Journal Biological Chemistry**, v. 28, p. 3788 –3789, 2006.

GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 2, p. 169-180, 2012

GUERRA, M. de O.; PETERS, V. M. Como um mamífero se desenvolve desde a fertilização até a implantação do blastocisto. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 18, p. 15-32, 2007.

GUIMARÃES, J. D. et al. Seleção e manejo reprodutivo de touros zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 379-388, 2011.

GWATHMEY, T. M. et al. 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.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 530 p.

HERMO, L. et al. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**. v. 73, n. 4, p. 279-319, 2010.

HOGARTH, C. A.; GRISWOLD, M. D. The key role of vitamin A in spermatogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 956-962, 2010.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção da Pecuária Municipal (Economia, Agropecuária, Produção Pecuária). Dados 2004 a 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=21>. Acesso em: novembro de 2013.

JOBIM, M. I. M. et al. BSP A1/A2-like proteins ram seminal plasma. **Therogenology**, v. 63, n. 7, p. 2053-62, 2005.

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Marcadores protéicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 11-19, 2009.

JOHNSTON, D. S. et al. Analysis of the human sperm proteome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1061, p. 190-202, 2005.

KANIPPAYOOR, R. L.; ALPERN, J. H. M.; MOEHRING, A. J. Protamines and spermatogenesis in *Drosophila* and *Homo sapiens*: A comparative analysis. **Spermatogenesis**, p. 3, n. 2, p. 1-7, 2013.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 249-56, 2008.

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

KOTHARI, S. et al. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, p. 425-435, 2010.

LOMBARDI, A. P. G. et al. Physiopathological aspects of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the male reproductive system. **Spermatogenesis**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013.

LOPES, J. J. et al. Efeito do ambiente sobre as respostas fisiológicas de caprinos Saanen e seus mestiços com a raça Boer no semiárido paraibano. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 8, n. 3, p. 83-89, 2012.

MACHADO JÚNIOR, A. A. N. **Potencial reprodutivo de caprinos com escroto bipartido: Avaliação do processo espermatogênico em animais criados no estado do Piauí, Brasil.**

2009. 95 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2009.

MAIA, M. S.; MEDEIROS, I. M.; LIMA, C. A. C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 175-179, 2011.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.109-119, 2002.

MICHAEL, A. J. et al. Effect of N-Acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 120, p.1-7, 2008.

MIRANDA, P. V. et al. Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding in vitro. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.3, p.399-404, 1997.

MORÁN, A. M. **Identificación, regulación y estudio funcional de la proteína quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) en espermatozoides de mamíferos**. 2013. 210 f. Tese (Doutorado em Veterinária) Universidade de Extremadura, 2013.

MOURA, A. A. et al. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 139-144, 2011.

MOURA, A. A. et al. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 2006-2020, 2010.

NUNES, L. A. S. Síndrome metabólica e infertilidade masculina. **Revista Ciências em Saúde**, v. 2, n 2, p. 1-11, 2012.

O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v.250, p.4007-4021, 1975

OLIVA, R. et al. Methodological advances in sperm proteomics. **Human Fertility (Cambridge)**, v. 13, p. 263-267, 2012.

OLIVEIRA, J. C. V. **Caracterização e perfil etnológico de rebanhos caprinos nos Municípios de Ibimirim e Serra Talhada, Estado de Pernambuco**. 2004. 58

f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2004.

PATRIZIO, P. et al. Testicular origins of immunobead-reactin antigens in human sperm. **Fertility and Sterility**, v. 57, n. 1, p. 183-186, 1992.

PIRES, L. C. **Diversidade genética entre as populações caprinas com base em marcadores morfométricos**. 2009. 120 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2009.

REGHINI, M. F. S. et al. Utilização da N-A cetilcisteína na conservação do sêmen equino à 50 e 150 C. **Anais...** In: XI Conferência Anual da Associação Brasileira do Veterinários de Equídeos, v. 29, p. 326-327, 2010.

ROCHA, D. C. M.; DEBELJUK, L.; FRANÇA, L. R. Exposure to Constant light during testis development increase daily sperm production in adult Wistar rats. **Tissue Cell**, v. 31, p. 372-379, 1999.

ROLLAND, A. D. et al. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis analysis of spermatogenesis in the rat. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 683 –697, 2007.

RUSSELL, L. D. et al. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. **International Journal of Andrology**, v. 17, p. 93-106, 1994.

RUSSELL, L. D. **Mammalian Leydig cell structure**. In: Payne, A. H., Hardy, M. P., Russell, L. D. (eds). The Leydig cell . Cache River Press. Vienna, IL., cap. 10, p. 218-222, 1996.

SANTOS, F. C. B. et al. Adaptabilidade de caprinos exóticos e naturalizados ao clima semi-árido do nordeste brasileiro. **Ciência e Agrotecnologia** (Lavras), v. 29, n. 1, p. 142-149, 2005.

SARIÖZKAN, S. et al. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, p. 134-138, 2009.

SETCHELL, B. P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. (Ed.). **Reproduction in mamalian**, v. 1, p. 63-101, 1982.

SIDER, L. H.; ZAROS, L. G. A biologia avançada e o impacto da genômica na produção de caprinos e ovinos. **Embrapa caprinos e ovinos**, Documentos online, 2008.

SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal of Applied Physiology (Washington)**, v. 21, p. 1784, 1966.

SOUZA, C. E. A. et al. Binding patterns of seminal plasma proteins on bovine epididymal and ejaculated sperm membrane. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 535-543, 2011.

SOUZA, C. E. A. **Análise proteômica do plasma seminal e secreções do epidídimo em ruminantes: potenciais associações com o desenvolvimento sexual, parâmetros seminais e função espermática**. 2007. 161 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ce, 2007.

SPERRY, A. O. The dynamic cytoskeleton of the developing male germ cell. **Biology of the Cell**, v. 104, p. 297-305, 2012.

SULLIVAN, R. et al. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 35 p. 1 – 10, 2005.

TÖPFER-PETERSE, E. et al. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, v. 30, p. 217–224, 1998.

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

WIKIPÉDIA, espermatozoide Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Espermatozoide>> Acesso em: janeiro de 2014.

WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 19-50, 1996.

YANAGIMACHI, R. **Mammalian fertilization**. In: Knobil, E.; Neill, J. (Eds), The physiology of reproduction. New York: Raven Press, 1994. p.189-317.

CAPÍTULO 2
PERFIL PROTEÔMICO DO ESPERMATOZOIDE DA RAÇA SAANEN

Resumo

Estabelecer o perfil proteômico das células espermáticas da raça Saanen é um importante mecanismo para identificar o potencial reprodutivo dos animais. O objetivo desse capítulo é caracterizar o perfil proteômico da raça Saanen e indicar proteínas com potencial para serem biomarcadoras de fertilidade. Foram utilizados cinco reprodutores em idade reprodutiva de 18 a 21 meses e fertilidade comprovada. O sêmen foi colhido e submetido à avaliação dos parâmetros espermáticos, extração de proteínas, seguido pela técnica de eletroforese bidimensional. A análise foi feita em triplicata e foi obtido um total de 508 *spots* no gel de referência. As proteínas foram identificadas com base na comparação de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) no banco de dados UniProt utilizando a ferramenta *TagIdent* do ExPASy. Todas as proteínas foram classificadas conforme sua função, em proteínas de ligação, proteínas com atividade catalítica e proteínas de transporte. Observou-se 55 proteínas de maior expressão presente em todas as triplicatas dos 5 animais. Destas, foram selecionadas as candidatas a biomarcadoras de fertilidade. Ao final, foi possível estabelecer o perfil proteico da raça Saanen, identificar possíveis biomarcadores relacionados à fertilidade e conhecido importantes alvos de aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Caprino. Espermatozoides. Proteômica. Raça Saanen.

Abstract

In order to establish the proteomic profile of sperm cells Saanen of breed is an important mechanism to identify the reproductive potential of animals. The objective of this chapter is to characterize the proteomic profile of Saanen breed and indicate proteins with potential to be biomarkers of fertility. Five breeding of reproductive age (18-21 months) and proven fertility were used. Semen was collected and submitted for evaluation of sperm parameters, protein extraction, followed by two-dimensional electrophoresis technique. The analysis was done in triplicate and was obtained a total of 508 spots in the reference gel. Proteins were identified based on comparison of isoelectric point (pI) and molecular mass (MM) in database UniProt using the tool *TagIdent* of ExPASy. All proteins were classified according to their function, binding proteins, proteins with a catalytic activity, and transport proteins. Fifty five (55) proteins were observed with higher expression present in all triplicates of 5 animals. Of these, it was selected the candidates for biomarkers of fertility. At the end, it was possible to establish the protein profile of Saanen, identifying possible biomarkers related to fertility and it was appointed important targets for biotechnological applications.

Keywords: Goats. Spermatozoa. Proteomics. Saanen.

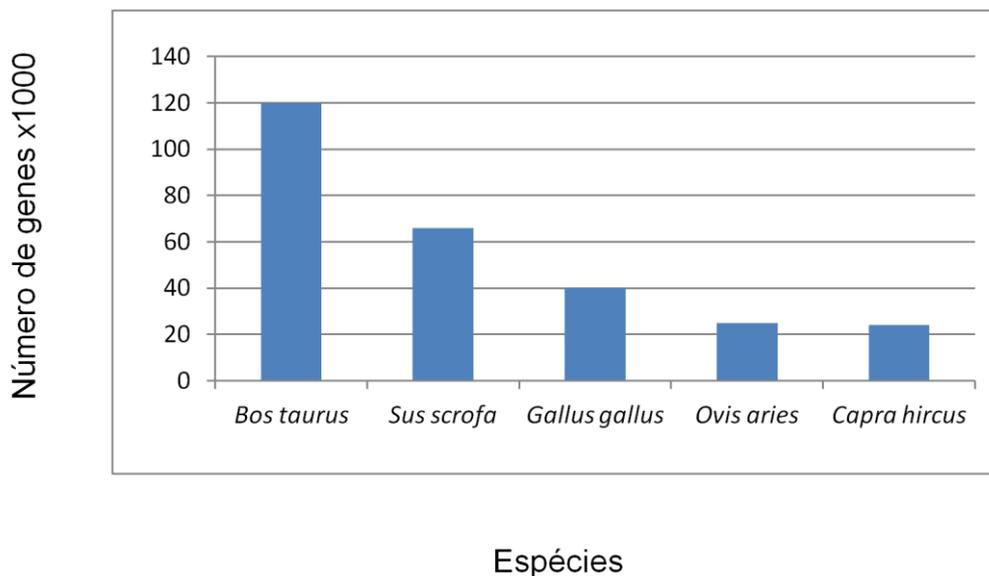
Introdução

Nas últimas duas décadas a proteômica tornou-se uma ferramenta de pesquisa fundamental devido a sua ampla atuação em diferentes categorias de estudos, dentre as quais, podemos citar: mapeamento genético das espécies de interesse econômico, investigação de marcadores em determinadas doenças, resposta da célula a diversos estímulos externos, comparar perfis proteômicos com diferentes objetivos de estudos, entre outros (ROCHA et al., 2005).

Um desafio da produção animal é entender as diferenças nos perfis proteômicos tanto dentro da mesma espécie como entre espécies diferentes, bem como, suas variações fenotípicas que possibilitem a compreensão sobre as patologias e respostas dos indivíduos a tratamentos, para melhorar o bem estar animal, a eficiência reprodutiva e assim aumentar a quantidade e qualidade dos seus produtos gerados (OLIVEIRA; MENEZES, 2011).

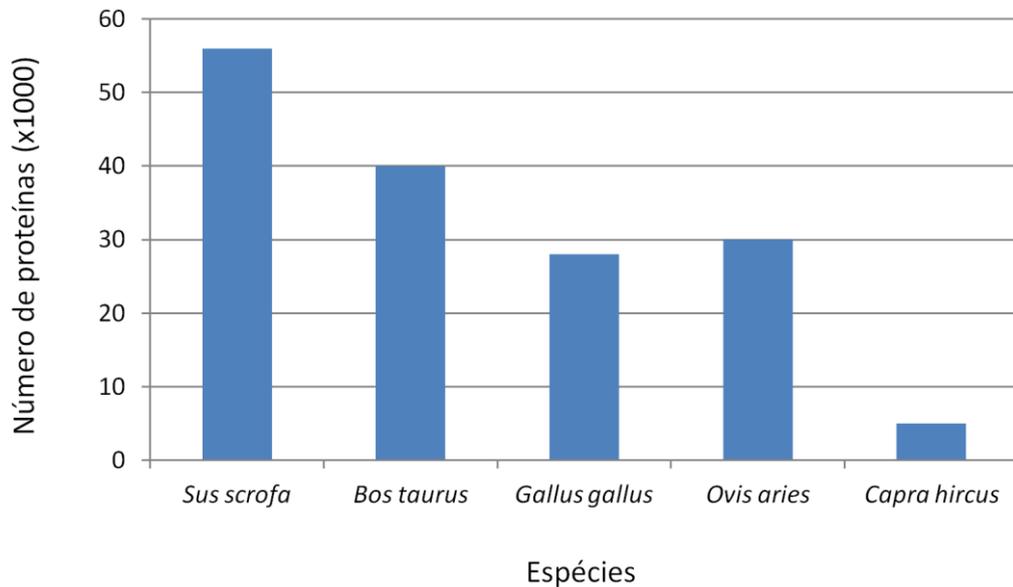
Dentre os animais de produção, a espécie caprina é a que possui menor porcentagem de informações moleculares em seus bancos de dados, tanto em nível de expressão de genes, como em nível de proteínas (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1: Representação gráfica da quantidade de genes identificados por espécie.



Fonte: (NCBI, 2014).

Gráfico 2: Representação comparativa da quantidade de proteínas identificadas por espécie domésticas.



Fonte: (UNIPROT, 2014).

Para o conhecimento da tolerância e capacidade de diversas raças exóticas para exploração, faz-se necessário estudo a níveis moleculares quanto à expressão do potencial produtivo quando são introduzidos em uma região diferente da sua de origem. Isso proporciona maior segurança no uso desses animais norteando um programa de cruzamento, que desenvolva genótipos mais adequados a uma condição ambiental específica (SANTOS et al., 2005).

As raças caprinas para produção de leite no Brasil são de origem européia. Estudos com machos Saanen analisando sua adaptabilidade ao clima da região Nordeste, têm apresentado sensível à elevação da temperatura, quando comparados com os nativos. A raça Saanen tem apresentado boa prolificidade e adaptação, mas precisa estar inserida em um sistema produtivo intensivo e devido sua alta produtividade apresenta-se mais susceptíveis a doença, porém marcam presença na maioria dos rebanhos leiteiros e sendo a mais utilizada em programas de melhoramento genético (COELHO, 2006).

Poucos estudos moleculares têm sido relatados para esta raça, tornando imprescindível maiores informações quanto ao seu aspecto reprodutivo, devido à grande importância econômica, especialmente nas explorações leiteiras, em que o fluxo das receitas inicia-se com

a capacidade de fertilização dos machos e a ocorrência dos partos nas fêmeas (LÔBO; SILVA, 2005).

O objetivo desse capítulo é caracterizar o perfil proteômico das células espermáticas da raça Saanen e indicar possíveis biomarcadores com potencial biotecnológico.

Materiais e Métodos

Animais experimentais e coleta do sêmen

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Saanen designados aleatoriamente em animais A,B,C,D, E e a partir daqui será usado essa denominação para os animais com suas idade de 18 a 21 meses, sadios e bem alimentados de acordo com a norma NRC (*National Research Council*) com capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) e com suplementação de 300 g de concentrado por dia, contendo 70% de milho, 27% de farelo de soja, 2% de calcário e água e sal mineral *ad libitum*. Todos os animais possuem fertilidade conhecida são submetidos a regime de criação intensivo na Embrapa Caprinos e Ovinos em Sobral, CE. Os animais foram denominados aleatoriamente de animais A, B, C, D, E, e a partir daqui será usada está denominação para os animais.

O sêmen foi colhido usando vagina artificial e uma fêmea ovariectomizada cujo cio foi induzido utilizando 1 mL de cipionato de estradiol. As coletas foram realizadas nos meses de março e abril de 2013 nos horários entre 08:00 h às 10:00 h, sendo realizada uma coleta por semana.

Avaliações espermáticas

Após a coleta, as amostras foram imediatamente mantidas em banho-maria a 37°C para avaliar os seguintes parâmetros espermáticos: quanto ao aspecto (Aquoso; Leitoso; Leitoso espesso; Cremoso; Cremoso espesso), volume do ejaculado (mL), motilidade progressiva individual (%), vigor (0-5) e concentração espermática ($\times 10^9$ /espermatozoides/mL) sendo avaliados em microscópio óptico e através de espectrofotômetro de acordo com recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Vale salientar que todas as avaliações espermáticas foram realizadas apenas pelo técnico e experiente laboratorista de modo a minimizar os erros de análises.

O sêmen foi centrifugado a 1.500 x g por 30 minutos à 4°C, com a finalidade de separar o plasma seminal dos espermatozoides, sendo estes armazenados a -80 °C até o uso para a extração de proteínas.

Extração de proteínas

Os espermatozoides foram descongelados a 37°C, lavados com tampão fosfato salino (PBS) a 0,15 M pH 7,4 e centrifugados a 4.000 x g em três ciclos de 10 minutos cada. Para

lisar as células, foi utilizado o detergente CHAPS (Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato) a 4 %, levado à mesa agitadora por 2 h e posteriormente, centrifugados a 10.000 x g por 20 minutos. Em seguida, observou-se duas fases, coletou-se o sobrenadante e adicionou a ele três volumes de acetona/TCA (ácido tricloroacético) à 10% gelado, por 16 horas à 20°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos. O precipitado foi lavado 3x com acetona 100% gelada, secado a temperatura ambiente e solubilizado em 50 µL de uréia/tioureia 9 M. As amostras selecionadas para extração foram referentes às coletas do mês de março. Após o processo de extração foi feito um *pool* das proteínas extraídas para cada animal, visando obter a quantidade necessária para quantificação das proteínas totais pelo o método de Bradford (1976), comprovar a integridade protéica por SDS-PAGE e o uso para eletroforese bidimensional.

Dosagem de proteínas totais

As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) que se baseia na ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue* G250 às proteínas, com formação de coloração azul. A presença de proteínas foi observada através de espectrofotômetro modelo Ultrospec 2100 (*GE Healthcare*), utilizando-se o comprimento de onda 595 nm. A quantificação foi feita em triplicata, usando a albumina sérica bovina (BSA) para criar uma curva padrão em concentrações conhecidas (0, 5, 10, 15, 20 µg/µL) de BSA.

Eletroforese Unidimensional (SDS-PAGE)

Para avaliar a integridade e a concentração das proteínas foi realizado uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). A partir do Bradford foi obtida leituras de absorbâncias das proteínas a 595 nm uma realizado para cada amostra em triplicata para se obter uma média no valor de suas concentrações e posteriormente aplicou-se 5 µg de proteínas por poço. O marcador de peso molecular utilizado foi o LMW (*Low Molecular Weight* - Marcador de baixo peso molecular) (*GE Healthcare*). O tempo de corrida foi estimado em uma hora e trinta minutos, nas seguintes condições: 150 V, 30 mA.

Após a corrida, o gel foi colocado na solução de fixação (Etanol 40%, Ácido acético 10%) por 15 minutos, posteriormente corado com *Comassie Brilliant Blue* R-350 por 24 horas e descorado com água quente.

Eletroforese Bidimensional

As proteínas do espermatozoide (250 µg) foram solubilizadas em tampão de reidratação (uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 65 mM, CHAPS 1% p/v, anfólitos 0,5% v/v e azul de Bromofenol 0,002%). A mistura foi reidratada em canetas do *IPGBox* (*GE Healthcare*) e incubadas em tiras de gradiente de pH imobilizado (*IPG Strip*) de 13 cm, com faixa de pH linear de 4-7 por 16 horas.

A focalização isoeétrica foi conduzida no equipamento *Ettan™ IPGPhor III™* (*GE-Healthcare*) nas seguintes condições: etapa 1 (500 V por 30 minutos); etapa 2 (4000 V por 2:30 horas) e etapa 3 (8000 V até atingir 18.000 V horas totais). Em seguida as tiras foram armazenadas em freezer a -80 °C para procedimentos posteriores.

Após a focalização as tiras foram equilibradas, sob agitação, em solução de equilíbrio (tris 50 mM, glicerol 30%, uréia 6M, SDS 2% e azul de bromofenol 0,002%) com ditioneitol 1% (DTT 1% p/v) por 15 minutos para a redução das proteínas e, em seguida, alquiladas com iodoacetamida 3% (IAA 3% p/v) também em solução de equilíbrio por 15 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas na segunda dimensão em géis de poliacrilamida à 12,5% na presença de SDS. A corrida foi realizada sob as seguintes condições: 15 mA/gel por 15 minutos e 25 mA/gel por 6-8 horas. Foi utilizado marcador de peso molecular entre 14 e 97 kDa sendo corrido em triplicata para cada animal.

Os géis foram fixados em mistura de etanol, ácido acético e água (4:1:5 v/v/v), durante 15 minutos e posteriormente corados com solução de Coomassie G 250 (*Blue Silver*) (CANDIANO, G. et al. 2004) durante vinte e quatro horas e armazenados em solução de ácido acético 5%.

Para digitalização dos géis, utilizou-se o equipamento *ImageScanner III* gerenciados pelo programa *LabScan 6.0* (ambos da *GEHealthcare*). As imagens obtidas foram analisadas no programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0* (*GE-Healthcare*).

Identificação das Proteínas

As proteínas presentes nos géis bidimensionais foram identificadas *in silico* com base nos dados de ponto isoeétrico e massa molecular comparados com o banco de dados de proteínas não redundantes do *Uniprot* através da ferramenta online *TagIdent* (web.expasy.org/tagident). Os parâmetros do *TagIdent* incluíram a restrição do organismo para “Mammalia” e margem de erro de 10%. Apenas a primeira proteína da lista (maior hit) foi considerada.

Os dados dos *spots* como ponto isoeletrico, massa molecular, volume do *spot* juntamente com as informações de identificação foram armazenados em uma planilha no *Microsoft Excel*.

Resultados e Discussões

Parâmetros espermáticos

No presente trabalho foram avaliados os parâmetros espermáticos, bem como, o perfil proteômico dos espermatozoides de caprinos das raças Saanen.

Tabela 1: Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos da raça Saanen avaliados estatisticamente pelo programa *Graphpad prism*® versão 4.0 One-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Considerando <0,05.

Parâmetros	Amostra				
	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E
Motilidade (%)	83,33±3,33 ^a	76,67±6,67 ^a	86,67±3,33 ^a	90,00±0,01 ^a	83,33±6,67 ^a
Vigor (1-5)	4,00±0,01 ^a	3,67±0,33 ^a	4,67±0,33 ^a	4,00±0,01 ^a	4,67±0,33 ^a
Concentraçãox x10⁹/mL	3,17±0,31 ^a	3,86±0,10 ^a	3,73±0,49 ^a	3,88±0,22 ^a	2,85±0,86 ^a
Volume (mL)	1,33±0,24 ^a	1,73±0,39 ^a	1,67±0,44 ^a	1,03±0,20 ^a	0,90±0,06 ^a

Fonte : Autor

A partir das coletas e avaliação de sêmen não se observou diferença significativa de acordo com os parâmetros mostrados na Tabela 1. Estes dados corroboram com Bezerra e colaboradores (2009), Rovay (2006), Matos (2012) e Eloy e Pereira (2013) os quais avaliaram os mesmo parâmetros com caprinos da raça Boer, Saanen, Moxotó e Anglo-Nubiano, respectivamente.

No entanto pesquisas têm revelado nos reprodutores bovinos avaliados pelos métodos tradicionais, características seminais semelhantes uma diferença de 20 a 25% no índice de Fertilidade Larson e Miller (2000). Provavelmente essas diferenças podem estar relacionadas com proteínas e outros compostos intercelulares.

Dosagem das proteínas e eletroforese unidimensional

Para avaliar a eficiência do método de extração das proteínas totais de espermatozoides da raça caprina Saanen, realizou-se uma quantificação de acordo com o método do Bradford e uma SDS-PAGE.

De acordo com as concentrações obtidas foi avaliado o menor e maior valor médio, observando uma variação de 14,25 µg/µL e 28,6 µg/µL, respectivamente (Tabela 2). Os referidos dados estão de acordo com Matos (2012), que, estudando espermatozoides de

caprinos Moxotó no mesmo período do ano de março e abril obteve valores médios de 17,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 27,9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

O método de extração de proteínas utilizado foi eficiente nos aspectos qualitativos e quantitativos, sendo observado, no SDS-PAGE, bandas protéicas íntegras e livres de contaminantes, como carboidratos e lipídeos conforme a Figura 1.

Tabela 2: Quantificação de proteínas totais de espermatozoides de caprinos da raça Saanen utilizando o método de Bradford.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Animal A	25,95
Animal B	18,85
Animal C	22,2
Animal D	28,6
Animal E	14,25

Fonte: Autor.

Eletroforese Unidimensional

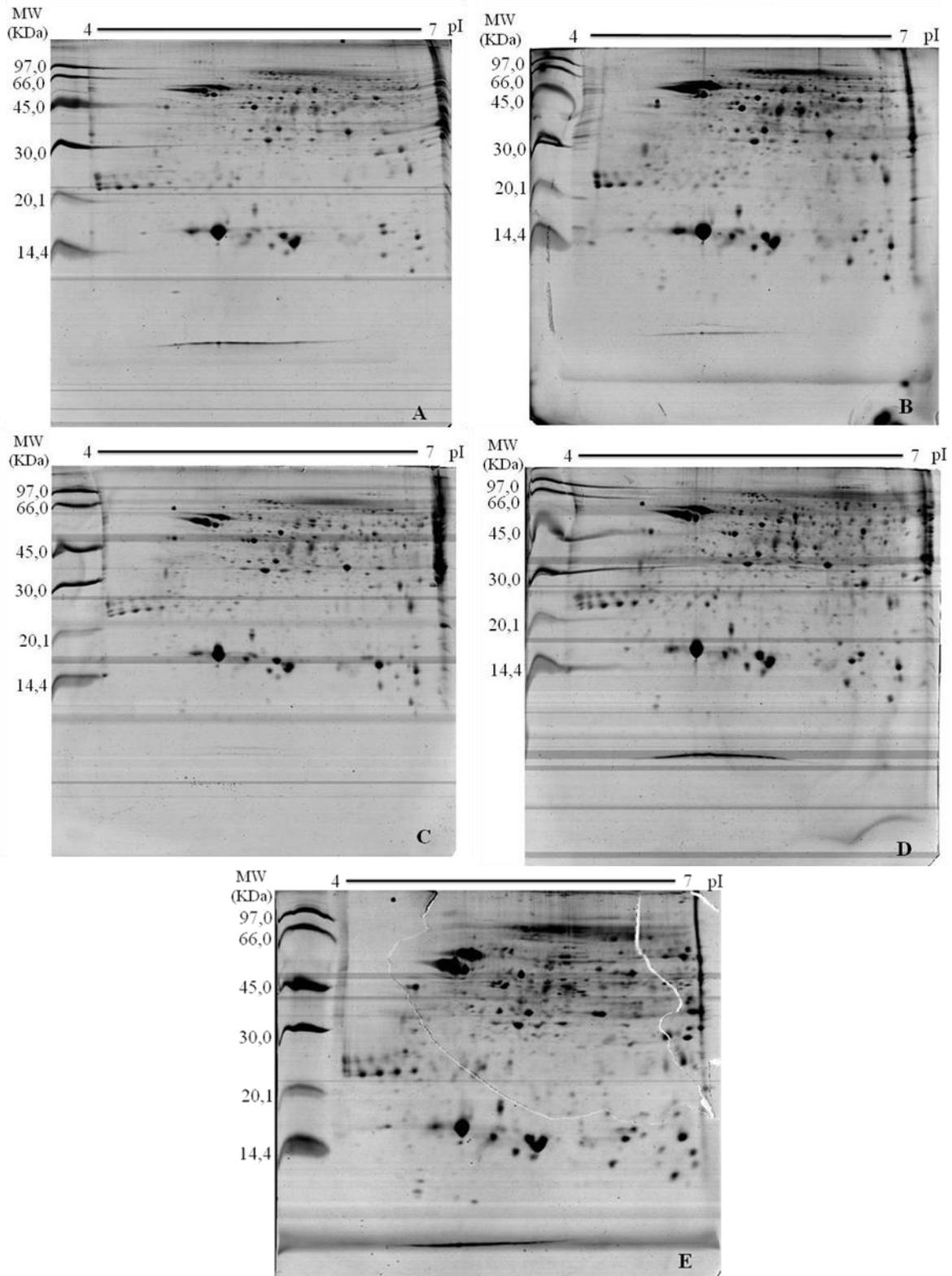
A realização da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5% de proteínas de espermatozoides utilizando 5 μL de amostra em cada poço teve como finalidade averiguar a integridade das proteínas extraídas e se as mesmas estavam livres de contaminantes para a eletroforese bidimensional.

Eletroforese Bidimensional

A eletroforese bidimensional mostrou um grande número de *spots* protéicos nítidos na triplicata da raça Saanen. Os géis de referência para cada animal podem ser visualizados na figura 2. Os dados obtidos relataram um número médio de *spots* variando de 319 (animal E) a 468 (animal D) e o número de *spots* correspondentes (*Matches*) variou de 273 (animal C) a 347 (animal D) (Tabela 3).

Recentemente, Matos (2012) detectou uma média de 330 *spots* de amostras protéicas de espermatozoides de caprinos da raça Moxotó através de eletroforese bidimensional (2DE), utilizando faixa de pH de 4 - 7. Estudos com bovinos da raça holandesa, analisando o espermatozoide com a técnica de 2DE, detectou uma média de 861 ± 45 no valor total de *spots* onde, 567 ± 143 pontos combinava com o gel de referência fazendo *matches* (D'AMOURS et al., 2010).

Figura 2: Géis bidimensionais das proteínas totais de espermatozoide de caprinos da raça Saanen.



Perfil protéico dos géis de referência de cada animal. Animal - A ; Animal - B; Animal 250; **D** - Animal 238; **E** - Animal 910. À esquerda encontram-se os valores de massa molecular (MW), os quais variam de 97,0 a 14,4 KDa e acima os valores de ponto isoelétrico (pI), que varia de 4 a 7. **Fonte:** Autor

Tabela 3: Número de *spots* e *spots* correspondentes (*matches*) presentes nos géis bidimensionais de cada animal.

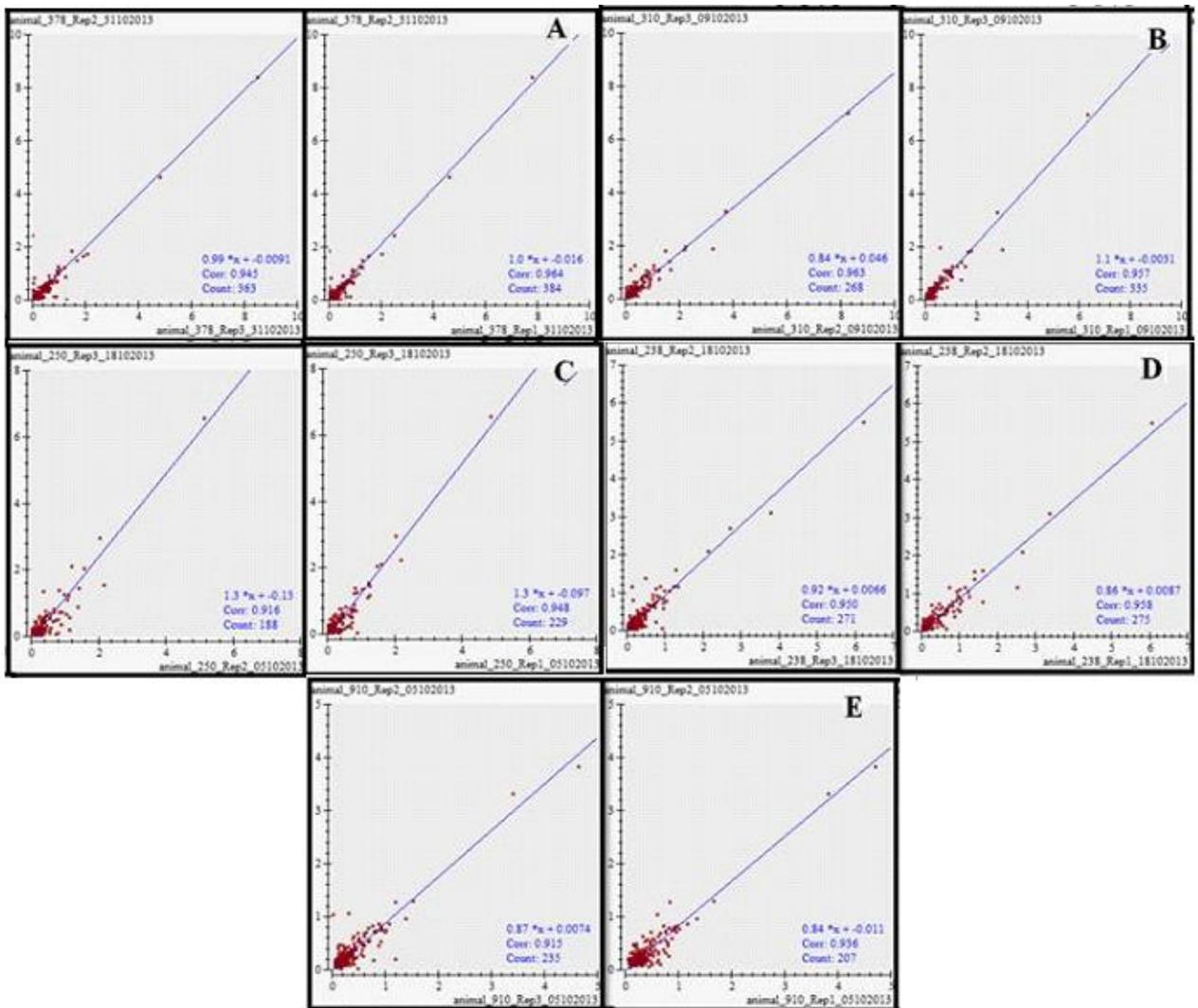
Animal	R1	R2	R3	Número médio de <i>spots</i>	<i>Spots</i> correspondentes (<i>Matches</i>)
Animal A	443	486	408	445	414
Animal B	390	317	370	359	351
Animal C	417	384	505	436	273
Animal D	449	504	453	468	347
Animal E	272	391	294	319	275

Os valores de *spots* das réplicas de cada animal estar representada por R1, R2 e R3 juntamente com o número médio de *spots* entre elas. A correlação entre as triplicatas mostrou 414, 351, 273, 347 e 275 *spots* correspondentes (*Matches*) para os animais A, B, C, D e E, respectivamente.

Fonte: Autor.

De acordo com os valores dos *matches* foi construído um gráfico de dispersão, a partir da porcentagem do volume do *spot*, para verificar a reprodutibilidade da técnica 2D (Gráfico 3). Conforme os valores dos gráficos foram reproduzidos, uma tabela com os valores de correlação obtidos em suas réplicas de cada animal (Tabela 4).

Gráfico 3 - Gráficos de dispersão das triplicatas dos géis 2D, contendo proteínas de espermatozoides de caprinos da raça Saanen.



O parâmetro considerado foi a porcentagem do volume (% Vol) dos *spots*. Animal-A; Animal-B; Animal-C; Animal-D; Animal-E. **Corr.** – Correlação linear entre as replicatas; **Count.** – Número de *spots* compartilhados (*matches*) entre as replicatas. Os gráficos foram obtidos pelo programa *ImageMaster Platinum* versão 6.0. **Fonte:** Autor.

Tabela 4: Coeficientes de correlação linear para as triplicatas por animal.

Animal	Correlação R1 e R2	Correlação R1 e R3
A	0,945	0,964
B	0,963	0,957
C	0,948	0,916
D	0,950	0,958
E	0,936	0,915

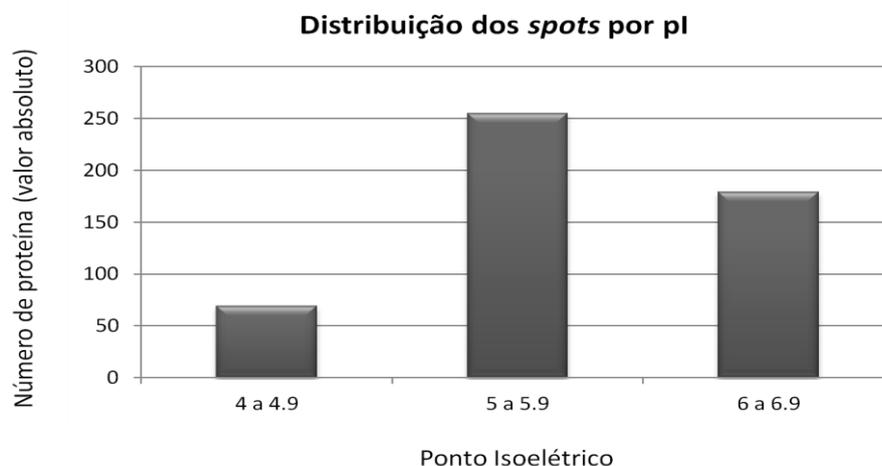
R1: gel de referência; Correlação com as repetição **R1** e **R2** e Repetições 2 e 3, respectivamente.

Fonte: Autor

De acordo com a correlação de Pearson, valores acima de 0,85 são aceitáveis para indicar boa reprodutibilidade entre duas variáveis (VIEIRA, 1980). Assim, observou-se boa reprodutibilidade em todos os géis de todos os animais em estudo. Estes dados corroboram com os obtidos por Matos (2012) em espermatozoide da raça Moxotó .

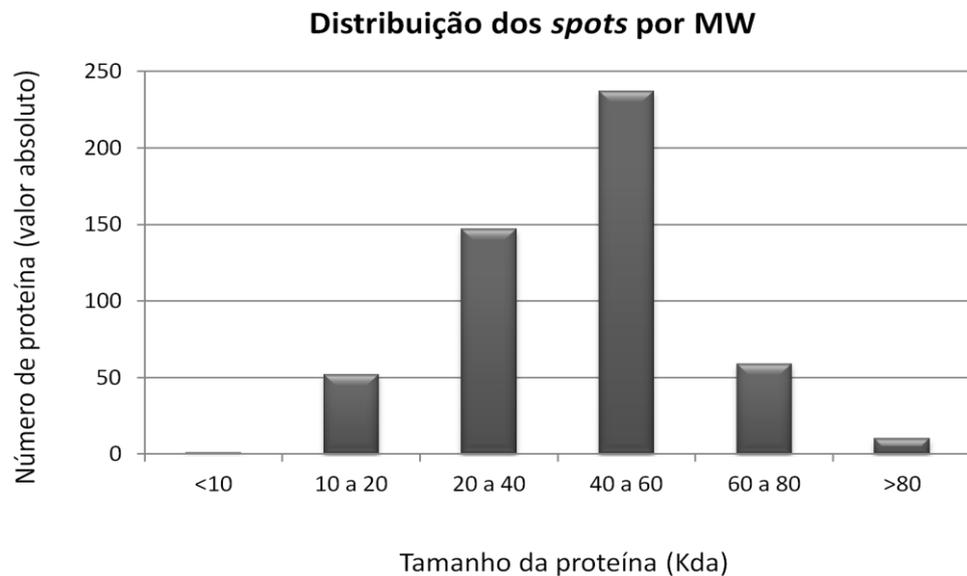
Foi observado maior abundância de proteínas na faixa de pH de 5 a 6.69, como mostra o Gráfico 4. Em relação à massa molecular a maior concentração de *spots* foi entre 20 a 80 kDa (Gráfico 5). As proteínas foram estudadas numa faixa de pH de 4 a 7 com 13 cm (unidades de pH/cm). Estudos demonstram que essa faixa é mais eficiente na detecção de maior número de *spots* quando comparadas com tiras menores como a de 7 cm e faixa de pH de 3 a 10.

Gráfico 4: Distribuição dos *spots*, por Ponto Isoelétrico (pI), de proteínas das células espermáticas da raça Saanen.



Fonte: Autor

Gráfico 5: Distribuição dos *spots*, por Massa Molecular (MW), de proteínas das células espermáticas da raça Saanen.



Fonte: Autor

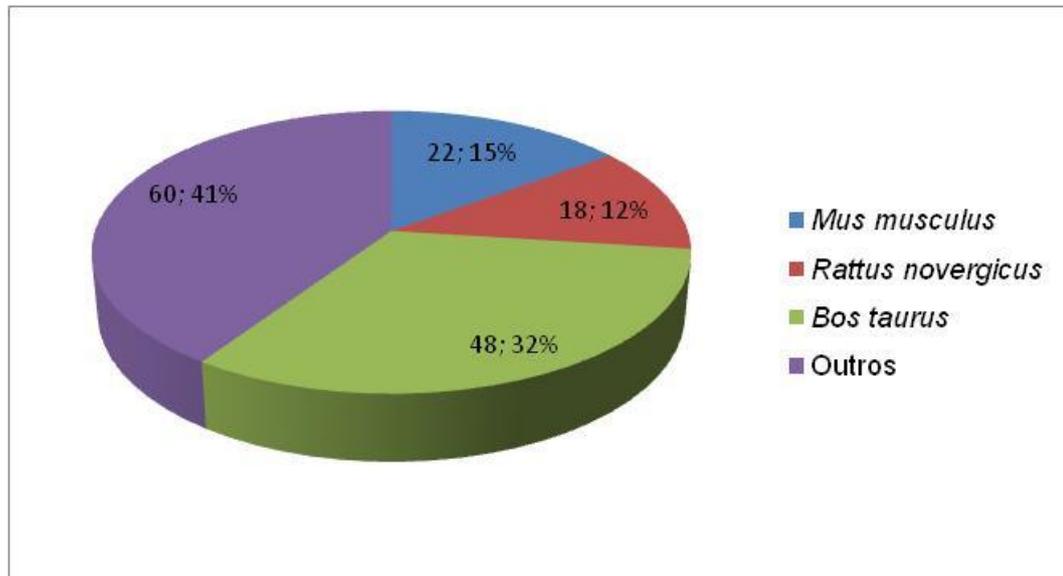
De acordo com Matos (2012), a maioria das proteínas de espermatozoides da raça Moxotó se concentram na faixa de pH entre 5 a 6 e com massa molecular entre 20 a 60 kDa. Resultados semelhantes foram obtidos em espermatozoides de cavalos, onde a maioria das proteínas se concentraram na faixa de pH entre 5 a 7 com massa molecular entre 20 a 80 kDa (DIAS, 2006). Esses resultados corroboram com os resultados obtidos para a raça Saanen.

Identificação de proteínas

Os *spots* protéicos foram identificados no banco de dados *Uniprot* através da comparação por pI e massa molecular, e foram comparados com proteínas de outras espécies (Gráfico 6) e classificadas quanto sua categoria funcional, componente celular e processos biológicos (Gráfico 7).

De acordo com as identificações de proteínas feitas com base nos valores de pI e massa molecular, a maioria das proteínas identificadas são homólogas àquelas presentes em *Bos taurus* (Gráfico 6).

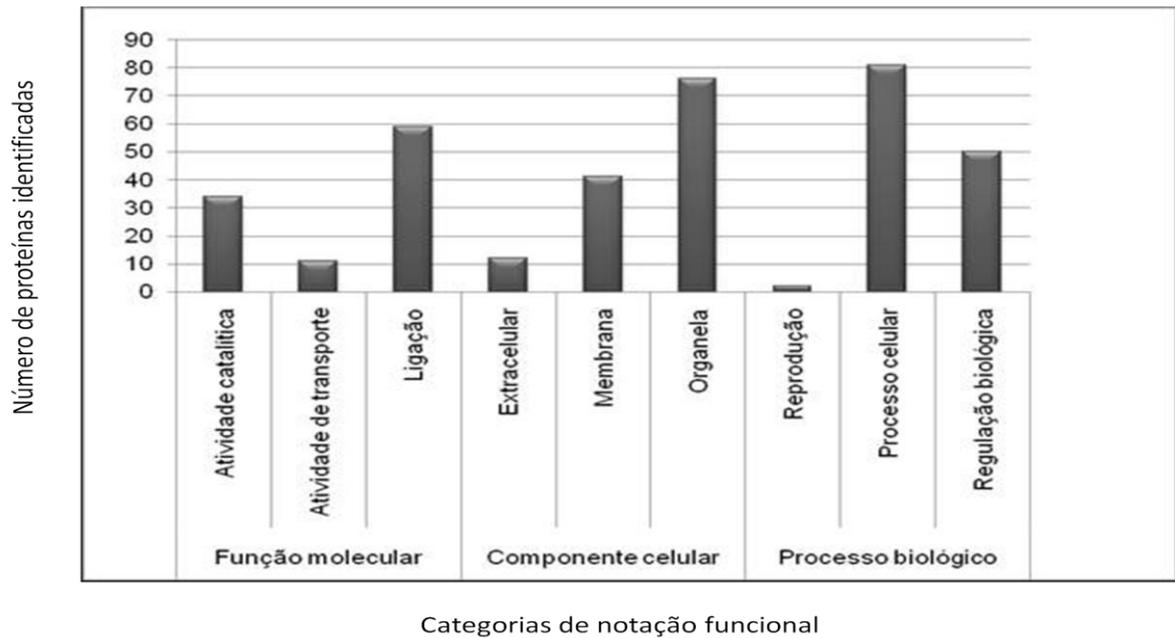
Gráfico 6: Distribuição das proteínas identificadas em géis bidimensionais de Saanen com base em proteínas homólogas de outros organismos.



Fonte: Autor

Estudos filogenéticos comparando a proteína 5 contendo motivo tripartite (TRIM5) em diferentes animais, mostrou uma maior similaridade entre caprinos e ovinos quando comparados com bovinos (JAUREGUI et al., 2012). Possivelmente, esse resultado pode ser justificado pela proximidade filogenética entre a espécie *Bos tauros* e *Capra hircus*, sendo que, a primeira espécie, possui maior quantidade de proteínas registradas em banco de dados e relatada na literatura, quando comparadas com ovinos. Sendo assim, o gráfico de identificação de proteínas, de acordo com o organismo, pode ser uma ferramenta indicativa de similaridade em estudos com proteínas homólogas de organismos filogeneticamente próximos.

Gráfico 7: Identificação de proteínas separadas por função molecular, componente celular e processo biológico por genes ontologos e classificação independente.



Fonte: Autor

Milardi e colaboradores (2012), estudando plasma seminal de humanos, obtiveram resultados semelhantes com dados protéicos de espermatozoide quanto a identificação de proteínas. Analisando a função molecular, através do banco de dados *Uniprot*, a maior proporção encontrada são as proteínas de ligação, correspondendo a 58%, seguida por proteínas catalíticas (20%). Quanto a categoria de processos biológicos, 40% das proteínas estão envolvidas no processo celular e 31% por proteínas envolvidas na regulação.

De acordo com os resultados obtidos, existe um grande número de proteínas identificadas na categoria funcional de ligação. Proteínas de ligação têm sido descritas na literatura em associação com a superfície espermática, indicando um papel potencial na fertilização, desempenhando funções específicas na fusão do espermatozoide com o oócito e exercendo funções direta nos últimos eventos de fertilização onde elas são expressas nos testículos e epidídimo (BARROS, 2011).

Numerosas tentativas têm sido realizadas no intuito de se estabelecer marcadores de fertilidade em machos com a utilização de anticorpos contra proteína de ligação, *in vitro*, nos espermatozoides e na zona pelúcida, sem afetar a motilidade, reação acrossômica ou a fusão das membranas dos gametas masculino e feminino (BOUE; SULLIVAN, 1996).

Entre as proteínas com atividades catalíticas destacam-se as quinases e fosfatases. Essas proteínas atuam como elementos de controle chave, agindo como reguladoras de sinais extracelulares e intracelulares. Além disso, também desempenham um papel importante na regulação da transdução de sinal específica por sua presença em uma série de módulos de sinalização macromoleculares. As fosfatases são encontradas em abundância em células dos testículos humano (FARDILHA, 2003).

Proteínas associadas a função de transporte têm sido descritas em estudos imunohistoquímicos, sendo localizadas na peça principal do flagelo de espermatozoides humanos, camundongos e ratos. A natureza conservada dessa enzima sugere que elas possuem a mesma função em outras espécies de mamíferos (WELCH et al., 2000).

Assim, no presente momento, não se questiona mais se a mitocôndria espermática produz novas proteínas, mas sim quais novas proteínas estão sendo produzidas e como essas novas proteínas são utilizadas pelas células. Portanto, embora a criação de listas proteômicas nos forneça um “inventário” de proteínas presentes dentro da célula espermática, funcionalmente ainda é difícil determinar quais destas proteínas são, por exemplo, modificadas durante o trânsito epididimário para permitir a ligação espermatozoide-ócito, ou iniciar a motilidade espermática (BAKER, 2011).

Proteínas mais expressas do perfil proteômico

Considerando os *spots* protéicos presentes em todas as repetições dos géis, foi selecionado um grupo contendo as proteínas mais expressas. As proteínas foram identificadas utilizando os seus respectivos valores de pI e massa (Tabela 5), dentre elas, foram selecionadas algumas proteínas de maior expressão para discutir sua função de acordo com as identificações do *Uniprot* e com a literatura.

Tabela 5: Proteínas mais expressas no perfil proteômico da raça Sannen, utilizando o banco de dados do *Uniprot*.

SpotID	pI	MW	Nº DE ACESSO	pI	MW	Nome da proteína
262	5.49	53379.0	A0A8J8	5.47	54959	Angiopoietin-2
415	5.64	39730.0	A5YM72-2	5.64	41774	Carnosine synthase 1
530	5.39	27663.0	A1E295	5.25	27649	Cathepsin B
805	5.74	20351.0	CAV1_PAPAN	5.64	20326	Caveolin-1
625	5.14	17099.0	CAV2_PAPAN	5.20	18265	Caveolin-2
465	5.92	34943.0	A1A4V9-2	5.91	33880	Coiled-coil domain-containing protein C16orf93
407	5.50	40494.0	A1YER5	5.44	39086	E3 ubiquitin-protein ligase RING1
303	5.45	49246.0	A0JN74	5.41	52948	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM11
220	5.12	55773.0	A0JND9	5.20	53240	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8
534	5.32	27007.0	A1A4M2	5.28	24766	ER membrane protein complex subunit 10
459	5.54	35525.0	A0M8R8	5.58	32818	F-actin-capping protein subunit alpha-2
535	5.82	26963.0	A1YIY0-2	5.89	27358	Fc receptor-like protein 6
650	5.64	16195.0	LEG16_HUMAN	5.53	16576	Galectin-16
573	6.79	24822.0	B0BMZ3	6.63	24343	GTPase IMAP family member GIMD1
671	6.84	14986.0	HBB_SCICA	6.77	15914	Hemoglobin subunit beta
292	4.71	50318.0	A5A6P3	4.80	45918	Keratin, type I cuticular Ha3-I
366	5.27	45397.0	A0JND2	5.23	47438	Keratin, type II cytoskeletal 80
656	6.53	15766.0	LY6H_BOVIN	6.48	14813	Lymphocyte antigen 6H
638	4.94	17050.0	MED22_RAT	4.92	16436	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 22
540	4.83	26807.0	A1E960	4.84	28322	Odontogenic ameloblast-

						associated protein
639	5.41	17124.0	OOEP_BOVIN	5.39	15868	Oocyte-expressed protein homolog
491	5.21	31245.0	A0PG75	5.12	30027	Phospholipid scramblase family member 5
681	6.53	13490.0	PIP_HYLAG	6.51	13488	Prolactin-inducible protein homolog
640	4.60	17001.0	F71E1_MOUSE	4.55	16860	Protein FAM71E1
807	5.54	17224.0	FA72A_RAT	5.49	16756	Protein FAM72A
975	4.31	25742	HUMMR_BOVIN	4.29	24888	Protein MGARP
293	4.77	50158.0	A6NHM9	4.61	54511	Putative DBH-like monooxygenase protein 2
560	4.40	26324.0	A6NL28-2	4.48	24801	Putative tropomyosin alpha-3 chain-like protein
653	5.91	16148.0	RMI2_BOVIN	5.96	16817	RecQ-mediated genome instability protein 2
580	5.08	24073.0	A0JNG4-2	5.56	22919	RING finger protein 207
355	6.16	46090.0	A1A5R1	6.02	45551	RNA binding protein fox-1 homolog 2
204	5.95	57812.0	A0AV96-2	5.94	56920	RNA-binding protein 47
787	5.68	28242.0	PRS38_HUMAN	5.67	29473	Serine protease 38
438	6.25	36766.0	A0JNK3	6.11	35118	Serine protease HTRA2, mitochondrial
935	5.69	35032.0	SRR_BOVIN	5.72	36181	Serine racemase
421	5.40	39730.0	A0AV02-4	5.31	41059	Solute carrier family 12 member 8
791	4.83	23717.0	TLDC2_MOUSE	4.73	21987	TLD domain-containing protein 2
607	5.43	20317.0	TIFA_BOVIN	5.33	21580	TRAF-interacting protein with FHA domain-containing protein A
641	5.46	16805.0	TMM72_HUMAN	5.36	16870	Transmembrane protein 72
642	6.71	16695.0	TMM80_BOVIN	6.70	15339	Transmembrane protein 80

802	4.71	17938.0	TRM1L_MOUSE	4.73	16214	TRMT1-like protein
628	6.84	17925.0	TYW5_HUMAN	6.84	17526	tRNA wybutosine-synthesizing protein 5
435	5.05	38782.0	A0JNC0	5.05	40459	Tropomodulin-1
649	5.38	16467.0	UBE2C_HUMAN	5.53	15765	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C
417	5.12	40546.0	A0AVT1-3	5.11	43216	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6

Fonte: *Uniprot* 2014 e Autor

Entre as proteínas de ligação com maior expressão está a Caveolina 2, que é uma receptora de ligação que segundo, o banco de dados do *Uniprot*, sua localização atribuída a uma proteína de membrana caveolar com função reguladora acessória em conjunto com CAV 1 na segmentação de bolsas lipídicas e na articulação caveolar. Essa proteína tem sido estudada para fins reprodutivos associadas com a sinalização e enriquecimento de propriedades biofísicas da membrana espermática durante o processo da perda do colesterol, preparando o espermatozoides para a reação acrossômica.

Miranda e colaboradores (2009), utilizando espermatozoides de ratos, avaliaram a localização da CAV-2 antes e após a reação acrossômica, e durante o processo de capacitação espermática. Os estudos demonstraram a especificidade na superfície do acrossoma, utilizando anticorpo específico para a CAV-2 e imunofluorescência, conseguindo, assim, comprovar que a CAV-2 emitiu fluorescência até a participação na reação acrossômica, o que não foi detectado sua emissão durante o processo de capacitação espermática, sugerindo seu potencial como biomarcador para a reação acrossômica.

A proteína Homeobox Nkx-6.3 participa do processo celular de ligação à região reguladora da transcrição na sequência específica do DNA. Especificamente, é um fator de transcrição, que pode estar envolvido na modelação do sistema nervoso central e do pâncreas.

Os membros da família de proteínas Nkx foram estudados por Alanentalo et al. (2006), que observaram, por clonagem e expressão, o desenvolvimento do Nkx6.3 como um novo membro da subfamília Nkx6, observando que seu desenvolvimento ocorre no sistema nervoso central (SNC) e no trato gastrointestinal.

A família das galectinas compreende um grupo de lectinas cujos domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs) possuem afinidade específica para β -galactosídeos.

Estas se encontram amplamente distribuídas em células normais e neoplásicas de diferentes organismos e estão envolvidas em uma grande diversidade de eventos celulares, tais como o risco de infarto do miocárdio, processos inflamatórios, adesão celular, progressão tumoral (TOSCANO et al., 2006).

As galectinas têm sido foco de estudos recentes, principalmente pelo seu envolvimento em processos inflamatórios e neoplásicos, entretanto, ainda existem muitas perguntas sobre suas interações com diferentes carboidratos, a especificidade destas interações e o papel específico das galectinas em inflamação (NORLING; PERRETTI; COOPER, 2009).

Um dos antígenos leucocitários humanos não-clássica (HLA) da classe de proteínas HLA-G, exerce função imunorregulatória de atividade importante, especialmente durante a gravidez na fêmea, porém sua presença no fluido seminal de macho pode ter influência sobre o risco de desenvolvimento da pré - eclampsia.

Larsen e colaboradores (2011), através da técnica de *Western Blot* com anticorpo HLA-G (sHLA -G) e imunostiquímica em plasma seminal, epidídimo e próstata de humanos, investigou sua localização específica durante sua expressão, confirmando que os níveis de expressão são variados em plasma seminal e epidídimo, porém não houve evidência nos tecidos da próstata.

A prolactina é um hormônio que desempenha um importante papel na produção de leite e atua na manutenção das glândulas mamárias em fêmeas. Em macho, sua função ainda não é esclarecida, mas associada a diminuição da libido, infertilidade e baixa produção de espermatozoides.

Comparando o perfil proteômico do esperma humano, foi encontrado prolactina no plasma seminal, podendo este, atuar como um possível biomarcador de infertilidade, ou deficiência no mecanismo de transporte dos espermatozoides, quando associada a animais inférteis. É importante compreender as proteínas envolvidas em estresse oxidativo e inflamação porque isso vai ajudar a identificar de eventuais medicamentos e terapias antioxidantes que poderiam ajudar a tratar os homens inférteis que consequência do estresse oxidativo (SHARMA et al., 2013)

A proteína que pertence à segunda categoria, de média expressão, com atividade catalítica é uma Serina Protease. Esta classe de proteínas desempenha papel fundamental em muitos processos biológicos, regulando as proteínas de superfície que são pontos-chave em vias de sinalização. Vários estudos têm relatado a presença de membros desta família nos espermatozoides de diferentes espécies (CESARI et al., 2010).

A proteína que pertence à terceira categoria, com menor expressão, com atividade de transporte é a proteína bicaudal 2. Ela é identificada em diversos vertebrados e a sua expressão está restringida ao desenvolvimento do cérebro, olho, dorsal, gânglios da raiz e do rim. Estudos recentes têm demonstrado ação dessas proteínas relacionada com a ovogênese e embriogênese (NOORDSTRA, 2012).

Muitos mediadores de resistência intrínseca em células tem sido estudados, afim de inibir o potencial de replicação dos retrovírus, proteínas da família TRIM. Os domínios 5 e 3 têm sido bastante elucidados em estudos para o HIV, um potente retrovirus precursor da AIDS. Entretanto, há poucos relatos de estudos dessa família de proteínas para inibir a ação de retrovírus para doenças específicas em caprinos, como no caso da CAEV.

Jauregui et,al (2012) estudaram propriedades restritivas do motivo tripartite 5-alfa (TRIM5 α), buscando identificar sequências semelhantes em ovinos e caprinos. Este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar em ovinos e caprinos com a possível função restritiva da proteína para as infecções dos lentivirus para maedi visna e caev. Com técnicas de clonagem, foi inserido os genes restritivo da TRIM5 α em ovinos e caprinos, extraído o RNA, cDNA e sequenciado para a construção de uma árvore filogenética com as sequências de nucleotídeos TRIM 5 α de espécies diferentes e verificar a homologação do gene. Os resultados mostraram que todas as sequências TRIM5 ovinas e caprinas descritos são ortólogos, sendo possível apenas a comprovação das células transduzidas com ovinos TRIM5 α através da PCR que efetivamente inibiu a síntese de DNA viral, sugerindo um mecanismo conservado de restrição para cada especie. A identificação de TRIM5 α espécies moleculares ativos pode abrir novas estratégias profiláticas contra as infecções dos retrovírus. Porém não há estudos com a proteína TRIM da família 11 experimentalmente para pequenos ruminantes, apenas tendo sido relatado sua ação anti- retroviral para humanos e ratos.

Conclusão

Pode-se concluir que foi estabelecido o mapa proteômico da raça Saanen conhecendo possíveis candidatas a biomarcadores de fertilidade envolvida na reação acrossômica, citamos a CAV-2. E também proteínas ligadas as características imunofisiologica citamos a proteína TRIM11 com potencial de ação retroviral e com possibilidades biotecnológicas.

Referências Bibliográficas

- ALANENTALO, T. et al. Cloning and analysis of *Nkx6.3* during CNS and gastrointestinal development. **Gene Expression Patterns**, v. 6, p. 162–170, 2006.
- BAKER M. A. The omics revolution and our understanding of sperm cell biology. *Asian Journal of Andrology*, v. 13, p. 6 -10, 2011.
- BAKER, M. A. et al. Analysis of proteomic changes associated with sperm capacitation through the combined use of IPG-strip pre-fractionation followed by RP chromatography LC-MS/MS analysis. **Proteomics**, v. 11, n. 3, p. 482-495, 2010.
- BARROS, L. de O. **Efeito da adição dos antioxidantes glutathiona peroxidase e cisteína ao diluidor de congelação do sêmen equino**. 2011. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2011.
- BEZERRA, F. Q. G. et al. Avaliação dos parâmetros seminais e espermáticos de caprinos jovens da raça Boer nascidos nas estações chuvosa e seca. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1256-1262, 2009.
- BOUE, F.; SULLIVAN, R. Cases of human infertility are associated with the absence of P34H na epididymal sperm antigen. *Biol. Reprod.* 54, 1018-1024, 1996.
- BRADFORD, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CANDIANO, G. et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-33, 2004.
- CBRA. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2 Ed. – Belo Horizonte: CBRA, 49p. 1998.
- CESARI, A. et al. Regulated serine proteinase lytic system on mammalian sperm surface: There must be a role. **Theriogenology**, v. 74, p. 699–711, 2010.

COELHO, L. A. et al. Características do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmara bioclimática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.544-549, 2006.

D'AMOURS, O. et al. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. **Reproduction**. v. 139, n. 3, p. 545-556, 2010.

DIAS, G. M. **Identificação e caracterização parcial de proteínas de espermatozoides epididimários de *Equus caballus***. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro. 2006.

ELOY, A. M. X.; PEREIRA, E. P. Estresse na reprodução de caprinos machos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 156-163, 2013.

FARDILHA, M. S. da C. **Caracterização do Interactoma da PP1 do Testículo Humano**. 2003. 247 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Aveiro, Portugal. 2003.

JAUREGUI, P. et al. Ovine TRIM5 α Can Restrict Visna/Maedi Virus. **Journal of Virology**, v. 86, n. 17, p. 9504–9509, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARSON, J.L MILLER. D.J Can relative spermatozoa galactosyltransferase activity be predictive of dairy bull fertility? **Journal of dairy Science Chemical**. V.83, p.2473-2479,2000.

LARSEN, M. H. et al. Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma. **Molecular Human Reproduction**, v.17, n.12, p. 727–738, 2011.

LÔBO, R. N.; SILVA, F. L. R. Parâmetros genéticos para Características de interesse econômico em cabras das raças Saanen e Anglo-nubiana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 1, p. 104 - 110, 2008.

MATOS, M. N. C. **Efeito da sazonalidade no perfil de proteínas de espermatozoides em caprinos da raça Moxotó**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Ceará. 2012.

MILARDI, D. et al. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 1, p. 67 - 74, 2012.

MIRANDA, P. V. et al. Localization of Low-Density Detergent-Resistant Membrane Proteins in Intact and Acrosome-Reacted Mouse Sperm. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 897–904, 2009.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: Janeiro de 2012.

NOORDSTRA, I. **The Role of Bicaudal D in motor protein mediated transport**. Cancer genomics & developmental biology, Utrecht University, 2012, 27 p.

NORLING, L. V. PERRETTI, M. COOPER, D. Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response. **Journal of Endocrinology**, v. 201, p. 169–184, 2009.

OLIVEIRA, R. V.; MENEZES, E. B. S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 139-144, 2011.

ROCHA, T. L. et al. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Comunicado Técnico 136, Brasília–DF 12p., 2005.

ROVAY, H. **Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempo de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos**. 2006. 73 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2006.

SANTOS, F. C. B. et al. Adaptabilidade de Caprinos exóticos e naturalizados ao clima semi-árido do nordeste brasileiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 142-149, 2005.

SHARMA, R. et al. Proteomic analysis of seminal fluid from men exhibiting oxidative stress. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 11, p. 1 - 15, 2013.

TOSCANO, M. A. et al. Galectin-1 Suppresses Autoimmune Retinal Disease by Promoting Concomitant Th2- and T Regulatory-Mediated Anti-Inflammatory Responses. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 6323-6332, 2006.

UNIPROT. **Universal Protein Resource**. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/>>. Acesso em: Janeiro de 2012.

VIEIRA, S. **Introdução a bioestatística**. Ed. Campus, 3º edição, 1980.

CAPÍTULO 3
ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA ENTRE AS RAÇAS
SAANEN E MOXOTÓ

Resumo

Buscando analisar quantitativamente os valores dos parâmetros espermáticos, bem como as proteínas expressas nos espermatozóides de caprinos (*Capra hircus*) das raças Saanen e Moxotó, foram identificadas as proteínas exclusivas e suas diferenças quanto aos níveis de expressão entre elas. A avaliação comparativa dos parâmetros espermáticos entre os reprodutores, não se obteve diferença significativa entre as raças. A análise proteômica dos géis bidimensionais detectou maior quantidade de proteínas para raça a Moxotó (806 *spots*), em comparação com a raça Saanen (505 *spots*). A quantidade de *spots* correspondentes (*matches*) entre elas foi 213. O parâmetro comparativo foi realizado pelo programa *Image Master 6.0*, utilizando como gel de referência a raça Saanen. Foram observadas diferenças quantitativas na detecção de proteínas para cada raça, bem como na identificação de proteínas com potencial para serem biomarcadores exclusivos de fertilidade tanto para a Saanen como para Moxotó.

Palavras-chave: Caprinos. Análise quantitativa. Proteômica.

Abstract

Seeking to analyze quantitatively the values of sperm parameters as well as the proteins expressed in spermatozoa of caprin (*Capra hircus*) of Saanen and Moxotó, was identified the exclusives proteins and their differences in expression levels between them. Assess the reproductive potential of their breeding, from comparing sperm parameters, there was no significant difference between the breeds. The proteomic analysis of two-dimensional gels revealed a higher quantity of proteins to Moxotó breed (807 spots) in comparison with the Saanen (508 spots). The quantity of corresponding spots (matches) between them was 213. The comparative parameter was performed by *Master Image* 6.0 software, using as reference gel breed Saanen. Quantitative differences were observed in the detection of proteins for each breed, as well as the identification of proteins with the potential to be exclusive biomarkers of fertility both Saanen and for Moxotó.

Keywords: Goats. Quantitative analysis. Proteomics.

Introdução

Diversas análises comparativas da proteômica foram possíveis devido à integração e automatização de uma variedade de técnicas que permitem separar, identificar, quantificar e caracterizar proteínas, bem como relacionar essa informação com as obtidas por outras abordagens, através da Bioinformática. Utilizando essa abordagem, a biologia comparativa se tornou possível até mesmo em alguns animais de produção, onde o genoma completo não está totalmente sequenciado (SANTOS; TEIXEIRA; SÁ-CORREIA, 2004).

A técnica de eletroforese bidimensional (2D) seguida de identificação por espectrometria de massas (MS), são técnicas amplamente utilizadas para comparar proteomas com a finalidade de identificar proteínas diferencialmente expressas (BRANDÃO; BARBOSA; ARRUDA, 2010).

Algumas limitações também são atribuídas à técnica de eletroforese bidimensional, como a perda de proteínas hidrofóbicas, baixa resolução de polipeptídeos grandes ou pequenos demais, dificuldades para obter reprodutibilidade e coloração dos géis. Com relação a pouca reprodutibilidade, para a comparação de dados obtidos em diferentes laboratórios, se faz necessário a padronização para as técnicas de extração da amostra e para os procedimentos da eletroforese (RICROCH et al., 2011). Neste trabalho foi possível uma comparação devido a padronização dos animais, técnicas laboratoriais e software especializados.

Estes *softwares* permitem a identificação das proteínas, mas também de uma caracterização adicional que varia do cálculo das propriedades físico-químicas básicas até a predição de potenciais modificações pós-traducionais e de estruturas tridimensionais (3D). A proteína encontrada e as bases de dados dos géis bidimensionais são o núcleo da bioinformática na pesquisa de proteomas. *SWISS-PROT* é um exemplo típico de uma base de dados (BAIROCH; APWEILER, 1998).

Os experimentos desenvolvidos no laboratório necessitam ser complementados pelas análises virtuais feitas com o auxílio de um computador além de softwares para analisar a separação eletroforéticas. Algumas destas estão disponíveis através da Internet ao usuário: ExPASy (www.expasy.ch/www/tools.html) (HOCHSTRASSER, 1998).

Nesse contexto, a proteômica comparativa identifica as diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, sendo a técnica de eletroforese bidimensional (2-D) geralmente o método escolhido, gerando dados em formato que possibilita uma boa avaliação visual e fornece comparações quantitativas (RABILLOUD, 2002).

No presente estudo, a técnica de eletroforese bidimensional foi utilizada para comparar os perfis protéicos de espermatozoide da raça Saanen e Moxotó, bem como suas diferenças quanto a intensidade nos seus níveis de expressão. O objetivo dessa abordagem é estabelecer proteínas exclusivas que são expressas em Saanen e Moxotó, bem como as diferenças na expressão de intensidade das proteínas em comum.

Matérias e Métodos

Os animais da raça Saanen e Moxotó são reprodutores da Embrapa Caprinos (Sobral-CE) foram utilizados 5 animais que eram submetidos às mesmas condições de tratamento.

A avaliação dos parâmetros espermáticos dos grupos foi realizada seguindo mesma metodologia descrita para os animais Saanen do capítulo 1.

Os géis bidimensionais de espermatozoides da raça Moxotó, foram previamente descritos por MATOS, 2012, e estavam disponíveis no laboratório para comparação com aqueles obtidos da raça Saanen, descritos no Capítulo 2. A comparação foi possível, pois tanto as condições de tratamento dos caprinos quanto à metodologia utilizada para a extração das proteínas e os géis bidimensionais foram os mesmos.

Os géis bidimensionais foram digitalizados pelo *ImageScanner III (GE Healthcare)* e analisados pelo software *ImageMaster 6.0 Platinum (GE Healthcare)*. A detecção de proteínas (*spots*) foi feita no modo automático, seguido de ajustes manuais. A seleção do gel de referência foi feita levando-se em consideração o gel com o maior número de *spots* tanto nas repetições como nos grupos de animais.

A comparação entre os géis bidimensionais das raças Saanen e Moxotó foi feita através da análise inter-classe do programa *ImageMaster*. Os histogramas foram feitos utilizando a porcentagem do volume como parâmetro de comparação dos *spots*.

Para uma melhor visualização dos resultados, os histogramas foram classificados em duas categorias: as proteínas que diferiram entre as raças e aquelas que não diferem. Entre as proteínas que diferem entre as raças, subdividimos em duas subcategorias: as que diferem por presença/ausência de *spots* e aquelas que diferem pelo nível de expressão (aumento do volume do *spot*).

Resultados e Discussão

Parâmetros espermáticos

De acordo com os resultados analisados não se obteve diferença significativa entre os parâmetros espermáticos de cada raça estudada (Tabela 1).

Tabela 1: Análise comparativa dos parâmetros espermáticos da raça Saanen e Moxotó.

Raça	Saanen	Moxotó
Parâmetros		
Motilidade(%)	84±8,28 ^a	85,8±8,81 ^a
Vigor (1-5)	4,2±0,56 ^a	4,2±0,66 ^a
Concentração 10x10 ⁹ mL	3,49±0,81 ^a	3,42±1,2 ^a
Volume (mL)	1,33±0,52 ^a	0,65±0,29 ^a

Valores médios, desvios padrões e análise estatística foram feitos utilizando o programa *Graphpad prism*® versão 4.0 com Teste *t*-Student. Considerando P<0,05.

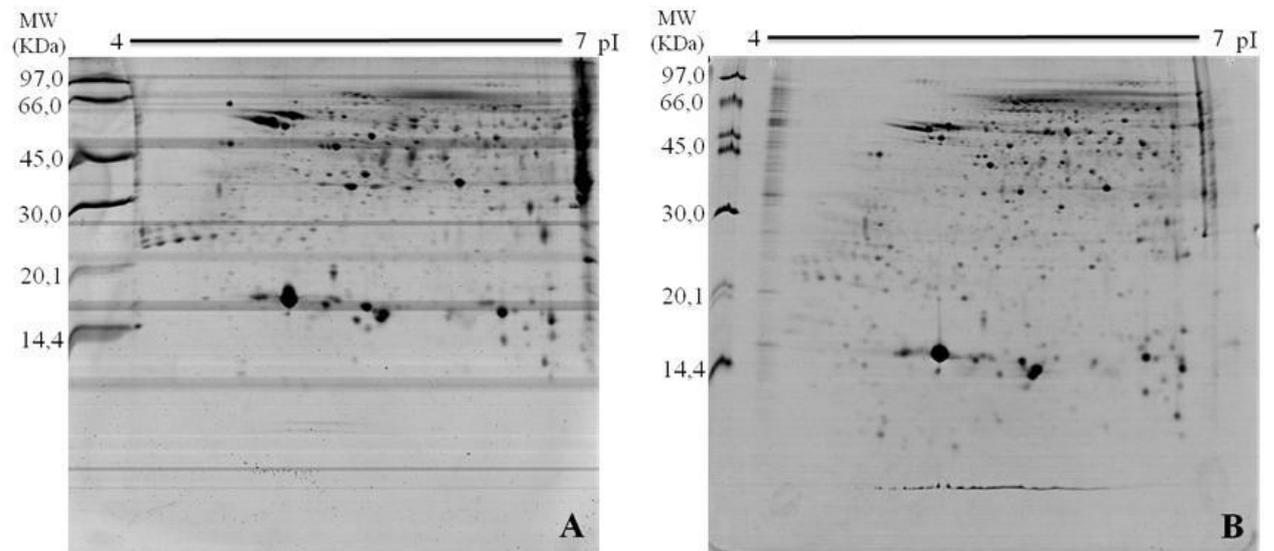
Fonte: Autor. e Matos 2012..

Corroborando com os resultados obtidos, Coelho e colaboradores (2006) avaliaram os parâmetros espermáticos entre as raças Saanen e Pardo alpina sob a mesma condição ambiental e nutricional. A avaliação estatística foi feita de acordo com o teste Duncan e não houve diferenças entre as raças (P<0,05). Observando o volume do ejaculado, onde os machos Saanen (0,6±0,3/mL) produziram maior volume do ejaculado quando comparados com os da raça Pardo-Alpina (0,5±0,3/mL).

Comparação dos géis bidimensional entre as raças Saanen e Moxotó

Durante a análise comparativa entre os perfis protéicos, foi escolhido um gel de referência para cada raça, utilizando como parâmetro para a escolha a quantidade de *spots*. Foram detectados 505 e 806 *spots* nos géis de referência das raças Saanen e Moxotó, respectivamente (Figura 1). Comparando as raças foi obtido um total de 213 *spots* correspondentes (*matches*).

Figura 1: Géis bidimensionais das proteínas totais de espermatozoide das raças Saanen e Moxotó.



(A) Perfil bidimensional da raça Saanen; (B) Perfil bidimensional da raça Moxotó. À esquerda encontram-se os valores de massa molecular (MW), os quais variam de 97,0 a 14,4 KDa e acima os valores de ponto isoelétrico (pI), que varia de 4 a 7.

Fonte: Autor. e Matos 2012..

Avaliando bovinos de raças diferentes (chianina) e (holstein) por eletroforese bidimensional Miarelli e Signorelli (2009) detectaram uma média total das duas raças de 649 *spots*.

Investigando as diferenças associadas à fertilidade dos bovinos da raça Kedah Kelantan (*Bos indicus*) ser maior do que da raça européia Mafriwal (*Bos taurus*) em áreas de climas tropicais, utilizou a proteômica para identificar proteínas relacionadas à maior termotolerância e fertilidade. As proteínas de espermatozoide de ambas as raças foram extraídas e analisadas por eletroforese bidimensional. Um total de 627 *spots* foram detectados para a raça Mafriwal enquanto que Kedah Kelantan obteve-se 707 *spots* o autor não revelou os valores correspondentes (*matches*) entre os géis (ASHRAFZADEH; NATHAN E KARSANI 2013).

Proteínas exclusivas da raça Saanen

. Algumas proteínas mais evidentes dos cinco animais e suas réplicas foram selecionadas para a construção de figuras, mostrando o número de identificação (ID), pI e massa (Figuras 1) em apêndice. A construção da tabela 2 apresenta a identificação das proteínas simplificada com o nome das proteínas, números de acesso, pI e massa teórico e experimental para auxiliar na discussão com base no banco de dados do *UNIPROT* e estudos na literatura.

Tabela 2: Identificação das proteínas detectadas da raça Saanen com base no pI e massa, utilizando o banco de dados do *Uniprot*.

ID	pI/MW (Exp.)	Número de acesso	pI/MW (Teor.)	Nome da Proteína (classe)
303	5.45/49246	A0JN74	5.41/52948	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM11
312	6/31828	GDA2_WHEAT	6.51/31631	Alpha/beta-gliadin A-II (Prolamin)
360	5.75/44886	A0JPP7	5.77/45451	Protein DDI1 homolog 1
456	5.37/36348	A0AVT1-4	5.20/37693	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6
470	5.31/34546	A0AVT1-4	5.20/37693	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6
935	5.69/35032.0	SRR_BOVIN	5.72/36181	Serine racemase

Fonte: Autor.

Dentre as proteínas detectadas foi possível observar maior frequência para a família das ubiquitinas, sendo composta por uma cadeia de peptídeos de 76 AA. Esta família é um marcador universal para proteólise encontrado em todos os tecidos e organismos correspondendo a um sinal celular altamente específico nas proteínas.

O processo de ubiquitinação é modulado pela ação específica de três enzimas E1 ativação, a E2 conjugação, E3 ligase. Quando ativadas, se ligam covalentemente a uma proteína alvo sinalizando que esta será degradada ou simplesmente suas funções são alteradas, sendo utilizada pelo sistema de proteossoma ubiquitina (UPS). Além da função proteolítica, o processo de ubiquitinação é importante para regulação e interações proteicas, tradução de sinal, reparação do DNA, no tráfico de proteína, progressão do ciclo celular, comunicação intercelular, proliferação das células e apoptose. Diversos estudos têm se

aplicado em processos patológicos incluindo neurológico e imunológico, câncer, diabetes, obesidade e reprodutivos (AMARAL et al., 2014) .

A ubiquitinação foi proposta como evidência de modificações na membrana plasmática do espermatozoide que leva a uma redução da fertilidade ou como um mecanismo de controle para qualidade espermática dependente de ubiquitina. Foi descrito nos espermatozoides de várias espécies: Seres humanos (SUTOVSKY et al., 2001), equinos (SUTOVSKY et al., 2003) e em bovinos (SUTOVSKY; HAUSER; SUTOVSKY, 2004).

Potenciais para biomarcadores do esperma incluem proteínas que são exclusivamente associadas a determinados tipos de defeitos nos espermatozoides (marcadores "negativos" de fertilidade) ou por proteínas abundantes em espermatozoides com morfologia e função normal (marcadores "positivos"), um dos biomarcadores de proteína de qualidade espermática de touro que ainda não possui seu papel totalmente esclarecido é a ubiquitina (RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2014).

Espermatozoides anormais são marcados por ubiquitinação na superfície da membrana plasmática dos espermatozoides, durante a passagem pelo epidídimo e observa-se uma redução das células com defeitos na cabeça do acrossomo e na peça intermediária, indicando que houve remoção das células com defeitos. A remoção ocorre por fagocitose, nas células epiteliais dos ductos eferentes e por macrófagos intra-epiteliais na cauda do epidídimo (BASKA et al., 2008).

Há duas razões principais para este processo ser relevante: uma que atua como um mecanismo seletivo para espermatozoides férteis e saudáveis e outra é que pode representar deficiência do sistema regulatório dos espermatozoides deficientes, prejudicando o processo de fertilização dentro do trato reprodutivo da fêmea (AITKEN; KOPPERS, 2011) .

Segundo Amaral e colaboradores (2014) a identificação abrangente de ubiquitina em esperma é um indicativo para relacionar a função em que está envolvido ao substrato e a função que ele está exercendo no interior da célula em cada proteína ubiquitinada .

O fato da ubiquitina estar sendo expressa, e considerando que a adição de uma única proteína-alvo altera sua atividade e localização, Dikic, Wakatsuki e Walters (2009) relataram a importância de estudar os domínios de ligação da ubiquitina (UBDS) com uma diversificada gama de cadeias ligantes a ubiquitina, sendo específicos e correspondendo aos eventos direcionados ao proteossoma 26S. Os domínios, por sua vez, atuam de forma reversível, altamente regular para seus mecanismos e funções versáteis *in vivo*. O número de UBDS identificados está em constante crescimento, com mais de vinte famílias diferentes

identificadas até o momento, diferenciando por sua estrutura e tipo de reconhecimento a ubiquitina.

A enzima E1 (Uba1) possui função reconhecida por ser ativadora dos processos de ubiquitinação, porém, estudos evidenciaram outra enzima com capacidade de se fixar às proteínas para a degradação, indicando que pode haver uma especificidade associada a essa via, conhecida como modificador de tipo 6 (Uba6) com função específica nas células germinativas, participando da transição de gonócitos para espermatogônias, garantindo o fornecimento adequado de ubiquitina para a proliferação e diferenciação celular. Entretanto, onde foram relatados para desempenhar um papel na transição da mitose a meiose. Considerando que as duas enzimas medeiam diferentes tipos de funções, apesar de serem coexpressas em alguns tipos de células, observa-se que a UPS funciona em vários níveis em gonócitos (PEREIRA, 2013).

Corroborando com os resultados obtidos, (HORGARTH; GRISWOLD 2010), utilizando o testículo de ratos como modelo de estudos, relatou altos níveis de transcritos que a Uba6 em populações de células germinativas e somáticas no testículo neonatal, mas em seguida, tornou-se restrito para as células germinativas, de acordo com a idade do animal, estando especificamente nas espermatogônias e células de Sertoli. Assim, a importância dessa proteína no epidídimo pode servir como um controle de qualidade espermática e pode ser uma explicação para redução seletiva dos espermatozoides com defeitos, garantindo uma produção de espermatozoide normal e fértil.

Outro membro de proteínas que se encontra ligada a ubiquitina E3ligase foi a *Motif Tripartite* (TRIM) que possui mais de 100 membros em humanos. É uma proteína transmembrana, pertencente a superfamília das imunoglobulinas, com localização específica no citoplasma ou no núcleo. Essa proteína age principalmente em processos como apoptose, transcrição, diferenciação e regulação da progressão do ciclo celular. Um grupo de aproximadamente 55 proteínas dessa família possuem atividades específica antiviral contra retrovírus. Descritos em estudos utilizando 36 humanos e 19 ratos, confirmam a dificuldade na liberação dos vírus da imunodeficiência 1 (HIV), vírus da leucemia murina (MLV) e vírus da leucose aviária (ALV) quanto a expressão da TRIM 5 e TRIM 3 (UCHIL et al., 2008).

A TRIM 19 também foi descrita por sua capacidade de inibir o herpes tipo 1, ebola e HIV (BJORNDAL; SZEKELY; ELGH, 2003). A TRIM 22 foi descrita por possuir um efeito antiviral para o HIV, bloqueando a liberação do vírus para célula hospedeira e sua ação liga-se especificamente às células gag do vírus (BARR et al., 2008).

Com a possível identificação da expressão TRIM 11 de acordo com suas funções. Ozato e colaboradores (2008) constataram sua contribuição na restrição de retrovírus endógenos em células hospedeiras, interferindo na replicação celular, sendo referidas como fatores de restrição e consideradas como parte do sistema imunitário inato ou intrínseco no hospedeiro que expressam especificamente essa proteína.

Em recente estudo a TRIM 11 quando ligada com a E3 ligase ubiquitina, interage de forma negativa com o peptídeo Humanin, o qual foi identificado como antiapoptótico e com a função de proteção dos neurônios contra a doença de Alzheimer, porém o nível intracelular do humanin diminuiu na presença da proteína TRIM 11 (IKEDA;INOUE 2012).

Proteínas exclusivas da raça Moxotó

. Algumas proteínas mais evidentes dos cinco animais e suas réplicas foram selecionadas para a construção de figuras, mostrando o número de identificação (ID), pI e massa (Figuras 2) em apêndice. A construção da tabela 3 apresenta a identificação das proteínas simplificada com o nome das proteínas, números de acesso, pI e massa teórico e experimental para auxiliar na discussão com base no banco de dados do *UNIPROT* e estudos na literatura.

Tabela 3: Identificação das proteínas detectadas da raça Moxotó com base no pI e massa, utilizando o banco de dados do *Uniprot*.

ID	pI/MW (Exp.)	Número de acesso	pI/MW (Teor.)	Nome da Proteína (classe)
423	5.7/51565	A1A4L0	5.67/52194	Sorting nexin-4
719	4.7/27738	Q9Y4I5-3	4.6/26737	Isoform 3 of Tesmin OS=Homo sapiens GN=MTL5
921	5.6/13114.0	Q99MH5	5.7/13018	Nucleoside diphosphate kinase homolog 5
1028	5.5/25601	A4QPB2-2	5.4/25620	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5-like protein
1007	5.7/26491	Q03060-7	5.6/26513	cAMP-responsive element modulator
959	6.0/28599	A0PJE2-3	6.05 /30850	Dehydrogenase/reductase SDR Family member 12

Fonte: Matos 2012.

A raça Moxotó demonstrou maior variedade de proteínas sendo expressas quando comparadas com as exclusivas do Saanen selecionamos as proteínas mais estudadas e com relevância das suas funções de acordo com a literatura.

A *Sorting nexin-4* está envolvida em várias etapas do tráfico intracelular, desempenhando um papel na reciclagem de endocitose no receptor transferrina, evitando sua degradação.

Weering, Verkadeb e Cullen (2010), estudando marcadores para reciclagem de membrana no endossoma do plasma, identificou como receptor de transferrina a SNX4, que transita como uma via rápida e direta no endossoma para a membrana plasmática.

A proteína *Isoform 3 of Tesmin* GN=MTL5 não possui funções bem elucidadas na literatura, incluindo no banco de dados *Uniprot*, que a exemplificou que pode estar envolvida no processo de espermatogênese.

Em análise de RT-PCR a partir de tecidos de rato com genes específicos que codificam a proteína metalotioneína, exclusivas de testículo, *tesmin 2* foram relacionadas de transcrições 2,2 e 1,8 kb em ratos, apresentando ser rica em cisteína de 32 kDa em análise de hibridação *in situ* o testículo do rato adulto demonstraram que *tesmin* é especificamente expresso em espermátócitos a RT-PCR quantificou sua expressão em diferentes estágios de desenvolvimento pós-natal (dia 4, 8, 12, 18 e 42) com início de expressão no 8 dia coincidindo com a entrada de células germinativas em meiose. Além disso, nos ratinhos adultos onde não foi detectado a expressão de *Tesmin* GN=MTL5, tiveram problemas de fertilidade (SUGIHARA et al., 1999).

A proteína NDK (*nucleoside diphosphate kinase*) possui atividade quinase, mas confere proteção contra a morte celular e altera os níveis celulares de várias enzimas antioxidantes. Pode desempenhar um papel na espermiogênese, aumentando a capacidade de espermátóides de fase final para eliminar as espécies reativas de oxigênio.

As proteínas do grupo *nucleoside diphosphate kinase* (NDPKs) são conservadas ao longo da evolução e podem estar envolvida em vários processos biológicos associadas com a proliferação, desenvolvimento e diferenciação. A *nucleoside diphosphate kinase homolog 5* - NDPK , nm23 - M5 foi identificada um novo membro que codifica uma proteína de 211 aminoácidos, a análise de *Northern blot* com testículos de ratos revelou a proteína que codifica transcritos nm23 - M5 que são altamente específicos no testículo adulto ,complementando com análise de RT-PCR demonstrou que as transcrições de nm23 - M5 aparecem pela primeira vez em espermátócitos e aumenta sua expressão na fases seguintes (HWANG, 2003).

Buscando entender melhor a função NM23 -M5, Choi e colaboradores (2009), produziram camundongos transgênicos com níveis reduzidos de NM23 - M5 *in vitro* com as técnicas de *Northern* e *Western* por análise de transferência. Que camundongos transgênicos NM23 -M5 exibiu números reduzidos de células haplóides e o antioxidante glutathiona peroxidase 5 (GPX - 5) que é regulada por NM23 - M5 mudou o nível de expressão e atividade. Estes resultados revelam que a expressão de NM23 - M5 desempenha uma importante função na espermiogênese aumentando os níveis celulares de GPX - 5 para eliminar as espécies reativas de oxigênio.

O *cAMP-responsive element modulator* (CREM) que se liga a uma sequência presente em muitos promotores virais e celulares. As isoformas são ativadores de transcrição ou repressores. Desempenha um papel na espermatogênese e está envolvido na maturação das espermátides.

A análise quantitativa dos principais fatores de transcrição para a espermiogênese é identificar fatores que interferem na produção do esperma aparentemente normal ou com disfunções. Noda e colaboradores (2014) buscou elucidar os mecanismos moleculares para o *cAMP-responsive element modulator* (CREM) durante a espermiogênese usando testículos de 21 touros japoneses e mudanças individuais do ativador, utilizando as técnicas de PCR, *Northern Blot*, imunofluorescência indireta. A motilidade e morfologia da cauda do epidídimo foram examinados antes das análises quantitativas do ativador testicular CREM, a fim de confirmar a capacidade para produzir esperma com motilidade e morfologia normais. O tecido de fígado foi utilizado para comparar com os altos níveis de expressão no testículo demonstrando sua importância para o progresso normal da espermiogênese e atividade transcricional de genes que codificam fatores essenciais para a capacidade de fertilização de espermatozoides.

Seus resultados foram consistentes no envolvimento cAMP com o elemento responsável modulador (CREM) estão envolvidos na espermiogênese em testículos de bovinos e que os níveis de mRNAs variaram significativamente entre os indivíduos, que têm a capacidade para produzir esperma com o motilidade e morfologia normal.

A *Dehydrogenase/reductase* SDR - 12 possui uma importante função na estimulação de hormônio esteróide, prostaglandinas, retinóide no metabolismo e sinalização.

Devido o grande número de membros desta família, é feita uma subdivisão para melhor esclarecer sobre suas funções. Em mamíferos a correlação entre a classificação da família e sua função existe também alguns membros associados a outras proteínas como a *Dehydrogenase/reductase* SDR - 12 é dependente das 17 *b-hydroxysteroid dehydrogenases*

(17 b-HSDs) que promove a síntese de esteróides e enzimas do metabolismo. Além disso, ao investigar o padrão de expressão de 17 β HSD - 12 *in vivo*, que sugerem ter um papel central durante o processo reprodutivo mediada por esteróides (KALLBERG; OPPERMANN; PERSSON, 2010).

Proteínas diferencialmente expressa da raça Saanen em comparação com a raça Moxotó

A partir da comparação entre os dois géis além das proteínas exclusivas de cada raça, também foi possível detectar proteínas que estavam presentes em ambos os géis mais com *spots* mais intensos nos níveis de expressão diferenciados. As proteínas mais evidente dos cinco animais e suas réplicas foram selecionadas para a construção de figuras, mostrando o número de identificação (ID), pI e massa (Figuras 3) em apêndice. A construção da tabela 4 apresenta a identificação das proteínas simplificada com o nome das proteínas, números de acesso, pI e massa teórico e experimental para auxiliar na discussão com base no banco de dados do *UNIPROT* e estudos na literatura.

Tabela 4: Identificação das proteínas diferencialmente expressas da raça Saanen em comparação com a raça Moxotó com base no pI e massa, utilizando o banco dedados do *Uniprot*

ID	pI/MW (Exp.)	Número de acesso	pI/MW (Teor.)	Nome da Proteína (classe)
327	5.18/59087.0	Q8WWU5	5.08/56141	T-complex protein 11 homolog
607	5.5/42030	(A1YER5)	5.44/39086	E3 ubiquitin-protein ligase RING1
900	5.5/35525	(A0M8R8)	5.58/ 32818	F-actin-capping protein subunit alpha-2
968	6.7/29630	(A0JN86)	6.60/ 29642	Polycomb group RING finger protein 5
1112	4.1/21288	(A5PJD3)	4.09/ 19950	Coordinator of PRMT5 and differentiation stimulator
1242	4.4/14103	(A6NDE8)	4.32/12924	G antigen 12H.

Fonte: Autor. e Matos 2012.

A proteína *T-complex protein 11 homolog* desempenha um papel importante na função do esperma e na fertilidade sendo essencial para a capacitação espermática e reação acrossômica.

Em estudos com ratos foram identificados três produtos de *splicing* alternativo de seu gene homólogo humano, TCP11 são eles: TCP11a, TCP11b e TCP11c onde sua expressão é

específica no testículo durante a espermatogênese e na maturação do espermatozoide. A fim de explorar a função de TCP11, foi estudado com ensaio de RT - PCR a localização subcelular, expressão e sua ligação com o esperma em todas as isoformas presentes nos testículos e no esperma. No entanto, por western blot só foi possível observar a expressão das proteínas TCP11a e TCP11c e uma diferença no nível da expressão da TCP11c inferior contendo 15% de espermatozoides anormais quando comparados com a TCP11a de morfologia normal. Além disso, várias proteínas TCP11a foram isolados e adicionado no exterior fibra densa 1 (ODF1) um componente da cauda do espermatozoide que contribuem para a diferenciação morfológica e função da cauda. Em ensaios de co-imunoprecipitação de extratos celular de esperma confirmou que a proteína TCP11 também interagiu com ODF1 que pode contribuir para a morfologia e motilidade dos espermatozoides (LIU et al., 2011).

A proteína *F-actin-capping protein subunit alpha-2* se liga de uma forma independente ao Ca^{2+} para os fins de rápido crescimento de filamentos de actina, bloqueando assim a troca de subunidades a esses fins. Ao contrário de outras proteínas de nivelamento, estas proteínas não corta os filamentos de actina e estão associadas ao espermatozoide com o canal de cálcio e envolvida com o processo de fertilização no interior do trato feminino com o imediato influxo de cálcio, bicarbonato e aumento no nível de AMPc, processo que aumenta a motilidade espermática. Também foi demonstrado que essa proteína está envolvida no aumento da motilidade e na interação do espermatozoide com o oócito (BAKER et al., 2010).

O componente de um *Grupo Polyco complexo* (PCG) é uma classe complexa e necessária para manter o estado transcricionalmente repressivo de muitos genes, incluindo o gene HOX. Ao longo do desenvolvimento do embrião, ela age de forma complexa na remodelação da cromatina e modificação das histonas tornando a cromatina hereditária com sua expressabilidade modificada.

Proteínas *Grupo Polycomb* (PCG) são repressores transcricionais em que a expressão de genes reguladores estão em desenvolvimento. Os recentes avanços na nossa compreensão da o sistema PCG incluem purificações bioquímicos que revelaram uma variedade considerável em PcG composição complexa, essas análises bioquímicas, estudos estruturais começaram a fornecer uma visão sobre como PcG proteínas interagem umas com as outras e com a cromatina. Finalmente perfis de ligação do genoma funcional e análise da regulação do gene alvo revelou que o sistema PcG não é utilizado apenas para o silenciamento permanente do desenvolvimento genes reguladores. Em vez disso, PcG mediada repressão também constitui no mecanismo de controlo dinâmico da transcrição de genes (MULLER; VERRIJZER, 2009).

A proteína-arginina metiltransferase 5 (PRMT5) é um Coordenador e diferenciação estimuladora que promove a ligação das histonas necessária para a atividade histona metiltransferase H4 que interage com o N-terminal de PRMT5.

A metilação é modulada especificidade pelo substrato de PRMT5 sugerindo que ele atua promovendo a associação entre a histona H4 e PRMT5 desempenha um papel na diferenciação de células musculares, através da modulação do recrutamento de PRMT5 para o promotor de genes envolvidos na coordenação entre a saída do ciclo celular e diferenciação muscular.

A metilação da arginina é importante para uma variedade de processos celulares, incluindo transcrição regulamento, *splicing* de RNAm, reparo do DNA, nuclear/citoplasma e vários tradução de sinal. No entanto, o papel da metilação na arginina e a biossíntese de proteínas e dos sinais extracelulares não são totalmente compreendidos.

Jung e colaboradores (2011) demonstrou que o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) tem sido identificado como um potente estimulador da diferenciação em fibroblastos a dimetilação arginina de alongamento eucariótica fator 2 (eEF2) é induzida em fibro-embrião de rato por bFGF, sem a mudança no nível de expressão de eEF2 concluindo que a arginina proteína metiltransferase 7 (PRMT7) é responsável pela metilação, e que PRMT5 atua como um coordenador.

A proteína G antigen 12H. pertence a uma família de multigenes expressa numa grande variedade de tumores enquanto que em tecidos normais, a expressão está restringida às células germinativas. Estes genes organizados em repetições agrupadas, têm um alto grau de identidade de sequência previsto, mas diferem por dispersa substituição de nucleotídeo único. Suas seqüências contêm o peptídeo antigênico YYWPRPRRY ou YRPRPRRY que é reconhecida pelas células T citotóxicas (*uniprot* 2014).

Pertencente à família GAGE de antígenos CT inclui um pequeno número de proteínas ácidas com um elevado grau de aminoácidos suas funções não são totalmente compreendida, embora possam ter anti apoptóticas propriedades com reconhecimento de células T citotóxicas essa família foi identificada por autólogo genes que codificam antigênico e peptídeos pelo HLA- Cw6 e HLA- A29 em células de melanoma de câncer em humanos transcritos do gene GAGE foram encontrados em numerosas tipos de câncer e mais freqüentemente em melanomas malignos (24%-42%) , cancros do pulmão (19% -54%), da tiróide, (30%) carcinomas, cancros da mama (26%),carcinoma hepatocelular (38%) ovário (30%). Especificamente a proteínas ANTIGEN 12 /Antígenos câncer GAGE está associada a cancer

nos testículo, enquanto que a sua expressão nos tecidos normais é limitado para as células germinativas das gonadas testiculos e ovários (GJERSTORFF; DITZEL, 2007).

Proteínas diferencialmente expressa da raça Moxotó em comparação com a raça Saanen

A partir da comparação entre os dois géis além das proteínas exclusivas de cada raça, também foi possível detectar proteínas que estavam presentes em ambos os géis mais com níveis de expressão diferenciados. As proteínas mais evidente dos cinco animais e suas réplicas foram selecionadas para a construção de figuras, mostrando o número de identificação (ID), pI e massa (Figuras 4) em apêndice. A construção da tabela 5 apresenta a identificação das proteínas simplificada com o nome das proteínas, números de acesso, pI e massa teórico e experimental para auxiliar na discussão com base no banco de dados do *UNIPROT* e estudos na literatura.

Tabela 5: Identificação das proteínas diferencialmente expressas da raça Moxotó em comparação com a raça Saanen com base no pI e massa, utilizando o banco de dados do *Uniprot*.

ID	pI/MW (Exp.)	Número de acesso	pI/MW (Teor.)	Nome da Proteína (classe)
505	6.0/45643	Q2KIY6	6.01/ 44785	HORMA domain-containing protein 1
588	6.2/42928	A2A7Y5	6.16/ 42829	Migration and invasion-inhibitory protein
704	5.5/38444	A1YER5	5.44/ 39086	E3 ubiquitin-protein ligase RING1
787	5.9/35067	A1A4V9-2	5.91/ 33880	Coiled-coil domain-containing protein C16orf93
1117	5.7/20827	A0M8R6	5.64/ 20326	Caveolin-1
1248	5.0/13827	A0A889	5.05/ 13543	Prolactin-inducible protein homolog

Fonte: Autor. e Matos 2012..

A proteína *HORMA domain-containing 1* desempenha um papel fundamental na progressão da meiose regulamenta 3 funções diferentes: Garante o número suficiente de DNA e a quebra da fita dupla processado (LAP) estão disponíveis para busca bem sucedida de homologia promove a formação sinaptonêmico complexo independentemente de seu papel na busca de homologia.

O processo de meiose é único para as células germinativas. Na reprodução, a proteína Hormad1 é essencial durante a gametogênese nos machos, e quando apresentam baixos níveis de Hormad1, há deficiência na fase meiótica apresentando defeitos genéticos. Em humanos ela está associada com azoospermia. Miyamoto e colaboradores (2012) analisaram mutações em todas as regiões de codificação por meio de sequência direta com 30 homens diagnosticados com azoospermia resultante de deficiência meiotica e 80 comprovadamente férteis para polimorfismos pela análise da sequência, três locais Polimorfismo de Um Único Nucleotide Polymorphism 1 (c. 163A > G), SNP2 (c. 501T > G) e SNP3 (c. 918C > T), foram encontrados em exons 3, 8 e 10. Ambos SNP1 e SNP2 foram associados com azoospermia humana causada por deficiência meiótica ($P < 0,05$).

A proteína inibidora da migração e invasão (MIIP) inibe glioma e células invasoras e regula genes associados à mobilidade, como NFKB2 e ICAM1 adesão e exposições efeitos opostos para IGFBP2 na invasão celular. Wang, Wen e Zhang (2011) estudando a proteína inibidora da migração e invasão (MIIP) surgiu como função chave reguladora a invasão e migração celular relacionada a fisiologia do câncer incluindo o de mama, pâncreas, além de glioma e neuroblastoma. Estudos utilizando modelos de ratos demonstraram que ela possui atividade supressora de tumores o que levou à descoberta do gene MIIP que foi inicialmente denominado Iip45 e proteínas com massa molecular de 45 kDa.

A proteína CAV 1 participa na co-estimulação essencial de sinal para o receptor de células T (TCR), mediada pela ativação de células-T. Sua ligação a DPP4 induz a proliferação de células T e a ativação de NF-*kappa*-B de uma maneira receptor/CD3-dependent de células T. Pode atuar como uma proteína de andaimes em membranas caveolar. Interage diretamente com as subunidades alfa e proteína G e funcionalmente pode regular a sua atividade. Forma um complexo estável com heterooligomeric CAV2 que tem como alvo a jangadas lipídicas e impulsiona a formação caveolae.

A proteína de bolsas lipídica caveolin - 1 (CAV1) é uma proteína de membrana integral, identificada como um dos principais substratos de tirosina - fosforilada contendo um *cold-shock domain* (CSD de 20 aminoácidos) que interage com proteínas diferentes tais como G- receptores acoplados a proteínas, as proteínas G. Essas interações levou a hipótese de sinalização através da caveolin específica e capaz de reunir e coordenar as funções de vários complexos envolvidos na tradução de sinal celular, homeostase de lipídios e adesão celular.

Baltiérrez-Hoyos, Roa-Espitia e Hernández-González (2012), analisando esperma de cobaias e ratos por imunofluorescência, verificou-se que CDC42 participa na regulação e

capacitação da reação acrossômica resultados comprovaram que CDC42 é ativado durante a capacitação e sua atividade foi regulada através de sua associação com CAV1; essa interação é interrompida durante a capacitação através da fosforilação de CAV1 em Tyr14.

Algumas proteínas identificadas na tabela e que não foram discutidas é porque não suas tem funções definidas no banco de dados do *Uniprot* ou porque já foram estudadas nos itens anteriores ou no capítulo 2.

Conclusões

A raça Moxotó apresentou maior quantidade de proteínas expressas nos espermatozoides em relação a raça Saanen e também proteínas específicas ligadas a reprodução, enquanto a Saanen apresentou maior expressão de proteínas ligadas ao sistema imuno-fisiológico.

Supõe-se que a raça Saanen por ser altamente produtiva, e por estar fora do seu habitat natural, explique a existência de proteínas de maior expressão ligadas ao sistema imune.

Referências Bibliográficas

AITKEN, R. J., KOPPERS, A. J. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. **Asian Journal of Andrology**, v.13, p.36-42, 2011.

AITKEN, R.J.; HENKEL, R. R. Sperm cell biology: current perspectives and future Prospects. **Asian Journal Andrology**, v. 13, p. 3-5, 2011.

AMARAL, A. et al. The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 1 p. 40 – 62, 2014.

ASHRAFZADEH, A.; NATHAN, S.; KARSANI, S. A. Comparative Analysis of Mafriwal (*Bos taurus* × *Bos indicus*) and Kedah Kelantan (*Bos indicus*) Sperm Proteome Identifies Sperm Proteins Potentially Responsible for Higher Fertility in a Tropical Climate. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 15860-15877, 2013.

BAIROCH, A., APWEILER, R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1998. **Nucleic Acids Research.**, v. 26, p. 38–42, 1998.

BAKER, M. A. et al. Analysis of proteomic changes associated with sperm capacitation through the combined use of IPG-strip pre-fractionation followed by RP chromatography LC-MS/MS analysis. **Proteomics**, v. 11, n. 3, p. 482-495, 2010.

BALTIÉRREZ-HOYOS, R.; ROA-ESPITIA, A. L.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E. O. The association between CDC42 and caveolin-1 is involved in the regulation of capacitation and acrosome reaction of guinea pig and mouse sperm. **Reproduction**, v. 144, p. 123–134, 2012.

BARR, S. D. et al. The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM 22. *Plos Pathology*, v. 4, n. 2, p. 1000 - 1007, 2008.

BASKA, K. M. et al. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 215, p. 684-696, 2008.

BJORNDAL, A. S. SZEKELY, L.; ELGH, F. Ebola virus infection inversely correlates with the overall expression levels of promyelocytic leukaemia (PML) protein in cultured cells. **BMC Microbiology**, v. 3, p 1-15, 2003.

BRANDÃO, A. R., BARBOSA, H. S.; ARRUDA, M. A. Z. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. **Journal of Proteomics**, 73. p 1433 – 1440, 2010.

CHOI, Y-J. et al. Nm23-M5 mediates round and elongated spermatid survival by regulating GPX-5 levels. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1292–1298, 2009

COELHO, L. A. et al. Características do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmara bioclimática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 544-549, 2006.

DIKIC, I.; WAKATSUKI, S.; WALTERS, J. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. **Molecular cell Biology**, v. 10, p. 659 - 671, 2009.

GJERSTORFF, M. F.; DITZEL, H. J. An overview of the GAGE cancer/testis antigen family with the inclusion of newly identified members. **Tissue Antigens**, v. 71, p. 187–192, 2007.

HOCHSTRASSER, D. F. Proteome in perspective. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 36, p. 825–36, 1998.

HOGARTH, C.; GRISWOLD, M. D. The key role of vitamin A in spermatogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 4, p. 956–962, 2010.

HWANG, K-C. et al. Cloning, sequencing, and characterization of the murine nm23-M5 gene during mouse spermatogenesis and spermiogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 306, p. 198–207, 2003.

IKEDA.K; INOUE.S; TRIM/RBCC Proteins / edited by Germana Meroni.(ed)**ADVENCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY**, v.770, p.27, 2012.

JUNG, G. A. et al. Methylation of eukaryotic elongation factor 2 induced by basic fibroblast growth factor via mitogen-activated protein kinase. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 43, n. 10, p. 550-560, 2011.

KALLBERG, Y.; OPPERMAN, U.; PERSSON, B. Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models. **FEBS Journal**, v. 277, p. 2375–2386, 2010.

LIU, Y. et al. Human t-Complex Protein 11 (TCP11), a Testis-Specific Gene Product, Is a Potential Determinant of the Sperm Morphology. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 224, p. 111 - 117, 2011.

MATOS, M. N. C. Efeito da sazonalidade no perfil de proteínas de espermatozoides em caprinos da raça Moxotó. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Ceará. 2012.

MIARELLI, M.; SIGNORELLI, F. Differential expression of liver proteins in Chianina and Holstein young bulls. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 593-598, 2009.

MIYAMOTO, T. et al. Single-nucleotide polymorphisms inHORMAD1 may be a risk factor for azoospermia caused by meiotic arrest in Japanese patients. **Asian Journal of Andrology**, v. 14, p. 580–583, 2012.

MULLER, J.; VERRIJZER, P. Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 19, p. 150 – 158, 2009.

NODA, T. Expression patterns of the activator type of cAMP responsive element modulator (CREM) in testicular germ cells of Japanese Black bulls. **Theriogenology**, 40 p., 2014.

OZATO, K. et al. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. **Immunology**, v. 8, p. 849 - 860, 2008.

PEREIRA, N. Z. **Expressão ex vivo de fatores antivirais em mães infectadas por HIV e recém-natos**. 2013. 27 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

RABILLOUD, T. Two dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains. **Proteomics**, v. 2, p. 3-10, 2002

RICROCH, A. E. et al. Evaluation of Genetically Engineered Crops Using Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomic Profiling Techniques. **Plant Physiology**, v. 155, n. 4 p. 1752-1761, 2011.

RODRÍGUEZ-LOZANO, I. et al. Percentage of Ubiquitinated Spermatozoa does not Correlate with Fertilizing Capacity of Thawed Bovine Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, n. 49, p. 27–31, 2014.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. A análise Proteómica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 77, p. 7–17, 2004.

SUGIHARA, T. et al. A Novel Testis-Specific Metallothionein-like Protein, Tesmin, Is an Early Marker of Male Germ Cell Differentiation. **Genomics**, v. 57, p. 130–136, 1999.

SUTOVSKY, P. et al. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 1665-1675, 2001.

SUTOVSKY, P. et al. Differential ubiquitination of stallion sperm proteins: Possible implications for infertility and reproductive seasonality. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 688-698, 2003.

SUTOVSKY, P.; HAUSER, R.; SUTOVSKY, M. Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. **Human Reproduction**, v. 19, p. 628-638, 2004.

UCHIL, P. D. TRIM E3 Ligases Interfere with Early and Late Stages of the Retroviral Life Cycle. **PLoS Pathogens**, v. 4, p. 1 - 13, 2008.

WANG, Y.; WEN, J.; ZHANG, W. MIIP, a Cytoskeleton Regulator that Blocks Cell Migration and Invasion, Delays Mitosis, and Suppresses Tumorigenesis. **Current Protein and Peptide Science**, v. 12, p. 68-73, 2011.

WEERING, J. R. T. VAN; VERKADEB, P.; CULLEN, P. J. SNX–BAR proteins in phosphoinositide-mediated, tubular-based endosomal sorting. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, p. 371–380, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise proteômica através das técnicas de eletroforese bidimensional (2D), seguidas do uso da bioinformática e de banco de dados públicos, mostrou-se uma ferramenta biotecnológica com grande potencial e reprodutibilidade para estudos em caprinos.

O perfil proteômico das células espermáticas de caprinos Saanen foi descrita pela primeira vez e, diante dos resultados obtidos, foi detectado possíveis biomarcadores envolvidos em diversos processos imuno-fisiológico, além de proteínas específica para a reação acrossômica.

O comparativo entre os perfis proteômicos de raças diferentes já foi descritos para outras espécies, entretanto com base na literatura este trabalho é o pioneiro para caprinos, abordando análise quantitativa e comparativa do perfil proteômico e da identificação de possíveis biomarcadores para cada raça, contribuindo para sua eficiência na reprodução animal.

A importância de se estudar os aspectos moleculares dos espermatozoides, levando-se em conta o potencial de transferência de genes favoráveis ou desfavoráveis para as futuras gerações, é de importância para esclarecer os mecanismos responsáveis por suas características fenotípicas e metabólicas. Adicionalmente, este estudo demonstra a identificação de possíveis biomarcadores como ferramenta biotecnológica para futuros estudos de melhoramento genético de caprinos.