



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

BRUNA ALVES FELIX

PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS
DA RAÇA SANTA INÊS ALIMENTADOS COM FONTE ALTERNATIVA DE
PROTEÍNA

FORTALEZA

2022

BRUNA ALVES FELIX

PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS DA
RAÇA SANTA INÊS ALIMENTADOS COM FARELO DE MAMONA
INDUSTRIALMENTE DESTOXIFICADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará e Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia. Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.

Coorientador: Dr^a. Denise Damasceno Guerreiro

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F36p Felix, Bruna Alves.
Parâmetros seminais e proteômica do plasma seminal de ovinos da raça Santa Inês alimentados com farelo de mamona industrialmente destoxificado / Bruna Alves Felix. – 2022.
75 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.
Coorientação: Prof. Dr. Denise Damasceno Guerreiro.
1. bioinformatica. 2. pequenos ruminantes. 3. proteínas plasmáticas. I. Título.

CDD 636.08

BRUNA ALVES FELIX

PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS DA
RAÇA SANTA INÊS ALIMENTADOS COM FARELO DE MAMONA
INDUSTRIALMENTE DESTOXIFICADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará e Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia. Área de Concentração: Produção Animal.

Aprovada em: 29/11/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^a. Denise Damasceno Guerreiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Francisco Gleyson da Silveira Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Jorge André Matias Martins
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Prof^a. Dr^a. Ana Luiza Malhado Cazaux de Souza Velho
Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

Primeiramente a Deus Pai, a Maria Virgem Santíssima e a São José por me concederem a graça de confiar e ser fiel aos propósitos de Deus, honrando-me com a vida dos meus pais, das minhas filhas e do marido.

Ofereço!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus Pai todo poderoso pelo dom da vida e do amor ao próximo. Em especial, agradeço, a Maria Virgem Santíssima, minha mãe e meu exemplo de silêncio, obediência e servidão. Aos anjos e arcanjos de Deus pela proteção e livramentos das maldades desse mundo. A São José, meu Amado José, meu exemplo de confiança nos propósitos de Deus.

À Universidade Federal do Ceará pelo privilégio de realizar um curso de nível superior concedendo-me assim a oportunidade de realizar o Doutorado em Zootecnia.

Ao Curso de Pós Graduação em Zootecnia, principalmente por sua estrutura, funcionários e coordenação, em especial a Francisca sempre muito solícita e gentil, auxiliou-me em todas as burocracias ao longo desses anos. Agradeço a atual coordenadora Prof^a. Elzânia Pereira por seus ensinamentos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro por meio da concessão da bolsa.

Ao professor e orientador Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura, pela confiança e respeito ao meu trabalho. Tê-lo como o orientador, sem dúvidas, foi uma honra. Sou grata pelos seus ensinamentos, pois foram fundamentais para o resultado final desse projeto.

À doutora Denise Guerreiro que tão gentilmente contribui significativamente para a realização desse trabalho e tão carinhosamente me apoio e me aconselhou. Te agradeço por cada fração de segundo que você dedicou para me coorientar

Ao professor Magno Cândido por confiar na execução desse experimento, sem dúvidas, serei eternamente grata por sua disponibilidade e dedicação.

Aos demais membros participantes da banca examinadora: Prof^{ca}. Dr^a. Ana Luiza Malhado Cazaux de Souza Velho, Dr. Francisco Gleyson da Silveira Alves e Prof. Dr. André Jorge Martins pela valorosa contribuição para a melhoria do nosso trabalho.

Aos membros do NEEF (Núcleo de Ensino e Estudos em Forragicultura) por todo suporte e dedicação durante todo o experimento.

A minha amada família que brilhantemente estiveram ao meu lado, suporte fundamental para me manter de pé, principalmente, nos momentos de tempestades. A minha tão amada mãe, Maria Alves Felix e ao meu amado pai, Antônio Neves Felix que não cessaram de rezar e orar por mim. Ao meu amor, Luís Adair Chagas Filho, que tão pacientemente me amou e me apoiou em cada decisão necessária a ser tomada, ao amor dedicado a mim e as nossas Marias. As minhas meninas, Maria Laura e Maria Luisa, lindas e fortes, presentes de Deus que tão serenamente foram meu combustível para chegar até aqui. Aos meus avós, Rosilda, Francisco, Tereza e Miguel, servos de Deus que me ensinaram a ter fé independente das circunstâncias. A minha irmã e comadre, Mikeline Alves, sua paciência e seus conselhos foram fundamentais ao longo dessa jornada. Aos meus sogros, Luis Chagas e Lucia Chagas, queridos pais que o senhor me honra com a vida deles.

Ao meu querido amigo Dr. Francisco Gleyson que de maneira especial ajudou-me a ter esse projeto e não mediu esforços para que esse experimento fosse realizado com a minha contribuição. A você, meu amigo, te entrego um coração repleto de gratidão.

A minha amada amiga, Dra. Kamila Otavio, presente de Deus que nos uniu para vida. Tive o privilégio de apreender com você a essência de amizade disposta em ajudar em todos os momentos, a você, minha amiga, minha eterna gratidão.

Aos meus tão amados companheiros de laboratório, em especial, Ylana Galiza, Iury Lima, parceiros e confidentes, principalmente, nos dias difíceis. Eternamente os levarei em

meus pensamentos, muito obrigada por me ensinarem a ver a vida com leveza, meus incríveis amigos.

Aos professores que a vida me presenteou, Prof^a Ana Luiza Malhado Cazaux de Souza Velho, Prof. Fagner Cavalcante, Prof^a. Solange Damasceno, Prof^a. Mariana Baraldi, Prof. Nielyson Batista e Prof. Aderson Viana queridos amigos que tive a honra de conviver, doutores de uma inteligência admirável. Muito obrigada por vossas amizades.

Aos queridos amigos e profissionais do Laboratório de Fisiologia Animal que com todo conhecimento, carinho e dedicação contribuiu para meu amadurecimento profissional, dos quais cito; Eduardo Pessoa, Nhaira Maia, Fabio Vasconcelos, Maria Julia, Adália Oliveira, Revila Melo, Deisy Díaz, Monica Ramirez, Rafael Ferreira, Mayra Vettorazzi, Taciane Alves, Thiago Damasceno, Jander Fabrício e aos demais colegas que passaram pelo laboratório meu eterno agradecimento.

Aos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos (NPDM) pela contribuição em nosso trabalho. Em especial agradeço a Prof^a Dr.^a Maria Elisabete Moraes por nos ceder tão gentilmente o uso do equipamento Orbitrap e a Prof^a Dr.^a Claudia do Ó, que nos cedeu o espaço e equipamentos para a realização deste trabalho. E aos colegas do NPDM que participaram do experimento: Carlos Paier, Laís Brasil, Guilherme Graziany e Islay Magalhães.

Enfim, a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

Obrigada!

“A tarefa não é ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

O estudo foi conduzido com dois objetivos: 1) analisar a composição proteica do plasma seminal de 8 carneiros Santa Inês alimentados com farelo de mamona dessolventizado utilizando a espectrometria de massas associada a cromatografia líquida (Estudo 1). 2) determinar o efeito das dietas sobre os parâmetros seminais, integridade da cromatina espermática e dimensões testiculares de carneiros Santa Inês alimentados com farelo de mamona industrialmente destoxificado (Estudo 2). Os carneiros foram divididos em três grupos (FS - farelo de soja, FMDP – farelo de mamona dessolventizado peneirado e FMD – farelo de mamona dessolventizado) e o sêmen de todos os animais foi coletado através de eletroejaculador em um intervalo de três dias, após 77 dias de alimentação. No estudo 1, o plasma seminal foi separado das células espermáticas, precipitado, quantificado e as proteínas foram digeridas com tripsina, dessalinizadas e analisadas por LC-MS/MS. A pesquisa de espectro peptídico permitiu a identificação em média de 849 proteínas no estudo, confirmando as BSPs (*Binder Sperm Proteins*) como as proteínas mais abundantes. Os dados foram analisados com o auxílio de ferramentas de bioinformática de acordo com a ontologia gênica, agrupamento de proteínas, interação proteína-proteína, vias metabólicas e miRNAs. Foi possível identificar as principais proteínas plasmáticas e proteínas ligadas a toxicidade e neurotoxicidade, principais sintomas de intoxicação por mamona. Logo, se faz necessário um estudo para avaliar o efeito do farelo de mamona sob os parâmetros seminais para afirmarmos se o farelo de soja pode ser substituído pelo farelo de mamona sem comprometer a fertilidades dos carneiros. Para o estudo 2, após as coletas, um volume de sêmen foi medido e a concentração espermática foi determinada com o auxílio da câmara de Neubauer. Para analisar a porcentagem de espermatozoides móveis, uma pequena fração de sêmen foi avaliada sob um microscópio óptico e a morfologia espermática foi avaliada utilizando uma solução de formol salino tamponado. Uma alíquota de sêmen foi destinada ao teste de dispersão da cromatina para avaliação da integridade do DNA espermático e ao sêmen restante, o *pellet*, contendo os espermatozoides ejaculados, foi lavado em tampão e armazenado a - 20° C. Os parâmetros seminais e dimensões testiculares analisados nesse trabalho não foram influenciados pela dieta, ou seja, o farelo de soja pode ser substituído pelo farelo de mamona, sem comprometer a fertilidade dos animais.

Palavras-chave: bioinformática; pequenos ruminantes; proteínas plasmáticas

ABSTRACT

The study was conducted with two objectives: 1) to analyze the protein composition of the seminal plasma of 8 Santa Inês rams fed with desolventized castor bean bran, using mass spectrometry associated with liquid chromatography (Study 1). 2) to determine the effect of diets on seminal parameters, sperm chromatin integrity and testicular dimensions of Santa Inês rams fed with industrially detoxified castor bean meal (Study 2). The rams were divided into three groups (FS - soybean meal, FMDP - sieved desolventized castor bean meal and FMD - desolventized castor bean meal) and the semen of all animals were collected through an electroejaculator in an interval of three days, after 77 days of feeding. In study 1, seminal plasma was separated from sperm cells, precipitated, quantified and the proteins were digested with trypsin, desalted and analyzed by LC-MS/MS. The peptide spectrum research allowed the identification of an average of 849 proteins in the study, confirming the BSPs (Binder Sperm Proteins) as the most abundant proteins. Data were analyzed using bioinformatics tools according to gene ontology, protein clustering, protein-protein interaction, metabolic pathways and miRNAs. It was possible to identify the main plasma proteins and proteins linked to toxicity and neurotoxicity, the main symptoms of castor bean poisoning. Therefore, a study is necessary to evaluate the effect of castor bean meal on seminal parameters to confirm whether soybean meal can be replaced by castor bean meal without compromising the fertility of rams. For study 2, after the collections, a semen volume was measured and the sperm concentration was determined with the aid of the Neubauer chamber. To analyze the percentage of motile sperm, a small fraction of semen was evaluated under an optical microscope and sperm morphology was evaluated using a formalin buffered saline solution. An aliquot of semen was used for the chromatin dispersion test to assess the integrity of the sperm DNA and the remaining semen, the pellet containing the ejaculated spermatozoa, was washed in a buffer and stored at -20° C. Seminal parameters and testicular dimensions analyzed in this study were not influenced by the diet, that is, soybean meal can be replaced by castor bean meal, without compromising the fertility of the animals.

Keywords: bioinformatics; plasma proteins; small ruminants

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
2	CAPÍTULO I – PROTEOMA DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS ALIMENTADOS COM FARELO DE <i>RICINUS COMMUNIS</i> DESSOLVENTIZADO.....	17
2.1	Introdução	19
2.2	Material e Métodos	20
2.2.1	<i>Localização, delineamento experimental e extração do óleo da mamona..</i>	20
2.2.2	<i>Coleta do sêmen.....</i>	22
2.2.3	<i>Precipitação do plasma seminal com acetona fria.....</i>	22
2.2.4	<i>Quantificação de proteínas</i>	22
2.2.5	<i>SDS-PAGE.....</i>	22
2.2.6	<i>Tripsinização e dessalinização.....</i>	24
2.2.7	<i>Label-free mass spectrometry.....</i>	24
2.2.8	<i>Pesquisa de banco de dados e identificação de proteínas.....</i>	25
2.2.9	<i>Análise bioinformática.....</i>	26
2.3	Resultados	27
2.4	Discussão	39
2.5	Conclusão	45
3	CAPÍTULO II – PARÂMETROS SEMINAIS E DIMENSÕES TESTICULARES DE OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS ALIMENTADOS COM FARELO DE MAMONA INDUSTRIALMENTE DESTOXIFICADO.....	47
3.1	Introdução	49
3.2	Material e métodos	50
3.2.1	<i>Localização, delineamento experimental e extração do óleo da mamona</i>	50
3.2.2	<i>Coleta do sêmen e análise dos parâmetros seminais.....</i>	51
3.2.3	<i>Avaliação das dimensões testiculares.....</i>	52
3.2.4	<i>Avaliação da integridade da cromatina espermática.....</i>	52
3.2.5	<i>Análise estatística.....</i>	53
3.3	Resultados	53
3.4	Discussão	58

3.5	Conclusão	60
3.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE A – LISTA DAS MÉDIAS E DESVIO-PADRÃO POR TRATAMENTO.....	74
	APÊNDICE B – LISTA DE ILUSTRAÇÕES POR CAPÍTULO.....	76
	APÊNDICE C - LISTA DE TABELAS POR CAPÍTULO.....	77

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A nutrição influencia diretamente a fertilidade dos ruminantes pelo fornecimento de nutrientes específicos necessários para o processo de gametogênese, ovulação, fertilização, sobrevivência do embrião e estabelecimento da gestação (ROBINSON et al., 2006). Em carneiros adultos, a redução da produção de espermatozoides por desnutrição foi demonstrada em alguns estudos (SALAMON, 1964; SETCHELLETAL et al., 1965; OLDHAMETAL et al., 1978; CAMERONETAL et al., 1988), entretanto, ainda não está claro se a perda de massa intersticial e a redução na produção de espermatozoides estão associadas a alterações na qualidade dos espermatozoides. Ao estudar o sêmen de carneiros da raça Merino sexualmente maduros alimentados com dieta abaixo das exigências de manutenção nutricional, Guan et al. (2014) observaram reduções na circunferência escrotal, massa testicular, densidade de espermatozoides e número de espermatozoides.

Nesse contexto, para alcançar bons índices reprodutivos é necessário um excelente manejo nutricional, pois o tempo o qual os animais levam até atingir a puberdade também influenciará no custo do sistema de produção, devido ao aumento no consumo de ração até se atingir o peso ideal à puberdade (POMPEU, 2009). Inicialmente, parece simples a questão de fornecer ao animal nutrientes de acordo com as suas necessidades nutricionais, entretanto, aliar o manejo nutricional ao manejo reprodutivo, buscando o máximo desempenho reprodutivo é um pouco mais complexo, devido à ausência de clareza no estabelecimento de objetivos e estratégias que visem a máxima produtividade com rentabilidade econômico-financeira do manejo reprodutivo. Assim, a qualidade seminal impacta diretamente a taxa de fertilização, qualidade embrionária e, conseqüentemente, o processo reprodutivo (PIRES et al., 2015). Para atingir as necessidades nutricionais adequadas e com baixo custo, os resíduos da agroindústria têm sido utilizados na alimentação animal, principalmente na época de escassez de forragens de boa qualidade (POMPEU, 2009). Dentre os subprodutos, os oriundos da mamona (*Ricinus communis L.*) vem ganhando destaque na alimentação de ruminantes. A mamona é uma planta oleaginosa nativa das regiões tropicais e subtropicais, cujo óleo extraído de suas sementes é rico em óleo glicídico, solúvel em álcool com inúmeras aplicações na indústria, sendo usado na fabricação de plásticos, fibras sintéticas, tintas, esmaltes, entre outros (FONSECA et al., 2004; BONFIM et al., 2009). A produção do óleo de mamona gera o farelo de mamona, um subproduto que normalmente é utilizado como adubo orgânico ou na alimentação animal como alternativa na substituição total ou parcial do concentrado proteico tradicional, farelo de soja

(SANTOS et al., 2013). O farelo de mamona possui cerca de 40% de proteína bruta (ROCHA et al., 2022), entretanto, há substâncias na mamona que limitam sua utilização na alimentação animal: ricina (proteína tóxica que inativa especificamente e irreversivelmente os ribossomos eucariotos); ricinina (alcaloide toxico) e o CB-1A (complexo alergênico) (POMPEU, 2009).

O complexo alergênico não é um fator limitante, pois sua alergenicidade só é danosa quando injetado ou absorvido pelo trato respiratório (BANDEIRA et al., 2004). Entre as três substâncias presentes, a ricina é o principal fator antinutricional devido à alta toxicidade. A ricina é encontrada, principalmente, no endosperma da mamona, permanecendo todo o componente toxico na torta ou no farelo (GAILLARD e PEPIN, 1999). A ricinina está presente em diversas partes da mamoneira, sendo que o seu teor pode variar de acordo com as partes da planta (MOSHKIN, 1986), parecendo não ser uma toxina tão potente quanto a ricina (TÁVORA, 1982). A intoxicação pela ricina presente nas sementes de mamona já foi identificada em grande número de espécies animais (ALEXANDER et al., 2008; GARLAND e BAILEY, 2006; SOTOBLANCO et al., 2002) e os sinais mais comuns de intoxicação são vômitos, seguido por depressão, diarreia aquosa que frequentemente evolui para diarreia sanguinolenta, e dor abdominal. Pode ocorrer ainda anorexia, hematêmese, fraqueza, hipertermia, ataxia, sialorreia, decúbito e taquicardia (ASLANI et al., 2007).

O valor nutritivo dos subprodutos da extração de óleo das sementes dessa oleaginosa depende diretamente do método de extração, da espécie, do grau de decorticação da semente (remoção da casca da semente) e do processamento do produto resultante (POMPEU, 2009). Dessa forma, vários métodos mecânicos (extração) e químicos (adição de solventes orgânicos) foram desenvolvidos para promover a destoxificação do farelo de mamona (POMPEU, 2009). O processo de extração do óleo para a obtenção do farelo consiste em cinco etapas, sendo a última etapa caracterizada por dessolventização, onde o material é submetido a 95 °C por 30 minutos para a evaporação do solvente, deixando-o seguro para ser consumido por ruminantes (POMPEU et al., 2020). Após este processo, o farelo de mamona pode ser inserido na dieta de ruminantes na forma peneirada (58% de proteína bruta) ou não peneirada (39 a 43% de proteína bruta) (ABDALLA et al., 2008), podendo substituir 100% do farelo de soja na alimentação de carneiros (ROCHA et al., 2022), uma vez que o preço deste insumo tem onerado o custo com a alimentação.

Devido a seu alto percentual proteico e boa digestibilidade, os resíduos da mamona têm sido alvo de muitos estudos que envolve os aspectos nutricionais e reprodutivos dos animais. Em seu estudo, Silva et al. (2013) não observaram efeitos deletérios sobre a

foliculogênese de ovelhas da raça Santa Inês alimentadas com torta de mamona destoxificada e outro estudo verificou que a concentração, motilidade e morfologia espermática de bodes mestiços não foram afetadas pela dieta contendo torta de mamona sem óleo (OLIVEIRA et al., 2015). Apesar desses resultados mostrarem que a torta de mamona não afeta os gametas de pequenos ruminantes, o uso do farelo de mamona dessolventizado na alimentação de carneiros e seus efeitos sobre a composição do plasma seminal ainda precisam ser avaliados.

O plasma seminal possui proteínas, açúcares e lipídios, além de outros componentes, que modulam as funções espermáticas e apresentam as relações com índices de fertilidade e congelabilidade do sêmen, sendo consideradas potenciais marcadores moleculares da capacidade reprodutiva dos animais (MOURA et al., 2011 RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Nos sistemas de produção de pequenos ruminantes, a eficiência reprodutiva é um dos fatores essenciais para a lucratividade (MATOS *et al.*, 1992), podendo ser aprimorada através do uso de biotecnias, e através da seleção de reprodutores testados e com alta capacidade fertilizante. Desse modo, é importante a inclusão de características reprodutivas dentre os parâmetros utilizados em sua seleção (ISLAM e LAND, 1977). A análise dos parâmetros seminais e da integridade da cromatina espermática são utilizados para definição de critérios mínimos aceitáveis para a seleção de reprodutores, assim como as dimensões testiculares, podendo contribuir para um expressivo melhoramento genético devido às suas correlações com a produção e qualidade seminal (YARNEY et al., 1990).

Portanto, objetivou-se, com os estudos: 1) analisar a composição proteica do plasma seminal de 12 carneiros Santa Inês alimentados com farelo de *Ricinus communis* dessolventizado utilizando a espectrometria de massas associada a cromatografia líquida (Estudo 1). 2) determinar o efeito das dietas sobre os parâmetros seminais, integridade da cromatina espermática e dimensões testiculares de carneiros Santa Inês alimentados com farelo de mamona industrialmente destoxificado (Estudo 2).

CAPÍTULO I

PROTEOMA DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS ALIMENTADOS COM FARELO DE *RICINUS COMMUNIS* DESSOLVENTIZADO

RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo analisar a composição proteica do plasma seminal de 8 carneiros Santa Inês alimentados com farelo de *Ricinus communis* dessolventizado, como fonte alternativa de proteína, utilizando espectrometria de massas LC-MS/MS. Os carneiros foram divididos em três grupos (FS - farelo de soja, FMDP – farelo de mamona dessolventizado peneirado e FMD – farelo de mamona dessolventizado) e o sêmen de todos os animais foi coletado por meio de eletroejaculador em intervalo de três dias, após 77 dias de alimentação. O plasma seminal foi então separado das células espermáticas, precipitado, quantificado e as proteínas foram digeridas com tripsina, dessalinizadas e analisadas por LC-MS/MS. A pesquisa de espectro peptídico foi realizada usando PatternLab V no qual permitiu a identificação em média de 849 proteínas no estudo, confirmando as BSPs (*Binder Sperm Proteins*) como as proteínas mais abundantes. Os genes foram selecionados para modulação potencial por miRNAs e identificou, principalmente, miRNAs ligados a toxicidade e neurotoxicidade. Os processos biológicos de cada grupo estavam ligados, principalmente, a resposta celular, processo metabólico, regulação biológica, localização e resposta a estímulos, enquanto que os componentes celulares estavam relacionados, em especial, a anatomia celular e complexos proteicos. As funções moleculares estavam diretamente associadas a atividade dependente de ATP, atividade catalítica e ligação. No presente estudo ficou claro que as principais proteínas plasmáticas foram identificadas independente da dieta fornecida no experimento. Como trabalhamos com um equipamento de alto poder de resolução e alta sensibilidade, levou-nos a identificar as proteínas relacionadas aos sintomas mais comuns de intoxicação por mamona, no grupo FMDP. Portanto, se faz necessário a análise dos parâmetros seminais para observar se há ou não influência do farelo de mamona na dieta desses animais, sem comprometer a sua fertilidade e assim afirmarmos que o farelo de soja pode ser substituído de forma integral pelo farelo de mamona.

Palavras-chave: fonte proteica, proteínas plasmáticas, subproduto.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the protein composition of the seminal plasma of 8 Santa Inês rams fed with desolventized *Ricinus communis* bran, as an alternative source of protein, using LC-MS/MS mass spectrometry. The rams were divided into three groups (FS - soybean meal, FMDP - sieved desolventized castor bean meal and FMD - desolventized castor bean meal) and the semen of all animals were collected using an electroejaculator in an interval of three days, after 77 days of feeding. The seminal plasma was then separated from the sperm cells, precipitated, quantified and the proteins were digested with trypsin, desalted and analyzed by LC-MS/MS. The peptide spectrum research was performed using PatternLab V, which allowed the identification of an average of 849 proteins in the study, confirming the BSPs (Binder Sperm Proteins) as the most abundant proteins. Genes were selected for potential modulation by miRNAs and identified mostly miRNAs linked to toxicity and neurotoxicity. The biological processes of each group were mainly linked to cellular response, metabolic process, biological regulation, localization and response to stimuli, while the cellular components were related, in particular, to cellular anatomy and protein complexes. Molecular functions were directly associated with ATP-dependent activity, catalytic activity and binding. In the present study, it was clear that the main plasma proteins were identified regardless of the diet provided in the experiment. As we worked with high resolution and high sensitivity equipment, it led us to identify the proteins related to the most common symptoms of castor bean poisoning in the FMDP group. Therefore, it is necessary to analyze the seminal parameters to observe whether or not there is influence of castor bean meal on the diet of these animals, without compromising their fertility and thus affirming that soybean meal can be completely replaced by castor meal.

Keywords: by-product, plasma proteins, protein source.

2.1 Introdução

A qualidade seminal impacta diretamente a taxa de fertilização, qualidade embrionária, e conseqüentemente no processo reprodutivo (PIRES et al., 2015), visando atingir as necessidades nutricionais adequadas e com baixo custo, os resíduos da agroindústria têm sido utilizados na alimentação animal, principalmente na época de escassez de forragens de boa qualidade (POMPEU et al., 2020). A mamona (*Ricinus communis L.*) é uma planta oleaginosa nativa das regiões tropicais e subtropicais, cujo óleo extraído de suas sementes é rico em óleo glicídico, solúvel em álcool com inúmeras aplicações na indústria (BONFIM et al., 2009; FONSECA et al., 2004). A produção do óleo de mamona gera o farelo de mamona, um subproduto que normalmente é utilizado como adubo orgânico ou na alimentação animal como alternativa na substituição total ou parcial do concentrado proteico tradicional, farelo de soja (SANTOS et al., 2013), podendo ser inserido na dieta na forma peneirada (58% de proteína bruta) ou não peneirada (39 a 43% de proteína bruta) (ABDALLA et al., 2008). Porém, há substâncias na mamona que limitam sua utilização na alimentação animal, tais como: ricina (proteína tóxica que inativa especificamente e irreversivelmente os ribossomos eucariotos); ricinina (alcaloide tóxico) e o CB-1A (complexo alergênico) (SEVERINO, 2005). Devido a seu alto percentual proteico os resíduos da mamona têm sido alvo de muitos estudos que envolvem os aspectos nutricionais e reprodutivos dos animais.

Silva et al. (2013) não observaram efeitos deletérios sobre a foliculogênese de ovelhas da raça Santa Inês alimentadas com torta de mamona destoxificada e outro estudo verificou que a concentração, motilidade e morfologia espermática bodes mestiços não foram afetadas pela dieta contendo torta de mamona sem óleo (OLIVEIRA et al., 2015). Apesar desses resultados mostrarem que a torta de mamona não afeta os gametas de pequenos ruminantes, o uso do farelo de mamona dessolventizado na alimentação de carneiros e seus efeitos sobre a composição do plasma seminal ainda precisam ser avaliados.

O plasma seminal possui proteínas, açúcares e lipídios, além de outros componentes, que modulam as funções espermáticas e apresentam as relações com índices de fertilidade e congelabilidade do sêmen, sendo consideradas potenciais marcadores moleculares da capacidade reprodutiva dos animais (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; MOURA et al., 2011). Portanto, objetivou-se, no presente estudo, analisar o proteoma do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês alimentados com diferentes fontes proteicas, utilizando “label-free mass spectrometry” e ferramentas de bioinformática.

2.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado sob o Protocolo nº 3155291019, conforme a Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, no Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

2.2.1 Localização, delineamento experimental e extração do óleo da mamona

O experimento foi realizado no Núcleo de Ensino e Estudos em Forragicultura (NEEF/DZ/CCA/UFC), em Fortaleza-Ceará. Foram utilizados 12 ovinos machos não castrados da raça Santa Inês, com aproximadamente 20 kg e oito meses de idade. Todos os animais foram vermifugados e receberam suplementação de vitaminas A, D e E injetável por via subcutânea. Os animais foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, quatro repetições por tratamento, em função das dietas: farelo de soja; farelo de mamona dessolventizado (FMD) e farelo de mamona dessolventizado peneirado (FMDP), em peneira de 30 *mesh* (orifícios de 0,5 mm). O volumoso utilizado no experimento foi o feno de capim-tifton 85 (*Cynodon* sp.) e as dietas foram elaboradas de modo que fossem isoproteicas e isoenergéticas e continham uma relação volumoso: concentrado de 40:60, prevendo ganho de peso médio diário de 200 g dia⁻¹ (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Composição centesimal das rações experimentais utilizadas

Ingredientes	Farelo de Soja	FMD	FMDP
	(% MS)		
Feno Tifton 85	50	50	50
Milho moído	47	49,78	51,45
Farelo de soja	10,7	-	-
FDM	-	9,2	-
FMDP	-	-	7,73
Calcário	1	0,62	0,71
Ureia	0,1	0,4	0,1

FMD: Farelo de mamona dessolventizado; FMDP: Farelo de mamona dessolventizado peneirado; MS: Matéria seca.

Tabela 2. Composição químico-bromatológico dos ingredientes e das rações experimentais utilizadas

Ingredientes	MS (g/kg MN)	MO (g/kg MN)	MM (g/kg MS)	PB (g/kg MS)	EE (g/kg MS)	FDN (g/kg MS)	FDA (g/kg MS)	NDT (g/kg MS)
Feno	847	928	72	104	25	787	375	460
Milho	873	983	17	67	61	135	26	833
Farelo de Soja	884	924	76	476	27	161	93	818
FMD	893	885	115	454	12	355	275	707
FMDP	884	858	142	587	13	173	90	811
Concentrado								
Farelo de soja	870	944	56	184	61	147	49	859
FMD	872	951	49	184	58	172	61	871
FMDP	896	944	56	182	58	125	32	850

FMD: Farelo de mamona dessolventizado; FMDP: Farelo de mamona dessolventizado peneirado; MS: Matéria seca; MM: Matéria mineral; MO: Matéria orgânica; PB: Proteína Bruta; EE: Extrato etéreo; FDN: Fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: Fibra insolúvel em detergente ácido; NDT: Nutrientes digestíveis totais.

Os animais foram mantidos em baias de madeira individuais, com área de aproximadamente 1,12m², durante 77 dias, nos quais os 14 primeiros dias foram para adaptação dos animais às dietas e ao ambiente experimental. As baias eram dotadas de cochos para o fornecimento do alimento, bebedouros com água à disposição e sal mineral *ad libitum*, sendo esses animais pesados semanalmente durante todo o período experimental.

O farelo de mamona foi obtido por meio do processamento da semente de *Ricinus communis* da indústria Azevedo Óleos Ltda., localizada no município de Itupeva, SP. O material obtido é oriundo de processo composto por cinco etapas, sendo a última etapa caracterizada por dessolventização, onde o material é submetido a 100 °C a 110 °C por duas horas para a evaporação do solvente, deixando-o seguro para ser consumido por ruminantes (POMPEU et al., 2020). Após este processo, o farelo de mamona foi inserido na dieta dos carneiros na forma peneirada contendo 58% de proteína bruta e forma não peneirada contendo de 39 a 43% de proteína bruta.

2.2 Coleta do sêmen

Três coletas de sêmen de cada animal foram realizadas por meio de eletroejaculador (eletroejaculador Torjet - 65; Eletrovet, Brasil; Souza et al. 2010), em um intervalo de três dias, após 77 dias de alimentação. Alíquotas de sêmen foram retiradas para as análises dos parâmetros seminais e ao restante do sêmen foi adicionado inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e, em seguida, centrifugado (700 x g, 10 minutos, 4 °C), para separação do plasma seminal e células espermáticas. As células espermáticas foram congeladas e o plasma seminal foi transferido para um novo tubo e novamente centrifugado (10.000 x g, 15 minutos, 4 °C), dividido em alíquotas e armazenado a -20 °C.

2.2.3 Precipitação do plasma seminal com acetona fria

Amostras de plasma seminal (30 µL / tubo) foram descongeladas em temperatura ambiente e submetidas à precipitação de proteínas com adição de acetona fria (-20 °C; 1:9, v:v) e incubados *overnight* a -20 °C. Após a incubação, a mistura (amostra + acetona) foi submetida centrifugada (12.000 × g, 30 minutos, 4 °C), o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi seco sob vácuo (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA) durante 20 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em 30 µL de bicarbonato de amônio (50mM) e armazenado a -20 °C.

2.2.4 Quantificação de proteínas

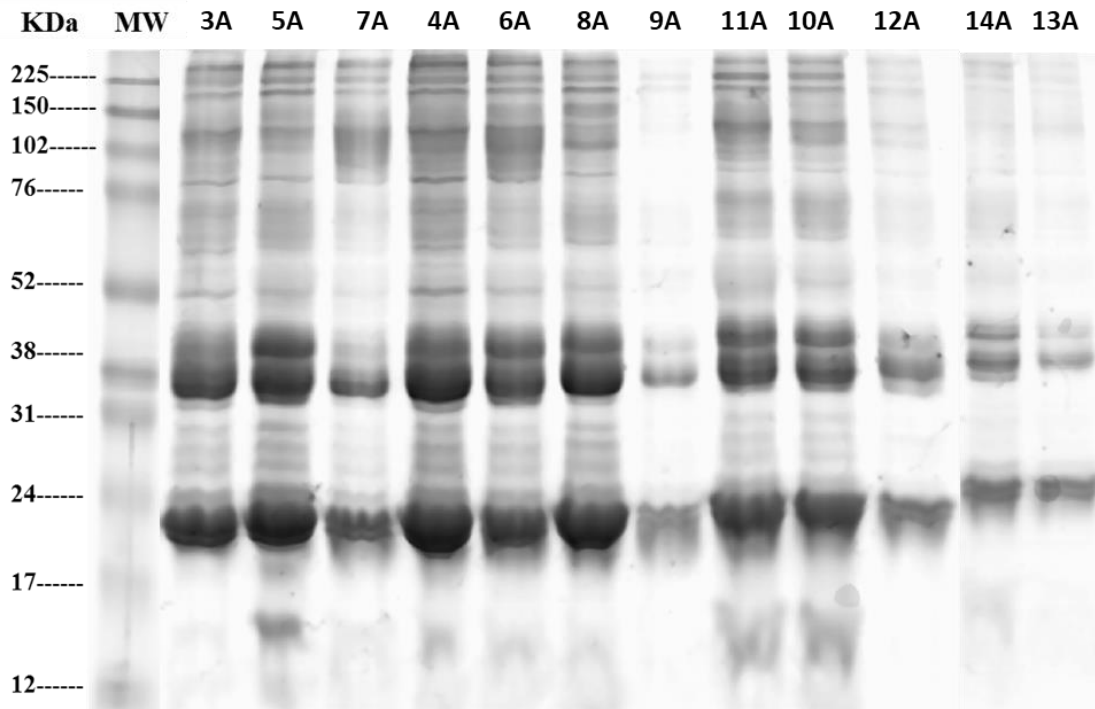
Uma alíquota (3µL) de cada amostra foi previamente descongelada e diluída em 27 µL de PBS (Phosphate buffered saline) para determinação da concentração de proteína total pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA-Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) como padrão.

2.2.5 SDS-PAGE

A eletroforese unidimensional do plasma seminal dos 12 carneiros foi realizada para verificar a integridade das proteínas plasmáticas (Figura 1), e confirmar a presença dos

grupos proteicos mais importantes relacionados a modulação e a preparação dos espermatozoides para o processo de fertilização e transmissão do material genético masculino.

Figura 1. SDS-PAGE do plasma seminal de carneiros Santa Inês



Para eletroforese unidimensional, um volume contendo 20 μ g de proteínas de cada animal foi misturado com 20 μ L de tampão de amostra (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% (v/v) glicerol, 0,2 M DTT, 0,02% de azul de bromofenol), aquecido por 90 segundos e carregado nos poços de um gel de empilhamento (4% de acrilamida), colocado em um gel de poli-acrilamida com gradiente de 12,5%. Em um poço de gel de empilhamento, 6 μ l de mistura padrão de peso molecular de 225-12 kDa (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) foi carregado para permitir a estimativa do peso molecular das bandas de proteína.

Uma corrente de 25 mA por gel foi aplicada por 2 h para fazer com que as proteínas migrassem lentamente através do gel de empilhamento. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue (CBB-R250) por 12 h, e descolorido após várias lavagens em solução contendo metanol (40%), ácido acético (10%) em água duplamente destilada. Após a descoloração, o gel foi escaneado em 300 dpi (Image Scanner, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) e salvo como um arquivo TIFF.

Os mapas de proteínas unidimensionais foram analisados usando o software Quantity One®, v.4.6.3 (Bio-Rad, Rockville, MD, EUA). O peso molecular de cada banda foi

determinado de acordo com o marcador molecular (Amersham ECL Rainbow Molecular Weight Markers; GE LifeSciences, Piscataway, NJ, EUA) usando um modelo de regressão ponto a ponto disponível no software Quantity One® (Bio-Rad, Rockville, MD, EUA).

2.2.6 Tripsinização e dessalinização

As proteínas plasmáticas (60 µg) foram alíquotadas em microtubos e para cada amostra, 10 µL de 8 M ureia foi acrescentado. Todo o processo de digestão seguiu conforme publicado por Otavio et al. (2022). Em resumo, 5 mM de DTT foram adicionados, seguido de incubação a 56 °C por 25 minutos. Além disso, como um processo de alquilação, IAA foi adicionado para atingir uma concentração final de 14 mM. A mistura foi incubada a 21 °C a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Antes da digestão das proteínas, DTT foi adicionado para atingir uma concentração final de 5 mM em um volume final de 21 µL.

As amostras foram diluídas em 50 mM de bicarbonato de amônio, em uma razão de 1/5, para reduzir a concentração de ureia para 1,6 M. Foi adicionado 1 mM final de Cloreto de Calcio e então todas as amostras foram digeridas com tripsina (Promega, Madison, WI, USA) com uma razão enzima/substrato de 1/50 (p/p) e incubado a 37 °C por 16h. Uma solução de TFA (Ácido Trifluoroacético) foi adicionada a uma concentração final de 0,4 % para interromper a atividade trípica (Arshid et al., 2017). Para realização da dessalinização dos peptídeos foram utilizadas SEP colunas (Sep-Park tC18, Waters).

Para ativar a coluna foi adicionado 3 mL de ACN (Acetonitrila) 100%, em seguida as colunas foram equilibradas com 1 mL 50/50 de ACN e água ultra-pura (Milli-Q) com 0,1% de ácido fórmico e 3 mL de TFA (Ácido trifluoroacético). Por fim, as amostras digeridas foram adicionadas às colunas e as mesmas foram lavadas para remover o sal da amostra com 3 mL de TFA 0,1%. As colunas foram equilibradas com 1 mL de ácido fórmico 0,1%. Para eluir os peptídeos foram adicionados 2 mL 50/50 ACN e água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico. Posteriormente os peptídeos foram eluídos mais uma vez com 1 mL 80/20 ACN e água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram liofilizadas e armazenadas a -80 °C até o dia da análise. Todas as amostras foram novamente submetidas à quantificação de peptídeos antes da análise de espectrometria de massa (Qubit™; Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA).

2.2.7 Label-free mass spectrometry

Peptídeos trípticos (1 μg) foram analisados em um sistema cromatográfico com colunas capilares (nano-UHPLC Dionex Ultimante 3000) acopladas a um espectrômetro de massa híbrido quadrupolo-orbitrap, Orbitrap Q Exactive™ Plus (Thermo Scientific, Alemanha). Os solventes utilizados nas corridas foram: solvente A (0,1% ácido fórmico em água) e solvente B (acetonitrila/0,1% ácido fórmico 80/20). O sistema cromatográfico consistiu em duas colunas. Primeiro, uma pré-coluna Acclaim™ PepMap™ 100 C18 (300 μm \times 5 mm) contendo partículas esféricas de sílica de 5 μm de diâmetro com tamanho de poro de 100 Å (Thermo Fisher, EUA), onde as amostras foram injetadas a uma taxa de fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, com 98% de solvente A e 2% de solvente B.

Em seguida, os peptídeos foram separados em uma coluna analítica PicoCHIP® (75 μm \times 25 cm, ponta de 15 μm), empacotada com partículas de Reprosil-PUR C18 de 1,9 μm , tamanho de poro de 120 Å (Novo Objetivo, EUA), através de um gradiente de eluição com solvente B (2-40% durante 170 min.; 40-85% durante 15 min.; passo isocrático de 85% durante 5 min.), seguido de um passo isocrático de 2% de solvente B durante 19 min. e 30 segs. para reequilibrar a coluna. A interface entre o nanoLC e o espectrômetro de massas híbrido seguiu o controle automático do equipamento, utilizando o software Xcalibur 4.1.31.9 (Thermo Scientific, EUA). A ionização do peptídeo foi realizada em uma fonte de íons PicoCHIP nanoelectrospray (New Objective, EUA), com voltagem de pulverização ajustada em 2,5 kV e temperatura capilar de transferência em 250 °C.

Os espectros de MS foram adquiridos no modo positivo, com aquisição dependente de dados (DDA). O ciclo DDA consistiu em uma varredura de pesquisa compreendendo faixa de 200-2000 m/z sob resolução de 140.000 FWHM (largura total na metade do máximo) a m/z 400 e com um valor alvo de controle de ganho automático (AGC) de 3×10^6 íons para todas as varreduras FTMS e tempo máximo de preenchimento de 45 ms. A varredura de pesquisa foi seguida por fragmentação MS/MS por dissociação de colisão de alta energia (HCD) dos 20 íons precursores mais abundantes em cada momento, sob 30% de energia de colisão, com 17.500 FWHM em m/z 400, um valor alvo de AGC de 1×10^6 íons e um valor mínimo de 8×10^3 íons para todas as varreduras FTMS e um tempo de preenchimento máximo de 60 ms. Íons precursores previamente fragmentados foram excluídos dinamicamente por 10 s.

2.2.8 Pesquisa de banco de dados e identificação de proteínas

A busca e filtragem de correspondência de espectro de peptídeos foi realizada usando o mecanismo de busca Comet (versão 2019.01), incorporado no PatternLab for Proteomics (versão V, <http://patternlabforproteomics.org>; CARVALHO et al., 2016). Sequências não revisadas de *Ovis aries* foram baixadas do UniProtKB (35.607 entradas; 10 de setembro de 2021, <http://www.uniprot.org/>). A pesquisa final do banco de dados, usando a ferramenta Search Database Generator do PatternLab, incluiu um chamariz reverso para cada sequência alvo mais sequências comuns, como BSA, queratina, ubiquitina e tripsina.

Os parâmetros de pesquisa incluíram: candidatos a peptídeos totalmente específicos com massas entre 500 e 6000 Da, até duas clivagens perdidas, 40 ppm para massa precursora e bins de 1,0005 m/z para MS/MS. Modificações fixas e variáveis foram definidas como carbamidometilação da cisteína e oxidação da metionina, respectivamente. A validação de correspondências de espectro de peptídeos (PSMs) foi avaliada usando o Search Engine Processor (SEPro). Para cada resultado, XCorr, DeltaCN, DeltaMass, SpecCount Score e os valores de pontuação secundária do Comet foram usados para gerar um discriminador Bayesiano e uma pontuação de corte foi estabelecida para aceitar 1% de taxa de falsa descoberta (FDR). Foi necessário um comprimento mínimo de sequência de 6 resíduos de aminoácidos e os resultados foram filtrados para aceitar apenas PSMs com erro de massa de precursor inferior a 6 ppm. O filtro de pós-processamento resultou em um FDR global, no nível de proteína, inferior a 1% e foi independente do estado triptico, sendo necessários pelo menos 2 peptídeos/proteína para identificação.

2.2.9 Análise bioinformática

Todos os genes dos três grupos foram selecionados para modulação potencial por miRNAs, usando o conjunto de dados *Homo sapiens* miRBase (<http://www.mirbase.org>; KOZOMARA e GRIFFITHS-JONES, 2011) e servidor miRNet 2.0 (<https://www.mirnet.ca>; CHANG et al., 2020). A análise da ontologia gênica (processo biológico, função molecular e componentes celulares) do conjunto de proteínas detectadas, de cada grupo, foi realizado através do Panther 17.0 (<http://www.pantherdb.org>), usando o banco de dados UniProtKB (PATHAN et al., 2015).

Clusters funcionais de todas as proteínas do plasma seminal foram analisados por grupo, através da plataforma Metascape (<https://metascape.org>), de acordo com pontuações de enriquecimento e valores p (Zhou et al., 2019). O Kyoto a Enciclopédia de Genes e Genomas

(KEGG) foi realizada através da plataforma DAVID (Functional Annotation Bioinformatics Analysis; <https://david.ncifcrf.gov>) para analisar as vias mais representativas. Esta ferramenta também foi empregada para realizar as vias de KEGG. Metascape foi utilizado para análise *in-silico* na interação proteína-proteína com base em previsões coletadas de associações diretas (físicas) ou indiretas (funcionais) das proteínas identificadas, integrando evidências do contexto genômico, co- expressão e dados da literatura.

2.3 Resultados

As análises realizadas por LC-MS/MS permitiram a identificação em média de 409 proteínas no plasma seminal dos carneiros do grupo farelo de soja, 240 proteínas no farelo de mamona dessolventizado peneirado e 200 proteínas no farelo de mamona dessolventizado não peneirado. Todas as proteínas listadas foram caracterizadas de acordo com o Uniprot Database (Tabela suplementar 1, 2 e 3), no qual nossos resultados mostraram que as BSPs foram as proteínas mais abundantes dos três grupos (FS, FMDP e FMD) com base na pontuação de enriquecimento e contagem de espectro (Tabela 3). Além das BSPs identificadas nos grupos, destacamos também as espermadezinas e as clusterinas, por estarem presentes nos três grupos e por serem os principais constituintes do plasma seminal.

A junção dos genes dos grupos FMDP e FMD foram submetidos ao miRNet, no qual o banco de dado do software possibilitou a identificação de 5 principais genes: *ECMI*, *PYY*, *LPO*, *MSMB* e *EDIL3* (Figura 2). Destes, havia 79 miRNAs associados aos 5 genes identificados pelo programa. Usando o módulo explorador do servidor miRNet, os miRNAs recuperados modulam a expressão de genes envolvidos na toxicidade (12 miRNAs), apoptose (16 miRNAs), divisão celular (7 miRNAs), neurotoxicidade (6 miRNAs), cardiotoxicidade (5 miRNAs) dentre outros. A lista dos genes selecionados, miRNAs e sequências estão disponíveis como informações de suporte (Tabela 4).

Tabela 3. Lista das 10 proteínas mais abundantes encontradas no plasma seminal de carneiros de cada grupo

Código de acesso à proteína	Gene (UniProt) ^a	Farelo de soja		Descrição da proteína
		<i>Protein score</i>	<i>Spectrum count</i>	
A0A6P7E628	LOC105615578	83.298	810	Mucina-2
A0A6P9FQI0	BSP1	79.166	779	BSP 1
A0A6P3TM89	LOC101113728	146.905	590	Clusterina
A0A6P9FQA8	BSP5	57.072	465	BSP 5
A0A6P7E5E6	EDIL3	153.275	444	EGF
A0A6P3EGV0	MSMB	80.732	443	Beta-microseminoproteína
A0A6P3TIH8	LOC105613767	108.051	378	Ribonuclease inativa
A0A6P3T587	LOC101117129	179.694	360	Inibidor da anidrase carbônica
A0A6P3CWI7	LPO	127.17	342	Lactoperoxidase
A0A6P3Y PQ4	LOC101111505	89.073	342	Espermadesina Z13
Farelo de mamona dessolventizado peneirado - FMDP				
A0A6P9FQI0	BSP1	97.951	558	BSP 1
A0A6P3EK34	LOC101110099	62.88	307	Membro 1D da família da secretoglobina
A0A6P7E5E6	EDIL3	130.523	278	EGF
A0A6P7E628	LOC105615578	57.439	258	Mucina-2
A0A6P3TM89	LOC101113728	82.319	244	Clusterina
A0A6P9FQA8	BSP5	36.333	243	BSP 5
A0A6P3E512	FETUB	80.969	238	Fetuina-B
A0A6P3T587	LOC101117129	110.69	229	Inibidor da anidrase carbônica
A0A6P3TIH8	LOC105613767	48.521	225	Ribonuclease inativa
A0A6P3Y PQ4	LOC101111505	58.384	184	Espermadesina Z13
Farelo de mamona dessolventizado – FMD				
A0A6P9FQI0	BSP1	75.872	544	BSP 1
A0A6P9FQA8	BSP5	37.57	328	BSP 5

A0A6P3TM89	LOC101113728	80.858	289	Clusterina
A0A6P3E512	FETUB	53.884	253	Fetuina-B
A0A6P3EK34	LOC101110099	29.312	250	Membro 1D da família da secretoglobina
A0A6P7E5E6	EDIL3	90.29	244	EGF
A0A6P7E628	LOC105615578	25.629	228	Mucina-2
A0A6P7EFZ6	LOC554335	60.743	225	Enzima conversora de angiotensina
A0A6P3TIH8	LOC105613767	55.769	213	Ribonuclease inativa
A0A6P3YPQ4	LOC101111505	52.746	190	Espermadesina Z13

Figura 2. Análise e conjunto gênico de miRNAs associados aos 5 genes identificados pelo programa com base nos maiores valores-P obtidos do banco de dados miRNe

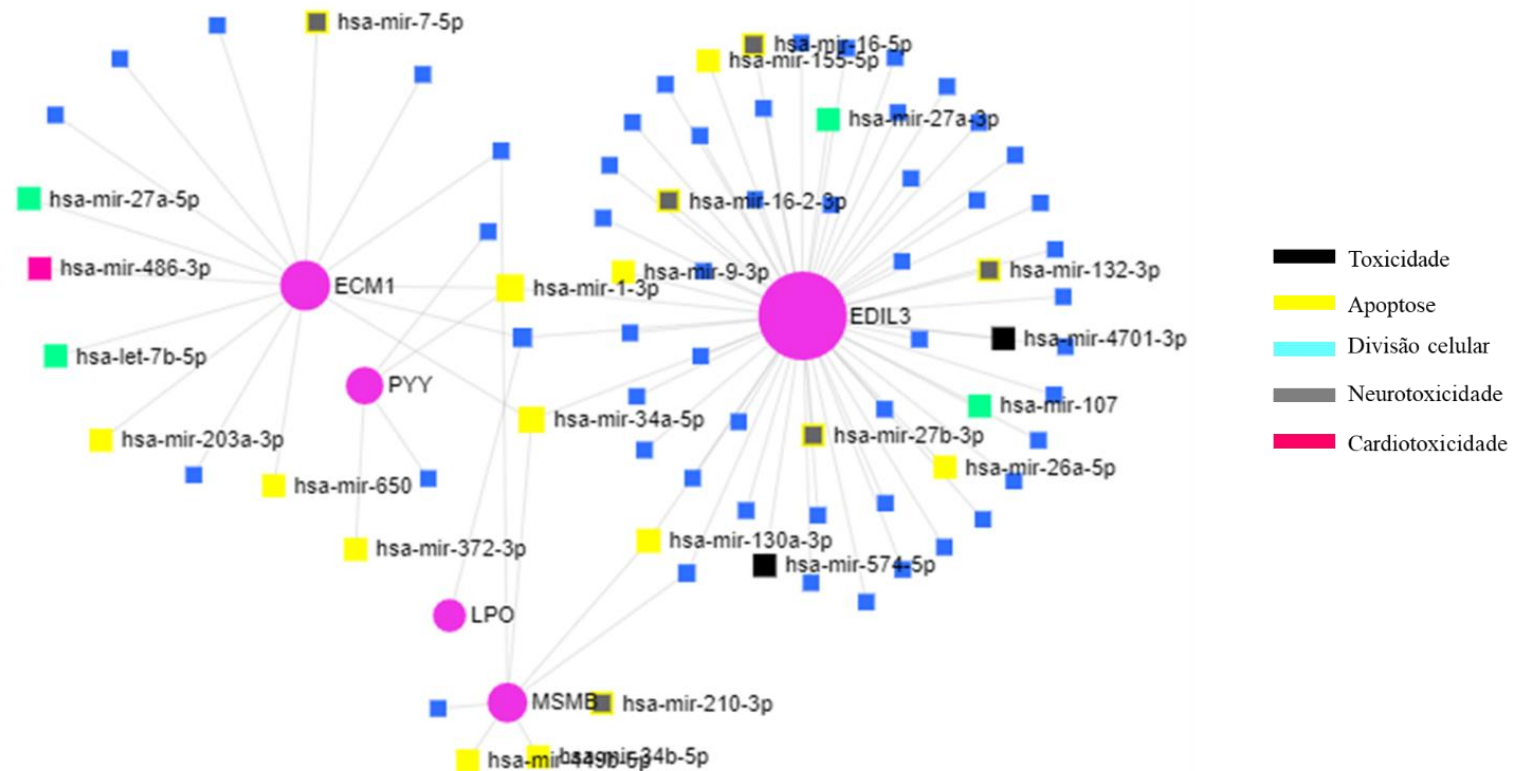


Tabela 4. Análise KEEG pathways utilizando o servidor DAVID para genes relacionados ao plasma seminal dos três grupos.

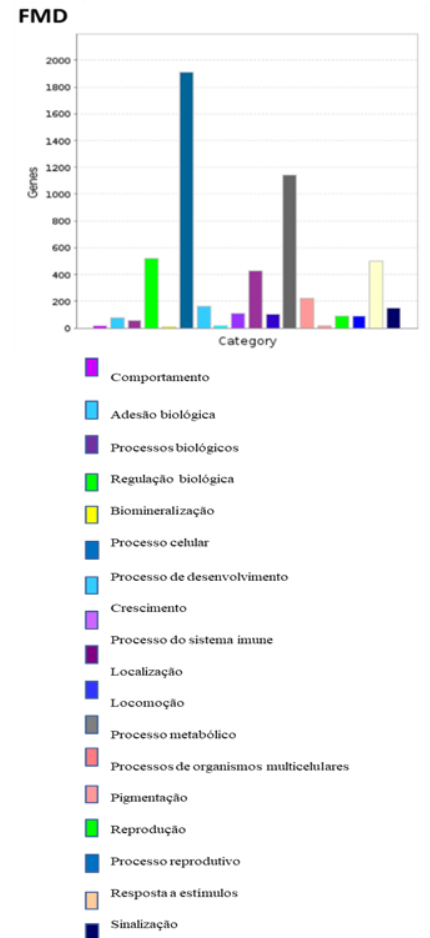
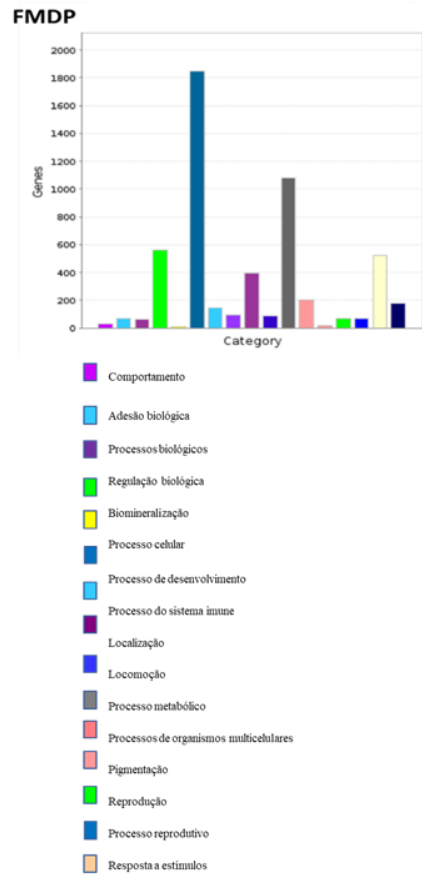
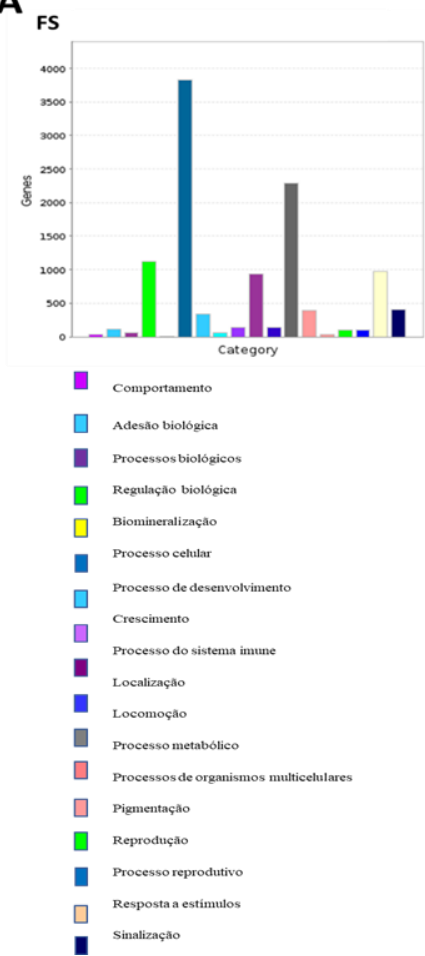
Pathways	FS – Farelo de soja		<i>Fold enrichment</i>	<i>P-value</i>	FDR	<i>Enrichment score</i>
	<i>Gene count</i>	<i>Percentage (%)</i>				
Proteassoma	24	4.61	14.60	8.16 ⁽⁻²²⁾	1.80 ⁽⁻¹⁹⁾	14.62
Junção Gap	15	2.88	4.66	3.07 ⁽⁻⁰⁶⁾	3.40 ⁽⁻⁰⁵⁾	6.54
Apoptose	12	2.30	2.30	0.014	0.05	3.25
Digestão e absorção de carboidratos	7	1.34	4.26	0.005	0.02	2.24
Absorção mineral	8	1.53	3.39	0.008	0.03	2.24
FMDP – Farelo de mamona dessolventizado peneirado						
Glicólise/Gliconeogênese	17	6.85	14.89	1.09 ⁽⁻¹⁴⁾	1.92 ⁽⁻¹²⁾	11.18
Metabolismo do carbono	19	7.96	9.34	1.04 ⁽⁻¹²⁾	9.14 ⁽⁻¹¹⁾	11.18
Biossíntese de aminoácidos	12	4.83	9.94	2.37 ⁽⁻⁸⁾	8.72 ⁽⁻⁷⁾	11.18
Metabolismo do piruvato	7	2.82	8.46	1.55 ⁽⁻⁰⁴⁾	3.09 ⁽⁻⁰⁴⁾	3.25
Processamento de proteínas no retículo endoplasmático	8	3.22	2.79	0.02	0.10	1.23
FMD – Farelo de mamona dessolventizado						
Glicólise/Gliconeogênese	20	7.87	18.29	0.00	6.83 ⁽⁰²⁾	15.17
Contração do músculo cardíaco	6	2.36	4.16	0.01	0.06	2.57
Digestão e absorção de proteínas	6	2.36	2.84	0.05	0.20	2.57
Proteassoma	5	1.96	68.58	0.00	0.03	2.19
Processamento de proteínas no retículo endoplasmático	9	3.54	3.28	0.00	0.03	1.55
Metabolismo de nucleotídeos	6	2.36	4.50	0.01	0.06	1.24

Foi realizado o “upload” de 1638 códigos de acesso do grupo FS, 958 códigos do grupo FMDP e 803 códigos de acesso do grupo FMD, sem contaminantes, proteínas não caracterizadas, *low quality proteins* e Queratina, através do Uniprot, no intuito de converter os códigos para genes *names*. Identificou-se 563 genes no grupo FS, 279 no grupo FMDP e 277 genes no grupo FMD. A lista de genes de cada grupo foi analisada na plataforma Metascape e foram associados a 20 *clusters* funcionais enriquecidos. (Figura 4). Dentre estes 20 agrupamentos, foram selecionados os cinco mais significativos de cada grupo de acordo com o escore de enriquecimento e valor-P.

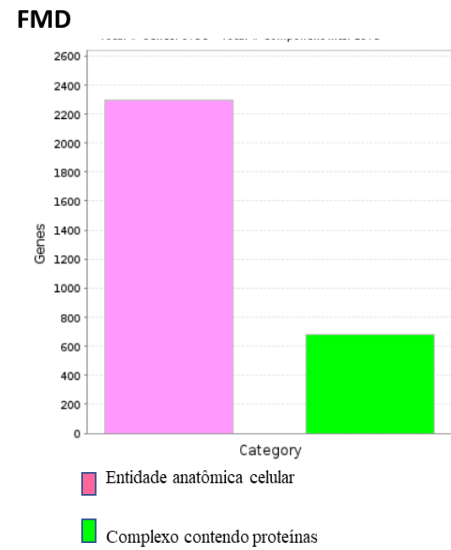
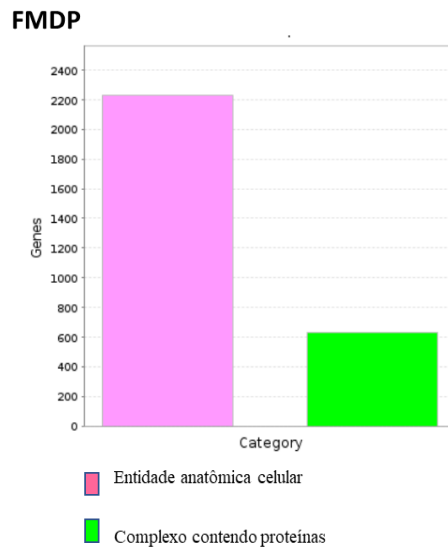
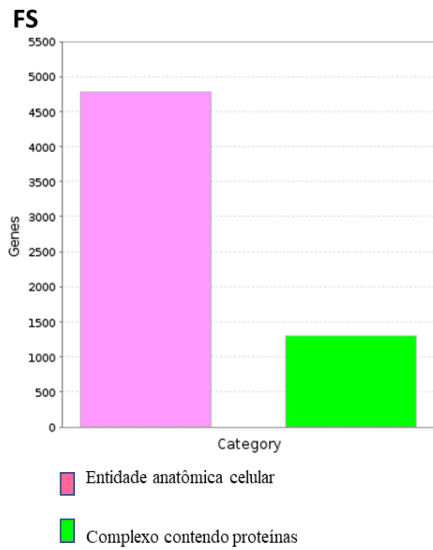
No grupo FS os genes foram associados à degranulação de neutrófilos, papel da GTSE na progressão G2/M após o *checkpoint* G2, metabolismo de carboidratos, formação de intermediários de dobramento da tubulina e hemostasia e outros. Já no grupo FMDP os genes foram associados à glicólise e gliconeogênese, reconhecimento de óvulos pelo espermatozoide, degranulação de neutrófilos, regulação de proteólises e dobramento de proteína. Enquanto no grupo FMD os genes estavam associados à degranulação de neutrófilos, glicólise e gliconeogênese, dobramento de proteínas, papel da GTSE na progressão G2/M após o *checkpoint* G2 e via do sistema proteossoma ubiquitina

Figura 3. Diagrama da ontologia gênica demonstrando a distribuição funcional das proteínas mais abundantes no plasma seminal de ovinos da raça Santa Inês. A distribuição foi feita com base em processos biológicos (A), componentes celulares (B) e funções moleculares (C) de cada tratamento. FS – Farelo de soja; FMDP – Farelo de mamona dessolventizado peneirado e FMD – Farelo de mamona peneirado.

A



B



C

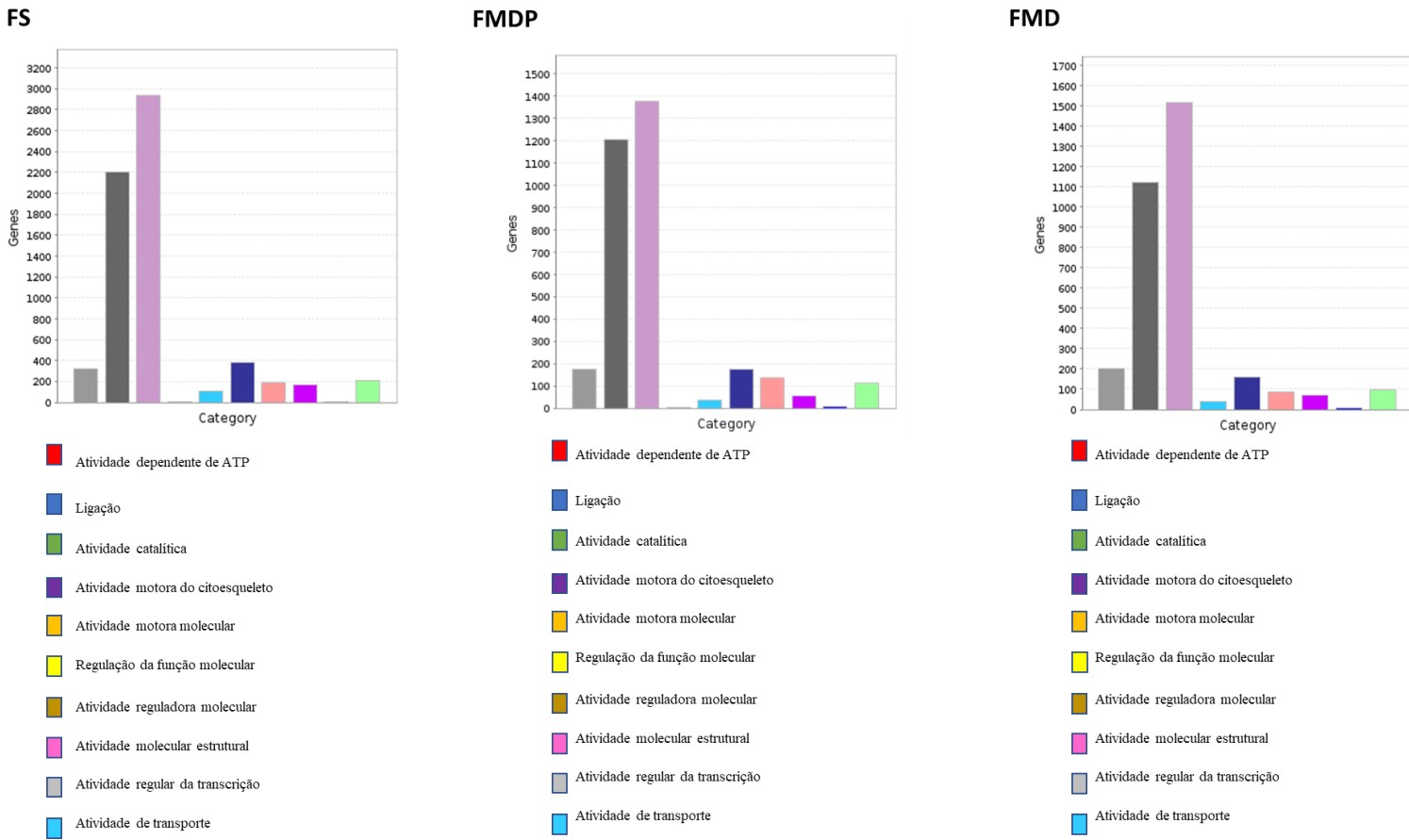
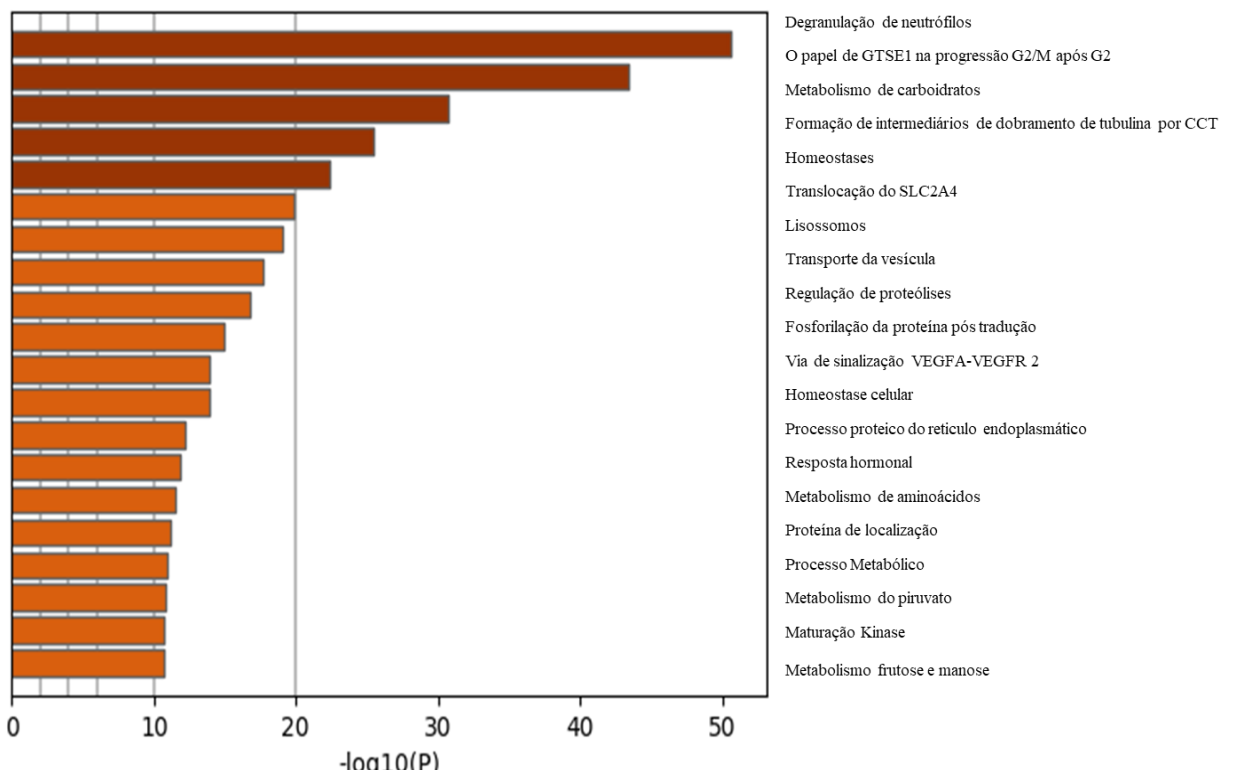
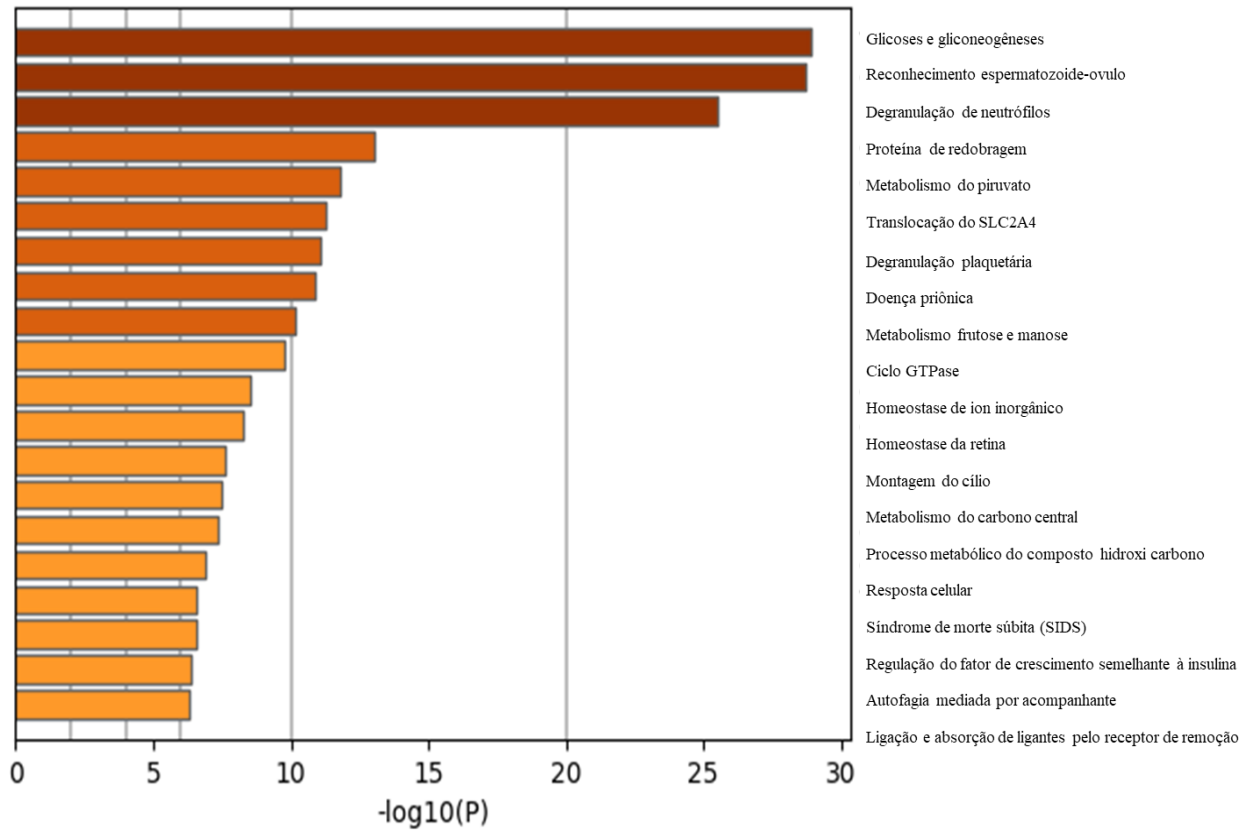
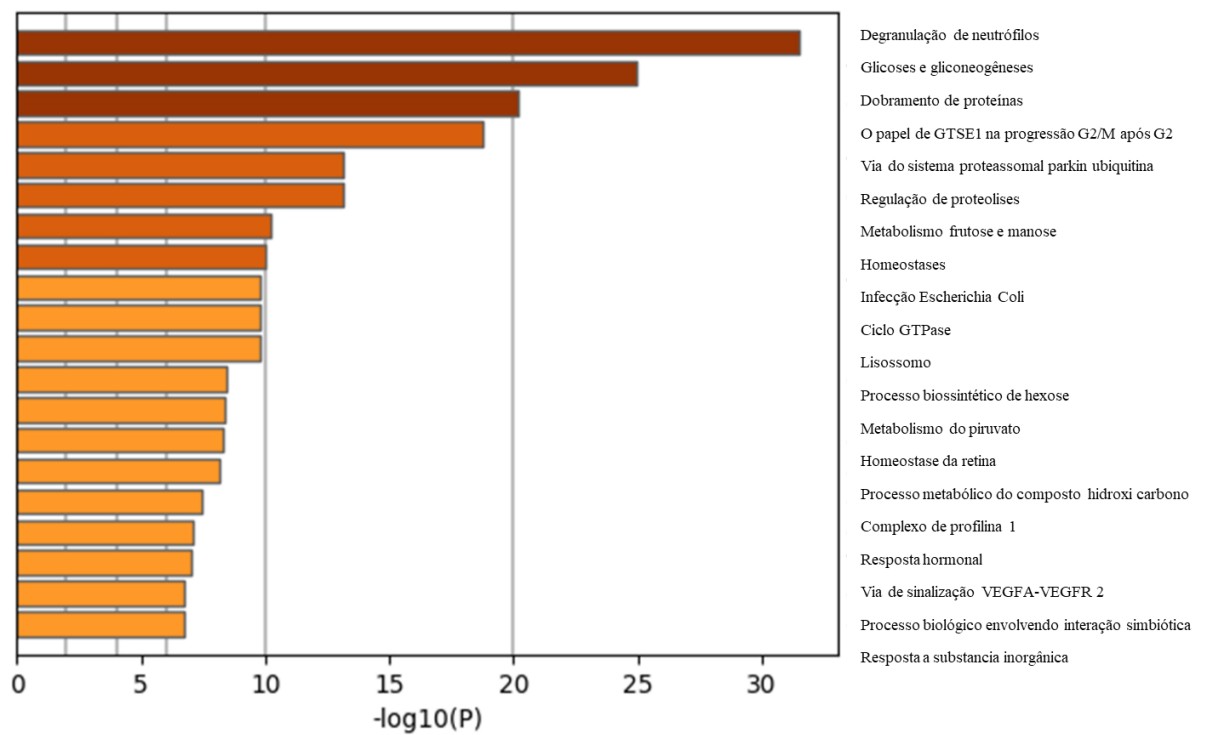


Figura 4. Agrupamentos de proteínas identificadas no plasma seminal de cada grupo, conforme determinado pelo Metascape_ A - FS – Farelo de soja; B - FMDP – Farelo de mamona dessolventizado peneirado e C - FMD – Farelo de mamona peneirado

A



B**C**

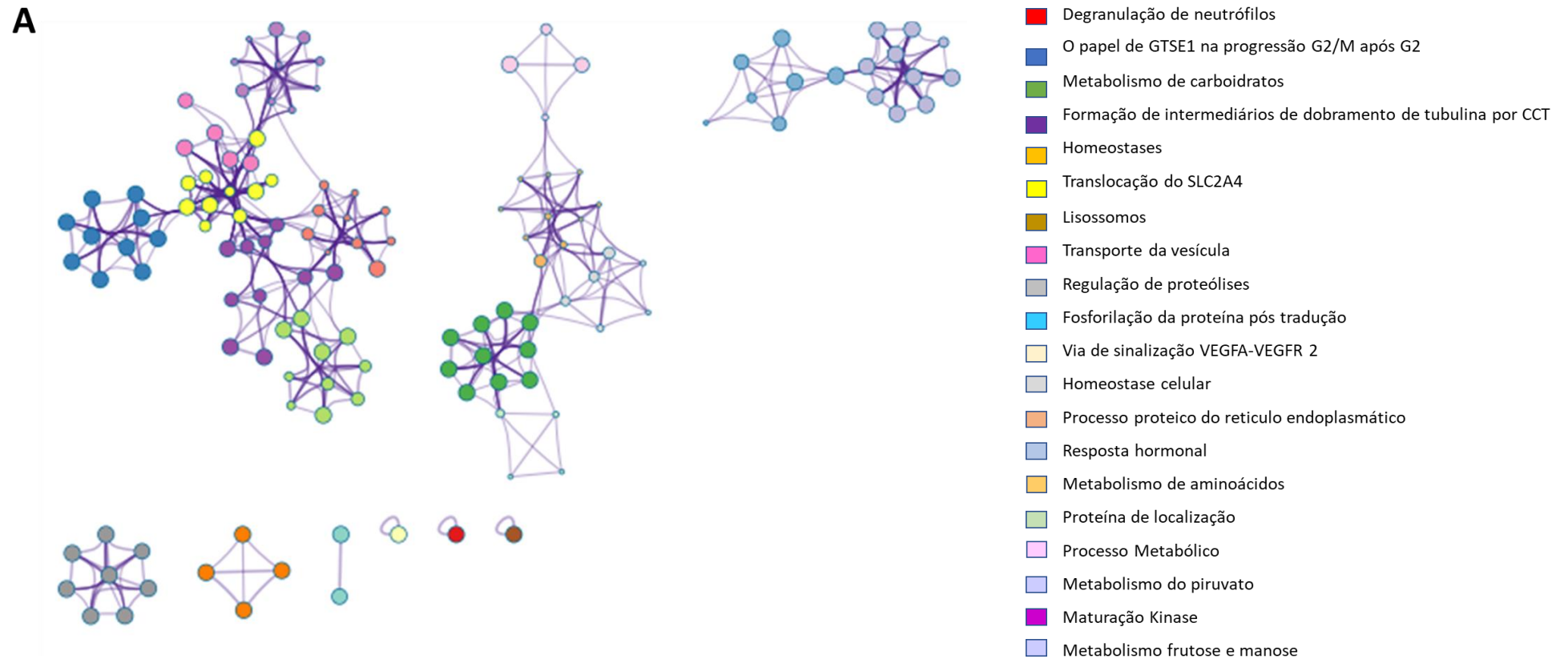
A interação proteína-proteína no grupo FS permitiu a visualização da translocação GLUT4, transporte mediado por vesícula, formação de tubulina, papel da GTSE e metabolismo de carboidratos, enquanto observou-se uma interação mais fraca entre os grupos resposta hormonal e regulação de proteólises (Figura 5). As vias de degranulação de neutrófilos, homeostases, lisossomos, VEGFA-VEGFR2, fosforilação de proteínas pós-traducionais e regulação de proteólise não apresentaram interação com outros grupos proteicos (Figura 5).

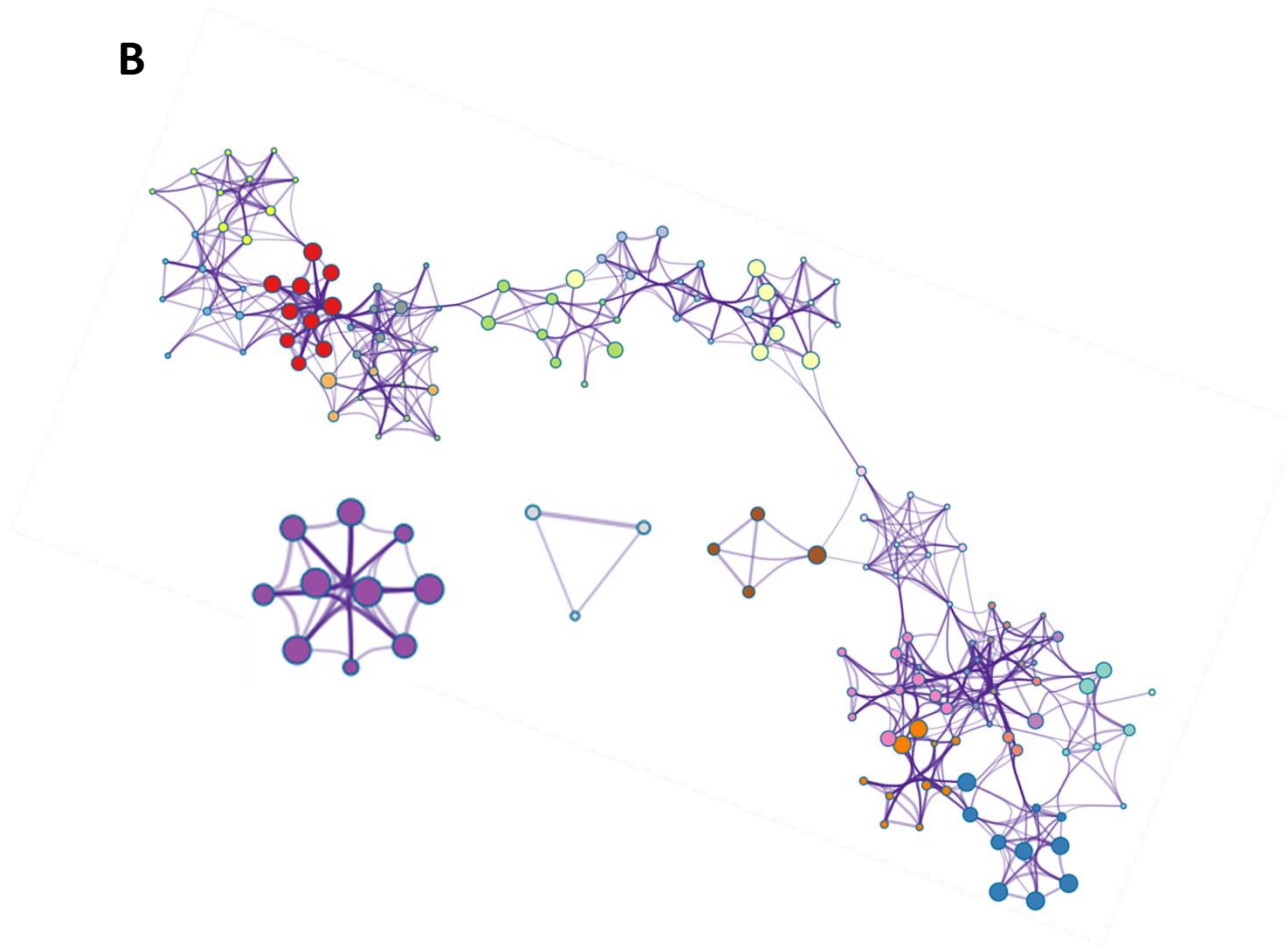
No grupo FMDP foi possível observar a glicólise e gliconeogênese, metabolismo do piruvato, reconhecimento do óvulo pelo espermatozoide, redobramento de proteína, metabolismo da frutose, degranulação do neutrófilo, homeostases de íons inorgânicos e ciclo da GTP, enquanto foi observado uma fraca interação na via de regulação da proteólise e metabolismo do câncer (Figura 5).

No grupo FMD foi observado a interação glicólises e gliconeogêneses, metabolismo da frutose, via do sistema proteossoma ubiquitina, homeostases, resposta a hormônios, processos biológicos, dobramento de proteínas e papel da GTS1. Enquanto as vias de degranulação de neutrófilos e regulação de proteólises não interagiram com as demais vias (Figura 5).

As vias do KEGG estabelecidas a partir da análise do DAVID do grupo FS indicaram genes correlacionados a proteossoma, junção GAP, apoptose, digestão e absorção de carboidratos e absorção de minerais. O grupo FMDP indicou genes relacionados a glicólise e gliconeogênese, digestão e absorção de proteínas, proteossoma, processo ligado ao retículo endoplasmático e metabolismo de nucleotídeos. Enquanto o grupo FMD indicou genes ligados a glicólise e gliconeogênese, metabolismo de carbono, biossíntese de amino, metabolismo de piruvato e processo ligado ao retículo endoplasmático.

Figura 5. Análise in silico das interações proteína-proteína de cada grupo. As interações foram definidas pelo Metascape. A - FS – Farel o de soja; B - FMDP – Farelo de mamona dessolventizado peneirado e C - FMD – Farelo de mamona dessolventizado peneirado

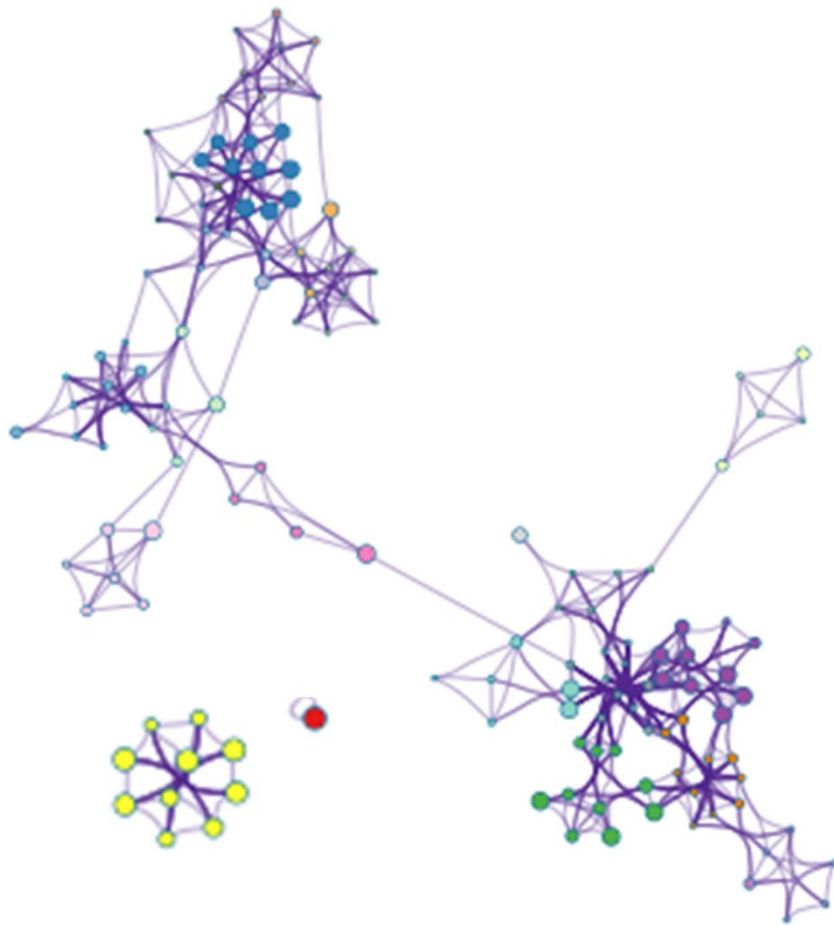


B

37

- Glicosés e gliconeogêneses
- Reconhecimento espermatozoide-ovulo
- Degranulação de neutrófilos
- Proteína de redobragem
- Metabolismo do piruvato
- Translocação do SLC2A4
- Degranulação plaquetária
- Doença priônica
- Metabolismo frutose e manose
- Ciclo GTPase
- Homeostase de ion inorgânico
- Homeostase da retina
- Montagem do cílio
- Metabolismo do carbono central
- Processo metabólico do composto hidroxí carbono
- Resposta celular
- Síndrome de morte súbita (SIDS)
- Regulação do fator de crescimento semelhante à insulina
- Autofagia mediada por acompanhante
- Ligação e absorção de ligantes pelo receptor de remoção

C



- Degranulação de neutrófilos
- Glicoses e gliconeogêneses
- Dobramento de proteínas
- O papel de GTSE1 na progressão G2/M após G2
- Via do sistema proteassomal parkin ubiquitina
- Regulação de proteólises
- Metabolismo frutose e manose
- Homeostases
- Infecção Escherichia Coli
- Ciclo GTPase
- Lisossomo
- Processo biossintético de hexose
- Metabolismo do piruvato
- Homeostase da retina
- Processo metabólico do composto hidróxido de carbono
- Complexo de profilina 1
- Resposta hormonal
- Via de sinalização VEGFA-VEGFR 2
- Processo biológico envolvendo interação simbiótica
- Resposta a substância inorgânica

2.4 Discussão

O espectrômetro de massa híbrido quadrupolo-orbitrap ofereceu uma excelente exatidão de massa, alto poder de resolução e alta sensibilidade, executando com confiabilidade a identificação das proteínas do presente estudo. Portanto, as proteínas identificadas com base na espectrometria de massa e na análise de bioinformática do plasma seminal de carneiros corroborou com os resultados de Hitit et al. (2021), no qual foi possível verificar perfis proteômicos de espermatozoides de carneiro com fenótipos de fertilidade contrastantes utilizando LC-MS/MS Label-free, totalizando 997 proteínas identificadas.

O plasma seminal de mamíferos contém duas famílias principais de proteínas, as Espermadesinas, principais proteínas do plasma seminal envolvidas na capacitação e interação espermatozoide-ovulo e as BSPs (*Binder Sperm Proteins*) que contêm domínios de fibronectina tipo II ligando-se aos espermatozoides durante a ejaculação (BERGERON et al., 2005). As BSPs são secretadas pela vesícula seminal (MANJUNATH, 1992) e se ligam a fosfolipídios, induzindo o efluxo de colesterol na membrana espermática para promover a capacitação espermática (PLANTE et al., 2012).

Em bovinos, são denominadas BSP1, BSP3 e BSP5 (MANJUNATH et al., 2009). Estas proteínas são estruturalmente relacionadas, compostas de peptídeos de cadeia única, acídicas, com massas moleculares variando de 15-16 kDa (BSP1 e 3) a 28-30 kDa (BSP5) (MANJUNATH et al., 1987). Foi identificado que as BSP1 e 5 existem em várias formas moleculares e glicofomas (PLANTE et al., 2016), ou seja, são altamente glicosiladas, explicando assim a presença de diversas isoformas encontradas no estudo realizado por van Tilburg et al. (2013).

No estudo desenvolvido por Rodríguez-Villamil et al. (2016) foi possível observar que a BSP1 promoveu a capacitação *in vitro* de espermatozoides ejaculados e epidídimaes, portanto, a BSP1 melhora a capacitação espermática e sua ausência poderá comprometer o

processo de fertilização. De acordo com Bergeron et al. (2005), as BSPs apresentam proteínas homólogas no plasma seminal de carneiros, sendo denominadas RSVPs (*Ram Seminal Vesicle Proteins*). As sequências de aminoácidos, juntamente com a atribuição de ligações dissulfeto, confirmam a semelhança estrutural de RSVPs com BSPs (FERNANDEZ-JUAN et al., 2006). Para Moura et al. (2011), as RSVPs de 14 kDa e 22 kDa são consideradas as proteínas mais importantes relacionadas à capacitação espermática e reação acrossômica, pois essas proteínas modulam os espermatozoides preparando-os para o processo de fertilização e transmissão do material genético masculino. Corroborando, também, com os resultados apresentados por van Tilburg et al. (2013) no qual 42% da intensidade total de todos os *spots* identificados por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, correspondia as BSPs1 e 5 de carneiros.

As espermedesinas são um grupo de polipeptídios (HAASE et al., 2005) encontradas no plasma seminal de diversos mamíferos: carneiros (SOUZA et al., 2012, BERGERON et al., 2005), touros (MOURA, 2006), porém suínos, por sua vez, constitui o principal componente proteico (CAMPANERO-RHODES et al., 2005). As espermedesinas aderem à superfície do espermatozoide no acrossoma para estabilizá-la e protegê-la, mas a maioria é liberada durante o processo de capacitação e o restante atua como proteínas primárias de ligação à zona pelúcida (HAASE et al., 2005). Semelhante as BSPs, as espermedesinas foram detectadas com diferentes isoformas, em suínos os padrões de glicosilação da espermedesina seminal definiram como essa molécula interage com a zona pelúcida e outras proteínas (CALVETE et al., 1994). Os resultados colaboraram com o estudo realizado com Viana et al. (2018) ao analisar o perfil proteico de touros leiteiros associados a fertilidade por meio de espectrometria de massas acoplada com um nano HPLC.

A clusterina é uma glicoproteína importante no sêmen dos mamíferos, sendo secretada pelo testículo, epidídimo e vesícula seminal (AHUJA et al., 1996; O'BRYAN et al., 1994; SYLVESTER et al., 1991). A expressão da clusterina nos testículos e epidídimos está

ligada a diferenciação das células germinativas (GRIMA et al., 1992), sugerindo que essa proteína pode estar envolvida com a reabsorção de espermatozoides defeituosos na cauda do epidídimo (AKERLOF et al., 1989), maturação espermática (HERMO et al., 1991), modulação da lise celular (MATSOUKA et al., 2006) e proteção dos espermatozoides (MERI et al., 2001). Como a clusterina contribui para a remoção de espermatozoides defeituosos, essa proteína é considerada um indicador de má qualidade do sêmen em diversas espécies como; touros (SHOJAEI SAADI et al., 2013), carneiros (IBRAHIM et al., 2001), homens (ZALATA et al., 2012), GARANHÕES (Novak et al., 2010) e Cateto (*Tayassu tajacu*) (SANTOS et al., 2014). Além disso, a clusterina presente no plasma seminal está inversamente associada ao número de espermatozoides normais em bovinos de corte (BOE-HANSEN et al., 2015) e existe uma associação positiva entre morfologia anormal da cabeça espermática e expressão de clusterina após isolamento escrotal de touros da raça Holandesa (SHOJAEI SAADI et al., 2013). Portanto, a clusterina age como uma chaperona, ligando-se a proteínas parcialmente desnaturadas, solubilizando-as e protegendo os espermatozoides dos efeitos citotóxicos da precipitação proteica (WILSON et al., 2000).

Com base nas proteínas mais abundantes do grupo FMDP e FMD foi possível identificar cinco genes (ECM1, PYY, LPO, MSMB e EDIL3) que permitiram a identificação de 79 miRNAs. Os microRNAs (miRNA) estão entre as descobertas biológicas mais significativas das últimas décadas (TULAY e SENGUPTA, 2016), pois regulam a expressão de muitos genes e, conseqüentemente, suas funções (GOMES et al., 2013). No presente estudo foi observado o papel dos miRNAs na toxicidade, apoptose, divisão celular, neurotoxicidade, cardiotoxicidade dentre outros. Identificou-se que os miRNAs ligados a neurotoxicidade (hsa-mir-7-5p; hsa-mir-210-3p; hsa-mir-16-2-3p, hsa-mir-16-5p, hsa-mir-132-3p, hsa-mir-27b-3p) estavam diretamente correlacionados aos miRNAs associados a apoptose (hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-1-

3p, hsa-mir-372-3p, hsa-mir-650, hsa-mir-203a-3p, hsa-mir-7-5p, hsa-mir-130a-3p, hsa-mir-155-5p e hsa-mir-16-2-3p).

O principal componente proteico, farelo de mamona, oriundo da extração do óleo de mamona, passou por processos mecânicos e químicos, deixando o componente seguro para ser consumido pelos carneiros e com um menor teor de extrato etéreo e maior teor de proteína bruta, principalmente quando comparado com a torta de mamona (POMPEU, 2009). Mesmo diante de um baixo teor de óleo, ou seja, mesmo diante de um baixo risco de intoxicação, foi possível observar miRNAs ligados a neurotoxicidade, um dos sinais relacionados a intoxicação por mamona. Como trabalhamos com um equipamento de alta sensibilidade e resolução, era de se esperar identificações relacionadas aos fatores antinutricionais presentes na mamoneira, mesmo passando por um processo de dessolventização. No que se refere aos miRNAs ligados a apoptose, estes também podem estar correlacionados a intoxicação causada pelos fatores antinutricionais. A regulação da apoptose ou morte celular programada é complexa e envolve um equilíbrio entre as proteínas pró e antiapoptóticas (MENEZES et al., 2020). A apoptose faz parte do processo normal fisiológico e regula a espermatogênese (WANG et al., 2019). Além disso, Menezes et al. (2020) observaram que o miR-34a em espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade é considerado como um importante regulador da fertilidade masculina. Estudos sugerem que membros da família miR-34, incluindo miR-34a, é um alvo transcricional direto do supressor tumoral p53 (HE et al., 2007) e foi demonstrado que p53 regula a expressão de miR-34a, ligando-se a um sítio de ligação específico de p53 localizado dentro do gene que codifica miR-34a (RAVER-SHAPIRA et al., 2007). Já em outro estudo foi demonstrado que o miR-34a está associado a motilidade celular reduzida e à fosforilação oxidativa de células precursoras neurais, derivadas de células-tronco do cordão umbilical humano (CHANG et al., 2011).

A análise baseada na ontologia gênica permitiu observar a distribuição das proteínas mais abundantes dos três grupos com base nos processos biológicos. Dentre os quais destacam-se as proteínas ligadas ao comportamento, adesão biológica, processo biológico, biomineralização, processo celular, processo de desenvolvimento, processo imune, localização, processo metabólico, processo multicelular, pigmentação, processo reprodutivo e resposta a estímulos. Entretanto, somente no grupo FMDP não foi possível observar proteínas ligadas ao crescimento, sendo o mesmo um processo biológico ligado a multiplicação e aumento do tamanho celular. Observou-se o efeito da dieta para a variável consumo de matéria seca, em que ovinos alimentados com dietas à base de farelo de soja não apresentaram diferenças daqueles alimentados com FMD, porém foi superior aos ovinos alimentados com FMDP. Para ovinos da raça Santa Inês a média do consumo de matéria seca ($965,58 \text{ g dia}^{-1}$) estava acima das exigências nutricionais recomendadas pelo NRC (2007) para mesma categoria. Portanto, acredita-se que essa diminuição no consumo de matéria seca do grupo FMDP seja a explicação para a ausência de proteínas ligadas ao crescimento.

Nossos resultados mostraram que o principal *clusters* enriquecido do plasma seminal e comum dos três grupos estava ligado a degranulação de neutrófilos. No estudo realizado por Ponthier et al. (2013), foi descrito a mieloperoxidase (MPO) como uma enzima pró-oxidante liberada pelos neutrófilos durante a degranulação ou após a lise. O sêmen pós-descongelamento contém MPO e sua concentração está associada à diminuição da motilidade espermática. A MPO está presente no sêmen equino pós-descongelamento e sua concentração é maior no sêmen de baixa qualidade (O'FLAHERTY et al., 1999). Em outras palavras, a concentração de MPO no sêmen pós-descongelamento mostrou estar associada à presença de células não espermáticas, colaborando com os resultados deste estudo. Como há células espermáticas sem motilidade no plasma seminal, há, consecutivamente, uma quantidade de proteínas liberadas relacionadas a degranulação de neutrófilos.

Um importante sítio regulatório das espécies de mamíferos no que diz respeito a fertilização está no nível da ligação do espermatozoide à zona pelúcida. E essa especificidade foi destacada no grupo FMDP, tendo como segundo principal agrupamento proteínas que fazem parte do reconhecimento espermatozoide-ovulo. Sabe-se que o plasma seminal de mamíferos é composto por fluidos do epidídimo, dos testículos e das glândulas sexuais acessórias (KRAUS et al., 2005) e que a habilidade dos espermatozoides de se ligarem a zona pelúcida é adquirida durante o trânsito epididimário (TÖPFER-PETERSEN et al., 1999). O fluido da cauda do epidídimo é rico em β -galactosidases e uma série de glicosidases auxilia na maturação espermática (DACHEUX, 2005). Estas proteínas modificam glicoproteínas presentes na membrana espermática (SKUDLAREK et al., 1993) ou ligam-se a essa membrana, atuando como sítios de ligação a carboidratos, explicando assim o fato do grupo FMDP apresentar as Beta-galactosidases sem nenhuma isoforma identificada, diferente dos grupos FMD e FS. Provavelmente seja esse o motivo do grupo FMDP ser o único a apresentar esse agrupamento espermatozoide-ovulo, pois se existe essa interação, acredita-se que tenha mais células espermáticas neste grupo e consecutivamente existe degranulação de neutrófilos e certamente uma forte interação com metabolismo de glicoproteínas.

No grupo FMDP, a degranulação de neutrófilos apresentou interação com o agrupamento proteico homeostase de íon inorgânico e metabolismo de frutose e manose. A manutenção de concentrações altamente assimétricas dos principais ânions inorgânicos é uma função importante tanto das membranas plasmáticas quanto das membranas das organelas intracelulares (DUBYAK, 2004). O metabolismo das glicoproteínas (frutose e manose) atuam na maturação epididimária, modificando a membrana plasmática, explicando assim o fato do grupo FMDP ser o único a ter interação entre a degranulação de neutrófilos com metabolismo de frutose e manose (Glicoproteínas) e homeostase de íon inorgânico.

Proteínas agrupadas de acordo com as vias KEEG foram mais semelhantes nos grupos FMDP e FMD no que se diz respeito a glicólise/gliconeogênese e ao processamento de proteínas no retículo endoplasmático. A proteína 78 regulada por glicose (*Glucose regulated protein 78 – GRP78*), identificada nos três grupos neste estudo, é uma chaperona molecular no retículo endoplasmático sensível ao cálcio, induzida por estresse de cálcio ou glicose (QUINONES et al., 2008). No sistema reprodutor masculino, a GRP78 foi identificada no testículo, epidídimo e no espermatozoide (LACHANCE et al., 2010). A expressão gênica e proteica de GRP78 foi relatada em espermátides arredondadas durante a espermatogênese (AGUILAR-MAHECHA et al., 2001). A GRP78 é adicionada exogenamente e liga-se à superfície do espermatozoide aumentando a concentração de cálcio intracelular, não afetando a viabilidade espermática, motilidade e integridade acrossomal (LACHANCE et al., 2007). A via glicólise/gliconeogênese identificada no presente estudo é uma parte vital da atividade do sêmen, pois está envolvida na capacitação, fornece uma fonte de energia para os espermatozoides e está intimamente relacionada à maturidade funcional dos espermatozoides e ao trânsito epididimário (ANDAR, 2008). Resultados semelhantes foram encontrados por Westfalewicz et al., (2017) ao identificar e analisar o proteoma do fluido da cauda epidídimo de touros (*Bos taurus*) por meio de eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas.

2.5 Conclusão

O presente estudo relata pela primeira vez a identidade de 440 proteínas expressas no plasma seminal de carneiros Santa Inês alimentados com farelo *Ricinus Communis* dessolventizado. Com base na identificação dos miRNAs foi possível observar no grupo FMDP e FMD miRNAs capazes de regular a expressão de genes de funções celulares relacionadas a toxicidade e neurotoxicidade, porém é necessário estudos adicionais para saber se esses miRNAs

comprometeriam a reprodução dos carneiros. Portanto, no presente estudo ficou claro que as principais proteínas plasmáticas foram identificadas independente da dieta fornecida no experimento.

CAPÍTULO II

PARÂMETROS SEMINAIS E DIMENSÕES TESTICULARES DE OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS ALIMENTADOS COM FARELO DE MAMONA INDUSTRIALMENTE DESTOXIFICADO

RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo determinar o efeito de diferentes fontes proteicas sobre os parâmetros seminais, integridade da cromatina espermática e dimensões testiculares de carneiros Santa Inês. Os carneiros foram divididos em três grupos (FS - farelo de soja, FMDP – farelo de mamona dessolventizado peneirado e FMD – farelo de mamona dessolventizado) e o sêmen de todos os animais foi coletado através de eletroejaculador em um intervalo de três dias, após 77 dias de alimentação. O volume ejaculado foi medido em um tubo graduado e uma pequena alíquota foi reservada para a avaliação dos parâmetros espermáticos. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do aplicativo estatístico Jamovi. A média do comprimento, largura e peso testicular do grupo FMDP foi de 88,0 cm, 61 cm e 149,3 g, do grupo FMD foi de 83,7 cm, 59,3 cm e 126,8 g e do grupo farelo de soja foi de 82,8 cm, 60,6 cm e 128,2 g. Já em relação à média da motilidade espermática, o grupo FMPD apresentou os melhores resultados (55%) quando comparado com os grupos farelo de soja (33,75%) e FMD (32,5%). Os melhores resultados em relação ao percentual de espermatozoides morfolologicamente normais foram observados no grupo FMD (85%), seguido do grupo farelo de soja (77%) e FMDP (75%). A integridade do DNA espermático alcançou os melhores valores no grupo farelo de soja (69%) enquanto nos demais grupos, FMDP e FMD, os valores foram de 47% e 26%, respectivamente. Portanto, de acordo com os parâmetros analisados no presente estudo não foi possível observar diferença estatística entre os grupos, concluindo que é viável a substituição do farelo de soja pelo farelo de mamona sem comprometer a qualidade seminal e consecutivamente, sem comprometer a fertilidade dos carneiros.

Palavras-chave: *Ricinus communis* pequenos ruminates; shotgun.

ABSTRACT

The present study aimed to determine the effect of diets on seminal parameters, sperm chromatin integrity and testicular dimensions of Santa Inês rams fed with industrial detoxified castor meal. The rams were divided into three groups (FS - soybean meal, FMDP - sieved desolventized castor meal and FMD - desolventized castor meal) and the semen of all animals were collected using electroejaculation with an interval of three days, after 77 days of feeding. The ejaculated volume was measured in a graduated tube and a small aliquot was reserved for the evaluation of sperm parameters. All statistical analyzes were performed using the Jamovi statistical application. The mean testicular length, width and weight in the FMDP group was 88.0 cm, 61 cm and 149.3 g, in the FMD group it was 83.7 cm, 59.3 cm and 126.8 g and in the soybean group was 82.8 cm, 60.6 cm and 128.2 g, respectively. Regarding the mean of sperm motility, the FMPD group presented the best results (55%) when compared to the soybean meal (33.75%) and FMD (32.5%) groups. The best results in relation to the percentage of morphologically normal sperm were observed in the FMD group (85%), followed by the soybean meal (77%) and FMDP group (75%). Sperm DNA integrity achieved the best values in the soybean meal group (69%) while in the other groups, FMDP and FMD, the values were 47% and 26%, respectively. Therefore, according to the parameters analyzed in the present study, it was not possible to observe a statistical difference between the groups, concluding that it is feasible to replace soybean meal by castor bean meal without compromising seminal quality, and consecutively, without compromising the fertility of rams.

Keywords: *Ricinus communis*, seminal parameters; shotgun.

3.1 Introdução

O Nordeste brasileiro concentra quase 70% do efetivo de ovinos e caprinos do país (IBGE, 2017), a criação de pequenos ruminantes ainda enfrenta desafios históricos associados à escala limitada de produção, má distribuição pluvial, baixa adoção de tecnologias e forte dependência de alimentos concentrados para a alimentação dos rebanhos, notadamente em períodos críticos de estiagem. Nesse contexto, a utilização de alimentos alternativos, é necessário, já que a nutrição dos ovinos, no sistema de criação, é responsável por uma alta parcela dos custos da produção.

Estudar alimentos alternativos podem trazer benefícios para a composição de dietas de ruminantes, garantindo, em muitos casos, maior disponibilidade de alimentos e possível aumento na eficiência de produção e reprodução, devido à redução dos custos (ARAÚJO et al., 2018). Entre essas alternativas destaca-se um dos subprodutos da mamona, o farelo de mamona, com 40% de proteína bruta (PALMIERI et al., 2017), surgindo como uma opção de substituição pelo concentrado proteico tradicional, farelo de soja (FURTADO et al., 2020). Segundo Gionbelli et al. (2014), a substituição do farelo de soja pelo farelo de mamona não apresentou efeito sobre a ingestão de nutrientes e ganho de peso em carneiros mestiços. Entretanto, outro estudo demonstrou que a adição de farelo de mamona reduz o consumo de ração de carneiros sem raça definida (MENEZES et al., 2016).

A toxidez da mamona é causada pela presença de algumas substâncias: ricina (proteína tóxica que inativa especificamente e irreversivelmente os ribossomos eucariotos), ricinina (alcaloide toxico) e CB-1A (complexo alergênico) (POMPEU, 2009). Entre as substâncias presentes, a ricina é o principal fator antinutricional devido à alta toxicidade, portanto para ser utilizado na alimentação animal, o farelo e torta da mamona devem ser submetidos a um processo de destoxificação (BELTRÃO, 2002). A destoxificação consiste na extração do óleo da semente da mamona através de métodos físicos e químicos, permitindo assim o seu uso na alimentação animal (POMPEU, 2009).

Vários estudos têm demonstrado o potencial de utilização dos subprodutos da mamona em substituição ao farelo de soja em dietas para ruminantes após a destoxificação (POMPEU et al., 2012; FURTADO et al., 2012). Contudo, a literatura ainda é deficiente em estudos com o objetivo de avaliar o efeito da dieta, contento o farelo de mamona como principal fonte proteica, em relação os parâmetros seminais e as dimensões testiculares de ovinos Santa Inês.

A análise da qualidade seminal é utilizada para definição de critérios mínimos aceitáveis para a seleção de reprodutores. A motilidade, morfologia, concentração e integridade da cromatina espermática são as características seminais mais utilizadas para se avaliar o potencial reprodutivo do macho (CORREA et al., 1997). Outros critérios além dos parâmetros seminais devem ser levados em consideração em relação a avaliação reprodutiva de carneiros, como por exemplo a raça. As dimensões testiculares destacam-se por apresentar herdabilidade moderada a alta, podendo contribuir para um expressivo melhoramento genético devido às suas correlações com a produção e qualidade do sêmen, características produtivas, reprodutivas e níveis hormonais (YARNEY et al., 1990).

De acordo com a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, 2008) foi observado que bovinos alimentados com subproduto da mamona por 14 meses não apresentaram problemas de fertilidade ou sinais clínicos de intoxicação. Já no estudo realizado por Silva et al. (2013) foi adicionado a dieta de ovelhas a torta de mamona e não foi observado efeito da alimentação na foliculogênese. Em contrapartida, foi relatado por Sandhyakumary et al. (2003) e Nithya et al. (2011) que a administração resíduos da raiz da mamona para roedores causou reduções nas concentrações e motilidade dos espermatozoides.

Nesse contexto, a correlação da dieta associada aos parâmetros seminais, dimensões testiculares e integridade do DNA espermático podem contribuir para sua utilização como marcadores moleculares para fertilidade, auxiliando na seleção de reprodutores mais férteis na raça Santa Inês. Objetivou-se com esse estudo determinar o efeito das dietas sobre os parâmetros seminais, integridade da cromatina espermática e dimensões testiculares de carneiros Santa Inês alimentados com farelo de mamona industrialmente destoxificado.

3.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado sob o Protocolo nº 3155291019, conforme a Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, no Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

3.2.1 Localização, delineamento experimental e extração do óleo da mamona

O experimento foi realizado no Núcleo de Ensino e Estudos em Forragicultura (NEEF/DZ/CCA/UFC), em Fortaleza-Ceará. Foram utilizados 12 ovinos machos não castrados da raça Santa Inês, com aproximadamente 20 kg e oito meses de idade. Todos os animais foram vermifugados e receberam suplementação de vitaminas A, D e E injetável por via subcutânea.

Os animais foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, quatro repetições por tratamento, em função das dietas: farelo de soja; farelo de mamona dessolventizado (FMD) e farelo de mamona dessolventizado peneirado (FMDP).

O volumoso utilizado no experimento foi o feno de capim-tifton 85 (*Cynodon* sp.) e as dietas eram isoproteicas e isoenergéticas e continham uma relação volumoso: concentrado de 40:60, prevendo ganho de peso médio diário de 200g/dia.

Os animais foram mantidos em baias de madeira individuais, com área de aproximadamente 1,12m², durante 91 dias, nos quais os 14 primeiros dias foram para adaptação dos animais às dietas e ao ambiente experimental. As baias eram dotadas de cochos para o fornecimento do alimento, bebedouros com água à disposição e sal mineral *ad libitum*, sendo esses animais pesados semanalmente durante todo o período experimental.

O farelo de mamona foi obtido por meio do processamento da semente de *Ricinus communis* da indústria Azevedo Óleos Ltda., localizada no município de Itupeva, SP,

consistindo em cinco etapas, sendo a última etapa caracterizada por dessolventização, onde o material é submetido de 100°C a 110°C por duas minutos para a evaporação do solvente, deixando-o seguro para ser consumido por ruminantes (POMPEU et al., 2020). Após este processo, o farelo de mamona foi inserido na dieta dos carneiros na forma peneirada (58% de proteína bruta) e não peneirada (39 a 43% de proteína bruta) (ABDALLA et al., 2008).

3.2.2 Coleta do sêmen e análise dos parâmetros seminais

Três coletas de sêmen de cada animal foram realizadas por meio de eletroejaculador (eletroejaculador Torjet - 65; Eletrovet, Brasil; Souza et al. 2010), em um intervalo de três dias, após 77 dias de alimentação. O volume do sêmen ejaculado foi medido em um tubo graduado e uma alíquota foi reservada para a avaliação dos parâmetros espermáticos.

A concentração espermática foi determinada com o auxílio de uma câmara de contagem de Neubauer, utilizando amostras de sêmen diluídas (1: 100) em solução salina tamponada com formaldeído e a média aplicada na fórmula: Concentração = $N \times 5 \times 200 \times 10$

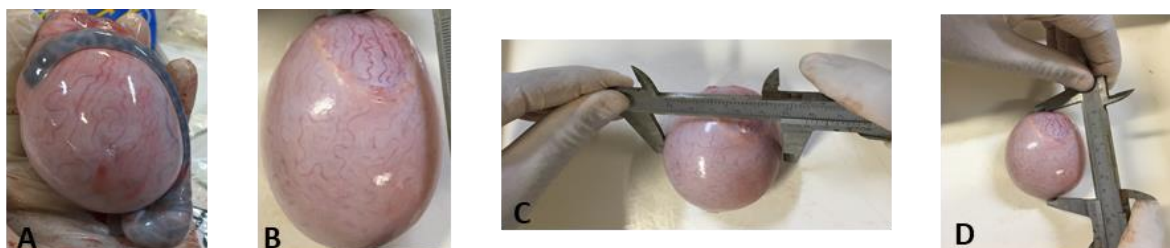
x 1000, onde: N = média dos espermatozoides contados nos dois lados da câmara 5 = número de quadrados contados em 1mm^2 , 400 = fator de diluição, 10 = fator de profundidade da câmara e 1000 = para a transformação para mL

Para analisar a morfologia espermática, uma pequena fração do sêmen foi diluída em formol salino tamponado (NaCl a 0,9%), removidos 30 μL da amostra para serem avaliadas em microscopia de campo claro (200 células/ animal/; aumento: x 1000 sob óleo de imersão). Uma alíquota de 10 μL de sêmen foi posicionada em lâmina sob lamínula, pré-aquecido a 37 °C, para avaliação subjetiva do vigor espermático (0–5), turbilhonamento (0–5) e a motilidade (%) em microscopia de campo claro (aumento: x 100 e aumento: x 400) (Evans e Maxwell, 1990). Ao sêmen restante foi adicionado inibidor de protease (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) e em seguida foi centrifugado a $700 \times g$ 10 min a 4 °C para separação do plasma seminal das células espermáticas. O *pellet* contendo os espermatozoides ejaculados obtido após a primeira centrifugação foi lavado três vezes ($700 \times g$ por 15 min; 4°C) em tampão PBS (NaCl 137 mM; KCL 15 mM; Na_2HPO_4 17 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; pH 7,4) e armazenado a - 20° C (van Tilburg et al., 2013).

3.2.3 Avaliação das dimensões testiculares

Os testículos (direito e esquerdo) dos 12 animais foram coletados logo após o abate, transportados ao laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Federal do Ceará - UFC em gelo seco e em seguida os mesmos foram identificados, desencapsulados, separados dos epidídimos, pesados e medidos o comprimento e o diâmetro (Figura 1).

Figura 1. Avaliação das dimensões testiculares dos cães da raça Santa Inês



A - Testículos recolhidos; B - pesados e desencapsulados; C e D – análise das dimensões testiculares com auxílio de paquímetro.

3.2.4 Avaliação da integridade da cromatina espermática

Após cada coleta, uma alíquota de sêmen foi destinada ao teste de dispersão da cromatina para avaliação da integridade do DNA espermático (Fernández et al., 2003). Uma alíquota de sêmen foi diluída (1:1) em PBS e, desta solução, 25 μ L foi adicionado a 50 μ l de agarose “low gelling temperature” e gentilmente misturados. Em seguida, alíquotas de 2 μ L desta mistura foram aplicadas sobre lâminas previamente tratadas com 0,65% Agarose NA e cobertas com lamínulas.

Posteriormente, as lâminas foram resfriadas a 4 °C por 5 minutos e em seguida removidas delicadamente e, incubadas em Seleção de HCl 0,08 N por 7 minutos na ausência de luz. Após este período, as lâminas foram incubadas em solução de lise (NaCl 2 M, SDS 0,5%, Triton-X 0,3%, EDTA 0,02 M, β -mercaptoetanol 2 M e Tris-Cl 0,2 M) por 25 minutos. Após este tratamento as lâminas foram submersas em água destilada por 5 minutos e, em seguida, tratadas com etanol (70%, 90% e 95%, 2 minutos em cada concentração). Por fim, as lâminas foram secas ao ar, em temperatura ambiente (27 °C), e coradas com reagentes panóticos (Intant-Prov®, NewProv, Brasil). Após confeccionadas, as lâminas foram avaliadas sob microscopia óptica pela contagem de 500 espermatozoides classificando-as em células com halo (DNA íntegro), sem halo (DNA fragmentado) e células sem halo e degradadas (células não coradas).

3.2.5 Análise estatística

O experimento foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado, com 3 dietas e 4 repetições. Todas as variáveis foram avaliadas quanto à normalidade de sua distribuição pelo teste de SHAPIRO-WILK. As variáveis paramétricas, comparação das dimensões testiculares entre os tratamentos, foram avaliadas por análise de variância com teste de Tukey a 5%. As variáveis não-paramétricas, comparações dos parâmetros seminais entre os tratamentos, foram realizadas através de do teste de KRUSKAL-WALLIS, com comparações múltiplas de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger a 5%. Todas as análises foram realizadas por meio do aplicativo estatístico Jamovi (v. 2.3.18; The Jamovi Project, 2022).

3.3 Resultados

No presente estudo foram analisados os parâmetros seminais, dimensões testiculares e integridade da cromatina espermática de 12 carneiros Santa Inês distribuídos em três grupos conforme a dieta (Tabela 1).

Em relação ao consumo de matéria seca, em que ovinos alimentados com dietas à base de farelo de soja não apresentaram diferenças daqueles alimentados com FMD, porém foi superior aos ovinos alimentados com FMDP (Tabela 2). Apesar disso, tal fato não foi suficiente para afetar o desempenho produtivo, uma vez que não houve diferenças de ganho de peso e de conversão alimentar dos animais.

No que se refere as dimensões testiculares (comprimento, largura e peso) dos 12 animais analisadas por grupo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 1. Parâmetros seminais, dimensões testiculares e integridade da cromatina espermática de todos os grupos analisadas no experimento

Grupos	Volume	Turbilhão	Vigor	Motilidade	Concentração espermática	Espermatozoides Normais	Defeitos Maiores	Defeitos Menores	DNA Integro	DNA Fragmentado	DNA Degenerado	Comprimento testicular	Largura testicular	Peso testicular
FS	1	4	3	65	2,81x10 ⁹	94	65	47	429	75	7	81,1	63,3	137,3
FS	0,5	0	1	5	1,9x10 ⁹	180	20	4	457	47	0	73,8	56,1	97,1
FS	0,25	0	1	5	1,0x10 ⁹	187	9	6	459	41	1	89,5	61,2	128,7
FS	2,5	4	3	60	2,5x10 ⁹	169	23	11	64	429	8	86,6	61,9	149,7
FMD	3	5	4	85	4,17x10 ⁹	180	17	3	326	165	13	92,2	58,4	145,5
FMD	1,5	1	1	1	1,0x10 ⁹	167	16	18	178	301	28	80,8	58,7	121,2
FMD	1,5	1	2	45	1,5x10 ⁹	168	22	15	34	366	102	79,1	57,7	118,4
FMD	0,5	1	1	1	1,2x10 ⁹	174	11	16	0	0	500	82,7	62,5	122,2
FMDP	1,5	3	3	70	3,0x10 ⁹	158	29	16	431	68	6	92,2	64,8	183,1
FMDP	3,5	1	2	20	1,5x10 ⁹	118	19	70	98	380	25	86,4	60,1	142,6
FMDP	1,5	4	3	65	9,34x10 ⁹	180	5	26	426	81	3	87,5	59,9	139,4
FMDP	1,5	4	3	65	3,5x10 ⁹	173	9	33	0	0	500	85,9	59,1	132,2

FS: Farelo de soja; FMD: Farelo de mamona dessolventizado; FMDP: Farelo de mamona dessolventizado e peneirado.

Tabela 2. Desempenho de ovinos da raça Santa Inês alimentados com dietas contendo diferentes proteicas

Variável	Genótipo (G)		Dieta (D)			P valor			CV ² (%)
	Santa Inês	Farelo de Soja	FMD	FMDP	EPM ¹	G	D	G*D	
PI (kg)	19,81	19,86	18,11	18,84	2,14	0,0627	0,2858	0,8018	11,3
PF (kg)	34,25A	33,5	31,19	31,6	2,66	0,0009	0,2074	0,6984	8,29
GPT (kg)	14,44A	13,64	13,07	12,76	1,47	0,0004	0,4897	0,6518	11,12
CMS (gdia ⁻¹)	965,58A	995,88a	891,38ab	816,88b	107,95	0,0093	0,0133	0,6567	11,98
CA (kgkg ⁻¹)	4,52	4,98	4,71	4,48	0,72	0,1887	0,4082	0,8367	15,33
ND12 (dias)	56,78B	60,72	64,42	66,58	8,4	0,0006	0,3883	0,8542	13,12

FMD: Farelo de mamona dessolventizado; FMDP: Farelo de mamona dessolventizado e peneirado; PI – Peso inicial; PF: – Peso final; CMS: Consumo de matéria seca; GPT – Ganho de peso total; GMD: Ganho médio diário; ND12: Número de dias para ganhar 12 kg; CA: Conversão alimentar; EA: Eficiência alimentar. Médias seguidas de letras diferentes minúsculas nas linhas (comparando as dietas) e maiúsculas nas linhas (comparando genótipos) diferem entre si pelo teste de Tukey $P < 0,05$; ¹Erro padrão da média; ²Coeficiente de variação

Tabela 3. Dimensões testiculares de carneiros Santa Inês alimentados com farelo de mamona analisadas

Variável	Dieta	N	Média	Desvio-padrão	Erro-padrão
Comprimento testicular	FS	4	82.8	6.91	3.45
	FMD	4	83.7	5.81	2.93
	FMDP	4	88.0	2.88	1.44
Largura testicular	FS	4	60.6	3.14	1.57
	FMD	4	59.3	2.16	1.08
	FMDP	4	61.0	2.59	1.29
Peso testicular	FS	4	128.2	22.45	11.23
	FMD	4	126.8	12.55	6.28
	FMDP	4	149.3	22.93	11.47

FS: Farelo de soja; FMD: Farelo de mamona dessolventizado; FMDP: Farelo de mamona dessolventizado e peneirado.

Os parâmetros seminais e integridade da cromatina espermática analisadas no presente estudo não apresentaram diferença entre os grupos (Tabela 4), ou seja, a dieta não teve influência sobre os parâmetros espermáticos e sobre a integridade da cromatina espermática,

assegurando a substituição do farelo de soja pelo farelo de mamona sem comprometer a produção e a fertilidade dos caneiros Santa Inês.

Tabela 4. Média dos parâmetros seminais, dimensões testiculares e integridade da cromatina espermática de todos os grupos experimentais analisadas por meio do aplicativo estatístico Jamovi (v. 2.3.18; The Jamovi Project, 2022)

Variável	N	Média	Erro-padrão	Intervalo de Confiança a 95%		Desvio-padrão	Shapiro-Wilk	
				Limite Inferior	Limite Superior		W	p
Concentração espermática	12	2.79e+9	6.66e+8	1.32e+9	4.25e+9	2.31e+9	0.730	0.002
Volume ejaculado	12	1.56	0.289	0.927	2.20	1.00	0.906	0.189
Motilidade Normais	12	40.58	9.175	20.388	60.78	31.78	0.849	0.036
Defeitos maiores	12	79.33	4.018	70.482	88.17	13.92	0.766	0.004
Defeitos menores	12	9.99	2.194	5.157	14.81	7.60	0.760	0.003
DNA íntegro	12	10.69	2.731	4.680	16.70	9.46	0.842	0.029
DNA fragmentado	12	47.83	11.173	23.235	72.42	38.71	0.829	0.020
DNA Degenerado	12	32.31	9.223	12.013	52.61	31.95	0.837	0.026
Comprimento testicular	12	19.86	10.922	-4.178	43.90	37.84	0.557	< .001
Largura testicular	12	84.82	1.589	81.318	88.32	5.51	0.957	0.736
Peso testicular	12	60.31	0.726	58.709	61.91	2.52	0.988	0.999
	12	134.78	6.053	121.462	148.10	20.97	0.944	0.555

3.4 Discussão

Vários fatores podem afetar a produção e interferir na qualidade do sêmen, dentre eles a nutrição. Nesse sentido, avaliar como os componentes da dieta podem atuar sobre os parâmetros reprodutivos é de extrema relevância para a formulação de uma dieta que visem não só o ganho de peso, mas que garantam aos animais reprodutores maximizarem seu potencial na produção de sêmen, para serem utilizados tanto em monta natural, quanto em biotécnicas de reprodução assistida.

A raça Santa Inês tem demonstrado ser uma excelente alternativa para incrementar a produção e a reprodução de carneiros, devido ao seu bom desenvolvimento corporal o que a coloca em posição estratégica como reserva de diversidade genética viável de uso em programas de melhoramento, por meio de seleção e cruzamentos (SOUSA et al., 2001). O presente estudo descreve pela primeira vez os efeitos do farelo de mamona dessolventizado nos parâmetros reprodutivos de carneiros Santa Inês.

Embora a fertilidade real desses animais, seja determinada pelas taxas de concepção de fêmeas acasaladas, não tenha sido avaliada, um conjunto diversificado de parâmetros cruciais para a fisiologia masculina foi incluído em nossa avaliação. Diferentes pesquisas foram realizadas para avaliar indicadores do potencial reprodutivo masculino em várias espécies, entre esses indicadores, destacam-se; as medidas testiculares (SOUZA et al. 2010; YARNEY et al. 1990), motilidade, morfologia espermática (CORREA et al. 1997) e integridade da cromatina espermática (WATERHOUSE et al. 2006; GILLAN et al. 2008).

No presente estudo, ao realizar as medidas das dimensões testiculares (comprimento, largura e peso) dos animais dos três grupos, não foi possível observar efeitos tóxicos ou interferência da dieta em todos os grupos, ou seja, a substituição do farelo de soja pelo farelo de mamona nos grupos FMD e FMDP não influenciou as dimensões testiculares, mesmo quando esses animais foram alimentados por até 77 dias, colaborando com resultados

apresentados por Oliveira et al. (2015), ao estudar a influência da torta de mamona sobre os parâmetros reprodutivos de caprinos, indicando que os animais tinham status funcional e potencial para ter fertilidade média. As medidas testiculares podem ser usadas para avaliações confiáveis de animais reprodutores, estando diretamente ligadas à idade na puberdade e ao peso corporal em animais jovens (SOUZA et al., 2010; MOURA et al., 1997). Nos estudos realizados por Souza et al. (2001) e Moura et al. (1999), o comprimento e largura testicular, em ovinos, apresentam correlações com a produção espermática, capacidade de serviço e desenvolvimento sexual. O comprimento testicular dos carneiros Santa Inês no presente estudo está dentro do intervalo relatado por Sousa (2003), para ovinos da mesma raça com aproximadamente 36 semanas (8,5 cm), colaborando com nossos resultados, em que a média do comprimento testicular dos grupos foi de $8,82 \pm 1,58$ cm.

O peso corporal pode estar correlacionado com peso testicular, assim como o peso testicular está correlacionado com a produção de espermatozoide conforme relatado por Souza et al. (2001). De acordo com o estudo realizado por Ghorbankhani et al. (2015), os carneiros da raça Sanjabi que ganharam mais peso por dia tinham testículos mais pesados, maior população de células de Sertoli por testículo, mais células germinativas e produziam mais espermatozoides. Em outro estudo, conduzido com carneiros da raça Merino, Hotzel et al. (1998) mostraram que dieta de alta valor proteico por até 69 dias afeta positivamente as medições testiculares, dos túbulos seminíferos e do número de núcleos de células de Sertoli por testículo. No presente estudo, observamos que a média encontrada para o consumo de matéria seca (965,58 g dia⁻¹) e ganho médio de peso (215,25 g dia⁻¹) está acima das exigências nutricionais recomendadas pelo NRC para a mesma categoria. Entretanto, apesar de se ter observado uma variável em relação ao consumo de matéria seca entre os grupos experimentais, não foi suficiente para afetar o desempenho produtivo, uma vez que não houve diferenças de

ganho de peso e de conversão alimentar dos animais, bem como não observamos diferenças no peso, largura e comprimento testicular.

A análise da qualidade seminal é utilizada para definição de critérios mínimos aceitáveis para a seleção de reprodutores (MOURA et al., 1999). Portanto, a motilidade, morfologia e concentração espermática são uma das características seminais mais utilizadas para se avaliar o potencial reprodutivo do macho (GODFREY et al., 1990). A integridade da cromatina espermática também é um importante parâmetro para a avaliação da qualidade espermática (BRAHEM et al., 2011), pois qualquer alteração significativa na estrutura da cromatina espermática pode levar à infertilidade, falha na fertilização, aborto espontâneo, desenvolvimento anormal do embrião ou mesmo causar diferentes distúrbios na prole (GE et al., 2017). Logo, o DNA fragmentado espermático é um bom bioindicador da fertilidade masculina (LEWIS e SIMON, 2010).

No presente estudo a concentração, motilidade, morfologia e integridade da cromatina espermática não foram afetadas pelas dietas, ou seja, a alimentação com farelo de mamona dessolventizado não influenciou nenhum dos parâmetros analisados. O fato de as dietas não terem afetado a concentração, motilidade, morfologia e integridade da cromatina espermática pode estar relacionada à baixa ou inexistente concentração de ricina presente no farelo de mamona utilizado em nosso estudo. Estudos anteriores relataram algum grau de tolerância em ruminantes alimentados com ricina (DINIZ et al., 2011), tais estudos explicam que é possível que essa proteína tóxica tenha sido inativada por proteases microbianas do rúmen (OLIVEIRA et al., 2010).

3.5 Conclusão

A substituição do farelo de soja pelo farelo de mamona dessolventizado não causou efeitos tóxicos, bem como, não interferiu no crescimento e desenvolvimento reprodutivo de

carneiros Santa Inês, mesmo quando esses animais foram alimentados por até 77 dias. Apesar de se ter observado uma variável em relação ao consumo de matéria seca, não foi suficiente para afetar o desempenho produtivo dos animais, concluindo que todos os parâmetros analisados nesse trabalho não foram influenciados pela dieta, ou seja, o farelo de soja pode ser substituído pelo farelo de mamona.

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da identificação de proteínas ligadas a intoxicação por mamona não foi observado relação com a expressão das principais proteínas do plasma seminal de carneiros, proteínas essas que desempenham papéis na capacitação, proteção das células, reação acrossoma e ligação espermática e óvulo. Também não foi observado influência da dieta nos parâmetros seminais, dimensões testiculares e integridade da cromatina espermática. O que nos leva a concluir que a expressão dessas proteínas ligadas a toxicidade e neurotoxicidade não prejudicou a fertilidade dos carneiros, sendo possível alimentar os animais com farelo de mamona industrialmente destoxificado, sem comprometer sua fertilidade.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A.L.; SILVA FILHO, J.C.; GODOIS, A.R.; CARMOS, A.A.; EDUARDO, J.L.P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 260-268, 2008.
- AGUILAR-MAHECHA A.; HALES, B.F.; ROBAIRE, B. Expression of stress response genes in germ cells during spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 119–127, 2001.
- AHUJA, H.S.; TENNISWOOD, M.; ZAKERI, Z.F. Differential expression of clusterin in the testis and epididymis of postnatal and germ cell deficient mice. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 491-501, 1996.
- AKERLOF, E.; FREDRICSSON, B.; GUSTAFSON, O.; LUNELL, N.O.; NYLUND, L.; ROSENBORG, L.; SLOTTE, H.; POUSETTE, A. Serum factors stimulate the motility of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 12, p. 124-130, 1989.
- ALEXANDER, J.; ANDERSSON, H.C.; BERNHOFT, A.; BRIMER, L.; COTTRILL, B.; FINK-GREMMELS, J.; JAROSZEWSKI, J.; SOERENSEN, H. Ricin (from *Ricinus communis*) as undesirable substances in animal feed: scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. **European Food Safety Authority (EFSA) Journal**, v. 726, p. 1-38, 2008.
- ARAÚJO, R.A.; NEIVA, J.N.M.; POMPEU, R.C.F.F.; CÂNDIDO, M.J.D.; ROGÉRIO, M.C.P.; LUCAS, R.C.; MARANHÃO, S.R.; FONTINELE, R.G.; EGITO, A.S. Feeding behaviour and physiological parameters of rearing goats fed diets containing detoxified castor cake. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, p. 2247-2260, 2018.
- ARSHID, S.; TAHIR, M.; FONTES, B.; MONTERO, E.F.S.; CASTRO, M.S., SIDOLI, S.; ROEPSTORFF, P.W.F. High performance mass spectrometry-based proteomics reveals enzyme and signaling pathway regulation in neutrophils during the early stage of surgical trauma. **Proteomics clinical applications**, v. 11, 2017.
- ASLANI, M. R.; MALEKI, M.; MOHRI, M.; SHARIFI, K.; NAJJAR-NEZHAD, V.; AFSHARI, E. Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. **Toxicon**, v. 49, p. 400-40, 2007.
- BANDEIRA, D.A.; CARTACHO, W.V; SEVERINO, L.S. Resíduo industrial da mamona como fonte alternativa na alimentação animal. In: I Congresso brasileiro de mamona. **Anais...** I Congresso brasileiro de mamona. 2004.
- BELTRÃO, N. E. M.; MELO, F. B.; CARDOSO, G. D.; SEVERINO, L. S. **Mamona: Árvore do Conhecimento e Sistemas de Produção para o Semiárido Brasileiro**. 2003. Campina Grande, PB: MAPA.
- BELTRÃO, N.E.M. **Torta de mamona (*Ricinus comunis L.*): fertilizante e alimento**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2002. (EMBRAPA Algodão. Comunicado técnico, 171).

BERGERON, M.; VILLEMURE, C.; MANJUNATH, P. Isolamento e caracterização das principais proteínas do plasma seminal de carneiro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 461-470, 2005.

BOE-HANSEN, G.B. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. **Animal Reproduction**, v. 162, p. 20–30, 2015.

BONFIM, M. A. D.; SILVA, M. M. C.; SANTOS, S. F. Potencialidades da utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de caprinos e ovinos. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 3, p. 15-26, 2009.

BUENO, M.S.; SANTOS, L.E.; CUNHA, E.A. **Alimentação de ovinos criados intensivamente**. 2007.

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

BRAHEM, S. Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. **Urology**, v.78, p.792-798, 2011.

BRITO, M.F.; AULER, A. P.; TAVARES, G.C.; REZENDE, C. P.; ALMEIDA, G.M.F.; PEREIRA, F.L.; CARLOS, A. G.; MOURA, A.A.; FIGUEIREDO, H.C.P.; HENRY, M. Label-free proteome of water buffalo (*Bubalus bubalis*) seminal plasma. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 1243, 2018.

CAMPANERO-RHODES, M.A.; MENENDEZ, M.; SAIZ, J.L SANZ, L.; CALVETE, J.J.; SOLIS, D. Analysis of the stability of the spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer. **The Febs Journal**, v. 272, p. 5663-5670, 2005.

CARVALHO, P.C.; LIMA, D.B.; LEPREVOST, F.V.; SANTOS, M.D.M.; FISCHER, J.S.G.; AQUINO, P.F.; MORESCO, J.J.; J.R. YATES, V.C.; BARBOSA, V. C. PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. **Nature Protocols**, v. 11, p. 102–117, 2016.

CALVETE, J.J.; RAIDA, M.; SANZ, L.; WEMPE, F.; SCHEIT, K.H.; ROMERO, A.; TÖPFER-PETERSEN, E. Localization and structural characterization of an oligosaccharide O-linked to bovine PDC-109. Quantitation of the glycoprotein in seminal plasma and on the surface of ejaculated and capacitated spermatozoa. **Febs Letters**, v. 350, p. 203-206, 1994.

CHANG, S. J.; WENG, S. L.; HSIEH, J. Y.; WANG, T. Y.; CHANG, M. D.; & WANG, H. W. MicroRNA-34a modulates genes involved in cellular motility and oxidative phosphorylation in neural precursors derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. **BMC Medical Genomics**, v. 4, p. 65, 2011.

CHANG, G.; ZHOU, O.; SOUFAN, J. XIA. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. **Nucleic Acids Research**, v. 48, p. 244–251, 2020.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, p. 721-731, 1997.

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

DINIZ, L.L.; VALADARES FILHO, S.C.; DE OLIVEIRA, A.S.; PINA, D.S.; DA SILVA, L.D.; BENEDETI, P.B. Castor bean meal for cattle finishing: 1. Nutritional parameters. **Livestock Science**, v. 135, p. 153-167, 2011.

DRUART, X.; RICKARD J.P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P.L.; KERSHAW-YOUNG, C.M.; BATHGATE, R.; GIBB, Z.; CROSSETT, B.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; GRUPEN, C.G.; DE GRAAF, S.P. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal Proteomics**, v. 91, p. 13-22, 2013.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on ricin as undesirable substances in animal feed. **EFSA Journal**, v. 726, p. 1–38, 2008.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon inseminación artificial de ovejas y cabras**. 1990. Zaragoza: Editorial Acribia

FERNÁNDEZ-JUAN, M.; GALLEGO, M.; BARRIOS, B.; OSADA, J.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A; MUIÑO-BLANCO, T. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, v. 132, p. 721 – 732, 2006.

FONSECA, N.R.; MYCZKOWSKI, M.L.; PRIOR, M.; SÁ, R.O.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C.; ZANOTTO, M.D. Testes de avaliação da viabilidade e do vigor em sementes de mamona. 2004. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA – Energia e Sustentabilidade, 1. **Anais...** CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, Campina Grande, 23/26 nov. 2004.

FURTADO, R.F.; POMPEU, R.C.F.F.; CANDIDO, M.J.D.; PEREIRA, E.S.; LOPES, M.N.; ROGERIO, M.C.P. Intake, digestibility and nitrogen balance in sheep fed diets containing detoxified castor cake. **Revista Ciência Agronômica**, v. 51, 2020.

FURTADO, R.N.; CARNEIRO, M.S.S.; CANDIDO, M.J.D.; GOMES, F.H.T.; PEREIRA, E. S. Valor nutritivo de dietas contendo torta de mamona submetida a métodos alternativos de destoxificação para ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 155-162, 2012.

GARLAND, T.; BAILEY, E. M. Toxins of concern to animals and people. **Revue Scientifique et Technique Office International of Epizootics**, v. 25, p. 341-351, 2006.

GE S, LIN S, ZHAO Z, SUN Q. Epigenetic dynamics and interplay during spermatogenesis and embryogenesis: implications for male fertility and offspring health. **Oncotarget**, v. 32, p. 53804-53818, 2017.

GHORBANKHANI, F.; SOURI, M.; MOEINI, M.M.; MIRMAHMOUDI, R. Effect of nutritional state on semen characteristics, testicular size and serum testosterone concentration in Sanjabi ram lambs during the natural breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 153, p. 22–28, 2015.

GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 201–214, 2008.

GIONBELLI, T.R.S.; VELOSO, C.M.; GIONBELLI, M.P. Utilization of castor bean meal treated with calcium hydroxide, fed wet or dry, by lambs. **Livestock Science**, v. 68, p. 76-83, 2014.

GODFREY, R.W. Effect of season and location on semen quality and serum concentrations of luteinizing hormone and testosterone in Brahman and Hereford bulls. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 734-749, 1990.

GOMES, F.P.; PARK, R.; VIANA, A.G.; FERNANDEZ-COSTA, C.; TOPPER, E.; KAYA, A. Protein signatures of seminal plasma from bulls with contrasting frozen-thawed sperm viability. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1–14, 2020.

GOMES, A. Q., NOLASCO, S., & SOARES, H. Non-coding RNAs: Multi-tasking molecules in the cell. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 16010– 16039, 2013.

GONZÁLEZ-CADAVID V.; MARTINS, J.A.; MORENO, F.B.; ANDRADE, T.S.; SANTOS, A.C.L.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MOREIRA, R.A.; MOURA, A.A. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. **Theriogenology**, v. 82, p. 697-707, 2014.

GRIMA, J.; PINEAU, J.; BARDIN, C.W.; CHENG, C.Y. Rat Sertoli cell clusterin, alpha 2-macroglobulin, and testins; biosynthesis and differential regulation by germ cell. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 89, p.127-140, 1992.

HAASE, B.; SCHLÖTTERER, C.; HUNDRIESER, M.E.; KUIPER, H.; DISTL, O.; TÖPFER-PETERSEN, E.; LEEB, T. Evolution of the spermadhesin gene family. 2005. **Gene**, v. 352, p. 20-29, 2005.

HE, L.; HE, X.; LIM, L. P.; DE STANCHINA, E.; XUAN, Z.; LIANG, Y. U.; HANNON, G. J. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. **Nature**, v. 447, p. 1130–1134, 2007.

HERMO, L.; WRIGHT, J.; OKO, R.; MORALES, C.R. Role of epithelial cells of the male excurrent duct system of the rat in the endocytosis or secretion of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 1113-1131, 1991.

HITIT, M.; ÖZBEK, M.; AYAZ-GUNER, S.; GUNER, H.; OZTUG, M.; BODU, M.; KIRBAS, M.; BULBUL, B.; BUCAK, M.N.; ATAMAN, M.B.; MEMILI, E.; KAYA, A. Proteomic fertility markers in ram sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 235, 2021.

- HITIT, Z.Y.; HALLENBECK, P.C. Analytical procedures, data reporting and selected reference values for biological hydrogen production. **Biomass and Bioenergy**, v. 147, 2021.
- HÖTZEL, M.J. Morphometric and endocrine analyses of the effects of nutrition on the testis of mature Merino rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 217-230, 1998.
- IBRAHIM, N.M.; ROMANO, J.E.; TROEDSSON, M.H.T.; CRABO, B.G. Effect of Scrotal Insulation on Clusterin-Positive Cells in Ram Semen and Their Relationship to Semen Quality. **Journal of Andrology**, v. 22, 2001.
- ISLAM, A.B.M.M.; LAND, R.B. Seasonal variation in testis diameter and sperm output of rams of breeds of different prolificacy. **Animal Production**, v. 25, p. 311-317, 1977.
- KRAUS, M.; TICHA, M.; ZELEZNÁ, B.; PEKNICOVÁ, JANA.; JONÁKOVÁ, V. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, p.33-46, 2005.
- LACHANCE, C.; FORTIER, M.; THIMON, V.; SULLIVAN, R.; BAILEY, J.L.; LECLERC, P. Localization of Hsp60 and Grp78 in the human testis, epididymis and mature spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 33, p. 33–44, 2010.
- LACHANCE, C.; BAILEY, J.L.; LECLERC, P. Expressão de Hsp60 e Grp78 no endométrio humano e oviduto, e seu efeito sobre as funções do esperma. **Human Reproduction**, v. 22, p. 2606–2614, 2007.
- LEWIS, S.E; SIMON, L. Clinical implications of sperm DNA damage. **Human Fertility**, v.13, p.201-207, 2010.
- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M.R.; Uma, J. Purification of four gelatinbinding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Bioscience Reports**, v.7, p. 231–238, 1987.
- MANJUNATH, P.; DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of biological chemistry**, v. 267, p. 10149-10155, 1992.
- MANJUNATH, P.; LEFEBVRE, J.; JOIS, P.S.; FAN, J.; WRIGHT, M.W. New nomenclature for mammalian BSP genes. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 394–397, 2009.
- MATSOUKA, T.; IMAI, H.; KOHNO, H.; FUKUI, Y. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. **Journal of Reproductions and Development**, v. 52, p. 675-683, 2006.
- MENEZES, D.R.; COSTA, R.G.; ARAÚJO, G.G.L. Detoxified castor meal in substitution of soybean meal in sheep diet: growth performance, carcass characteristics and meat yield. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, p. 297-302, 2016.
- MENEZES, E.S.B.; BADIAL, P.R.; DEBAKY, H.E.; HUSNA, A.U.L.; GUR, M.R.; KAYA, A.; TOPPER, E.; BULLA, C.; GRANT, K.E.; BOLDEN-TILLER, O. Sperm miR-15a and miR-29b are associated with bull fertility. **Andrologia**, v. 52, 2020.

MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.A.; HAVT, A.; CUNHA, R.M.S.; MARTINS, D.B.G.; CASTELLETTI, C.H.M. SOUZA, P.R.E.; FILHO, J.L.; FREITAS, V.J.F.; CAVADA, B.S.; RÀDIS-BAPTISTA, G. Os genes de Buck (*Capra hircus*) codificam novos membros da família das espermadésinas. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 8-16, 2008.

MERI, S.; JARVA, H. Complement regulatory proteins. **Nature Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-7, 2001.

MOSHKIN, V. A. **Castor**. 1986.

MOURA, A. A.; ANDRADE, C. R.; SOUZA, C. E. A. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 139 – 144, 2011.

MOURA, A.A.; CHAPMAN, D.A.; KOC H.; KILLIAN, G.J. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 534-541, 2006.

MOURA, A.A. Desenvolvimento ponderal e testicular em carneiros Santa Inês no estado do Ceará. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, 1999, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SBZ, 1999.

MOURA, A.A.; ERICKSON, B.H. Age-related changes in peripheral hormone concentrations and their relationships with testis size and number of Sertoli and germ cells in yearling beef bulls. **Journal of reproduction and fertility**, v. 111, p. 183-190, 1997.

NOVAK, S.; SMITH, T.A.; PARADIS, F.; BURWASH, L.; DYCK, M.K.; FOXCROFT, G.R.; DIXON, W.T. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. **Theriogenology**, v. 74, p. 956–967, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. 2007.

NITHYA, R.S.; ANUJA, M.M.; SWATHY, S.S.; RAJAMANICKAM, C.; INDIRA, M. Effects on spermatogenesis in Swiss mice of a protein isolated from the roots of *Ricinus communis* (Linn.) (*Euphorbiaceae*). **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 386–392, 2011.

O'BRYAN, M.K.; BAKER, H.W.; SAUNDERS, J.R.; KIRSZBAUM, L.; WALKER, I.D.; HUDSON, P.; LIU, D.Y.; GLEW, M.D.; D'APICE, A.J.; MURPHY, B.F. Human seminal clusterin (SP-40,40). Isolation and characterization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, p. 1477-1486, 1994.

O'FLAHERTY, C.M.; BEORLEGUI, N.B.; BECONI, M.T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 52, p. 289-301, 1999.

OLIVEIRA, C.H.; SILVA, A.M.; SILVA, L.M.; VAN TILBURGB, M.F.; FERNANDES, C.C.L.; VELHO, A.A.L.M.C.; MOURA, A.A.; MORENO, F.B.M.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MOREIRA, R.A.; LIMA, I.M.T.; RONDINA, D. A. Growth, testis size, spermatogenesis, semen parameters and seminal plasma and sperm membrane protein profile during the reproductive development of male goats supplemented with de-oiled castor cake. **Reproductive Toxicology**, v. 53, p. 152-161, 2015.

OLIVEIRA A.S.; CAMPOS, J.M.S.; OLIVEIRA, M.R.C.; BRITO, A.F.; S VALADARES FILHO, C.; DETMANN, E. Nutrient digestibility, nitrogen metabolism and hepatic function of sheep fed diets containing solvent or expeller castor seed meal treated with calcium hydroxide. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, p. 15-28, 2010.

PALMIERI, A.D.; CARVALHO, G.G.P.; TOSTO, M.S.; LEITE, V.M.L.; SANTOS, S. A.; BORJA, M.S.; AZEVÊDO, J.A.G.; FREITAS JÚNIOR, J.E.; LEITE, L.C.; RUFINO, L.M.A. Feeding behavior of finishing goats fed diets containing detoxified castor meal, coproduct of the biodiesel industry. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, p. 389-395, 2017.

PATHAN, M.; KEERTHIKUMAR, S.; ANG, C.S.; GANGODA, L.; QUEK, C.Y.; WILLIAMSON, N.A.; MOURADOV, D.; SIEBER, O.M.; SIMPSON, R.J.; SALIM, A.; BACIC, A.; HILL, A.F.; STROUD, D.A.; RYAN, M.T.; AGBINYA, J.I.; MARIADASON, J.M.; BURGESS, A.W.; MATHIVANAN, S. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. **Proteomics**, v. 15, p. 2597-2601, 2015.

PINI, T.; LEAHY T.; SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; COMBES-SOIA, L.; HARICHAUX, G.; RICKARD, J.P.; DRUART, X.; DE GRAAF, S.P. Proteomic Investigation of Ram Spermatozoa and the Proteins Conferred by Seminal Plasma. **Journal of Proteome Research**, v. 15, p. 3700-3711, 2016.

PIRES, A.V.; BIEH L.; SUSIN, M.V.; CRUPPE, L.H.; NEPOMUCEMO, D.D.; ROCHA, F.M.; FERREIRA, E.M. Interações entre nutrição e reprodução: fatores que potencializam o desempenho reprodutivo. 2015. In: **Anais... I SIMBOV MT-Simpósio Mato-grossense de Bovinocultura de Corte**, Cuiabá, cap.10, p.263-292, 2015.

PLANTE, G.; THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. Characterization of recombinant murine binder of sperm protein homolog 1 and its role in capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 87, p. 1–11, 2012.

PLANTE, G.; PRUD'HOMME, B.; FAN, J.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. **Cell and Tissue Research**, v. 363, p. 105–127, 2016.

POMPEU, R.C.F. F. **Substituição do farelo de soja pela torta de mamona destoxificada em dietas para ovinos: valor nutritivo e desempenho bioeconômico**. 2009. Tese (doutorado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

POMPEU, R.C.F.F.; ROCHA, A.C.; CANDIDO, M.J.D.; SALLES, H.O.; SEVERINO, L.S.; ROGERIO, M.C.P.; GUEDES, L.F.; ALVES, F.G.S.; FREITAS, J.W.L. **Farelo de mamona industrialmente destoxificado na alimentação de ovinos**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento; Emprapa caprinos e ovinos. 2020.

- PONTHIER, J.; TEAGUE, S. R.; FRANCK, T.Y.; DE LA REBIÈRE, G.; SERTEYN, D.D.; BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; DELEUZE, S. C. Effect of non-sperm cells removal with single-layer colloidal centrifugation on myeloperoxidase concentration in post-thaw equine semen. **Theriogenology**, v. 80, p. 1082-1087, 2013.
- QUINONES, Q.J.; DE RIDDER, G.G.; PIZZO, S.V. GRP78: um acompanhante com diversos papéis além do retículo endoplasmático. **Histology & Histopathology**, v. 23, p. 1409–1416, 2008.
- RAVER-SHAPIRA, N.; MARCIANO, E.; MEIRI, E.; SPECTOR, Y.; ROSENFELD, N.; MOSKOVITS, N.; OREN, M. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. **Molecular Cell**, v. 26, p. 731– 743, 2007.
- REGO, J.P.A.; MOURA, A.A.; NOUWENS, A.S.; MCGOWAN, M.R.; BOE-HANSEN, G.B. Seminal plasma protein profiles of ejaculates obtained by internal artificial vagina and electroejaculation in Brahman bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 8, p. 1-12, 2015.
- ROBINSON, J.J.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE, J.A.; MITCHELL, L.M.; MCEVO, T.G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, p. 259-276, 2006.
- ROCHA, A.C.; ALVES, F.G.S.; SALLES, H.O.; POMPEU, R.C.F.F.; LUDKE, J.V.; SEVERINO, L.S.; CANDIDO, M.J.D. The industrial process of solvent extraction of castor oil reduces the toxicity of the meal. **Industrial Crops e Products**, v. 181, 2022.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Seminal plasma proteins: what role do they play? **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, p. 11–22, 2011.
- RODRÍGUEZ-VILLAMIL, MARULANDA, P.; MARTINS, V.H.; OLIVEIRA, J.A.M.; AGUIAR, L.H. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 85, p. 540–554, 2016.
- ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L.F.T. DONZELE, J.L. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 2005.
- SANDHYAKUMARY, K.; BOBBY, R.G. Indira M. Antifertility effects of *Ricinus communis* (Linn.) on rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 508–11, 2003.
- SANTOS, P.A.; LUDKE, M.C.M.; LUDKE, J.V.; SANTOS, M.J.B.; MELO, A.G.S.; OLIVEIRA, A.C.; CAVALCANTI, A.S.A. Farelo de mamona na alimentação de não ruminantes. **Revista eletrônica nutritime**, v. 10, p. 2814-2827, 2013.
- SANTOS, E.A.; SOUSA, P.C.; MARTINS, J.A.M.; MOREIRA, R.A.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MORENO, F.B. M. B.; OLIVEIRA, M. F.; MOURA, A.A.; SILVA, A.R. Protein profile of the seminal plasma of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Reproduction**, v. 147, p. 753–764, 2014.

SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; BELTRÃO, N. E. M. **Mamona: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Campina Grande: Embrapa Algodão. 2006.

SEVERINO, L.S. **O que sabemos sobre a torta de mamona**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2005. (EMBRAPA Algodão. Documentos, 134).

SHOJAEI SAADI, H.A.; RIEMSDIJK, E.V.; DANCE, A.L.; RAJAMANICKAM, G.D.; KASTELIC, J.P.; THUNDATHIL, J.C. Proteins associated with critical sperm functions and sperm head are differentially expressed in morphologically abnormal bovine sperm induced by scrotal insulation. **Journal Proteomics**, v. 82, p. 64–80, 2013.

SILVA, L.S.; RUIVO, M.A.; C.T.M.; MENEGUELLO, J. E.; PILAU, E.J.; CARUSO, Í.; VANINI, G.; MORAES, A.C. M.; SEIXAS, F.A.V. Structural and biophysical characterization of the major proteins from the seminal plasma of Dorper rams. **Theriogenology**, v. 166, p. 64-70, 2021.

SILVA, L.M.; OLIVEIRA, C.H.A.; SILVA, A.M.; SILVA, C.M.G.; CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A. In vitro development of ovine preantral follicles and oocyte cleavage rate are not affected by long-term ingestion of detoxified castor meal. **Small Ruminant Research**, v. 35, p. 3–9, 2013.

SKUDLAREK, M.D.; TULSIANI, D.R.; NAGDAS, S.K.; ORGEBIN-CRIST, M.C. B-D-galactosidase of rat spermatozoa; subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 204-2013, 1993.

SOTO-BLANCO, B.; SINHORINI, I. L.; GORNIK, S. L.; SCHUMAHER-HENRIQUE, B. Ricinus communis cake poisoning in a dog. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 155-156, 2002.

SOUSA, F. M. L. Parameters of the reproductive tract, spermatogenesis, daily sperm production and major seminal plasma proteins of tropically adapted morada nova rams. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 409–419, 2014.

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

SOUZA, C.E.; ARAUJO, A.A.; OLIVEIRA, J.T.; LIMA SOUZA, A.C.; NEIVA, J.N.; MOURA, A.A. Reproductive development of Santa Ines rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 644-653, 2010.

SOUSA, W.H.; LOBO, R.N.B.; MORAIS, O.R. Ovinos Santa Inês: Estado de Arte e Perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 2, p. 2237-2247, 2003.

SOUZA, C.E.A.; MOURA, A. DE A.A.; LIMA, A.C.B. Circunferência escrotal e características seminais em carneiros Santa Inês. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.196-199, 2001.

SYLVESTER, S.R.; MORALES, C.; OKO, R. Localização da glicoproteína-2 sulfatada (clusterina) nos espermatozoides e no trato reprodutivo do rato macho. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 195-207. 1991.

VAN TILBURG, M.F.; RODRIGUES, M.A.M.; MOREIRA, R.A.; MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; CÂNDIDO, M.J.D.; MOURA, A.A. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, v. 79, p. 1247-1261, 2013.

VIANA, A.G.A.; MARTINS, A.M.A.; PONTES, A.H.; FONTES, W.; CASTRO, M.S.; RICART, C.A.O.; SOUSA, M.V.; KAYA, A.; TOPPER, E.; MEMILI, E.; MOURA, A.A. Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. **Scientific Reports**, v. 8, 2018.

TÁVORA, F.J.A.F. A cultura da mamona. **Empresa de pesquisa agropecuária do Ceará**. 1982.

TOPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P. F.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; DOSTÀLOVÀ, Z.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, v. 30, p. 207-244, 1999.

TULAY, P.; SENGUPTA, S.B. MicroRNA expression and its association with DNA repair in preimplantation embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 62, p. 225– 234, 2016.

YARNEY, T.A.; SANFORD, L.M.; PALMER, W.M. Pubertal development of ram lambs: body weight and testicular size measurements as indices of postpubertal reproductive function. **Journal Animal Science**, v.70, p.139-147, 1990.

WANG, Y.; LI, X.; GONG, X.; ZHAO, Y.; WU, J. MicroRNA-322 regulates self-renewal of mouse spermatogonial stem cells through Rassf8. **International Journal of Biological Sciences**, v. 15, p. 857– 869, 2019.

WATERHOUSE, K.E.; HAUGAN, T.; KOMMISRUUD, E.; TVERDAL, A.; FLATBERG, G.; FARSTAD, W.; EVENSON, D.P.; DE ANGELIS, P.M. Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 781–788, 2006.

WESTFALEWICZ, B.; DIETRICH, M.A.; MOSTEK, A.A.; PARTYKA, W.; BIELAS, W.; NIŻAŃSKI, CIERESZKO, A. Analysis of bull (*Bos taurus*) seminal vesicle fluid proteome in relation to seminal plasma proteome. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 2282-2298, 2017.

WILSON, M. R.; EASTERBROOK-SMITH, S. B. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. **A Journal of the International Biometric Society**, v. 25, p. 95-98, 2000.

ZALATA, A.; EL-SAMANOUDY, A.Z.; SHAALAN, D.; EL-BAIOMY, Y.; TAYMOUR, M.; MOSTAFA, T. Seminal clusterin gene expression associated with seminal variables in fertile and infertile men. **The Journal of Urology**, v. 188, p. 1260–1264, 2012.

ZHOU, Y.; ZHOU, B.; PACHE, L.; CHANG, M.; KHODABAKHSHI, A.H.; TANASEICHUK, O.; BENNER, C.; CHANDA, S.K. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. **Nature Communications**, v. 10, 2019.

APÊNDICE A - LISTA DAS MÉDIAS E DESVIO-PADRÃO POR TRATAMENTO

Parâmetros	Tratamento	N	Média	Desvio-padrão	Variância
Volume ejaculado	FS	4	1.063	1.008	1.016
	FMD	4	1.625	1.031	1.063
	FMDP	4	2.000	1.000	1.000
Turbilhão	FS	4	2.000	2.309	5.333
	FMD	4	2.000	2.000	4.000
	FMDP	4	3.000	1.414	2.000
Vigor	FS	4	2.000	1.155	1.333
	FMD	4	2.000	1.414	2.000
	FMDP	4	2.750	0.500	0.250
Motilidade	FS	4	33.750	33.260	1.106.250
	FMD	4	33.000	40.398	1.632.000
	FMDP	4	55.000	23.452	550.000
Concentração espermática	FS	4	2.05e+9	7.97e+8	6.35e+17
	FMD	4	1.97e+9	1.48e+9	2.20e+18
	FMDP	4	4.33e+9	3.44e+9	1.19e+19
Normais	FS	4	77.422	21.534	463.729
	FMD	4	85.400	3.643	13.271
	FMDP	4	75.153	12.492	156.044
Defeitos maiores	FS	4	14.285	11.881	141.153
	FMD	4	8.165	2.160	4.666
	FMDP	4	7.508	5.360	28.733
Defeitos menores	FS	4	8.293	9.793	95.910
	FMD	4	6.435	3.359	11.280
	FMDP	4	17.343	11.405	130.081
DNA íntegro	FS	4	69.752	38.141	1.454.768
	FMD	4	26.640	29.571	874.430
	FMDP	4	47.090	43.861	1.923.827
DNA fragmentado	FS	4	29.455	37.557	1.410.524
	FMD	4	41.255	32.170	1.034.891
	FMDP	4	26.225	33.618	1.130.138
DNA Degenerado	FS	4	0.793	0.809	0.655
	FMD	4	32.105	45.924	2.109.035
	FMDP	4	26.688	48.913	2.392.525
Comprimento testicular	FS	4	82.750	6.909	47.737
	FMD	4	83.700	5.854	34.273
	FMDP	4	88.000	2.879	8.287
Largura testicular	FS	4	60.625	3.140	9.862
	FMD	4	59.325	2.158	4.656

	FMDP	4	60.975	2.586	6.689
	FS	4	128.200	22.454	504.173
Peso testicular	FMD	4	126.825	12.553	157.589
	FMDP	4	149.325	22.933	525.916

APÊNDICE B - LISTA DE ILUSTRAÇÕES POR CAPÍTULO

CAPÍTULO I

Figura 1 -	SDS-PAGE do plasma seminal de carneiros Santa Inês.....	23
Figura 2 -	Análise e conjunto gênico de miRNAs associados aos 5 genes identificados pelo programa com base nos maiores valores-P obtidos do banco de dados miRNet.....	29
Figura 3 -	Diagrama da ontologia gênica demonstrando a distribuição funcional das proteínas mais abundantes no plasma seminal de ovinos da raça Santa Inês. A distribuição foi feita com base em processos biológicos (A), componentes celulares (B) e funções moleculares (C) de cada tratamento. Os dados de proteínas foram analisados usando o software de pesquisa de anotações de proteínas Panther17.0 gene ontology (GO). Os termos de ontologia gênica foram obtidos do banco de dados UniProtKB.....	31
Figura 4 -	Agrupamentos de proteínas identificadas no plasma seminal de cada grupo, conforme determinado pelo Metascape (https://metascape.org/)...	33
Figura 5 -	Análise in silico das interações proteína-proteína de cada grupo. As interações foram definidas pelo Metascape (https://metascape.org/).....	36

CAPÍTULO II

Figura 1 -	Avaliação das dimensões testiculares dos carneiros da raça Santa Inês.....	52
------------	--	----

APÊNDICE C - LISTA DE TABELAS POR CAPÍTULO

CAPÍTULO I

Tabela 1 -	Composição centesimal das rações experimentais utilizadas.....	20
Tabela 2 -	Composição químico-bromatológico dos ingredientes e das rações experimentais utilizadas.....	21
Tabela 3 -	Lista das 10 proteínas mais abundantes encontradas no plasma seminal de carneiros de cada grupo.....	28
Tabela 4 -	Análise KEEG pathways utilizando o servidor DAVID para genes relacionados ao plasma seminal dos três grupos.....	30

CAPÍTULO II

Tabela 1 -	Parâmetros seminais, dimensões testiculares e integridade da cromatina espermática de todos os grupos analisadas no experimento.....	55
Tabela 2 -	Desempenho de ovinos da raça Santa Inês alimentados com farelo de mamona em substituição ao farelo de soja.....	56
Tabela 3 -	Dimensões testiculares de carneiros Santa Inês alimentados com farelo de mamona analisadas por meio do aplicativo estatístico Jamovi (v. 2.3.18; The Jamovi Project, 2022).....	59
Tabela 4 -	Média dos parâmetros seminais, dimensões testiculares e integridade da cromatina espermática de todos os grupos experimentais analisadas por meio do aplicativo estatístico Jamovi (v. 2.3.18; The Jamovi Project, 2022).....	57