



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**  
**PDIZ/ UFC/ UFPB/ UFRPE**

**RODRIGO VASCONCELOS DE OLIVEIRA**

**PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS E DINÂMICA DA CROMATINA EM RUMINANTES:  
RELAÇÃO COM A FERTILIDADE EM TOUROS E COM O USO DE CASTANHA DE CAJU  
NA DIETA DE OVINOS.**

**FORTALEZA**

**2013**

**RODRIGO VASCONCELOS DE OLIVEIRA**

**PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS E DINÂMICA DA CROMATINA EM RUMINANTES:  
RELAÇÃO COM A FERTILIDADE EM TOUROS E COM O USO DE CASTANHA DE  
CAJU NA DIETA DE OVINOS.**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Zootecnia. Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Arlindo A. A. Noronha Moura

Co-orientador: Dr. Maurício Fraga van Tilburg

**FORTALEZA**

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- O51p      Oliveira, Rodrigo Vasconcelos de.  
            Proteínas espermáticas e dinâmica da cromatina em ruminantes: relação com a fertilidade em  
            tousos e com o uso de castanha de caju na dieta de ovinos. / Rodrigo Vasconcelos de Oliveira. – 2013.  
            118 f. : il. Color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de  
            Zootecnia, Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, Fortaleza, 2013.  
            Área de Concentração: Reprodução Animal.  
            Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.  
            Coorientação: Prof. Dr. Maurício Fraga van Tilburg.
1. Espermatozoides. 2. Cromatina. 3. Reprodução animal. 4. Castanha-de-caju. I. Título.

---

CDD 636.08

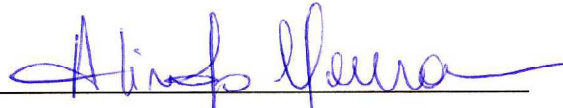
**RODRIGO VASCONCELOS DE OLIVEIRA**

**PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS E DINÂMICA DA CROMATINA EM RUMINANTES:  
RELAÇÃO COM A FERTILIDADE EM TOUROS E COM O USO DE CASTANHA DE  
CAJU NA DIETA DE OVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Zootecnia. Área de concentração: Reprodução Animal.

Aprovada em: 05/07/2013.

**BANCA EXAMINADORA**

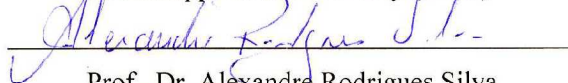


Prof. Dr. Arlindo Moura (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Erdogan Memili

Mississippi State University (MSU)



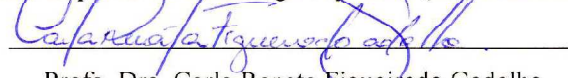
Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva

Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)



Profa. Dra. Claudia Roberta de Andrade

Instituto Superior de Tecnologia Aplicada (Faculdades INTA)



Profa. Dra. Carla Renata Figueiredo Gadelha

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dra. Vanessa Porto Machado

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Carlos Alberto Marques de Oliveira  
e Elza Maria Vasconcelos de Oliveira.

A minha irmã, Sabrina Vasconcelos de Oliveira.

A minha tia, Maria de Fátima Pereira de  
Vasconcelos *in memoriam*.

## AGRADECIMENTOS

Á Deus.

A minha mãe, Elza Maria Vasconcelos de Oliveira, pelo apoio incondicional as minhas metas profissionais. Pela mãe amorosa, carinhosa e zelosa. Que por sua dedicação ao trabalho, garantiu um estudo de qualidade para nós, eu e minha irmã, que foi essencial para os nossos ingressos em universidades públicas.

Ao meu pai, Carlos Alberto Marques de Oliveira, meu exemplo de caráter. Que mesmo distante, sempre me ajudou a manter a confiança, o foco e o desapego as opiniões e as pessoas negativas.

A minha irmã, Sabrina Vasconcelos de Oliveira, pela nossa fraternidade amorosa, respeitosa e feliz que mesmo duramente meu afastamento familiar devido ao mestrado e doutorado, nunca diminuiu. E pelo modelo de profissional da educação que trabalha com coração e dedicação.

Mãe, pai e irmã: vocês são os meus heróis. Estar distante de vocês fisicamente foi sem dúvida a tarefa mais difícil na realização deste trabalho. Amo vocês.

A minha namorada, Erika da Silva Bezerra de Menezes, por todo amor, carinho, motivação e apoio profissional durante esta caminhada.

Aos meus familiares, que sempre incentivaram, auxiliaram e acreditaram nas minhas finalidades profissionais. Vocês são a minha base. Procurei transformar a saudade em incentivo para representar nossa família com determinação e responsabilidade. Em especial, a minha amada Tia Fátima *in memoriam*, minha mãe de leite, a senhora estará sempre no meu coração. Voltar dos Estados Unidos e não poder receber o seu abraço, reforçou a lição que devemos aproveitar o bom da nossa efêmera vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arlindo Moura, pela orientação, oportunidades e por acreditar no meu trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Maurício Fraga van Tilburg, por sempre compartilhar seus conhecimentos e pelo companheirismo.

Ao Dr. Erdogan Memili e sua equipe do *Animal Functional Genomics Laboratory*, Sule Dogan, Kamilah Grant, Aruna Govindaraju, Melissa Mason, Lauren Belsser e Aressa Coley e, à todos os alunos e professores do *Department of Animal and Dairy Sciences* da *Mississippi State University* que tornaram os meus 9 meses de Doutorado Sanduíche nos Estados Unidos tão proveitosos e inesquecíveis.

Aos doutores participantes da banca examinadora: Prof. Dr. Erdogan Memili, Prof. Dr. Alexandre Rodrigues, Prof. Dra. Claudia Andrade, Prof. Dra. Carla Gadelha e Dra. Vanessa Porto pelas valiosas colaborações.

Aos professores da Universidade Federal do Ceará, Universidade Estadual do Ceará e Universidade Federal Fluminense que auxiliaram na minha formação profissional.

Em especial à minha orientadora durante a graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal Fluminense, a Dra Ana Helena Lopes Bento (vulgo Ana Kabrita). Que transformou minha curiosidade e interesse em pequenos ruminantes em uma paixão verdadeira. Que ao longo da graduação, sem que eu tomasse consciência, preparou e lapidou as minhas arestas deficientes para que pudesse estar mais preparado para o desdobrar de um curso de Pós-Graduação. Por sempre ouvir, acreditar e respeitar minhas ideias e opiniões. Que não mediu esforços em me proporcionar oportunidades profissionais. Do seu eterno desorientado, que tanto lhe estima e admira.

À minha tia Sueli Soares e meu amigo Jorge, pelo cuidado, consideração e acolhida no período de adaptação aqui em Fortaleza-CE.

A todos os meus amigos. Em particular aqueles que acompanharam pessoalmente a minha formação profissional no Ceará: Dr. José Maurício Cavalcante, Ítalo Lima e Emilson Moreira. E em especial aos meus amigos de infância e juventude pela confiança, suporte e incentivo na concretização desta realização profissional.

“O homem é do tamanho do seu sonho, disse Fernando Pessoa. E você é grande, amigo. Você sonhou com este momento, e ele chegou. A soma do trabalho e do foco na realização trouxe este momento de consagração. Lembre-se de cada esforço que foi feito. Lembre-se das manhãs, das tardes e das noites de incansável trabalho. Lembre-se de tudo que você teve que abdicar para alcançar esse objetivo. E pense: valeu cada segundo.

Hoje, temos em você um exemplo que nos enche de orgulho e de esperança. Orgulho porque você mostrou, desde muito cedo, uma capacidade incrível de superar desafios que, apesar de nobres, eram complexos. Esperança porque você, certamente, será um agente de transformação do futuro; o trabalho que você teve para chegar até aqui reflete a humanidade mais justa de amanhã.

Parabéns! Daqui, estamos com você aí!"

Escrito por Filipe Couto em nome dos amigos (Rodrigo Couto, Rodrigo Matias, Leonardo Dutra, Felipe Moraes, Louri Bianco, Paulo Bianco, Gabriel Araújo, Raphael Abraão, Thadeu Botelho, Sabrina Oliveira e demais amigos).

A equipe do GRUPO DE PESQUISA EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO - UFC, pelo convívio e apoio nas atividades. Em especial: Dr. Carlos Lobo e Lucas Fonseca.

As equipes de pesquisa do Laboratório de Proteínas de Defesa de Plantas - UFC (Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira), Núcleo Integrado de Biotecnologia - UECE (Dr. José Ferreira Nunes) e Grupo de Produtos Naturais Aplicados à Saúde - UNIFOR (Dra. Ana Cristina De Oliveira Monteiro Moreira e Dr. Renato de Azevedo Moreira) pelas contribuições aos estudos.

Ao Prof. Pedro Zione Souza, por ter cedido as baias para o experimento do Estudo 2.

Aos colegas das turmas de Pós-Graduação em Zootecnia - UFC, pela convivência.

As instituições: Funcap, CAPES e Fulbright, pelo apoio financeiro e pelas bolsas de auxílio durante o doutorado.

Ao Colégio Palas, pela bolsa de estudos integral concedida durante toda a minha vida escolar. Essa casa me presenteou com a base necessária para alcançar o meu sonho de ser Médico Veterinário.

Aos animais, pelas experiências de vida e morte.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

O meu sincero obrigado!



“Seja a mudança que você deseja para o mundo.”

Mahatma Gandhi

## RESUMO

A fertilidade em ruminantes é influenciada por fatores intrínsecos espermáticos como a cromatina e as proteínas. Considerando que a eficiência reprodutiva do macho depende de uma nutrição balanceada e viável, o farelo de castanha de caju (FCC) é um subproduto de baixo custo que deve ser analisado quanto a possíveis efeitos na integridade cromatínica e proteica dos espermatozoides.

**Estudo 1:** O estudo 1 teve como objetivos determinar: falhas na condensação da cromatina, níveis de expressão e localização celular das histonas: H3.3, H2b e H4B, respectivamente, em espermatozoides de touros de baixa (BF) e alta fertilidade (AF). Os dados foram avaliados pelo teste t e correlação de Pearson ( $P < 0,05$ ). Os resultados do teste do azul de anilina foram diferentes entre os grupos BF (1,73 (0,55, 0,19)) e AF (0,67 (0,17, 0,06)) ( $P < 0,0001$ ), os quais também foram negativamente correlacionados com a fertilidade *in vivo* de touros ( $r = -0,90$ ;  $P < 0,0001$ ). Apesar das histonas terem sido consistentemente imunodetectadas e localizadas nos espermatozoides, estas não apresentaram diferenças entre os grupos. As proteínas H3.3 e H4 apresentaram 100% de identidade e foram conservadas entre bovinos, murinos e seres humanos. Entretanto, as variantes H2B foram mais conservadas entre touros e humanos do que entre humanos e camundongos. Em conclusão, as proteínas H2B, H3.3 e H4 foram detectáveis em espermatozoides de touros e a condensação da cromatina espermática, alterada pela retenção de histonas, é relacionada com a fertilidade de touros. **Estudo 2:** O estudo 2 objetivou avaliar os efeitos da inclusão de 13% de FCC na dieta de carneiros Morada Nova sobre as características seminais, integridade de cromatina e perfil das proteínas espermáticas. Vinte carneiros foram divididos em dois grupos: castanha (GCA) e controle (GCO).que receberam na dieta 13% e 0% de FCC durante 90 dias, respectivamente. Os grupos foram comparados quanto ao peso vivo, circunferência escrotal, parâmetros seminais, integridade de cromatina e perfil das proteínas espermáticas aos 0, 45 e 90 dias de experimento. Os dados foram analisados pelo método GLM para medidas repetidas ( $P < 0,05$ ). Aos 90 dias o GCA (69,00% (7,38; 2,33)) apresentou porcentagem de espermatozoides móveis superior ao GCO (60,00% (9,43; 2,98)) ( $P < 0,05$ ). Não houve efeito da dieta contendo FCC sobre a integridade da cromatina. Porém, os percentuais das proteínas ODF1 e H2B foram mais elevados nos carneiros do GCA ( $P < 0,05$ ). As proteínas: ODF1, GPX4, FTL e H2B foram negativamente correlacionadas com a qualidade da cromatina espermática. Em conclusão, a inclusão de FCC na dieta de carneiros não afetou negativamente a qualidade seminal.

**Palavras-chave:** espermatozoide, histonas e integridade cromatínica

## ABSTRACT

The ruminant fertility is influenced by intrinsic sperm factors, like chromatin or proteins. Considering that the reproductive efficiency is dependent on a balanced and feasible nutrition, the cashew nut meal (CNM) is a low cost byproduct that must be analyzed for possible effects on sperm chromatin and proteins. **Study 1:** The objectives of study 1 were to determine failures of chromatin condensation, expression levels and cellular localizations of histones; H3.3, H2B and H4, respectively in spermatozoa from low (LF) vs. high fertility (HF) bulls. The data were analyzed by t test and Pearson correlation ( $P < 0.05$ ). We demonstrated that aniline blue staining was different within LF (1.73 (0.55, 0.19)) and HF Groups (0.67 (0.17, 0.06) ( $P < 0.0001$ ), which was also negatively correlated with *in vivo* bull fertility ( $r = -0.90$ ;  $P < 0.0001$ ). Although those histones were consistently immune-detectable and specifically localized in bull sperm, this was not different between the two groups. Except H2B variants, H3.3 and H4 showed 100% identity and conserved among bovine, mouse and human. The H2B variants were more conserved between bovine and human than those of mouse. In conclusion, we showed that H2B, H3.3 and H4 were detectable in bull spermatozoa and that sperm chromatin condensation status, changed by histone retention, is related with bull fertility. **Study 2:** The objectives of study 2 were evaluate the effects of 13% of CNM inclusion in the diet of Morada Nova rams on the semen parameters, chromatin integrity and sperm proteins. Twenty rams were distributed in two equal groups: cashew nut group (CNG) and control group (COG) that received 13% and 0% of CNM in the diet for 90 days, respectively. The groups were compared for live weight, scrotal circumference, seminal parameters, chromatin integrity and sperm protein profile at 0, 45 and 90 days of the experiment. The data were evaluated by GLM for repeated measures ( $P < 0.05$ ). At 90 days, CNG (69.00% (7.38; 2.33)) presented percentage of motile sperm superior than control group (60,00% (9,43; 2,98)) ( $P < 0.05$ ). There was not effect from the diet with CNM on chromatin integrity. But, the percentages of protein expression from ODF1 and H2B were larger in the CNG ( $P < 0.05$ ). The proteins: ODF1, GPX4, FTL and H2B were negatively correlated with sperm chromatin quality. In conclusion, the cashew nut meal did not affect negatively the semen quality.

**Keywords:** spermatozoa, histones and chromatin integrity

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão de Literatura

- Figura 1.** Estrutura da cromatina nos espermatozoides. 20
- Figura 2.** Imagens de géis oriundas das técnicas de eletroforese desnaturante unidimensional (SDS-PAGE) (A) e eletroforese bi-dimensional (B). 27

### Estudo 1

- Figura 1.** Espermatozoides de touros corados com azul de anilina. 47
- Figura 2.** Análise de regressão linear entre os resultados do teste do AZAN e a fertilidade de touros de baixa e alta fertilidades. 48
- Figura 3.** Western blot (3a) e quantidade relativa de histonas H2B (3b), H3.3 (3c) e H4 (3d) nos touros de BF (pontos negros) e de AF (pontos cinza). 49
- Figura 4.** Imunolocalização das histonas em espermatozoides bovinos. 50
- Figura suplementar 1.** Árvore filogenética (A) e alinhamento múltiplo\* (B) das histonas H2B oriundas de bovinos, camundongos e seres humanos. 58
- Figura suplementar 2.** Árvore filogenética e alinhamento múltiplo das histonas H3.3 (A e B) e H4 (C e D) oriundas de bovinos, camundongos e seres humanos. 60

### Estudo 2

- Figura 1.** Gel unidimensional das proteínas espermáticas de carneiros Morada Nova oriundas do grupo castanha (GCA) e controle (GCA) após 90 dias de experimento. 82
- Figura 2.** Localizações espermáticas e modelos tridimensionais das proteínas *ferritin light chain-like* (FTL), *phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mitochondrial* (GPX4), *histone H2B type W-T-like* (H2B) e *outer dense fiber protein 1* (ODF1). 87

## LISTA DE TABELAS

### Revisão de Literatura

<b>Tabela 1.</b> Exemplos de ferramentas de bioinformática para o estudo de proteínas.	29
--	----

### Estudo 1

<b>Tabela 1.</b> Fenótipos de fertilidade dos dezesseis touros. Os touros de 1 a 8 são do grupo BF e os touros de 9 a 16 são do grupo AF.	43
---	----

<b>Tabela 2.</b> Análise imunocitoquímica das histonas espermáticas de touros de alta e baixa fertilidade. Os resultados estão expressos como média (DP; EPM).	51
--	----

<b>Tabela suplementar 1.</b> Lista das histonas H2B utilizadas nas análises de bioinformática.	56
--	----

<b>Tabela suplementar 2.</b> Lista das histonas H3.3 e H4 utilizadas nas análises de bioinformática.	59
--	----

### Estudo 2

<b>Tabela 1.</b> Percentagem de nutrientes e ingredientes das rações totais fornecidas ao grupo castanha (GCA) e ao grupo controle (GCO).	75
---	----

<b>Tabela 2.</b> Peso vivo (PV), escore corporal (ECC) e circunferência escrotal (CE) em carneiros Morada Nova alimentados com ou sem farelo de castanha.	79
---	----

<b>Tabela 3.</b> Avaliação dos parâmetros seminais em carneiros Morada nova, alimentados com ou sem farelo de castanha. Apenas foi observada diferença estatística entre os grupos castanha e controle para o parâmetro porcentagem de espermatozoides móveis (PM) aos 90 dias (dados em negrito) ( $P < 0.05$ ).	80
---	----

<b>Tabela 4.</b> Correlações significativas entre o teste de azul de toluidina (AT) e avaliações espermáticas.	81
--	----

<b>Tabela 5.</b> Avaliação da expressão de proteínas espermáticas em carneiros Morada Nova, alimentados com ou sem farelo de castanha. Os valores referentes a cada banda estão expressos como porcentagens relativas ao total de cada amostra (%) (média (DP; EPM). Apenas foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos castanha e controle para as bandas proteicas B2 e B4 aos 90 dias de experimento (dados em negrito) ( $P < 0,05$ ).	83
---	----

**Tabela 6.** Correlações significativas entre as expressões das proteínas e as avaliações espermáticas ( $P < 0.05$ ). 84

**Tabela 7.** Proteínas identificadas, nas bandas B2, B3 e B4, por espectrometria de massas e seus números de acesso na plataforma NCBI, massa moleculares (kDa), pontos isoelétricos (pI), número de sequências peptídicas identificadas (número de sequências peptídicas significativas) e porcentagens das sequências cobertas (%), respectivamente. 85

**Tabela 8.** Principais processos biológicos, localizações celulares e funções moleculares das proteínas identificadas por espectrometria de massas obtidos na base de dados Uniprot. 86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AZAN:</b>	azul de anilina
<b>AZTO:</b>	azul de toluidina
<b>AU-PAGE</b>	ácido acético-uréia-poliacrilamida
<b>°C</b>	graus Celsius
<b>CE</b>	circunferência escrotal
<b>COMET:</b>	teste de eletroforese em célula única
<b>DEFMA:</b>	defeitos maiores
<b>DEFME:</b>	defeitos menores
<b>DEFTO:</b>	defeitos totais
<b>DP:</b>	desvio padrão da média
<b>EE:</b>	extrato etéreo
<b>EPM:</b>	erro padrão da média
<b>FCC:</b>	farelo de castanha de caju
<b>FITC:</b>	isotiocianato de fluoresceína
<b>FTL:</b>	ferritin light chain
<b>xg:</b>	constante gravitacional
<b>GCA:</b>	grupo castanha
<b>GCO:</b>	grupo controle
<b>GPX4:</b>	glutathione peroxidase 4
<b>H2A:</b>	histona H2A
<b>H2B:</b>	histona H2B
<b>H3.3:</b>	histona H3.3
<b>H3:</b>	histona H3
<b>H4:</b>	histona H4
<b>HCl:</b>	ácido clorídrico
<b>min:</b>	minutos
<b>mg</b>	miligramas
<b>MM</b>	motilidade massal
<b>NCBI:</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>ODF1:</b>	outer dense fiber protein 1

<b>PB:</b>	proteína bruta
<b>PBS-T:</b>	tampão de lavagem para imunocitoquímica contendo Triton X-100 a 0,1% em PBS (pH 7,4)
<b>PM</b>	porcentagem de espermatozoides móveis
<b>PMSF:</b>	fluoreto de fenilmetilsulfonil
<b>PV</b>	peso vivo
<b>kg</b>	kilogramas
<b>RNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>SCD:</b>	sperm chromatin dispersion test
<b>SCSA:</b>	sperm chromatin structure assay
<b>SwissProt:</b>	base de dados do Swiss Institute of Bioinformatics
<b>TBS-T20</b>	solução tamponada Tris-HCl contendo Tween-20 a 0.1%
<b>TP1:</b>	proteína de transição testicular 1
<b>TP2:</b>	proteína de transição testicular 2
<b>TRIS:</b>	tris(hidroximetil)aminometano
<b>TUNEL:</b>	técnica de inserção de nucleotídeos biotinizados na extremidade de fragmento de DNA
<b>Vigor</b>	Vigor espermático
<b>µm</b>	microgramas
<b>xg</b>	constante gravitacional



## LISTA DE SÍMBOLOS

® marca registrada

% porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 A importância da cromatina espermática na avaliação de reprodutores. ....	19
2.2 As proteínas espermáticas: potenciais marcadores de qualidade seminal e fertilidade em animais.....	23
2.3 As abordagens proteômicas associadas a eletroforese em gel.....	26
2.4 Influências da nutrição na fisiologia de reprodutores ruminantes.....	30
2.5 Utilização da castanha de caju e seus subprodutos na alimentação de ruminantes. ....	33
<b>3 JUSTIFICATIVAS</b> .....	35
<b>4 HIPÓTESE</b> .....	35
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	36
5.1 Objetivo Geral.....	36
5.2 Objetivos específicos.....	36
5.2.1. <i>Estudo 1: Morfologia molecular e funções do espermatozoide bovino relacionadas às histonas e associadas à fertilidade</i> .....	36
5.2.2. <i>Estudo 2: Avaliação da integridade de cromatina e proteínas em espermatozoides de carneiros morada nova alimentados com farelo de castanha: e suas relações com os parâmetros seminais</i> .....	36
<b>6 ESTUDO 1: MORFOLOGIA MOLECULAR E FUNÇÕES DO ESPERMATOZOIDE BOVINO RELACIONADAS ÀS HISTONAS E ASSOCIADAS À FERTILIDADE</b> .....	37
6.1 Introdução .....	40
6.2 Materiais e métodos.....	42
6.2.1 <i>Determinação da fertilidade dos touros</i> .....	42
6.2.2 <i>Isolamento dos espermatozoides para extração das nucleoproteínas</i> .....	42
6.2.3 <i>Teste do azul de anilina (AZAN)</i> .....	43
6.2.4 <i>Extração das nucleoproteínas</i> .....	44
6.2.5 <i>Western blotting</i> .....	44
6.2.6 <i>Imunocitoquímica</i> .....	45
6.2.7 <i>Bioinformática</i> .....	46
6.2.8. <i>Análise estatística</i> .....	46
6.3 Resultados.....	46
6.3.1 <i>Teste do azul de anilina (AZAN)</i> .....	47
6.3.2 <i>Western blotting</i> .....	48
6.3.3 <i>Imunocitoquímica</i> .....	49

6.3.4 <i>Bioinformática</i> .....	51
6.4 <b>Discussão e conclusão</b> .....	52
6.5 <b>Declaração de interesse</b> .....	55
6.6 <b>Financiamento</b> .....	55
6.7 <b>Agradecimentos</b> .....	55
6.8 <b>Tabelas e figuras suplementares</b> .....	56
6.9 <b>Referências bibliográficas</b> .....	61
<b>7. ESTUDO 2: AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE CROMATINA E PROTEÍNAS EM ESPERMATOZOIDES DE CARNEIROS MORADA NOVA ALIMENTADOS COM FARELO DE CASTANHA E SUAS RELAÇÕES COM PARÂMETROS SEMINAIS.</b> .....	69
7.1 <b>Introdução</b> .....	72
7.2 <b>Material e métodos</b> .....	74
7.2.1 <i>Animais e grupos experimentais</i> .....	74
7.2.2 <i>Coleta e avaliação seminal</i> .....	74
7.2.3 <i>Teste do azul de toluidina</i> .....	75
7.2.4 <i>Extração das proteínas espermáticas</i> .....	76
7.2.5 <i>Eletroforese unidimensional nativa em gel de ácido acético-uréia-poliacrilamida (AU-PAGE)</i> .....	76
7.2.6 <i>Análise das bandas proteicas auxiliada por computador</i> .....	77
7.2.7 <i>Digestão das bandas de proteínas</i> .....	77
7.2.8 <i>Identificação das proteínas por espectrometria de massa</i> .....	78
7.2.9. <i>Análise estatística</i> .....	78
7.3 <b>Resultados</b> .....	79
7.4 <b>Discussão</b> .....	88
7.5 <b>Conclusões e perspectivas</b> .....	91
7.6 <b>Referências bibliográficas</b> .....	91
<b>8. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	97
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	97
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	98

## 1 INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva é uma necessidade ao sucesso econômico da produção animal. Considerando que, a capacidade reprodutiva dos machos afeta em significativa proporção as taxas de procriação de um rebanho, estudos relacionados à predição da fertilidade de reprodutores são vitais para incrementar a geração de produtos de origem animal. Classicamente, a avaliação de reprodutores é baseada em biometrias corporais e testiculares e, em exames das características seminais.

Entre os parâmetros tradicionalmente mensurados têm-se: concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides. Contudo, existem alterações espermáticas moleculares que podem não ser constatadas por meio destas análises clássicas. Dentre estas anomalias existem os danos presentes à cromatina espermática, pois, espermatozoides maduros normais devem ter seu genoma organizado, em uma estrutura ímpar altamente condensada, para sua proteção durante o trajeto até a fecundação. Além disso, entre as moléculas orgânicas importantes para a fertilidade espermática, destacam-se as proteínas. Estes polímeros de aminoácidos desempenham funções celulares estruturais, enzimáticas, de transporte e proteção. Desta forma, nas duas últimas décadas, as proteínas espermáticas vêm sendo investigadas como potenciais marcadores não apenas da qualidade seminal, mas também de fertilidade.

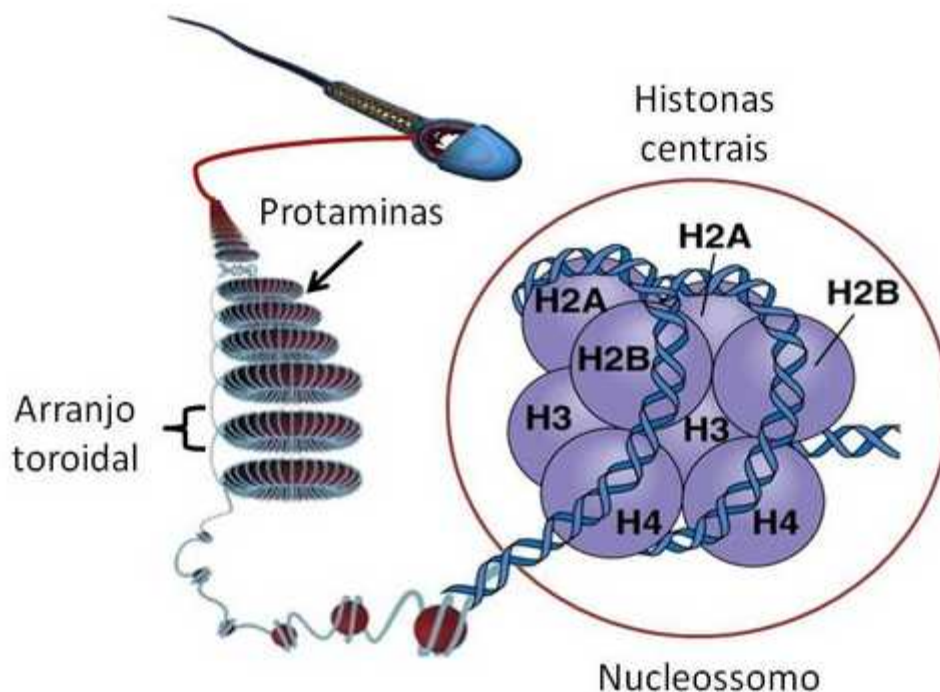
A manutenção da eficiência reprodutiva dos machos depende de um manejo nutricional corresponde a principal parcela de gastos. Assim, o custo constante com a nutrição adequada dos reprodutores motiva a utilização de alimentos baratos e nutritivos. Em regiões tropicais, resíduos agroindustriais correspondem a uma opção viável na composição da dieta para animais de produção. Neste contexto, o farelo de castanha de caju, oriundo de sobras não qualificadas para consumo humano, se apresenta como um ingrediente interessante para alimentação de ruminantes no nordeste brasileiro.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A importância da cromatina espermática na avaliação de reprodutores.**

A função dos reprodutores em um sistema zootécnico é contribuir para o mérito genético do rebanho gerando uma população espermática em quantidade e qualidade necessárias para não apenas alcançar e fertilizar o oócito como também manter o desenvolvimento embrionário inicial (Amann e Dejarnette, 2012). Os espermatozoides são células germinais maduras, produzidas pelos testículos e estruturalmente divididas em cabeça e flagelo (Eddy, 2006). A célula espermática madura possui volume e citoplasma reduzidos, sua cabeça é principalmente ocupada pelo acrossoma e o núcleo, o qual é altamente condensado (Pesch e Bergmann, 2006). Esta condensação se deve a distinta estrutura que a cromatina espermática possui que difere da estrutura básica de nucleossomos das células diploides e gametas femininos (D'Occhio et al., 2007). A cromatina é um dinâmico e estruturado complexo de proteínas e DNA (Soldi e Bolnadi, 2013), sendo o genoma haploide de espermatozoides maduros basicamente associado a nucleoproteínas denominadas histonas e protaminas.

Durante a espermatogênese ocorre uma sistemática reposição das histonas pelas protaminas (Rousseaux et al., 2009). Nos estágios iniciais, as espermatogônias e espermatócitos apresentam basicamente as histonas centrais, H2A, H2B, H3 e H4, que compõem um octâmero proteico, o nucleossomo (Hazzouri et al., 2000). Durante a espermiogênese, as espermátides iniciais têm suas histonas repostas pelas chamadas proteínas de transição testiculares, representadas principalmente pela TP1 e TP2 (Steger et al., 1998; Meistrich et al., 2003). E ao final da espermiogênese, as proteínas de transição são repostas pelas protaminas que por meio de seus aminoácidos básicos se associam ao DNA, formando uma estrutura cromatínica densa e compacta (Lewis et al., 2003). Em humanos, primatas, equinos e murinos encontramos as protaminas 1 e 2, porém nos ruminantes, suínos e caninos encontramos apenas a protamina 1 (Dadoune, 2003). A maior porção das nucleoproteínas espermáticas é representada pelas protaminas, variando de 85% em humanos a 95% em touros, cavalos e roedores (Gatewood et al., 1990; Bench et al., 1996).



**Figura 1.** Estrutura da cromatina nos espermatozoides (adaptado de Carrell et al., 2012).

Após a espermatogênese, os espermatozoides imaturos serão submetidos a um conjunto de alterações celulares no epidídimo relacionadas às modificações de proteínas membranares, aquisição da motilidade, aumento da condensação da cromatina e desenvolvimento do potencial capacitante, chamado de maturação epididimária (Aitken e Vernet, 1998). A elevação do grau de compactação cromatínica é devido à formação de pontes dissulfeto entre as protaminas (Dias et al. 2006). Desta forma, um espermatozoide maduro normal possui a estrutura de cromatina mais compacta entre as células eucariotas, a qual é caracterizada por arranjos toroidais semelhante a um pneu (Figura 1) (Fuentes-Mascorro et al. 2000).

Durante a formação, maturação e transporte no trato reprodutivo, os espermatozoides estão sujeitos a agentes deletérios, como por exemplo: altas temperaturas, espécies reativas de oxigênio, ambientes ácidos (Suarez e Pacey, 2006). Da mesma forma, os processamentos de diluição, centrifugação, criopreservação e sexagem para utilização dos espermatozoides em técnicas reprodutivas, como inseminação artificial e produção *in vitro* de embriões, também promovem prejuízos na qualidade espermática (Oehninger et al., 2000; Suh et al., 2005; Barthgate, 2008). Neste contexto, um dos alvos destas fontes danosas é a cromatina espermática.

Os danos à cromatina podem ser avaliados basicamente pela frequência de fragmentação da cromatina via apoptose, por incidência de fraturas no DNA e pelo grau de condensação do DNA pelas protaminas (Silva e Gadella, 2006). Assim, análises têm sido empregadas com o intuito de avaliar a ocorrência e extensão destas alterações e suas consequências na fertilidade.

O teste de dispersão da cromatina em espermatozoides (sperm chromatin dispersion test, SCD) se baseia na avaliação da dispersão da cromatina após a lise celular, por meio de corantes nucleares fluorescentes ou não (Fernandez et al., 2003). As células espermáticas com DNA fragmentado (positivas) apresentam um grande halo ao redor da região da cabeça (García-Macías et al., 2007).

Espermatozoides que sofreram apoptose podem apresentar, como dano terminal, a fragmentação do DNA por endonucleases, este fenômeno é avaliado pelo teste de TUNEL (técnica de inserção de nucleotídeos biotinizados na extremidade do fragmento do genoma, *Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUDP nick-end labeling*) (Gorczyza et al., 1993). Esta abordagem quantifica a ligação, via enzimática (terminal deoxynucleotidyl transferase), de nucleotídeos (dUTP) conjugados com FITC, nas extremidades 3'OH de fraturas do DNA, mensurando a quantidade de espermatozoides positivos com a fluorescência verde (Oosterhuis et al., 2000).

Outro teste utilizado para a análise da integridade do DNA espermático é o ensaio de eletroforese em gel de célula única (COMET). Basicamente, neste ensaio, esfregaços de espermatozoides fixados em agarose, são lisados, submetidos à eletroforese e marcados com corantes fluorescentes para visualização do DNA (Simon e Carrel, 2013). Ao final, as células normais (negativas) apresentam o DNA apenas ao redor da região da cabeça, enquanto, as células espermáticas que contém o DNA fragmentado (positivas) possuem um arrasto destes pedaços de DNA, semelhante à cauda de um cometa (Boe-Hansen et al., 2005). Contudo, esta técnica ainda possui entre suas limitações uma carência de padronização entre os laboratórios (Evenson e Wixon, 2006).

Além das análises microscópicas da cromatina espermática, métodos utilizando a citometria de fluxo também são utilizados com a vantagem de avaliarem milhares de células espermáticas por minuto (Evenson et al., 1991). Um dos mais utilizados é o ensaio de estrutura da cromatina espermática (SCSA) que utiliza o laranja de acridina, um corante metacromático, capaz de fluorescer em vermelho nas regiões cromáticas com DNA fragmentado e em verde nas áreas normais (Love et al., 2005). Os parâmetros obtidos com esta análise tem sido correlacionados com a fertilidade em touros (Bocheneck et al., 2001) e varrões (Evenson et al., 1994). Esta técnica têm

sido associada não apenas a microscopia de fluorescência, mas também, a citometria de fluxo (Fernandez et al., 2003).

No tocante as análises de condensação da cromatina dos espermatozoides, também se destacam as análises citoquímicas utilizando corantes nucleares, como o azul de anilina (AZAN) e azul de toluidina (AZTO), em microscopia de campo claro (Talebi et al., 2012). A avaliação da cromatina espermática pelo corante azul de anilina (AZAN) marca em azul escuro células anormais que possuem um elevado grau de persistência de histonas (Foresta et al., 1992). Esta coloração possui alta afinidade pelos resíduos de lisina que enriquecem as histonas (Franken et al., 1999). O aumento da porcentagem de espermatozoides positivos para este ensaio se relacionaram negativamente com a fertilidade em touros (Vieytes et al., 2008; Mukhopadhyay et al., 2011). Khalifa et al. (2008) também estudando reprodutores bovinos observaram que os resultados positivos para o ensaio de AZAN foram correlacionados positivamente com a diminuição da população de células normais e viáveis.

O azul de toluidina (AZTO) é um corante acidofílico metacromático que se liga a grupos fosfatos livres no DNA, corando de azul escuro à violeta a cromatinas espermáticas anormais (Mello, 1982). A metacromasia é uma qualidade física de alguns corantes que promove uma alteração de cor causada por ligações a estruturas particulares de células e tecidos (Exbrayat, 2013). A coloração nuclear metacromática do azul de toluidina em espermatozoides tem sido associada a uma redução na compactação da cromatina devido à diminuição das pontes dissulfeto entre as protaminas (Andretta et al., 1995). Adicionalmente, a porcentagem de espermatozoides positivos para o AZTO também são correlacionados com resultados positivos para os testes do laranja de acridina e do TUNEL, demonstrando também a relação deste ensaio com a integridade de DNA (Erenpreisa et al., 2003). Belletti et al. (2005) observaram que anormalidades cromatínicas em touros ocorrem em células espermáticas morfológicamente normais, destacando a importância de se adicionar o AZTO as avaliações andrológicas. Adicionalmente, o ensaio da integridade de cromatina pelo AZTO foi considerado um componente importante na composição de um modelo de para predição da fertilidade de touros baseado em características espermáticas *in vitro* (Oliveira et al., 2013).

Considerando que o aumento de danos ou falhas na compactação do DNA espermático reduzem as clivagens iniciais *in vitro* (Van Soom et al., 2007; Lechniak et al., 2008), anteriores a expressão do genoma embrionário que se inicia nos estágios de 2 à 8 células em bovinos (Memili e First, 2000; Meirelles et al., 2004), as técnicas supracitadas de avaliação da cromatina espermática devem ser exploradas para predição da fertilidade de reprodutores. Além disso, sabe-se que a



integridade da cromatina é dependente de proteínas, desta forma estudos proteômicos da cromatina espermática têm sido conduzidos, principalmente com seres humanos e animais de laboratório (Wu et al., 2008), mas ainda são escassos em animais de produção.

## **2.2 As proteínas espermáticas: potenciais marcadores de qualidade seminal e fertilidade em animais.**

O espermatozoide é uma célula altamente especializada que necessita da integridade de suas proteínas para transpor o trato reprodutivo feminino, adquirir as mudanças moleculares, estruturais e metabólicas relacionadas à capacitação, fecundação oocitária e manutenção do desenvolvimento embrionário inicial (Conner e Barrat, 2006; Kovac et al., 2013). Além destas funções, também temos cadeias peptídicas protegendo os espermatozoides durante o trajeto no trato reprodutivo feminino, como por exemplo, as proteínas da membrana espermática ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) que reduzem a fagocitose por macrófagos (Hutchinson et al., 2005). Desta forma, os espermatozoides têm se tornado o foco de experimentos baseados na identificação de marcadores proteicos de fertilidade nos machos (Dorus et al., 2012; Govindaraju et al., 2012). Nesta recente área de estudo pós-genômica são aplicadas as abordagens proteômicas, que se constituem em análises de alterações na quantidade ou nas modificações pós-traducionais de proteínas extraídas de células ou fluídos biológicos (Huber, 2003). Atualmente, estas pesquisas ainda são principalmente realizadas em humanos e animais de laboratório, porém vem sendo desenvolvidas de forma crescente em animais de produção.

O proteoma espermático é uma variada coleção de peptídeos. Na célula espermática de roedores já foram identificadas mais de 5000 proteínas, localizadas em sua maioria no interior da célula (82%), principalmente associadas às mitocôndrias, desempenhando funções de catalise, ligação, transporte, oxido-redução e interação com o DNA (Baker et al., 2008). Como a célula espermática possui porções distintas, como a membrana plasmática e o núcleo, análises regionalizadas aumentam a capacidade de identificação de proteínas produzidas em menores quantidades. Nesse sentido, van Tilburg et al. (2013) avaliando a fração enriquecida da membrana espermática ovina, observaram mais de cem isoformas e identificaram mais de 30 proteínas relacionadas principalmente a funções de ligação (37%), catalise (32%), proteínas auxiliares no enovelamento (chaperonas) (9%) e estrutural (7%). Fato este também confirmado em bovinos, onde a análise das redes de interações das proteínas membranares dos espermatozoides revelou três grupos principais: proteases, enzimas metabólicas e chaperonas (Byrne et al., 2012). Vale destacar

que estudos comparativos entre espécies, demonstram que as proteínas da membrana espermática foram as que mais sofreram diferenciação evolutiva nos mamíferos, provavelmente por estarem sujeitas a uma complexa pressão de seleção durante os contatos e interações do exterior do espermatozoide com os fluídos e células do trato reprodutivo (Dorus et al., 2010). Além disso, as proteínas de membrana isoladas dos espermatozoides são também oriundas de secreções epididimários (Marengo et al., 2008; Moura et al., 2010) e das glândulas sexuais acessórias (Moura et al., 2007; Souza et al., 2012). Quanto as principais nucleoproteínas espermáticas, destacam-se as protaminas e as histonas, porém também são identificadas proteínas associadas à cromatina com funções de transcrição (fatores de transcrição), constitutivas (housekeeping proteins, phosphofruitoquinases), de citoesqueleto (proteína filamentosa intermediária-1) e de sinalização (proteína quinase Ca-dependente) (de Mateo et al., 2011; Chu et al., 2006).

O proteoma espermático também pode refletir a capacidade fecundante das células. Por exemplo, espermatozoides morfologicamente normais de bovinos apresentam maior quantidade de proteínas que modulam a capacitação, as interações com o oócito e as estruturas do citoesqueleto, quando comparados aos anormais, os quais expressam mais proteínas relacionadas à regulação do estresse oxidativo, apoptose e metabolismo (Shojaei Saadi et al., 2013). Proteínas espermáticas também têm sido correlacionadas com parâmetros de qualidade seminal, como motilidade ou morfologia. A atividade da enzima conversora de angiotensina (ACE) identificada na membrana espermática já foi associada à motilidade espermática em equinos (Ball et al., 2003) e bovinos (Costa et al., 2012). Adicionalmente, em touros a utilização de captopril, um fármaco inibidor da ACE, durante a indução da capacitação afetou negativamente a motilidade (Costa e Thundathil, 2012). Em suínos a expressão espermática da chaperona HSP70 foi correlacionada positivamente com a motilidade e morfologia nos ejaculados (Huang et al., 2000). Além disso, enzimas responsáveis por modificações pós-traducionais também podem afetar a fertilidade. Como modelo, camundongos nocauteados para sulfotransferases de resíduos de tirosina (TSP2) apresentam uma alteração na expressão de metaloproteinases (ADAM3 e ADAM6) na membrana espermática que reduziram as interações entre espermatozoides e oócitos relacionadas à infertilidade (Marcello et al., 2011).

Nos animais de produção existe uma necessidade da elaboração de protocolos e seleção de reprodutores que tenham por objetivo elevar a congelabilidade das células espermáticas para programas de inseminação artificial, neste contexto a abordagem proteômica também vem se tornando uma estratégia promissora (Moore e Thatcher, 2006). Pois, o processo de criopreservação afeta negativamente proteínas do citoesqueleto espermático bovino (actina F e distrobrevina b),

sendo estas perturbações associadas ao aumento de fragilidade na teca perinuclear e alterações na morfologia espermática (Felipe-Perez et al., 2012). Além disso, a preservação pelo frio também diminuiu a concentração de enzimas oxido-redutoras (GSH) presentes em espermatozoides bovinos, sendo estes resultados influenciados pelo tipo de diluidor (Stradaoli et al., 2007). Em suínos a congelação dos espermatozoides promoveu alterações nas nucleoproteínas, Histonas H1 e protaminas, relacionadas a danos da cromatina (Flores et al. 2008; Flores et al., 2011). Assim, considerando a relação da criopreservação com as proteínas espermáticas, tem sido realizadas investigações de potenciais marcadores proteicos para congelabilidade. Em suínos, as correlações positivas entre a quantidade de uma chaperona (HSP90AA1) com a motilidade e a integridade espermáticas após a congelação, sugeriram a validação desta proteína como um marcador molecular de congelabilidade (Casas et al., 2010).

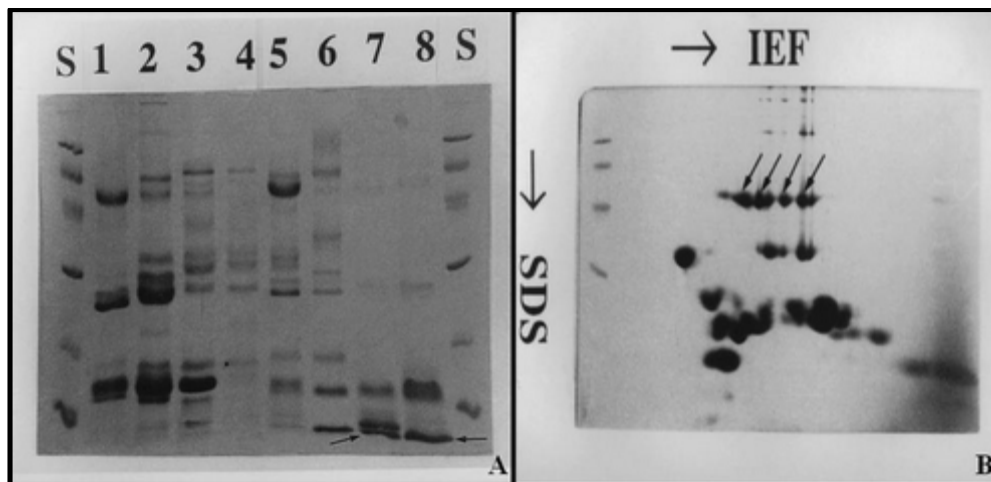
Devido às associações entre peptídeos e características desejadas nos espermatozoides, as proteínas espermáticas têm sido investigadas como possíveis preditores de fertilidade. Assim, quando as proteínas de espermatozoides de touros com fertilidades variadas foram comparadas, os animais de baixa fertilidade apresentaram maiores expressões de duas chaperonas (CCT5 e CCT8), duas proteínas membranares (ELSPBP1 e BSP1) e uma protease (PSMB6) e, os de alta fertilidade foram superiores para uma adenilato quinase (AK1) e uma proteína inibidora de proteases intracelular (PEBP1), estas duas últimas foram associadas ao metabolismo energético para motilidade espermática e ao processo de capacitação, respectivamente (D´amours et al., 2010). Na raça Nelore, a espermadesina aSFP e a BSPA3 foram mais expressas na membrana da população espermática de reprodutores de alta e baixa fertilidade, respectivamente (Roncoletta et al., 2006) Ainda em bovinos, outro estudo também demonstrou uma expressão superior da adiponectina, que possui funções relacionadas ao efluxo de colesterol durante a capacitação, em espermatozoide de touros de alta fertilidade (Kasimanickam et al., 2013). Peddinti et al. (2008) realizaram uma avaliação global da expressão e associação das proteínas espermáticas em touros de fertilidade distintas e, constataram 125 proteínas que diferiram entre os fenótipos de alta e baixa fertilidade, destacando que nos animais de alta fertilidade as três vias de interação principais foram de sinalização pelo EGF/PDGF, fosforilação oxidativa e metabolismo de piruvato as quais atuam na capacitação e motilidade dos espermatozoides. Adicionalmente, em equinos, proteínas relacionadas à fisiologia acrossomal (NSF, sinaptotagmina e caveolina-1) foram mais expressas nos espermatozoides de fertilidade elevada (Gamboa e Ramalho-Santos, 2005). Finalmente, podemos considerar a análise das proteínas espermáticas como uma ferramenta promissora na avaliação andrológica dos animais de produção.

### 2.3 As abordagens proteômicas associadas a eletroforese em gel.

A proteômica envolve estudos de identificações, interações e modificações pós-traducionais de proteínas (Chich, 2001). Porém, mesmo sendo uma estratégia eficiente na investigação da dinâmica celular sob diferentes condições, ainda é pouco utilizada em animais de produção (Lippolis e Reinhardt, 2010). Em pesquisas abordando a comparação de amostras biológicas contendo um conjunto variado de proteínas, a separação destas comumente se realiza pela utilização de técnicas de eletroforese em gel.

A eletroforese é um método de separação que se baseia na migração de moléculas carregadas em um campo elétrico (Righetti, 2005). Dentre os tipos de eletroforese em gel unidimensionais mais utilizados podemos citar: a eletroforese nativa unidimensional (1D-PAGE), onde a migração das moléculas peptídicas no gel ocorre em função conjunta de sua massa e carga e a eletroforese desnaturante unidimensional (SDS-PAGE), na qual devido à utilização do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) as proteínas são desnaturadas para então migrarem no gel apenas em função da sua massa molecular (Figura 2) (Chiou e Wu 1999). Nestas técnicas, várias amostras podem ser comparadas em um mesmo gel, porém, as bandas proteicas podem apresentar mais de um tipo de proteína (Figura 2). Esta limitação na separação das proteínas foi superada pela técnica de eletroforese bidimensional (2D-PAGE).

A 2D-PAGE combina dois métodos distintos e sequenciais, o primeiro baseado na separação em função do ponto isoelétrico (pI) realizada em um gel estreito em formato de fita, sendo este em seguida depositado sobre um gel de SDS-PAGE para a segunda subdivisão das moléculas (Figura 2) (Gorg et al., 2009). Para a visualização das proteínas nos géis 1D e 2D são utilizados métodos de coloração, como por exemplo, a coloração por prata, coomassie (R-250® ou G-250®) ou fluorescência (CyDyes® ou SYPRO®) (Panfoli et al., 2012).



**Figura 2.** Imagens de géis oriundas das técnicas de eletroforese desnaturante unidimensional (SDS-PAGE) (A) e eletroforese bi-dimensional (B). 1A: os números de 1-8 representam as amostras, a letra S representa o padrão de peso molecular e os traços escuros compreendem as bandas proteicas. (imagens obtidas de Chiou e Wu (1999)).

Atualmente, a identificação das proteínas de interesse nos géis é principalmente realizada pela técnica de espectrometria de massas (Schevchenko et al., 2006). O espectrômetro de massa basicamente realiza a ionização dos peptídeos, pelos métodos de dessorção-ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI) ou ionização por eletronebulização (ESI), que posteriormente seguem para o analisador de massas, que pode ser de vários tipos e combinações como tempo-de-voe (TOF), quadrupólo (Q) ou Q-TOF, onde são separados e detectados em função da relação massa/carga ( $m/z$ ) (Domon e Aebersold, 2006). Os dados gerados pela espectrometria de massas são analisados por meios de programas como o MASCOT® ou SEQUEST® para a identificação das proteínas em bancos de dados como NCBI® ou SwissProt® (Grosse-Coosmann et al., 2005). Além da identificação por espectrometria de massas, peptídeos também podem ser imuno-identificados por meio de anticorpos. Dentre as técnicas utilizadas o Western blot está entre as principais. O Western blot, também conhecido como imuno-blot, é uma abordagem utilizada em seguida à eletroforese na qual as proteínas são eletricamente transferidas de um gel para uma membrana, como as de fluoreto de polivinila (PVDF) ou nitrocelulose, onde serão reveladas por antibióticos específicos marcados (Macphee, 2010). Além das técnicas laboratoriais, também podemos obter informações importantes sobre proteínas de interesse por meio de ferramentas de bioinformática.

As análises de bioinformática de proteínas são desenvolvidas em bases de dados e programas computacionais relacionados principalmente a sequências de aminoácidos, análise filogenética, conformação tridimensional (3D) e informações sobre ontologia gênica (Tabela 1) (McGarvey et al., 2008). Basicamente, a partir das séries aminoacídicas das proteínas podemos não apenas estabelecer comparações evolutivas entre as mesmas, como também, estabelecer suas funcionalidades moleculares e estruturas 3D (Pavlopoulou & Michalopoulos, 2011). Os bancos de dados de proteínas são normalmente fundamentados na ontologia gênica, uma fonte informativa universalizada das funções moleculares, processos biológicos e localização celular dos produtos gênicos (proteínas) (Lomax, 2005).

**Tabela 1.** Exemplos de ferramentas de bioinformática para o estudo de proteínas.

<b>Categoria da ferramenta</b>	<b>Nome</b>	<b>Endereço eletrônico</b>
Base de dados para sequências aminoacídica de proteínas	NCBI Reference Sequence Database (RefSeq)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/</a>
Base de dados para sequências aminocídica de proteínas	UniProt Knowledgebase (UniprotKB)- SwissProt	<a href="http://www.uniprot.org/help/uniprotkb">http://www.uniprot.org/help/uniprotkb</a>
Programa de alinhamentos de sequências	Clustal Omega (Clustal O)	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
Programa de alinhamento de sequências e construção de árvores filogenéticas	Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA)	<a href="http://www.megasoftware.net/">http://www.megasoftware.net/</a>
Programa de construção de arvores filogenéticas	Clustal phylogene (Clustal W2)	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny/</a>
Base de dados para sequência de aminoácidos e informações funcionais de proteínas	UniProt® Knowledgebase (UniprotKB®)	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>
Base de dados para estruturas 3D de proteínas	Protein Data Bank (PDB) - Biological Macromolecular Resource	<a href="http://www.rcsb.org/pdb">http://www.rcsb.org/pdb</a>
Base de dados para estruturas 3D de proteínas	Database of Comparative Protein Structure Models (ModBase)	<a href="http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/index.cgi">http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/index.cgi</a>
Base de dados para interações físicas e funcionais entre proteínas	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING)	<a href="http://string-db.org/">http://string-db.org/</a>

## 2.4 Influências da nutrição na fisiologia de reprodutores ruminantes.

Em sistemas de produção animal que utilizam a monta natural, o total de gastos relacionados à manutenção da eficiência reprodutiva dos machos é em maioria relacionado ao manejo nutricional. Desta forma, possíveis consequências nutricionais não apenas sobre os parâmetros seminais e espermáticos clássicos, mas também em relação às proteínas espermáticas não devem ser negligenciadas.

Os impactos da nutrição no futuro de um reprodutor já se iniciam durante a gestação e lactação por intermédio das matrizes. Assim, ovelhas em pasto enriquecido com leguminosas e suplementadas com concentrado durante a gestação e lactação geraram cordeiros ao desmame com parênquimas testiculares superiores, quanto a volume de túbulos seminíferos e de células de Sertoli e Leydig (Bielli et al., 2001). Porém a suplementação deve respeitar os requerimentos de cada categoria. Pois estudos em novilhas gestantes demonstraram efeitos negativos da suplementação excessiva com proteína e/ou energia sobre o parênquima testicular de seus bezerros (Sullivan et al., 2010).

Os requerimentos nutricionais dos machos variam em função da idade e frequência de cobertura. Podendo a nutrição afetar a reprodução não somente pela influência de centros cerebrais metabólicos e reprodutivos que levam a alterações na secreção de GnRH, mas também por meio da ação direta de metabólicos (glicose), hormônios (insulina) e fatores de crescimento (IGF-1) nos testículos (Martin et al., 2010). Assim, o manejo alimentar exerce efeitos diretos na fertilidade do ruminante provendo os metabólitos necessários ao desenvolvimento dos gametas e à manutenção da concentração sérica de hormônios requeridos para fisiologia reprodutiva (Robinson et al., 2006).

No tocante a machos jovens, a nutrição deficiente após o desmame retarda a puberdade e desenvolvimento sexual de touros (Barth et al., 2008). Neste contexto, Brito et al. (2007) sugeriram que a nutrição após o desaleitamento influencia a secreção de IGF-1 e insulina e que estes hormônios tem efeito positivo sobre eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, promovendo não apenas concentrações maiores de GnRH, LH e testosterona como também o incremento do desenvolvimento testicular e da produção de espermatozoides. Porém, deve-se evitar o excesso de energia e conseqüentemente obesidade em animais jovens. Coulter et al. (1997) constataram que touros alimentados após o desmame com dieta rica em energia, embora apresentassem peso e circunferência escrotal superiores, expressavam valores inferiores de qualidade espermática atribuídos a deposição de gordura e deficiência de termorregulação no escroto. Resultados semelhantes foram encontrados em ovinos jovens alimentados a vontade em regime intensivo, estes



animais mesmo possuindo biometria testicular superior apresentaram qualidade seminal inferior e elevada deposição de gordura no escroto (Fourie et al., 2004). Ressalta-se que falhas de manejo nutricional têm maiores consequências na reprodução em machos jovens do que nos reprodutores adultos (Brown, 1994).

Os reprodutores devem produzir espermatozoides em quantidade e qualidade, sendo os períodos necessários à espermatogênese e maturação espermática em torno de 50-60 dias (Russell e França, 1998) e 15 dias (Robaire et al., 2006), respectivamente, nos ruminantes domésticos. Desta forma, a suplementação de reprodutores a partir de oito semanas antes do início da estação de monta é uma prática que melhora a eficiência reprodutiva (Martin e Walkden-Brown, 1995). Assim como, Chilliard et al. (2005) destacam que práticas de suplementação nutricional em animais subalimentados aumentam a expressão de leptina, reduzem a secreção de glicocorticoides e otimizam a endocrinologia reprodutiva. A leptina é um hormônio produzido pelas células adiposas que em níveis fisiológicos exerce efeito positivo direto no hipotálamo, pituitária, células de Leydig, Sertoli e germinativas (Landry et al., 2013).

A qualidade nutricional dos volumosos é a base da nutrição de ruminantes. A adição de feno de leucena (*Leucaena leucocephala*) na alimentação de carneiros afetou positivamente a circunferência testicular e parâmetros espermáticos (Dana et al. 2000). Em caprinos jovens alimentados basicamente com feno, a suplementação com farelo de milho, melaço e ureia teve efeito positivo sobre a qualidade da morfologia espermática e biometria testicular (Almeida et al., 2007). Reprodutores a pasto estão sujeitos a sazonalidade reprodutiva devido a variação sazonal da oferta de forragens durante o ano (Chácon et al., 2002; Al-Ghalban et al., 2004). Desta forma, para manter as necessidades nutricionais dos machos ruminantes deve ser realizada uma suplementação para atender as exigências de energia, proteína e minerais. A suplementação adequada de proteína em touros promoveu efeitos positivos sobre a produção e qualidade espermática (Rekwot et al., 1988). Em carneiros adultos a suplementação com níveis de energia superiores em 50% às necessidades de manutenção elevou a qualidade dos parâmetros seminais (Tufarelli et al., 2011). A suplementação pode também influenciar a reprodução modulando os constituintes do plasma seminal. Carneiros suplementados com quantidades recomendadas de energia apresentaram níveis superiores de IGF-1 no plasma seminal e, sua concentração seminal foi correlacionada positivamente com parâmetros de motilidade espermática (motilidade progressiva, índice de linearidade e índice de progressão) mensurados por sistema de análise auxiliada por computador (CASA) (Selvaraju et al., 2012).

Os constituintes da dieta também afetam a reprodução dos machos. Por exemplo, ácidos graxos insaturados da dieta são utilizados para síntese de prostaglandina, hormônios esteroides e composição das membranas celulares (Wathes et al., 2007). A utilização da suplementação de ácidos graxos insaturados de cadeia longa tipo omega-3, em touros teve efeito positivo sobre a motilidade espermática avaliada por sistema CASA (Gholami et al., 2010). Resultados semelhantes também foram constatados na motilidade e viabilidade de espermatozoides frescos e descongelados de carneiros suplementados com óleo de peixe rico em omega-3 (Esmielli et al., 2012) e búfalos suplementados com semente de girassol (Adeel et al., 2009). Estas observações podem ter sido promovidas por alterações na composição da membrana espermática, pois a alimentação de carneiros com silagem de bagaço de azeitona, rica em ácidos graxos insaturados, elevou a percentagem destes na membrana espermática (Faraji et al., 2012). Vale ressaltar que embora os ácidos graxos insaturados estejam sujeitos a biohidrogenação no rúmen, uma porção destes pode alcançar ainda intacta o retículo para ser absorvida diretamente no intestino delgado (Herrera-Camacho et al., 2011).

A suplementação de ruminantes com anti-oxidantes, como ácido ascórbico, flavonoides, vitaminas A e E, auxiliam na redução de danos membranares, mitocondriais e cromatínicos causados pelo excesso de espécies oxigênio reativas (ROS: reactive oxygen species) no espermatozoide (Clément et al. 2012). As vitaminas A e E e, os minerais selênio (Se), zinco (Zn), cobre (Cu) e molibdênio (Mo) estão entre os principais micronutrientes que modulam a reprodução, desta forma suas deficiências afetam negativamente a puberdade, espermatogênese, motilidade e morfologia espermáticas (Smith e Akinbamijo, 2000). Doses intramusculares de Vitamina E e Se em carneiros promoveram efeito positivo sobre a libído, tamanho dos testículos e os parâmetros seminais (Mahmoud et al., 2013). Recentemente, estudos avaliando a inclusão de nanopartículas de selênio na ração de bodes constataram também seus efeitos positivos na concentração da glutatona peroxidase seminal e porcentagem de espermatozoides normais ejaculados, e também demonstraram que sua deficiência promoveu alterações na peça intermediária espermática associadas a defeitos mitocondriais (Shi et al., 2010). A suplementação mineral pode ter fontes orgânicas e inorgânicas. Por exemplo, touros suplementados com fontes de Zn na dieta expressaram parâmetros seminais superiores, porém os melhores resultados foram obtidos com fontes orgânicas de propionato de zinco (Kumar et al., 2006).

Os efeitos nutricionais sobre a cromatina e proteínas espermáticas são ainda pouco estudados e em ruminantes praticamente desconhecidos. Porém, por exemplo, em roedores já foi constatado que carências de ácido fólico aumentam a presença de danos cromatínicos na população

espermática (Swayne et al., 2012). Portanto, efeitos nutricionais sobre a qualidade da cromatina e proteoma espermáticos não devem ser ignorados, principalmente, em fontes alternativas de alimentos.

## **2.5 Utilização da castanha de caju e seus subprodutos na alimentação de ruminantes.**

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é uma planta originalmente do continente americano que tem como fruto verdadeiro a castanha do caju, e como pseudofruto a região macia e piriforme, conhecida vulgarmente como o fruto do caju (Nair, 2010). A porcentagem da produção mundial de caju é liderada por Vietnã (32%), Índia (17%), Nigéria (16%), Costa do Marfim (10%) e Brasil (5%) (FAO, 2011). O nordeste do Brasil possui como resíduo da indústria do caju, castanhas fora do padrão para consumo humano. Estas sobras de castanhas constituem um componente nutricional economicamente viável para alimentação de ruminantes, que poderia reduzir o custo da adição de milho e soja aos concentrados.

O óleo da castanha de caju é rico em componentes fenólicos e quando adicionado a ração promove uma diminuição das metanobactérias ruminais e aumento da produção de propionato (Watanabe et al., 2010). Além disso, compostos polifenólicos, como os flavonoides, também possuem capacidades anti-oxidantes relacionadas a doação de prótons  $H^+$  que estabilizam radicais livres reduzindo a peroxidação lipídica (Bravo, 1998; Chen e Blumberg, 2008). Os principais ácidos graxos encontrados na castanha de caju são o oleico (18:1) (48%) e o linoleico (18:2) (30%), os quais são ácidos graxos essenciais insaturados de cadeia longa (Abitogu e Borokini, 2009). Porém, embora o farelo de castanha seja rico em ácido oleico, a adição de 13% FCC na ração não alterou a composição de ácido oleico na musculatura de caprinos (Santos-Filho et al., 2005). Contudo, a castração associada à inclusão de FCC na ração elevou a deposição de gordura muscular em caprinos machos (Bezerra et al., 2007).

As pesquisas avaliando a inclusão de FCC na alimentação animal têm sido principalmente realizadas no Brasil. Este subproduto da agroindústria apresenta em torno de 91% de matéria seca (MS); 21% de proteína bruta (PB), 36 % de extrato etéreo (EE), 19% de fibra digerível em detergente neutro (FDN) e 7% de Cinzas (Rodrigues et al., 2003). Além de ser uma fonte mineral de Ca, Mg, Fe, Zn e Cu (Aletor et al., 2007). A alimentação de caprinos com a casca de castanha (10 ou 20%) proporcionou não apenas uma eficiente suplementação nutricional como a redução de custos na formulação da ração (Okolo et al., 2012). Estudos avaliando a inclusão de FCC no concentrado de ovinos não constataram efeitos no ganho de peso ou digestibilidade de MS, matéria

orgânica, proteína bruta, FDN, FDA e carboidratos não fibrosos, orientando sua inserção no concentrado em até 30% (Rodrigues et al. 2003; Pimentel et al., 2011). Silva et al. (2011), testando o consumo de ovinos alimentados com 22% de FCC no concentrado não observaram redução significativa no consumo. Contudo, o consumo de dietas contendo FCC pode ser influenciado por fatores genéticos. Por exemplo, ovinos F1 Santa X SRD e F1 Somalis X SRD reduziram o consumo de rações com FCC, entretanto, este fato não foi constatado em ovinos F1 Dorper x SRD (Nascimento et al., 2012). Além de ruminantes, o FCC também tem sido utilizado na alimentação de frangos de corte (Freitas, 2006).

Embora ainda carentes, estudos das associações entre a nutrição com FCC e a fisiologia reprodutiva de ruminantes têm sido conduzidos. Brasil (2003) observou em vacas que a adição de 20% FCC no concentrado reduziu o período de anestro pós parto de  $48,0 \pm 5,2$  dias (controle) para  $32,8 \pm 2,3$  dias. Em cabras, dietas contendo 12% e 24% de FCC mesmo aumentando a concentração de colesterol plasmático não afetaram o desenvolvimento *in vitro* dos oócitos (Fernandes, 2012). Bem como em experimento conduzido em carneiros, onde 18% de FCC não alteraram os parâmetros seminais e biometria testicular (Medeiros, 2005).

Blache et al. (2008) destacam que os efeitos de alimentos alternativos sobre a reprodução devem ser estudados, pois estes podem conter teores deletérios de micotoxinas, fitoestrógenos ou taninos. Assim, a identificação e a prevenção de efeitos adversos destes possíveis tóxicos são essenciais para a rentabilidade proporcionada pela eficiência reprodutiva (Evans, 2011). Neste sentido, os possíveis efeitos do farelo de castanha sobre a reprodução de reprodutores ruminantes ainda não foram profundamente avaliados quanto a consequências não apenas nos parâmetros seminais, mas também na cromatina e proteínas espermáticas.

### **3 JUSTIFICATIVAS**

Baseado no exposto, os estudos das características intrínsecas dos espermatozoides compoem uma área potencial para a descoberta de novos fatores responsáveis pela fertilidade do macho. Neste contexto, estudos sobre avaliações da integridade de cromatina e proteínas espermáticas já demonstraram relações com a fertilidade *in vitro* e *in vivo*, principalmente em animais de laboratório e seres humanos. Desta forma, estas abordagens podem identificar novos marcadores moleculares para a seleção de machos superiores. Entretanto, em animais de produção estas técnicas ainda são pouco exploradas. Assim, considerando a importância da reprodução para o sucesso econômico da produção animal estas análises cromatínicas e proteicas dos espermatozoides têm o potencial de aperfeiçoar a seleção e avaliação de reprodutores em um futuro próximo.

Mas para a expressão genética da capacidade reprodutiva, os machos ruminantes devem possuir, além da saúde, uma nutrição adequada. Adicionalmente, esta alimentação balanceada deve ser composta por ingredientes de baixo custo, como por exemplos, subprodutos da agroindústria. Neste contexto, castanhas de caju despadronizadas para alimentação humana têm sido utilizadas em forma de farelo na dieta de ruminantes. Como a nutrição é capaz de afetar a qualidade seminal, devem ser verificados os possíveis e desconhecidos efeitos da inclusão do farelo de castanha de caju, na dieta de ruminantes, sobre a integridade de cromatina, as proteínas e os parâmetros espermáticos.

### **4 HIPÓTESE**

A integridade da cromatina e as proteínas espermáticas são associadas à fertilidade em bovinos e influenciadas por dietas ricas em lipídeos a base de farelo de castanha de caju em ovinos.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação entre a integridade da cromatina e expressão das proteínas espermáticas com a fertilidade *in vivo* de touros e, com os parâmetros seminais em carneiros alimentados com dieta contendo farelo de castanha de caju.

### 5.2 Objetivos específicos

#### ***5.2.1. Estudo 1: Morfologia molecular e funções do espermatozoide bovino relacionadas às histonas e associadas à fertilidade***

- Analisar as associações entre a integridade da cromatina espermática, por meio do corante azul de anilina, com a fertilidade *in vivo* de touros.
- Determinar a relação entre a expressão de nucleoproteínas com a fertilidade *in vivo* de touros.

#### ***5.2.2. Estudo 2: Avaliação da integridade de cromatina e proteínas em espermatozoides de carneiros morada nova alimentados com farelo de castanha: e suas relações com os parâmetros seminais***

- Analisar as associações entre a integridade da cromatina espermática, por meio do corante azul de toluidina, com os parâmetros seminais de carneiros.
- Determinar a relação entre a expressão de proteínas espermáticas com as características seminais e integridade de cromatina em carneiros.
- Verificar possíveis efeitos de dietas ricas em lipídeos, contendo farelo de castanha de caju, sobre a qualidade, expressão proteica e integridade cromatínica de espermatozoides em carneiros

**6 ESTUDO 1: MORFOLOGIA MOLECULAR E FUNÇÕES DO ESPERMATOZOIDE BOVINO RELACIONADAS ÀS HISTONAS E ASSOCIADAS À FERTILIDADE.**

*(Este estudo foi aceito para publicação no periódico Reproduction em Junho de 2013)*

**Morfologia molecular e funções do espermatozoide bovino relacionadas as histonas e associadas a fertilidade.**

*(Molecular Morphology and Function of Bull Spermatozoa Linked to Histones and Associated with Fertility)*

Rodrigo V. de Oliveira, Sule Dogan, Lauren E. Belser, Abdullah Kaya, Einko Topper, Arlindo Moura, Giselle Thibaudeau, Erdogan Memili

**Morfologia molecular e funções do espermatozoide bovino relacionadas as histonas e associadas a fertilidade.**

**RESUMO**

A fertilidade em bovinos é influenciada por alterações na cromatina espermática e não pode ser melhorada pelo aumento da dose espermática na inseminação artificial. A retenção fisiológica de histonas durante a condensação da cromatina espermática exerce funções críticas na infertilidade do macho. Os objetivos do estudo foram determinar: falhas na condensação da cromatina espermática associadas com persistência anormal ou acessibilidade de histonas pelo teste do azul de anilina, níveis de expressão e localização celular de uma histona variante e duas histonas centrais: H3.3, H2b e H4B, respectivamente, em espermatozoides de touros de baixa (BF) e alta fertilidade (AF). Os níveis de expressão e localização celular das histonas estudadas foram analisados utilizando métodos de imunoblot, imunocitoquímica e coloração. A bioinformática foi focada sobre a identidade de sequência e distância evolucionária destas proteínas entre três espécies mamíferas: touro, camundongo e homem. Os dados foram comparados entre grupos pelo teste t e as associações entre variáveis foram testadas pela correlação de *Pearson* ( $P < 0,05$ ). Os resultados do teste do azul de anilina foram diferentes entre os grupos BF (1.73 (0.55, 0.19)) e AF (0.67 (0.17, 0.06)) ( $P < 0.0001$ ), os quais também foram negativamente correlacionados com a fertilidade *in vivo* de touros ( $r = -0.90$ ;  $P < 0.0001$ ). Apesar das histonas terem sido consistentemente imunodetectadas e especificamente localizadas nos espermatozoides, estas não apresentaram diferenças entre os grupos. As proteínas H3.3 e H4 apresentaram 100% de identidade e foram evolutivamente conservadas entre bovinos, merinos e seres humanos. Entretanto, as variantes H2B foram mais conservadas entre touros e humanos do que entre humanos e camundongos. Em conclusão, as histonas H2B, H3.3 e H4 foram detectáveis em espermatozoides de touros e a condição da condensação de cromatina, alterada pela retenção de histonas, foi relacionada com a fertilidade de touros.

**Palavras chave:** histonas espermáticas, cromatina espermática e fertilidade de touros



## **Molecular Morphology and Function of Bull Spermatozoa Linked to Histones and Associated with Fertility**

### **ABSTRACT**

Sub-par fertility in bulls is influenced by alterations in sperm chromatin and it might not be solved with increased sperm concentration per artificial insemination. Appropriate histone retention during sperm chromatin condensation plays critical roles in male infertility. The objective was to determine failures of sperm chromatin condensation associated with abnormal persistent or accessibility of histone by aniline blue test, expression levels and cellular localizations of one variant and two core histones; H3.3, H2B and H4, respectively in spermatozoa from low (LF) vs. high fertility (HF) bulls. The expression levels and cellular localizations of histones in spermatozoa were studied using immunoblotting, immunocytochemistry and staining method. The bioinformatics focused on the sequence identity and evolutionary distance of those proteins among three mammalian species, bovine, mouse and human. The data were compared between groups by t test and the association among variables were tested by *Pearson's* correlation. We demonstrated that aniline blue staining was different within LF (1.73 (0.55, 0.19)) and HF Groups (0.67 (0.17, 0.06) ( $P < 0.0001$ ), which was also negatively correlated with *in vivo* bull fertility ( $r = -0.90$ ;  $P < 0.0001$ ). Although those histones were consistently immune-detectable and specifically localized in bull sperm, this was not different between the two groups. Except H2B variants, H3.3 and H4 showed 100% identity and evolutionarily conserved among bovine, mouse and human. The H2B variants were more conserved between bovine and human than those of mouse. In conclusion, we showed that H2B, H3.3 and H4 were detectable in bull spermatozoa and that sperm chromatin condensation status, changed by histone retention, is related with bull fertility.

**Keywords:** sperm histones, sperm chromatin and bull fertility.

## 6.1 INTRODUÇÃO

A fertilidade é um dos principais fatores que influenciam a reprodução e evolução dos mamíferos. Em touros pode ser definida pela habilidade dos espermatozoides em fertilizar, ativar e sustentar o desenvolvimento embrionário inicial, a qual é classicamente avaliada por características espermáticas como motilidade e morfologia (Correa et al., 1997). Outras abordagens também avaliam a integridade de membranas e capacitação espermáticas por meio de microscopia e/ou citometria de fluxo, porém estas análises também ainda não são suficientes para prever a fertilidade dos machos (Januskauskas et al., 1999; Puglisi et al., 2012). Uma explicação para estas limitações é que estas técnicas estão avaliando apenas características necessárias para o espermatozoide alcançar e fertilizar o oócito, negligenciando fatores que são essenciais na ativação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial (Silva and Gadella, 2006). Entre estes, a integridade da cromatina é essencial para fisiologia espermática e desenvolvimento do embrião. Por exemplo, foi observado que danos a cromatina de espermatozoides reduziram a fertilidade em touros (Garcia-Macias et al., 2007) e homens (Agarwal e Said, 2003). Neste contexto, níveis anormais de nucleoproteínas específicas como as protaminas (Simon et al., 2011) e histona H4 acetiladas (Sonnack et al., 2012) no espermatozoides têm sido relacionados com a subfertilidade humana. Estas alterações moleculares que reduzem a fertilidade são importantes para o desenvolvimento da bovinocultura mundial, pois não são compensadas pelo aumento da quantidade de espermatozoides nas doses inseminantes (Blaschek et al., 2011).

A cromatina em células espermáticas maduras é composta pela molécula de DNA empacotada ao redor de nucleoproteínas, em maioria pelas protaminas e em minoria pelas histonas (D'occhio et al., 2007). Durante a espermatogênese, ocorre uma reorganização da cromatina das células espermáticas pela mudança das histonas pelas protaminas. A maioria das histonas presentes nas espermátides iniciais é inicialmente substituída pelas chamadas proteínas de transição e subsequentemente pelas protaminas ao final da espermiogênese (Hales et al., 2011). Ainda que as histonas associadas ao DNA dos espermatozoides maduros seja menos de 15% em humanos (Gatewood et al., 1990), é sugerido que esta retenção histônica promova regiões de DNA menos condensadas, onde genes paternos possam ser mais acessíveis aos fatores de transcrição logo após a fertilização (Rajender et al., 2011). Os quatro tipos de histonas centrais (canônicas) envolvidas no empacotamento do DNA são H2A, H2B, H3 e H4, estas constituem a subunidade cromatínica chamada nucleossomo, que se associa a distinta organização toroidal da cromatina espermática formada pelas protaminas (Dadoune, 1995). Embora a retenção de histonas seja considerada

essencial para os genes ativados antes e após a fertilização, uma proporção excessiva de histonas indica uma imaturidade da cromatina que culmina com disfunções espermáticas. Geralmente, análises de retenção excessiva de histonas na cromatina espermática podem ser avaliadas por métodos simples e eficazes, como por exemplo, colorações de cromomicina A3 (CMA), azul de toluidina e azul de anilina (AZAN) (Agarwal e Said, 2003). O corante AZAN é capaz de se ligar a resíduos de lisina, presentes em elevada proporção nas histonas, formando uma coloração azul na região da cabeça do espermatozoide (Franken et al., 1999). Os resíduos de aminoácidos das histonas também são alvos de modificações pós-traducionais (MPT) como metilação, acetilação e fosforilação influenciando epigeneticamente a acessibilidade do genoma masculino aos fatores de transcrição maternos durante o desenvolvimento embrionário (Miller et al., 2010).

Histonas metiladas são principalmente encontradas em regiões de heterocromatina onde os genes estão normalmente silenciados (Fischle et al. 2013). Ao contrário das histonas acetiladas presentes comumente nas áreas de eucromatina, que reduzem as ligações entre as nucleoproteínas e o DNA e, modulam a transcrição gênica e posterior substituição pelas protaminas na espermatogênese (Struhl, 1998; Dadoune, 2003). A fosforilação atua nos resíduos de serina sendo também associada com ativação gênica (Prigent and Dimitrov, 2003). Curiosamente, a histona H2B foi mais expressa em homens inférteis com maior porcentagem de danos ao DNA espermático (Zini et al., 2008). A histona H2B, H3 e sua variante H3.3 também foram associadas com ativação gênica (Mito et al., 2005). Modificações pós-traducionais específicas na histona H3 estão presentes em regiões do genoma espermático que são ativas durante a espermatogênese e desenvolvimento embrionário inicial (Brykczynska et al. 2010; Steilman et al. 2011). Adicionalmente, a histona H4 é relacionada com o sucesso do remodelamento da cromatina durante a espermatogênese (Kleimman et al., 2008) e com a herança da arquitetura cromossômica masculina no desenvolvimento do zigoto (Van der Heidjen et al. 2006).

Contudo, a extensão das associações entre os graus de expressão e as MPTs das histonas com a fertilidade de touros não é conhecida. Da mesma forma, mecanismos moleculares envolvidos nestes eventos biológicos que regulam a fertilidade ainda não estão elucidados. Portanto, existe uma necessidade de se pesquisar a interconectividade entre as histonas espermáticas e a fertilidade dos machos. Os objetivos do presente estudo foram determinar a qualidade da cromatina espermática, os níveis de expressão e localização celular de histonas espermáticas (H2B, H3.3 e H4) em touros de alta (AF) e baixa fertilidades (BF), em conjunto com um análise bioinformática da similaridade destas nucleoproteínas entre bovinos, camundongos e seres humanos.

## 6.2 Materiais e métodos

### 6.2.1 Determinação da fertilidade dos touros

Dezesseis touros foram selecionados e divididos em dois grupos de alta (AF) e baixa fertilidade (BF). Os dados de fertilidade, de pelo menos 300 inseminações por touro, foram obtidos pelo programa de computador *Alta Advantage Program* (Alta Genetics Inc., WI, USA), o qual é periodicamente atualizado com dados dos rebanhos cadastrados (Peddinti et al., 2008). Os fatores que influenciam o desempenho dos reprodutores como ambiente e manejo do rebanho foram ajustados utilizando os modelos de Zwald et al. (Zwald et al., 2004a; Zwald et al., 2004b). As análises de fertilidade foram desenvolvidas por meio do programa computacional Probit F90 (Chang et al., 2009). Sendo a fertilidade de cada touro expressa como a porcentagem de desvio da sua média de concepção em relação à concepção geral dos touros. O desvio padrão da população foi utilizado como critério de classificação dos touros e a diferença entre os reprodutores dos grupos AF e BF foi de pelos menos quatro vezes o DP.

### 6.2.2 Isolamento dos espermatozoides para extração das nucleoproteínas

Amostras de sêmen preservado em nitrogênio líquido (-196°C) foram fornecidas pela empresa Alta Genetic (Tabela 1). As amostras dos 16 touros foram descongeladas a 37°C por 30 segundos. Os espermatozoides foram primeiro lavados em 45% de percoll em PBS (pH 7,4) (D'amours et al., 2010) à 800g por 15 min e posteriormente lavados duas vezes com 5 mL de PBS (pH 7,4) contendo inibidores de proteases (cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche®) a 800g por 5 min. Posteriormente, os pellets foram divididos em alíquotas de 50.10<sup>6</sup> spz/mL e congelados a -80°C.

**Tabela 1.** Fenótipos de fertilidade dos dezesseis touros. Os touros de 1 a 8 são do grupo BF e os touros de 9 a 16 são do grupo AF.

<b>Número do touro</b>	<b>Fertilidade*</b>	<b>Número de coberturas</b>
Touros BF		
1	-12.3	595
2	-8.1	1552
3	-7.2	719
4	-6.4	668
5	-6.3	750
6	-5.9	781
7	-5.6	702
8	-4.2	783
Touros AF		
9	3.3	1024
10	4.2	651
11	4.5	578
12	4.8	300
13	4.8	300
14	4.8	518
15	5.0	326
16	6.2	743

\*Os valores de fertilidade correspondem à porcentagem de desvio da média de concepção do touro em relação à concepção geral dos touros.

### **6.2.3 Teste do azul de anilina (AZAN)**

Esfregaços de espermatozoides lavados em PBS foram preparados em lâminas para microscópio e deixados secar ao ar. Estes foram então fixados em solução de glutaraldeído á 3% (PBS, pH 7,4) por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS (pH 7,4) por 5 min cada. Posteriormente, os esfregaços foram corados em solução de AZAN à 5% e ácido acético a 4% (pH 3,5) por 7 min, lavados mais uma vez em PBS (pH 7,4) e secados ao ar. Duzentos espermatozoides foram avaliados por lâmina, em duplicata, sob aumento de 1000x em objetiva de imersão. Espermatozoides não corados foram considerados normais e os corados em azul escuro foram considerados com falhas na condensação da cromatina (espermatozoide imaturo) relativas a excesso de retenção (Dadoune et al., 1988; Dadoune et al., 2003) ou acessibilidade (de Lamirande et al., 2012) das histonas espermáticas.

#### **6.2.4 Extração das nucleoproteínas**

As nucleoproteínas foram extraídas individualmente de acordo com o protocolo de Yebra e Oliva (1993). Amostras de cinquenta milhões de espermatozoides foram lavadas duas vezes com 400  $\mu$ L de solução contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) a 5°C, respectivamente. Em seguida, foram adicionados em sequência 100  $\mu$ L de solução contendo 20 mM de EDTA, 1 mM de PMSF, 100 mM de Tris (pH 8.0), 100  $\mu$ L de 6M de cloreto de guanidina e 575 mM de ditioneitol (DTT) e por fim 200  $\mu$ L de 552 mM iodoacetato de sódio. As amostras foram protegidas da luz e incubadas a 20°C por 30 min. Ao final da incubação, cada uma das amostras recebeu 1 mL de etanol resfriado a -20°C, foi incubada por 1 min a -20°C e então centrifugada a 5°C por 15 min, este procedimento foi repetido duas vezes. O pellet foi incubado em 1000  $\mu$ L de 0,5 M ácido clorídrico (HCl) a 37°C por 15 min e centrifugado a temperatura ambiente por 10 min. O sobrenadante foi mantido, 300  $\mu$ L de 100% TCA a 4 °C foram adicionados, amostras foram incubadas a 4°C por 5 min e centrifugadas a 4°C por 10 min. O pellet proteico foi lavado duas vezes com 500  $\mu$ L de solução de 2-mercaptoetanol a 1% em acetona, deixado secar, dissolvido em 100  $\mu$ L de tampão contendo 5.5 M ureia, 2-mercaptoetanol à 20% e ácido acético à 5% e finalmente estocado a -80°C.

#### **6.2.5 Western blotting**

Após a extração, a concentração das proteínas foi mensurada pelo kit comercial Micro BCA™ Protein Assay Kit (cat# 23235, Pierce®). As proteínas espermáticas foram separadas por meio de eletroforese em gel de ácido acético-uréia-poliacrilamida (AU-PAGE). As dimensões dos géis utilizados foram 13,3 x 8,7 x 0,1 e estes possuíam uma malha de empilhamento de 7,5% e uma malha de separação de 15% (0.9 M de ácido acético e 2.5 M de ureia). Em cada amostra foi adicionado à metade do seu volume um tampão contendo 5,5 M de uréia, 2-mercaptoetanol a 20%, ácido acético a 5%, glicerol a 50% e azul de metileno a 0.2%. A separação eletroforética das proteínas foi realizada com um tampão de corrida composto de 0,9 M de ácido acético a 130 V constantes por 80 min. As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Imobilon-P®) utilizando uma unidade de transferência semi-seca (HEP-1, OWL®) e solução de ácido acético a 2,5% como tampão. Subsequentemente, a membrana foi incubada em solução tamponada comercial Tris-HCl com 1% de caseína (cat#1610782, Bio-rad®) à temperatura ambiente por uma hora. A membrana bloqueada foi então incubada com a solução do anticorpo primário de coelho (H2B,

H3.3 ou H4; Abcam<sup>®</sup> Ab1790, Ab97968 e Ab10158, individualmente) a 1:700 em solução tamponada Tris-HCl contendo Tween-20 a 0.1% (TBS-T20) a 4 °C por 12 horas. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T20, à temperatura ambiente por 10 min, respectivamente. A incubação com a solução do anticorpo secundário (IgG anti-coelho conjugada com HRP (horse radish peroxidase), cat#sc2313, Santa Cruz) a 1:50.000 em solução TBS-T20, foi realizada a temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, após mais três lavagens em TBS-T20, as membranas foram imersas na solução comercial contendo o substrato para HRP (Imobilon<sup>™</sup> Western, cat# P36599) seguindo as orientações do fabricante. Por fim, as proteínas foram reveladas nas membranas por meio de um sistema de captura de imagens quimioluminescentes auxiliado por computador (ChemiDoc XRS system, cat#170-8070, Bio-rad<sup>®</sup>) e os níveis de expressão determinados por meio do programa Quantity One (Bio-Rad<sup>®</sup>).

### **6.2.6 Imunocitoquímica**

A localização e quantificação da expressão de histonas nos espermatozoides foram realizadas por meio de experimentos de imunocitoquímica, baseados no protocolo modificado de Li et al. (2008). Foram utilizadas amostras de apenas dois touros, o de menor e o de maior fertilidade. As células espermáticas foram descongeladas, como descrito previamente, e lavadas com PBS (pH 7,4) contendo inibidores de protease (cOmplete, Roche<sup>®</sup>) e 10 mM de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) a 700xg por 5 min. Posteriormente, os espermatozoides foram incubados em solução contendo 20 mM de CHAPS ((3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamônio]-propano-sulfonato) a temperatura ambiente por 20 min, para então serem mais uma vez lavados com PBS (pH 7,4). Para descondensação da cromatina espermática, as amostras foram incubadas em solução de 10 mM de DTT e heparina a 0.1% à temperatura ambiente por 30 min (Motoishi et al., 1996). Os espermatozoides foram então depositados em lamínulas revestidas com poli-L-lisina, fixados com paraformaldeído a 4% em PBS, a 4<sup>o</sup>C por 10 min e permeabilizados com Triton X-100 a 0,2%, BSA a 0,1% em PBS a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma desidratação em série com etanol a 50%, 70%, 95% e 100%, respectivamente. Para então, serem incubadas com metanol a 100% a -20<sup>o</sup>C por 20 min, rinsadas com tampão formado por Triton X-100 a 0,1% em PBS (pH 7,4) (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T contendo BSA a 1% a temperatura ambiente por uma hora.

A incubação com os anticorpos primários policlonais de coelho contra H2B (1:250), H3.3 (1:250) e H4 (1:250) (Abcam<sup>®</sup>) foi conduzida a 4<sup>o</sup>C de um dia para o outro. Após duas lavagens

com PBS-T a temperatura ambiente por 15 min cada, as lamínulas foram incubadas em solução contendo os anticorpos secundários anti-coelho conjugados com fluoróforo diluídos 1:250 (donkey anti-rabbit, DyLight® 488, AbCam®) e DAPI a 0.00025% a temperatura ambiente por uma hora. Finalmente, amostras foram lavadas em solução de Triton X-100 a 2% em PBS á temperatura ambiente por 15 min e seladas em lâminas para microscopia utilizando um meio de montagem comercial (cat# H-1000, VECTAshield®).

As amostras foram então examinadas em microscopia confocal de fluorescência (Zeiss LSM 510®) sob aumento de 1000x em objetiva de imersão. As imagens foram digitalizadas pelo programa computacional *LSM 510 Image software*® e cem células espermáticas por touro, oriundos da contagem de duas lâminas (50 cada), foram classificadas, com base na intensidade total da fluorescência, em espermatozoides de nível baixo, médio e alto de histonas. As áreas ao redor das cabeças espermáticas descondensadas também foram mensuradas em  $\mu\text{m}^2$ .

### **6.2.7 Bioinformática**

As sequências das histonas H2B, H3.3 e H4 entre bovinos, seres humanos e camundongos foram comparadas utilizando programas de computador. As sequências das proteínas foram pesquisadas e alinhadas em bovinos, seres humanos e camundongos por meio do programa Uniprot® ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Como a proteína H2B possuía vários subgrupos e variantes na base de dados Uniprot®, foram selecionadas apenas as proteínas que possuíam 90% de identidade entre as espécies estudadas. Por meio do programa Clustal X® (<http://www.clustal.org>) foram desenvolvidos os alinhamentos múltiplos e árvores filogenéticas das histonas H2B, H3.3 e H4 (Saitou & Nei, 1987), respectivamente (Tabelas suplementares 1 e 2; Figuras suplementares 1 e 2).

### **6.2.8. Análise estatística**

Os dados foram analisados por meio do programa *SYSTAT 12*® (SYSTAT Software Inc, EUA). Os resultados foram expressos como média (desvio padrão (DP); erro padrão da média (EPM)). Para verificar possíveis diferenças entre os grupos AF e BF, foi utilizado o teste t ( $P < 0.05$ ). A correlação de Pearson foi realizada entre a retenção das histonas (teste do AZAN) ou expressão das histonas (western blot) com a fertilidade dos touros ( $P < 0.05$ ).

## **6.3 Resultados**

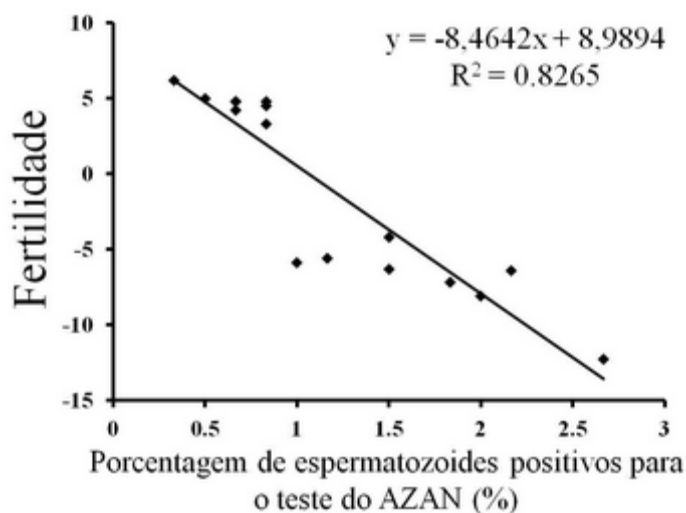


### 6.3.1 Teste do azul de anilina (AZAN)

O teste do AZAN foi utilizado para avaliar a condensação da cromatina pela retenção de histonas na população espermática de touros de AF e BF. Os espermatozoides corados em azul (positivos) apresentam deficiência da condensação da cromatina (imaturidade nuclear) com persistência excessiva de histonas e os não-corados possuem a cromatina normal (Fig. 1). Foi observada uma diferença significativa entre as células positivas entre os touros de BF (1,73 (0,55; 0.19)) e AF (0,67 (0,17; 0.06) ( $P < 0.0001$ )). Adicionalmente, uma regressão linear foi estabelecida entre a porcentagem de espermatozoides com cromatina anormal e a fertilidade dos touros (Fig. 2), os quais foram negativamente correlacionados entre si ( $r = -0,90$ ,  $r^2 = 0,82$ ,  $P < 0,0001$ ).



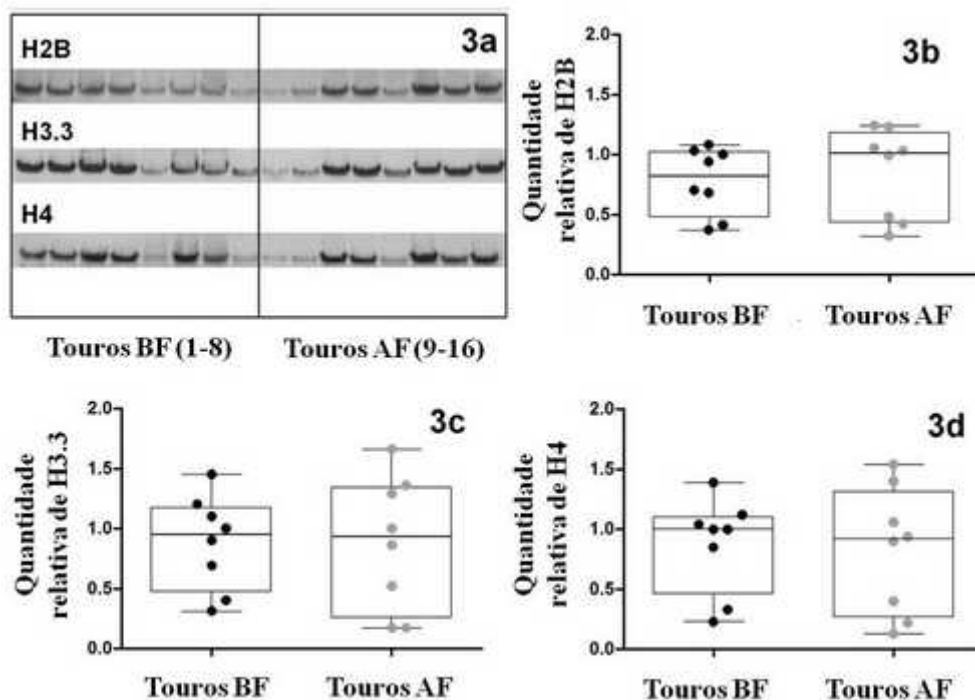
**Figura 1.** Espermatozoides de touros corados com azul de anilina. O espermatozoide não corado a esquerda apresenta cromatina normal e o espermatozoide corado em azul escuro a direita possui anormalidade da cromatina associada ao aumento da retenção e/ou acessibilidade das histonas.



**Figura 2.** Análise de regressão linear entre os resultados do teste do AZAN e a fertilidade de touros de baixa e alta fertilidades. Uma correlação negativa significativa foi observada entre os resultados do teste do AZAN e a fertilidade dos touros ( $r = -0,90$ ,  $P < 0,001$ ).

### 6.3.2 Western blotting

A técnica de Western blot foi utilizada para avaliar a expressão de H2B, H3.3 e H4 em espermatozoides de touros com fertilidade variada. Nossos resultados demonstraram que as histonas foram consistentemente detectadas em todas as amostras, entretanto, não houve diferença significativa nos níveis das histonas espermáticas entre touros de BF e AF (Fig.3). Além disso, não houve correlação entre a fertilidade e os resultados do western blot das histonas H2B ( $P = 0,98$ ), H3.3 ( $P = 0,84$ ) e H4 ( $P = 0,73$ ).

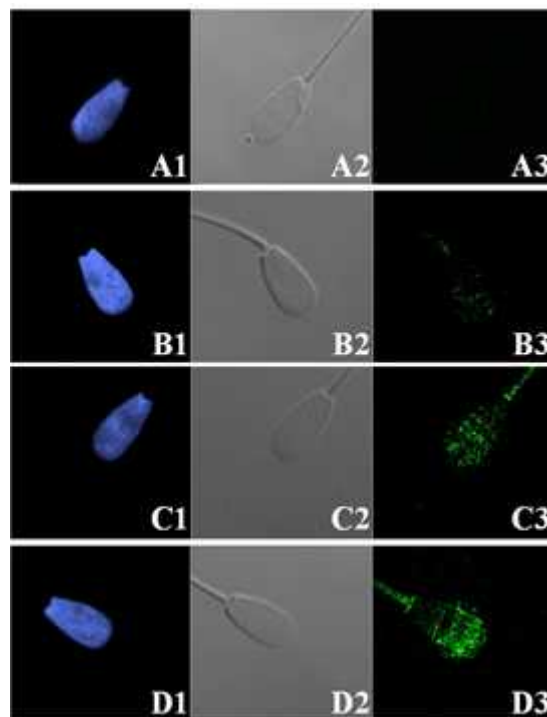


**Figura 3.** Western blot (3<sup>a</sup>) e quantidade relativa de histonas H2B (3b), H3.3 (3c) e H4 (3d) nos touros de BF (pontos negros) e de AF (pontos cinza). Cada valor de quantidade relativa corresponde a relação entre a intensidade da banda do touro e a intensidade da banda do touro 1 (referência). Os gráficos correspondem a um diagrama de extremos e quartis, onde a linha do meio corresponde a mediana, os extremos dos retângulos são o 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> quartis e os extremos das retas os valores máximo e mínimo, respectivamente. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

### 6.3.3 Imunocitoquímica

A localização e os níveis de histonas nos espermatozoides dos dois touros, de menor e maior fertilidade, foram analisados por microscopia de imunofluorescência. Os sinais das histonas foram claramente detectáveis na região da cabeça dos espermatozoides (Fig. 4 B, C e D), os quais foram presentes nas sub-regiões pós-equatorial, equatorial e pré-equatorial. Foram também observados fluorescência na peça intermediária, provavelmente relacionados a histonas não associadas com a cromatina espermática. Os valores médios de intensidade de fluorescência total das histonas e área da cabeça ( $\mu\text{m}^2$ ) de cem espermatozoides avaliados dos touros de BF e AF foram  $2,65 \cdot 10^6 \pm 1,70$ ;  $2,60 \cdot 10^6 \pm 1,38$ ;  $77,56 \mu\text{m}^2 \pm 13,80$  e  $79,43 \mu\text{m}^2 \pm 26,43$ , respectivamente.

Os espermatozoides foram divididos em três classes: nível baixo, médio ou alto de persistência histonas; com o intervalo das classes calculado pela divisão da diferença entre os valores máximos e mínimos de intensidade de fluorescência total por três (número de classes). A porcentagem, a média de intensidade de fluorescência total e a área da cabeça dos espermatozoides com níveis baixo, médio ou alto de retenção de histonas estão ilustradas na Tabela 2. Os resultados da imunocitoquímica também demonstraram que a maior parte da população espermática (74,5% (média dos dois touros) possui um nível baixo de retenção de histonas. Adicionalmente, uma correlação positiva foi observada entre a área da cabeça dos espermatozoides e a intensidade de sinais das histonas ( $r = 0,64$ ;  $P < 0.0001$ ).



**Fig.4. Imunolocalização das histonas em espermatozoides bovinos.** A1-D1: DNA corado com DAPI (azul); A2-D2: imagens microscopias de campo claro; A3-D3: marcação indireta das histonas com anticorpos secundários conjugados com fluoróforo (DyLight 488); A3: controle negativo: espermatozoides incubados apenas com anticorpo secundário; B3: espermatozoide com nível baixo de histona; C3: espermatozoide com nível médio de histonas e D3: espermatozoide com nível alto de histonas.

**Tabela 2.** Análise imunocitoquímica das histonas espermáticas de touros de alta e baixa fertilidade. Os resultados estão expressos como média (DP; EPM).

Parâmetros	Touro BF	Touro AF
Espermatozoides com nível baixo de histonas		
Porcentagem (%)	71	78
Intensidade de fluorescência total	1,77x10 <sup>6</sup> (0,76; 0,09)	1,97x10 <sup>6</sup> (0,47; 0,05)
Area da cabeça espermática (µm <sup>2</sup> )	58,70 (8,38, 0,99)	58,66 (7,06, 0,80)
Espermatozoides com nível médio de histonas		
Porcentagem (%)	24	17
Intensidade de fluorescência total	4,26x10 <sup>6</sup> (0,77; 0,16)	4,27x10 <sup>6</sup> (0,63; 0,15)
Area da cabeça espermática (µm <sup>2</sup> )	67,05 (9,30; 1,90)	54,25 (6,98; 1,69)
Espermatozoides com nível alto de histonas		
Porcentagem (%)	5	5
Intensidade de fluorescência total	7,37x10 <sup>6</sup> (1,03; 0,46)	6,75x10 <sup>6</sup> (0,57; 0,25)
Area da cabeça espermática (µm <sup>2</sup> )	65,87 (9,53; 4,26)	63,53 (8,45; 3,78)

### 6.3.4 Bioinformática

Utilizando a base de dados Uniprot<sup>®</sup>, foram identificados vinte e um tipos de proteínas H2B, sendo doze únicas para bovinos e as demais comuns ao homem e camundongos, porém apenas dezessete foram selecionadas. Assim, quatro proteínas de camundongo, sete de humanos e seis de bovinos foram utilizadas para o alinhamento múltiplo e construção da árvore filogenética. As variantes bovinas, F2Z4E8 e A5D7N2 foram 100% as variantes humanas Q99877 (H2B1N) e Q16778 (H2B2E), além de serem oriundas de uma sequência ancestral comum. Assim, estas deveriam ser consideradas como variantes bovinas H2B1N e H2BE, respectivamente. Além disso, a proteína H2B tipo 1 foi 100% conservada entre bovinos (P62808), seres humanos (P62807) e camundongos (Q6ZWY9) e possuiu a mesma sequência ancestral comum (Tabela suplementar 1 e Figura suplementar 1). Contudo, embora as proteínas Q8N257 humanas e Q8CGP0 murina foram 100% conservadas entre si, estas possuíam 98,41% de similaridade com A5D7N2 bovina. Apenas uma variante das histonas H3.3 e H4 por espécie foi identificada na plataforma UniProt<sup>®</sup>, as quais foram 100% idênticas e evolutivamente conservadas entre bovinos, murinos e seres humanos (Tabela suplementar 2 e Figura suplementar 2).

#### 6.4 Discussão e conclusão

As histonas estão normalmente presentes na cromatina espermática em uma distribuição que não é aleatória. Estudos demonstraram que as regiões ricas em histonas no genoma paternal possuem genes expressos durante as clivagens embrionárias iniciais (Hammoud et al., 2009). Desta forma, histonas espermáticas podem ter uma função significativa na avaliação da fertilidade masculina e no desenvolvimento embrionário inicial. Nossa hipótese foi que a fertilidade de touros está associada com as histonas retidas nos espermatozoides. Para testá-la, avaliamos a condensação da cromatina espermática pelo teste do AZAN, o qual cora células com taxas elevadas de retenção e/ou acessibilidade às histonas e, determinamos a expressão das histonas H2B, H3.3 e H4 em touros de fertilidade variada. Adicionalmente, uma análise computadorizada foi desenvolvida para ressaltar o quanto estas proteínas são conservadas entre mamíferos. O teste do AZAN tem sido utilizado para quantificação de espermatozoides com redução anormal da condensação da cromatina ou imaturos (Hammadeh et al., 1996; Chioccarelli et al., 2010; Sati and Huszar, 2013).

Com base nos presentes resultados, anormalidades na condensação da cromatina associadas com retenção e/ou acessibilidade elevadas das histonas espermáticas foram relacionadas com a fertilidade de touros. A população de espermatozoides positivos (anormais) para AZAN foi superior no BF do que no grupo de AF ( $P < 0.0001$ ). A maioria dos estudos utilizando o teste do AZAN foram realizados em humanos, nos quais tem sido sugerido seu valor preditivo na fertilidade do homem (Auger et al., 1990; Hammadeh et al., 2001). Relativamente, poucos estudos examinaram a associação entre o AZAN e a fertilidade de touros (Vieytes et al., 2008). Nos animais, a porcentagem de espermatozoide positivos para o teste é variada sendo 1% em camundongos (Shokri et al., 2013), 10% em gatos (Hingst et al., 1995), 10% em coelhos (Steger et al., 2005) e 50% em galos (Santiago-Moreno et al., 2009). Em touros a extensão dos resultados varia de 1 a 10% e estes tem sido associados a instabilidade da cromatina e danos no DNA (Khalifa et al., 2008; Mukhopadhyay et al., 2011). Nossos resultados foram caracterizados por uma diferença pequena mas significativa entre os grupos, a qual poderia indicar uma espermatogênese menos eficiente nos touros de baixa fertilidade.

Nos nossos experimentos de western blot nenhuma associação estatística entre as histonas (h2B, h3.3 e H4) e a fertilidade dos touros foi observada. Entretanto, foram constatadas distintas populações espermáticas com relação à intensidade do nível de histonas (baixo, médio e alto) (Fig.4 e Tab.2). Também foi observada uma correlação positiva entre a área da cabeça dos espermatozoides e a intensidade de presença das histonas ( $P < 0.0001$ ). Considerando que as

protaminas são essenciais para a compactação da cromatina espermática, a substituição ineficiente das histonas pelas protaminas pode reduzir o grau de condensação da cromatina (Carrel et al., 2007). Altos níveis de retenção de histonas foram associados com baixa condensação da cromatina, a qual pode influenciar o tamanho da cabeça do espermatozoide após protocolos de descondensação (Kazerooni et al., 2009). Corroborando estes achados, um estudo em bovinos demonstrou que danos ao DNA foram relacionados a anormalidades de forma e tamanho da cabeça do espermatozoide (Enciso et al., 2011). Foi observado no presente estudo que a maior parte da população espermática de ambos os dois touros apresentavam um nível reduzido de retenção de histonas (71% nos touros BF bull e 78% nos de AF), ratificando os resultados do teste do AZAN. Os sinais das histonas na imunofluorescência apresentaram um padrão pontuado na região da cabeça espermática (Fig. 4), este padrão também foi similar a estudos semelhantes em suínos (Flores et al., 2011) e homens (Zhang et al., 2006). Além disso, um dos poucos trabalhos conduzidos sobre a cromatina espermática de touros, demonstrou que as histonas também estão localizadas na teca perinuclear (Tovich and Oko, 2003). Esta observação é consistente com os nossos resultados, pois os sinais das histonas foram principalmente presentes na região pré-equatorial da cabeça. Histonas também podem se apresentar no citoplasma ou associadas com mitocôndrias em células animais (Cascone et al., 2012; Choi et al., 2011; Johnson et al., 2007; Kutsyi et al., 2009), o que pode justificar os sinais constatados nas peças intermediárias neste estudo.

Não houve diferença significativa na expressão das histonas espermática H2B, H3.3 e H4 entre touros BF e AF (Fig.3), contudo, os espermatozoides com retenção elevada de histonas foram mais abundantes no touros de BF. Porém, como a porcentagem de células positivas foi menor do que 2% em ambos os grupos, esta não foi suficiente para afetar a expressão das histonas mensuradas pelo western blot. A proporção anormal entre histonas e protaminas afeta negativamente a cromatina espermática. Por exemplo, Hammoud et al. (2011) sugeriram que a retenção de histonas promoveu uma diferença de distribuição das mesmas entre homens inférteis e férteis. Além disso, homens subférteis com taxas elevadas de gametas positivos para AZAN apresentaram alterações na acetilação das histonas (Paradowska et al., 2012). As causas para ocorrência de excessiva persistência de histonas ainda não foram elucidadas, mas alterações dos níveis de testosterona e hormônio folículo estimulante (FSH) e, defeitos moleculares estão entre os possíveis fatores (Gill-Sharma et al., 2012). Meyer-Ficca et al. (2009, 2011) relataram que a deficiência da poli (ADP-ribose) glicohidrolase (PARG) – uma enzima que modula o reparo do DNA durante a espermatogênese – promoveu um aumento específico dos níveis da histona

H2AFX-fosforilada e uma retenção anormal das histonas centrais em linhagens de camundongos subférteis.

Por meio das análises de bioinformática nós demonstramos que as histonas H3.3 e H4 são idênticas entre bovinos, camundongos e seres humanos, enquanto a histona H2B foi mais conservada entre o bovino e o homem quando comparada as variantes murinas. Estes resultados sugerem que as histonas H3.3 e H4 apresentam uma funcionalidade idêntica nestas espécies. Ao contrário da histona H2B que deve apresentar funções distintas entre os mamíferos. O bovino é um animal modelo explorado em diversas áreas da reprodução como criopreservação de embriões (Huang et al., 2007), testes genéticos (Almodin et al., 2005) e ensaios citotóxicos em espermatozoides (Cesari et al., 2007). Devido aos valiosos dados de fertilidade oriundos de centrais de inseminação (DeJarnette et al. 2004), o touro é um modelo conveniente para estudos de aspectos genéticos e epigenéticos da fertilidade masculina. As centrais de inseminação não apenas dispõem de análises de centenas inseminações por touro, mas também são capazes de classificar os machos em graus distintos de fertilidade, ao invés de somente dividi-los em fenótipos férteis ou inférteis. Além disso, técnicas para produção *in vitro* de embriões estão bem estabelecidas e são adequadas para avaliação do impacto do epigenoma paternal sobre o desenvolvimento embrionário (Machaty et al., 2012). No presente experimento, demonstramos a conservação e relação evolutiva entre as histonas de bovinos, camundongos e seres humanos, com o intuito de valorizar os espermatozoides de touros para estudos sobre a integridade da cromatina espermática.

Nosso estudo é o primeiro em avaliar diferenças de fertilidade em touros relacionadas à expressão de histonas nos espermatozoides. A pequena amostragem utilizada nos ensaios de imunofluorescência limitou a análise estatística para detecção de diferenças entre os grupos. Entretanto, observamos variações na população espermática que podem ser revalidadas utilizando um número maior de amostras relacionadas a estudos de fertilidade diagnósticos ou preditivos (Fig. 4). Embora as modificações pós-traducionais (MPT) nas histonas modulem o epigenoma espermático (Jenkins and Carrel, 2012), nosso estudo não abordou estes fatores. Desta forma, uma análise qualitativa das MPT em histonas espermáticas de touros pode trazer novas perspectivas para a compreensão das regulações epigenéticas que afetam a fertilidade dos machos. Utilizando os meios atuais de análise seminal, a predição da fertilidade em touros ainda está distante da demanda da bovinocultura mundial. No homem, a contribuição das histonas paternas já foi examinada e foram constatadas influências do epigenoma masculino no desenvolvimento embrionário inicial (van der Heijden et al., 2008). Neste contexto, a avaliação epigenômica dos espermatozoides é uma nova área de pesquisa na seleção de touros que poderá gerar resultados positivos para produtores e



consumidores. Em conclusão, a fertilidade de touros foi associada com o estado de condensação da cromatina, relacionado à retenção das histonas na população espermática. Não foram encontradas relações entre os níveis de expressão das histonas H2B, H3.3 e H4 com a fertilidade de touros. As análises de imunofluorescência demonstraram diferentes populações de espermatozoide relacionadas à retenção de histonas.

### **6.5 Declaração de interesse**

Os autores declaram que não houve nenhum conflito de interesse

### **6.6 Financiamento**

Este estudo foi financiado pelo Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station, Alta Genetic Inc., CNPq (Brasil) e pelo programa CAPES-FULBRIGHT.

### **6.7 Agradecimentos**

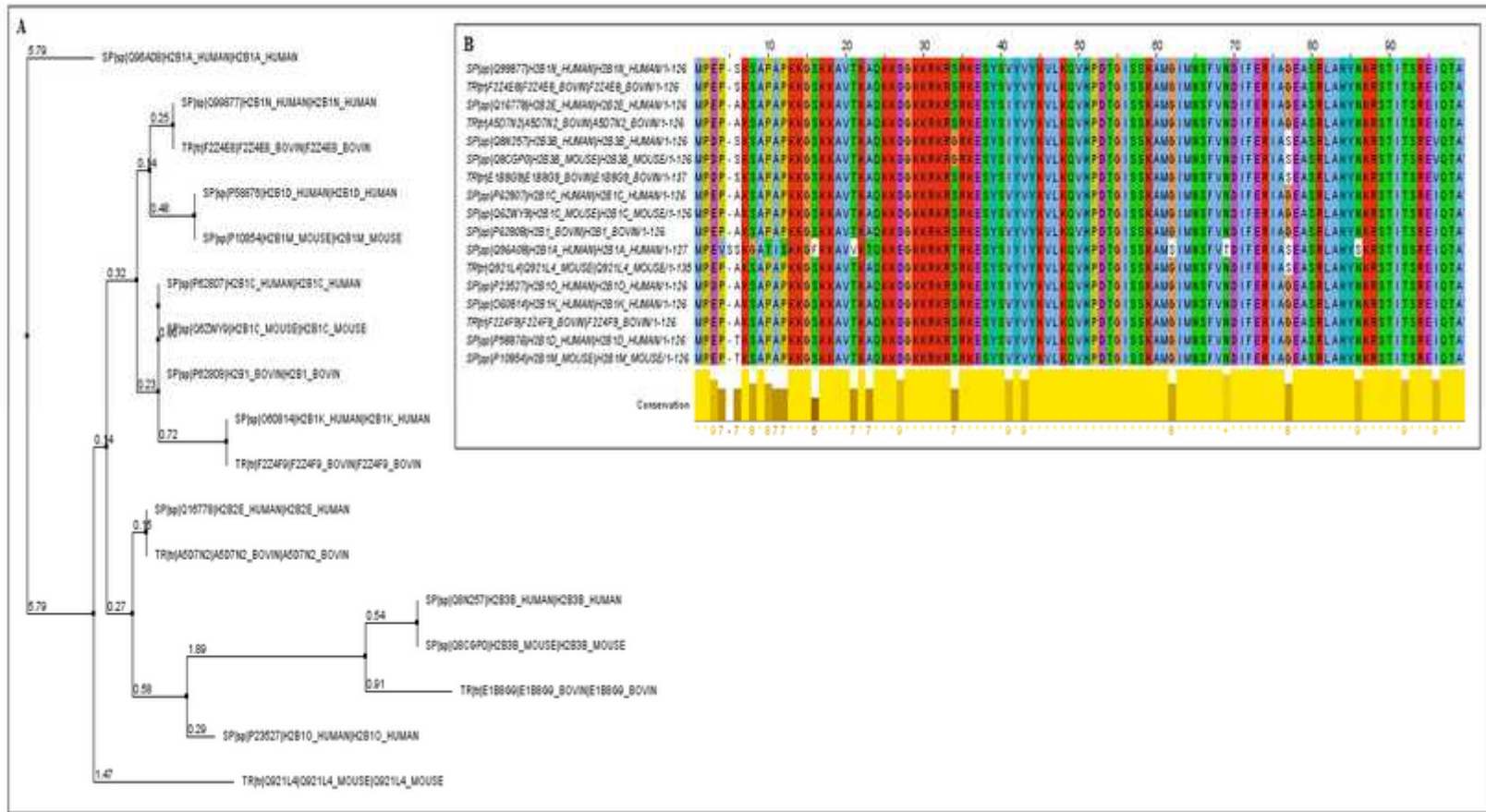
Os autores agradecem à Sra. Amanda Lawrence e ao Sr. William Monroe pela assistência técnica com a imunocitoquímica e microscopia de fluorescência.

## 6.8 Tabelas e figuras suplementares

**Tabela suplementar 1. Lista das histonas H2B utilizadas nas análises de bioinformática.**

Entrada	Nome de entrada	Nome da proteína	Organismo	Nome dos genes	Identidade (%)		
					bovino	camundongo	homem
<a href="#">Q99877</a>	H2B1N_HUMAN	Histone H2B type 1-N	Homo sapiens (Human)	HIST1H2BN H2 BFD	100%	N/A	-
<a href="#">F2Z4E8</a>	F2Z4E8_BOVIN	Histone H2B	Bos 56aurus (Bovine)	H2B	-	N/A	100%
<a href="#">Q16778</a>	H2B2E_HUMAN	Histone H2B type 2-E	Homo sapiens (Human)	HIST2H2BE H2 BFQ	100%	N/A	-
<a href="#">A5D7N2</a>	A5D7N2_BOVIN	Histone H2B	Bos 56aurus (Bovine)	HIST2H2BE	-	N/A	100%
<a href="#">Q8N257</a>	H2B3B_HUMAN	Histone H2B type 3-B	Homo sapiens (Human)	HIST3H2BB	98.41%	100%	-
<a href="#">Q8CGP0</a>	H2B3B_MOUSE	Histone H2B type 3-B	Mus musculus (Mouse)	Hist3h2bb Hist3h 2bb-ps	98.41%	-	100%
<a href="#">E1B8G9</a>	E1B8G9_BOVIN	Histone H2B	Bos 56aurus (Bovine)	HIST3H2BB	-	98.41%	98.41%
<a href="#">P62807</a>	H2B1C_HUMAN	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	Homo sapiens (Human)	HIST1H2BC H2 BFL HIST1H2BE H2 BFH HIST1H2BF H2B FG HIST1H2BG H2 BFA HIST1H2BI H2B FK	100%	100%	-
<a href="#">Q6ZWY9</a>	H2B1C_MOUSE	Histone H2B type 1-C/E/G	Mus musculus (Mouse)	Hist1h2bc Hist1h2be Hist1h2bg	100%	-	100%
<a href="#">P62808</a>	H2B1_BOVIN	Histone H2B type 1	Bos 56aurus (Bovine)		-	100%	100%
<a href="#">Q96A08</a>	H2B1A_HUMAN	Histone H2B type 1-A	Homo sapiens (Human)	HIST1H2BA TS H2B	N/A	85.04%	-
<a href="#">Q921L4</a>	Q921L4_MOUSE	Histone H2B	Mus musculus (Mouse)	Gm13646 Hist1h 2bc Hist1h2br LOC665622 OTTMUSG00000 013203 mCG_50238	N/A	-	85.04%

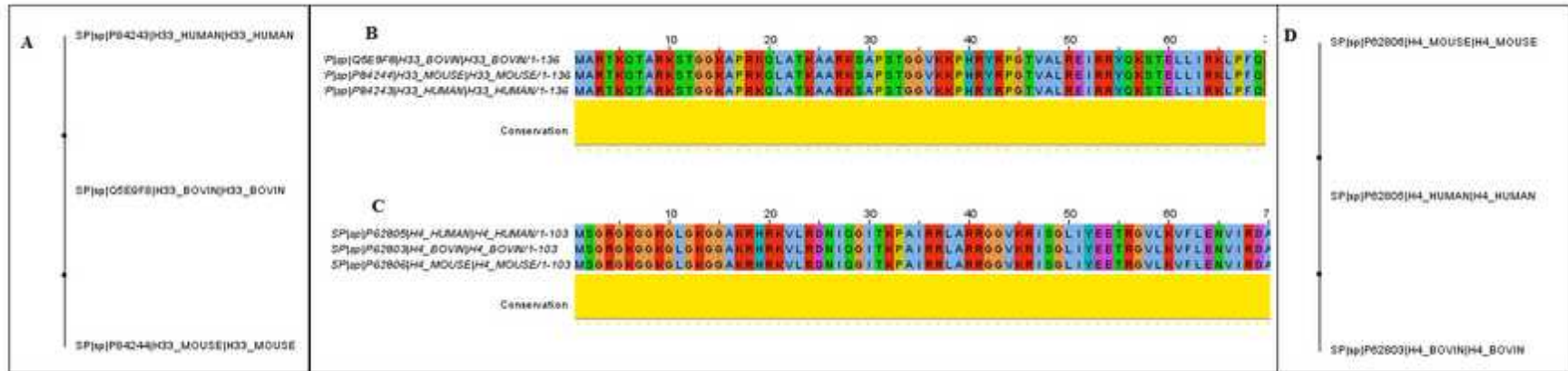
<a href="#">P23527</a>	H2B1O_HUMAN	Histone H2B type 1-O	Homo sapiens (Human)	HIST1H2BO H2 BFH H2BFN	-	-	-
<a href="#">O60814</a>	H2B1K_HUMAN	Histone H2B type 1-K	Homo sapiens (Human)	HIST1H2BK H2 BFT HIRIP1	100%	N/A	-
<a href="#">F2Z4F9</a>	F2Z4F9_BOVIN	Histone H2B	Bos 57aurus (Bovine)	BT.88561	-	N/A	100%
<a href="#">P58876</a>	H2B1D_HUMAN	Histone H2B type 1-D	Homo sapiens (Human)	HIST1H2BD H2 BFB HIRIP2	N/A	100%	-
<a href="#">P10854</a>	H2B1M_MOUSE	Histone H2B type 1-M	Mus musculus (Mouse)	Hist1h2bm	N/A	-	100%



**Figura suplementar 1.** Árvore filogenética (A) e alinhamento múltiplo\* (B) das histonas H2B oriundas de bovinos, camundongos e seres humanos. Árvore filogenética: as distâncias evolucionárias dos grupos de proteínas estão representadas numericamente nos ramos. Alinhamento múltiplo (B); aminoácidos iguais possuem cores iguais e aminoácidos diferentes estão representados na cor branca.

**Tabela suplementar 2.** Lista das histonas H3.3 e H4 utilizadas nas análises de bioinformática.

<b>Entrada</b>	<b>Nome de entrada</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>Organismo</b>	<b>Nome do gene</b>
<a href="#">Q5E9F8</a>	H33_BOVIN	Histone H3.3	Bos taurus (Bovine)	H3F3A H3F3B
<a href="#">P84244</a>	H33_MOUSE	Histone H3.3	Mus musculus (Mouse)	H3f3a H3.3a H3f3b H3.3b
<a href="#">P84243</a>	H33_HUMAN	Histone H3.3	Homo sapiens (Human)	H3F3A H3.3A H3F3 PP781 H3F3B H3.3B
<a href="#">P62805</a>	H4_HUMAN	Histone H4	Homo sapiens (Human)	HIST1H4A H4/A H4FA HIST1H4B H4/I H4FI HIST1H4C H4/G H4FG HIST1H4D H4/B H4FB HIST1H4E H4/J H4FJ HIST1H4F H4/C H4FC HIST1H4H H4/H H4FH HIST1H4I H4/M H4FM HIST1H4J H4/E H4FE HIST1H4K H4/D H4FD HIST1H4L H4/K H4FK HIST2H4A H4/N H4F2 H4FN HIST2H4 HIST2H4B H4/O H4FO HIST4H4
<a href="#">P62803</a>	H4_BOVIN	Histone H4	Bos taurus (Bovine)	
<a href="#">P62806</a>	H4_MOUSE	Histone H4	Mus musculus (Mouse)	Hist1h4a Hist1h4b H4-53 Hist1h4c H4-12 Hist1h4d Hist1h4f Hist1h4h Hist1h4i Hist1h4j Hist1h4k Hist1h4m Hist2h4a Hist2h4 Hist4h4



**Figura suplementar 2.** Árvore filogenética e alinhamento múltiplo das histonas H3.3 (A e B) e H4 (C e D) oriundas de bovinos, camundongos e seres humanos. Alinhamento múltiplo (B e C): aminoácidos iguais possuem cores iguais.

## 6.9 Referências bibliográficas

**Agarwal A & Said TM** 2003 Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update* **9** 331-345.

**Almodin CG, Moron AF, Kulay Jr L, Minguetti-Câmara VC, Moraes AC & Torloni MR** 2005 A bovine protocol for training professionals in preimplantation genetic diagnosis using polymerase chain reaction. *Fertility and Sterility* **84** 895-899.

**Auger J, Mesbah M, Huber C & Dadoune JP** 1990 Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *International Journal of Andrology* **13** 452-462.

**Blaschek M, Kaya A, Zwald N, Memili E & Kirkpatrick BW** 2011 A whole-genome association analysis of noncompensatory fertility in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science* **94** 4695-4699.

**Brykczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, Beisel C, Schubeler D, Stadler MB & Peters AHFM** 2010 Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nature Structural & Molecular Biology* **17** 679-687.

**Carrell DT, Emery BR & Hammoud S** 2007 Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction Update* **13** 313-327.

**Cascone A, Bruelle C, Lindholm D, Bernardi P & Eriksson O** 2012 Destabilization of the Outer and Inner Mitochondrial Membranes by Core and Linker Histones. *PLoS ONE* **7** e35357.

**Cesari A, Falcinelli AL, Mendieta JR, Pagano MR, Mucci N, Daleo GR & Guevara MG** 2007 Potato aspartic proteases (StAPs) exert cytotoxic activity on bovine and human spermatozoa. *Fertility and Sterility* **88** 1248-1255.

**Chang YM, Gianola D, Heringstad B & Klemetsdal G** 2004 Effects of trait definition on genetic parameter estimates and sire evaluation for clinical mastitis with threshold models. *Animal Science* **79** 355-363.

**Chioccarelli T, Cacciola G, Altucci L, Lewis SEM, Simon L, Ricci G, Ledent C, Meccariello R, Fasano S, Pierantoni R & Cobellis G** 2010 Cannabinoid Receptor 1 Influences Chromatin Remodeling in Mouse Spermatids by Affecting Content of Transition Protein 2 mRNA and Histone Displacement. *Endocrinology* **115** 5017-5029.

**Choi Y-S, Hoon Jeong J, Min H-K, Jung H-J, Hwang D, Lee S-W & Kim Pak Y** 2011 Shot-gun proteomic analysis of mitochondrial D-loop DNA binding proteins: identification of mitochondrial histones. *Mol Biosyst* **7** 1523-1536.

**Correa JR, Pace MM & Zavos PM** 1997 Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* **48** 721-731.

**D'Occhio MJ, Hengstberger KJ & Johnston SD** 2007 Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Animal Reproduction Science* **101** 1-17.

**Dadoune JP** 1995 The nuclear status of human sperm cells. *Micron* **26** 323-345.

**Dadoune JP** 2003 Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy Research and Technique* **61** 56-75.

**Dadoune JP, Mayaux MJ & Guihard-Moscato ML** 1988 Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* **20** 211-217.

**de Lamirande E, San Gabriel MC & Zini A** 2012 Human sperm chromatin undergoes physiological remodeling during in vitro capacitation and acrosome reaction. *Journal of Andrology* **33** 1025-1035.

**de Yebra L & Oliva R** 1993 Rapid Analysis of Mammalian Sperm Nuclear Proteins. *Analytical Biochemistry* **209** 201-203.

**DeJarnette JM, Marshall CE, Lenz RW, Monke DR, Ayars WH & Sattler CG** 2004 Sustaining the Fertility of Artificially Inseminated Dairy Cattle: The Role of the Artificial Insemination Industry. *Journal of Dairy Science* **87, Supplement** E93-E104.



**Enciso M, Cisale H, Johnston SD, Sarasa J, Fernández JL & Gosálvez J** 2011 Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology* **76** 23-32.

**Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD & Khorasanizadeh S** 2003 Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes & Development* **17** 1870-1881.

**Flores E, Ramió-Lluch L, Bucci D, Fernández-Novell JM, Peña A & Rodríguez-Gil JE** 2011 Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology* **76** 1450-1464.

**Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H & de Villiers A** 1999 Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia* **31** 361-366.

**García-Macías V, De Paz P, Martínez-Pastor F, Álvarez M, Gomes-Alves S, Bernardo J, Anel E & Anel L** 2007 DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *International Journal of Andrology* **30** 88-98.

**Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Schmid CW & Bradbury EM** 1990 Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *Journal of Biological Chemistry* **265** 20662 - 20666.

**Gill-Sharma MK, Choudhuri J, Ansari MA & D'Souza S** 2012 Putative molecular mechanism underlying sperm chromatin remodelling is regulated by reproductive hormones. *Clinical Epigenetics* **4** 23.

**Hales BF, Grenier L, Lalancette C & Robaire B** 2011 Epigenetic programming: From gametes to blastocyst. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* **91** 652-665.

**Hammadeh ME, Al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kúpker D, Diedrich K & Schmidt W** 1996 The effect of chromatin condensation (Aniline Blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection program. *Human Reproduction* **11** 2468-2471.

**Hammadeh ME, Zeginiadv T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W & Strehler E** 2001 Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Archives of Andrology* **46** 99-104.

**Hammoud SS, Nix DA, Hammoud AO, Gibson M, Cairns BR & Carrell DT** 2011 Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Human Reproduction* **26** 2558-2569.

**Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT & Cairns BR** 2009 Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* **460** 473-478.

**Hingst O, Blottner S & Franz C** 1995 Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. *Andrologia* **27** 275-279.

**Huang JYJ, Chung J-T, Tan SL & Chian R-C** 2007 High survival and hatching rates following vitrification of embryos at blastocyst stage: a bovine model study. *Reproductive BioMedicine Online* **14** 464-470.

**Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Hrd MGM, Hrd MC, Johannisson A & Rodriguez-Martinez H** 1999 Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* **52** 641-658.

**Jenkins TG & Carrell DT** 2012 The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. *Reproduction* **143** 727-734.

**Johnson DT, Harris RA, French S, Blair PV, You J, Bemis KG, Wang M & Balaban RS** 2007 Tissue heterogeneity of the mammalian mitochondrial proteome. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **292** C689-C697.

**Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffarpasand F, Kazerooni Y & Zolghadr J** 2009 Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *Journal of Assisted Reproduction Genetics* **26** 591-596.

**Khalifa TAA, Rekkas CA, Lymberopoulos AG, Sioga A, Dimitriadis I & Papanikolaou T** 2008 Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **104** 143-163.

**Kleiman SE, Bar-Shira Maymon B, Hauser R, Botchan A, Paz G, Yavetz H & Yogev L** 2008 Histone H4 acetylation and AZFc involvement in germ cells of specimens of impaired spermatogenesis. *Fertility and Sterility* **89** 1728-1736.

**Kutsyi MP** 2009 Histones induce the release of apoptogenic factors from liver mitochondria. *Biology Bulletin* **36** 328-332.

**Li Y, Lalancette C, Miller D & Krawetz SA** 2008 Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian Journal of Andrology* **10** 535-541.

**Machaty Z, Peippo J & Peter A** 2012 Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. *Theriogenology* **78** 937-950.

**Meyer-Ficca ML, Ihara M, Lonchar JD, Meistrich ML, Austin CA, Min W, Wang ZQ & Meyer RG** 2011 Poly(ADP-ribose) metabolism is essential for proper nucleoprotein exchange during mouse spermiogenesis. *Biology of Reproduction* **84** 218-228.

**Meyer-Ficca ML, Lonchar J, Credidio C, Ihara M, Li Y, Wang ZQ & Meyer RG** 2009 Disruption of poly(ADP-ribose) homeostasis affects spermiogenesis and sperm chromatin integrity in mice. *Biology of Reproduction* **81** 46-55.

**Miller D, Brinkworth M & Iles D** 2010 Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* **139** 287-301.

**Mito Y, Henikoff JG & Henikoff S** 2005 Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nature Genetics* **37** 1090-1097.

**Motoishi M, Goto K, Tomita K, Ookutsu S & Nakanishi Y** 1996 Decondensation of Bull and Human Sperm Nuclei by Dithiothreitol and/or Heparin. *Journal of Reproduction and Development* **42** 7-13.

**Mukhopadhyay CS, Gupta AK, Yadav BR, Chauhan IS, Gupta A, Mohanty TK & Raina VS** 2011 Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. *Livestock Science* **136** 114-121.

**Paradowska AS, Miller D, Spiess AN, Vieweg M, Cerna M, Dvorakova-Hortova K, Bartkuhn M, Schuppe HC, Weidner W & Steger K** 2012 Genome wide identification of promoter binding sites for H4K12ac in human sperm and its relevance for early embryonic development. *Epigenetics* **7** 1057-1070.

**Peddinti D, Nanduri B, Kaya A, Feugang JM, Burgess SC & Memili E** 2008 Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Systems Biology* **2** 19.

**Prigent C & Dimitrov S** 2003 Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of Cell Science* **116** 3677-3685.

**Puglisi R, Pozzi A, Foglio L, Spanò M, Eleuteri P, Grollino MG, Bongioni G & Galli A** 2012 The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo. *Animal Reproduction Science* **132** 17-28.

**Rajender S, Avery K & Agarwal A** 2011 Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **727** 62-71.

**Saitou N & Nei M** 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4** 406-425.

**Santiago-Moreno J, Castaño C, Coloma MA, Gómez-Brunet A, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A & Campo JL** 2009 Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. *Poultry Science* **88** 2661-2669.

**Sati L & Huszar G** 2013. Methodology of Aniline Blue Staining of Chromatin and the Assessment of the Associated Nuclear and Cytoplasmic Attributes in Human Sperm. In *Spermatogenesis*, Methods in Molecular Biology, pp. 425-436.

**Shokri S, Hemadi M, Bayat G, Bahmanzadeh M, Jafari-Anarkooli I & Mashkani B** 2013 Combination of running exercise and high dose of anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate, increases protamine deficiency and DNA damage in rat spermatozoa. *Andrologia* [in press] doi: 10.1111/and.12061.

**Silva PFN & Gadella BM** 2006 Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* **65** 958-978.

**Simon L, Castillo J, Oliva R & Lewis SEM** 2011 Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive BioMedicine Online* **23** 724-734.

**Sonnack V, Failing K, Bergmann M & Steger K** 2002 Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* **34** 384-390.

**Steger K, Slavov M, Failing K, Weidner W & Bergmann M** 2005 Effect of Vasectomy on Sperm Nuclear Chromatin Condensation in the Rabbit. *J Androl* **26** 289-295.

**Steilmann C, Paradowska A, Bartkuhn M, Vieweg M, Schuppe H-C, Bergmann M, Kliesch S, Weidner W & Steger K** 2011 Presence of histone H3 acetylated at lysine 9 in male germ cells and its distribution pattern in the genome of human spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* **23** 997-1011.

**Struhl K** 1998 Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & Development* **12** 599-606.

**Tovich PR & Oko RJ** 2003 Somatic Histones Are Components of the Perinuclear Theca in Bovine Spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry* **278** 32431-32438.

**UniProt C** 2012 Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* **40** D71-75.

**van der Heijden G, Ramos L, Baart E, van den Berg I, Derijck A, van der Vlag J, Martini E & de Boer P** 2008 Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Developmental Biology* **8** 34.

**van der Heijden GW, Derijck AAHA, Ramos L, Giele M, van der Vlag J & de Boer P** 2006 Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Developmental Biology* **298** 458-469.

**Vieytes AL, Cisale HO & Ferrari MR** 2008 Relationship between the nuclear morphology of the sperm of 10 bulls and their fertility. *Veterinary Record* **163** 625-629.

**Zhang X, San Gabriel M & Zini A** 2006 Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *Journal of Andrology* **27** 414-420.

**Zini A, Zhang X & Gabriel MS** 2008 Sperm nuclear histone H2B: correlation with sperm DNA denaturation and DNA stainability. *Asian Journal of Andrology* **10** 865-871.

**Zwald NR, Weigel KA, Chang YM, Welper RD & Clay JS** 2004a Genetic selection for health traits using producer-recorded data. I. Incidence rates, heritability estimates, and sire breeding values. *Journal of Dairy Science* **87** 4287-4294.

**Zwald NR, Weigel KA, Chang YM, Welper RD & Clay JS** 2004b Genetic selection for health traits using producer-recorded data. II. Genetic correlations, disease probabilities, and relationships with existing traits. *Journal of Dairy Science* **87** 4295-4302.

**7. ESTUDO 2: AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE CROMATINA E PROTEÍNAS EM ESPERMATOZOIDES DE CARNEIROS MORADA NOVA ALIMENTADOS COM FARELO DE CASTANHA E SUAS RELAÇÕES COM PARÂMETROS SEMINAIS.**

(Este estudo será enviado para publicação no periódico Animal Reproduction Science)

**Avaliação da integridade de cromatina e proteínas em espermatozoides de carneiros Morada Nova alimentados com farelo de castanha e suas relações com parâmetros seminais.**

(Evaluation of chromatin integrity and sperm proteins from Morada Nova rams fed with cashew nut meal and theirs relations with classical seminal parameters.)

Rodrigo V. de Oliveira, Maurício F. van Tilburg, Lucas S. Fonseca, Alethéia, C.B.L. Souza; Erika S.B. Menezes, Sule Dogan, Frederico B. Moreno, Ana Cristina O. Monteiro-Moreira, Erdogan Memili, Arlindo Moura.

**Avaliação da integridade de cromatina e proteínas em espermatozoides de carneiros morada nova alimentados com farelo de castanha e suas relações com parâmetros seminais.**

**RESUMO**

O farelo de castanha caju (FCC) é uma opção nutritiva e de baixo custo para a alimentação de ovinos. Entretanto, existe uma carência de estudos avaliando seus efeitos na reprodução de carneiros. Neste contexto, a integridade da cromatina, que está associada à qualidade das proteínas espermáticas, é vital para a fertilidade dos machos. Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da inclusão de 13% de FCC na dieta de carneiros Morada Nova sobre as características seminais clássicas, integridade de cromatina e o perfil das proteínas espermáticas. Vinte carneiros foram divididos em dois grupos: grupo castanha (GCA) e grupo controle (GCO). O GCA e o GCO receberam na dieta 13% e 0% de FCC durante 90 dias. Os grupos foram comparados quanto ao peso vivo, circunferência escrotal, parâmetros seminais clássicos (volume, concentração espermática, motilidade e morfologia), integridade de cromatina pelo teste do azul de toluidina e perfil das proteínas espermáticas por meio de eletroforese unidimensional em gel de ácido acético-uréia-poliacrilamida (AU-PAGE) aos 0, 45 e 90 dias de experimento. Aos 90 dias o GCA apresentou porcentagem de espermatozoides móveis superior ao GCO (69,00% (7,38; 2,33) e 60,00% (9,43; 2,98)) ( $P<0.05$ ). Não houve efeito da dieta contendo FCC sobre a integridade da cromatina. Porém, os percentuais de outer dense fiber protein 1 (ODF1) and histone H2B type W-T-like (H2B) foram mais elevados nos carneiros do GCA ( $P<0.05$ ). As proteínas: outer dense fiber protein 1 (ODF1), phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPX4), ferritin light chain-like (FTL) e histone H2B type W-T-like foram negativamente correlacionadas com a qualidade da cromatina espermática. Em conclusão, o FCC não afetou negativamente a qualidade seminal. Contudo, o impacto das diferenças no perfil das proteínas espermáticas encontradas no GCA deve ser avaliado sobre a fertilidade dos carneiros.

**Palavras-chave:** cromatina espermática, proteínas espermáticas e farelo de castanha de caju.



**Avaliação da integridade de cromatina e proteínas em espermatozoides de carneiros Morada Nova alimentados com farelo de castanha e suas relações com parâmetros seminais.**

**ABSTRACT**

The cashew nut meal (CNM) is a nutritious and low costs option for sheep feeding. However, there is a lack of studies evaluating its effects on ram's reproduction. In this context, chromatin integrity, that is associated with the quality of sperm proteins, is vital to male fertility. Therefore, the main objectives of this work were evaluate the effects of 13% of CNM inclusion in the diet of Morada Nova rams on the classical semen parameters, chromatin integrity and sperm proteins. Twenty rams were distributed in two equal groups: cashew nut group (CNG) and control group (COG). The CNG and COG received 13% and 0% of CNM in the diet for 90 days. The groups were compared for live weight, scrotal circumference, classical seminal parameters (volume, concentration, motility and morphology), chromatin integrity by using toluidine blue test and sperm protein expression by acetic acid-urea-PAGE unidimensional electrophoresis (AU-PAGE) at 0, 45 and 90 days of the experiment. At 90 days, CNG (69.00% (7.38; 2.33)) presented percentage of motile sperm superior than control group (60,00% (9,43; 2,98)) ( $P<0.05$ ). There was not effect of the diet with CNM on chromatin integrity. But, the percentages of outer dense fiber protein 1 (ODF1) and histone H2B type W-T-like (H2B) were larger in the CNG ( $P<0.05$ ). The proteins: outer dense fiber protein 1 (ODF1), phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPX4), ferritin light chain-like (FTL ) and histone H2B type W-T-like were negatively correlated with sperm chromatin quality. In conclusion, the cashew nut meal did not affect negatively the semen quality. However, the impact of the sperm protein profile differences found in the CNG should be evaluated on the *in vivo* ram fertility.

**Keywords:** sperm chromatin, sperm proteins and cashew nut meal.

## 7.1 Introdução

A rentabilidade da produção animal é dependente da eficiência reprodutiva do rebanho. Dentre os fatores que afetam a reprodução animal a nutrição se destaca como um dos principais (Robinson et al., 2006). Considerando o gasto elevado com manejo nutricional dos criadores, existe uma demanda de alimentos com baixo custo e nutritivos para inclusão nas rações animais (Cutrim et al., 2013). Desta forma, os resíduos da agroindústria tornam-se opções viáveis de ingredientes para ração de ruminantes (Devendra e Sevilla, 2002). Nesse contexto, subprodutos da produção de castanhas podem ser utilizados como ingredientes na composição de rações animais. A castanha de caju é a terceira castanha comestível mais produzida no mundo (dados obtidos na base de dados do International Nut Council; <http://www.nutfruit.org/>) e, aquelas que chegam à indústria fora do padrão para consumo humano têm sido aproveitadas na forma de farelo de castanha de caju (FCC) para nutrição animal (Santos-Filho et al., 2005).

O FCC tem sido utilizada na alimentação de bovinos (Pimentel et al., 2012), caprinos (Okolo et al., 2012) e ovinos (Pimentel et al., 2011) mostrando ser uma fonte viável, rica em energia e proteína, para a alimentação de ruminantes. Contudo, todo alimento alternativo deve ser avaliado quanto aos possíveis efeitos na fisiologia reprodutiva dos animais, como por exemplo, na qualidade espermática dos reprodutores (Blache et al., 2008). Classicamente, as principais avaliações do sêmen ovino estão relacionadas às características físicas seminais, como volume e aspecto, e exames microscópicos dos espermatozoides, relacionados a motilidade, morfologia e concentração espermáticas, porém, recentemente novas abordagens têm sido implementadas, como testes de qualidade mitocondrial e de integridade da cromatina (Tsakmakidis, 2010).

A cromatina espermática é um fator intrínseco espermático formado pela associação do DNA com nucleoproteínas, as protaminas e as histonas, e, sua integridade é essencial para o desenvolvimento embrionário (Miller et al., 2010). As protaminas são as proteínas nucleares espermáticas mais abundantes em mamíferos, sendo responsáveis pela compactação do genoma paternal, a qual é essencial para manutenção da integridade do DNA e hidrodinâmica espermática (Oliva, 2006). As regiões do DNA espermático associadas às histonas são ricas em genes relacionados ao desenvolvimento embrionário (Steilmann et al., 2011) e tem sido consideradas como potenciais fatores epigenéticos paternos (van der Heijden et al., 2008). Desta forma, alterações destes elementos epigenéticos, relacionadas à qualidade das nucleoproteínas espermáticas, têm sido atribuídas à diminuição da fertilidade *in vitro* e *in vivo* de camundongos (Katz-Jaffe et al., 2013). Além disso, em homens subférteis com baixa qualidade seminal, as histonas estão presentes em

quantidades elevadas anormais e são associadas a falhas na compactação da cromatina (Zini et al., 2008). Contudo, existe uma carência de experimentos analisando a relação da qualidade da cromatina espermática com as proteínas espermáticas em animais de produção.

Dentre os principais testes utilizados em ovinos para avaliar a integridade da cromatina quanto à fragmentação do DNA na população espermática, podemos citar: teste de dispersão da cromatina (*Sperm Chromatin Dispersion Test*, SDF (Halomax®)) (López-Fernández et al., 2008), ensaio de estrutura da cromatina espermática (*Sperm Chromatin Structure Assay*, SCSA) (Martinez-Pastor et al., 2004), eletroforese em gel de célula única (COMET essay) (Gundogan et al., 2010), técnica de inserção de nucleotídeos biotinizados na extremidade do fragmento do genoma (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling*, TUNEL) (Mendoza et al., 2012). Entretanto, estas técnicas têm seu caráter prático limitado devido à necessidade de equipamentos custosos, como microscópios de fluorescência e/ou citômetros de fluxo, além de serem técnicas laboriosas. Como opções para exames a campo da cromatina espermática existem os testes do azul de anilina e do azul de toluidina, os quais se baseiam em simples análises colorimétricas em microscopia de campo claro (Sousa et al., 2010). As colorações a base de azul de toluidina têm a capacidade de se ligar a grupos fosfatos expostos do DNA espermático, em células com falhas na condensação da cromatina, produzindo uma coloração violeta a azul escuro (Mello, 1982). O teste de azul de toluidina tem sido utilizado para avaliação da fertilidade em humanos (Tsarev et al., 2009).

Assim como a integridade da cromatina é dependente de proteínas, outras características estruturais e funcionais dos espermatozoides também o são. A análise proteômica espermática já identificou sequências peptídicas com funções enzimáticas, transportadoras, oxido-redutivas e estruturais (Baker et al., 2008; van Tilburg et al., 2013). Em bovinos, as associações de proteínas com a morfologia e a motilidade espermáticas já foram demonstradas (Shojaei Saadi et al., 2013; Costa et al., 2012). Além disso, a fertilidade *in vivo* de touros foi relacionada a expressões superiores das proteínas adenilato quinase (AK1) e da inibidora de proteases intracelular (PEBP1) (D'amours et al., 2010).

Considerando a viabilidade econômica do farelo de castanha na alimentação de ovinos, se faz necessária uma análise dos seus possíveis efeitos na qualidade espermática de carneiros. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da alimentação de reprodutores da raça Morada Nova com farelo de castanha de caju sobre a expressão das proteínas dos espermatozoides e integridade da cromatina espermática, além disso, também foram mensuradas as associações entre a expressão das proteínas espermáticas, a integridade de cromatina e os parâmetros seminais clássicos.

## 7.2 Material e métodos

### 7.2.1 Animais e grupos experimentais

O experimento foi realizado durante o período de Outubro a Dezembro de 2013 em Fortaleza-CE (latitude 3° 44' 33'' e longitude 38° 34' 42''). Vinte carneiros da raça Morada Nova variedade vermelha com 18 meses de idade foram divididos em dois grupos, denominados grupo castanha (GCA) e grupo controle (GCO). Ambos os grupos receberam rações totais, isoproteicas e isocalóricas (Tabela 1), compostas por 50% de feno tifton e concentrado a base de milho moído, farelo de soja e minerais. Entretanto, o GCA recebeu 13% de FCC na dieta. A quantidade de ração fornecida foi diariamente ajustada tendo por base o consumo do dia anterior, visando à manutenção das sobras em torno de 10% do total fornecido, para possibilitar a ingestão voluntária e não alterar a proporção de ingredientes.

### 7.2.2 Coleta e avaliação seminal

O sêmen foi coletado semanalmente durante 90 dias por meio de eletroejaculação. O sêmen foi avaliado quanto ao volume (mL) por meio de tubo de coleta falcon graduado. A motilidade massal (1-5) foi avaliada em gota de sêmen puro sobre lâmina aquecida a 37°C em microscopia de campo claro sob aumento de 100x. Para análise da porcentagem de espermatozoides móveis (%) e vigor espermático (1-5), o sêmen foi diluído em solução fisiológica (NaCl 0,09%) e uma gota depositada entre lâmina e lamínula (37 °C) avaliada em microscopia de campo claro sob aumento de x400 (Chemineau et al., 1991). Para exame da morfologia espermática, foram confeccionados esfregaços corados com eosina nigrosina para quantificação de defeitos totais, maiores e menores na população espermática (Blom, 1983). O sêmen recebeu 1 mM de PMSF (inibidor de protease) e foi armazenado a -20 °C e posteriormente lavado duas vezes com PBS (pH=7,4) a 700 g/15 min a 4°C. Aliquotas de  $50.10^6$  de espermatozoides foram armazenadas em microtubos de 1.5mL até a extração das proteínas e avaliação da integridade de cromatina pelo corante azul de toluidina.

**Tabela 1.** Percentagem de nutrientes e ingredientes das rações totais fornecidas ao grupo castanha (GCA) e do grupo controle (GCO).

<b>Nutrientes</b>	<b>Ração GCA</b>	<b>Ração GCO</b>
Matéria Seca (%)	90,47	89,98
Nutrientes digeríveis totais (%MS)	69,50	69,41
Fibra em detergente neutro (%MS)	41,77	41,59
Proteína bruta (%MS)	16,00	16,00
Extrato etéreo (%MS)	6,51	2,58
<b>Ingredientes</b>		
Feno de tifton (%)	50,00	50,00
Milho moído (%)	18,29	28,07
Farelo de soja (%)	16,63	20,13
Farelo de castanha de caju (%)	13,00	0,00
Calcário calcítico (%)	0,41	0,80
Cloreto de sódio (%)	0,50	0,50
Fosfato bicálcico (%)	0,67	0,00
Mistura mineral comercial* (%)	0,50	0,50

\*Mistura mineral comercial (/kg de produto): P: 61g; Ca: 267g; S: 35g; Co: 20mg; Mn: 2000mg; Cu: 350mg; F: 610mg; Se: 23mg; Mg: 20g; Cr: 60mg; Mo: 500mg; Zn: 6000mg; Fe: 3000mg; I: 80mg.

### **7.2.3 Teste do azul de toluidina**

Aliquotas dos espermatozoides armazenados a -20 °C foram descongeladas a 37 °C por 1 min para confecção de esfregaços para o teste do azul de toluidina. Estes esfregaços espermáticos foram fixados em 3:1 etanol:ácido acético por 1 min e, posteriormente, em etanol a 70% por 3 min. Para então serem submetidos a imersão em solução 4M de HCl por 25 min. Ao final, foram rinsados em água destilada e secados a temperatura ambiente. Uma gota do corante azul de toluidina (0.025% azul de toluidina em tampão Mcilvaine (citrato de sódio: fosfato pH=4.0) depositada sobre o esfregaço, foi coberta com lamínula e imediatamente avaliada em microscopia de campo claro sob aumento de 1000x em objetiva de imersão. Foram analisados 500 espermatozoides por esfregaço em duplicata.

Os espermatozoides levemente corados em azul claro foram julgados normais (negativos) e aqueles corados em azul escuro à violeta foram considerados com cromatina alterada (positivos).

#### ***7.2.4 Extração das proteínas espermáticas***

O protocolo de extração das proteínas espermáticas foi realizado segundo de Yebra e Oliva (1993). As alíquotas de espermatozoides foram lavadas em solução de 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) à 4 °C por 5 min à 10.000g, duas vezes. Em seguida, os respectivos pellets de espermatozoides foram incubados em solução de 5 mM EDTA, 0.25 mM PMSF, 140 mM iodoacetato de sódio, 1,5 mM cloreto de guanidina, 145 mM DTT e 25 mM Tris (pH=8.0) por 30 min à temperatura de ambiente. Posteriormente, as amostras foram lavadas em solução de 95% de álcool etílico, à 4 °C por 15 min à 10.000g, duas vezes. Os pellets foram então incubados em solução de 0.5M HCl por 15 min à 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 4 °C por 15 min à 10.000g. O extrato foi incubado com ácido tricloroacético (TCA) por 5 min à 4 °C e o precipitado centrifugado à 10.000g por 10 min à 4 °C. O pellet foi lavado duas vezes com solução de 1% de b-mercaptoetanol em acetona pura à 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, para ao final o pellet proteico ser solubilizado em 100 µL de tampão de amostra (5.5 M ureia, 20% b-mercaptoetanol e 5% ácido acético). Para quantificação das proteínas foi utilizado o método de Bradford (1976). As amostras foram estocadas a -20 °C até a corrida eletroforética.

#### ***7.2.5 Eletroforese unidimensional nativa em gel de ácido acético-uréia-poliacrilamida (AU-PAGE)***

As proteínas foram separadas em géis de AU-PAGE (2.5 M ureia e 0.9 M ácido acético) sendo o gel de empilhamento de 7,5% e o de separação de 15% (13 cm). Realizou uma corrida para cada período de coleta (0, 45 e 90 dias), desta forma cada gel possuía as 20 amostras respectivas aos 10 carneiros do GCA e os 10 do GCO. Sessenta microgramas de proteína de cada amostra foram individualmente diluídas 1:1, em tampão de amostra contendo 50% glicerol e 2% azul de metileno e depositadas individualmente em cada poço. As corridas eletroforéticas foram realizadas à 250 V em tampão de corrida de 0.9M de ácido acético.

Após a corrida os géis foram fixados em solução aquosa de etanol à 30% e ácido fosfórico à 2% por 12 hs. Posteriormente, lavados três vezes em solução aquosa de ácido fosfórico à 2% durante 20 min. E corados em solução aquosa de ácido fosfórico à 2%, etanol à 18%, sulfato de amônio 18% e Coomassie G-250 (SIGMA-ALDRICH®, EUA) à 2% por 72 hs sob leve agitação.

### **7.2.6 Análise das bandas proteicas auxiliada por computador.**

Os géis foram descorados em água destilada e escaneados para digitalização de suas imagens no ImageScanner III® (GE Healthcare®, EUA) utilizando o programa de computador *LabScan TM* 6.0 (GE Healthcare®, EUA). Para avaliação das imagens e quantificação da densidade óptica das bandas proteicas foi utilizado o programa *Quantity One* 4.6.3. (GE Healthcare®, EUA). A expressão relativa de cada banda foi expressa como porcentagem do total de sua respectiva amostra (porcentagem relativa da banda = (intensidade da banda/intensidade total da respectiva amostra) x 100). Foram selecionadas para comparação entre os grupos apenas as bandas presentes em todos os animais.

### **7.2.7 Digestão das bandas de proteínas**

As bandas proteicas foram excisadas do gel em pedaços de 1 mm<sup>3</sup> e acondicionadas em microtubos (Eppendorf®). Em seguida os fragmentos foram lavados três vezes em 400 uL de solução de 50% de acetonitrila à 100% e 50 mM de bicarbonato de amônio (pH= 8,0) por 15 min. Após as lavagens, estes foram desidratados em 200 uL de acetonitrila à 100%, por 5 min, e então submetidos a secagem em concentrador a vácuo (Speedvac®), durante 15 min.

Os pedaços de géis desidratados foram então imersos em 100 uL de solução de 10 mM de ditiotreitol e 100 mM de bicarbonato de amônio por 30 min à 56 °C. Após a remoção da solução de DTT, adicionou-se 100 uL de solução de 50 mM de iodoacetamina e 100 mM de bicarbonato de amônio por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavados com 200 uL de 100 mM de bicarbonato de amônio por 10 min e desidratados com 200 uL de acetonitrila à 100% por 5 min, duas vezes respectivamente. Em seguida, foram novamente desidratados em concentrador a vácuo (Speedvac®), por 15 min. Os fragmentos secos foram então acondicionados em gelo, para adição da tripsina (trypsin V511, Promega®) seguindo as orientações do produto. O excesso da solução de tripsina, não absorvido pelos fragmentos, foi removido para adição de 20 uL de 50 mM bicarbonato de amônio. A digestão dos fragmentos hidratados com tripsina foi realizada durante 16 horas à 37 °C. Ao final, o excesso de solução contendo peptídeos foi removido e transferido para um novo microtubo (Eppendorf®). Posteriormente, os fragmentos foram imersos em 30 uL de ácido fórmico a 5% e acetonitrila a 50%, por 30 min, sendo esta solução combinada com os peptídeos anteriormente removidos. Este procedimento foi repetido, e cada solução de peptídeos, respectiva a cada banda, foi

submetida à secagem em concentrador a vácuo (Speedvac®) por uma hora. Por fim, as amostras desidratadas foram armazenadas à -20 °C até a análise dos espectros de massa.

### **7.2.8 Identificação das proteínas por espectrometria de massa**

Os peptídeos tripsinizados referentes a cada banda foram submetidos à cromatografia líquida, em coluna de UPLC C18, associada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS; Synapt G2 HDMS instrument (Waters Co., Milford, EUA) (van Tilburg et al., 2013). Os espectros de massa obtidos foram processados e formatados pelo programa Mascot Distiller (Matrix Science Ltd) e então submetidos à busca nas bases de dados NCBI e SwissProt por meio do programa online *MASCOT Server* em modo de pesquisa *MS/MS Ion Search* (<http://www.matrixscience.com>). Os parâmetros estabelecidos para a busca foram: até uma clivagem perdida, oxidação parcial dos resíduos de metionina, carbamidometilação total dos resíduos de cisteína, valores de massa isotópicos e tolerâncias de massa de  $\pm 0.1$  Da. As proteínas sugeridas foram validadas quando apresentaram pelo menos duas sequências peptídicas significativas, ou seja, com pontuações individuais (score) acima do limite. Posteriormente, as proteínas identificadas validadas foram pesquisadas no banco de dados *UniProt® Knowledgebase* (<http://www.uniprot.org/>) para informações gerais de ontologia gênica relacionadas a localização celular, funções moleculares e biológicas. Modelos tridimensionais das proteínas foram obtidos na base de dados de estruturas proteicas da University of California, San Francisco (<http://modbase.compbio.ucsf.edu>).

### **7.2.9. Análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dois grupos (GCA e GCO) contendo 10 repetições cada. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Systat 12 (SYSTAT Software, Inc., EUA). Os dados foram avaliados quanto a normalidade pelos testes de D'Agostino Pearson e Shapiro-Wilk. Aqueles não paramétricos foram normalizados por meio de transformações logarítmicas ou quadráticas. Os dados foram analisados pelo método *GLM for repeated measures* (ANOVA) do Systat 12®. Para análise de possíveis diferenças entre o GCA e GCO no mesmo período (0, 45 ou 90 dias) foi utilizado o teste t ( $P < 0,05$ ). E quanto a possíveis diferenças entre períodos (0, 45 ou 90 dias) no mesmo grupo (GCA ou GCO) foi utilizado o teste de Tukey. Associações entre a porcentagem de espermatozoides positivos para o teste do AT com os parâmetros espermáticos de motilidade massal (MM), porcentagem de espermatozoides móveis



(PM), vigor espermático (Vigor), defeitos totais (DEFTO), maiores (DEFMA) e menores (DEFME) foram testadas pela correlação de Pearson ( $P < 0,05$ ). E as relações entre a porcentagem relativa de cada banda eletroforética (B1, B2, B3, B4 e B5) e os parâmetros espermáticos (AT, MM, PM, Vigor, DEFTO, DEFMA e DEFME) foram examinadas pela correlação de Spearman ( $P < 0,05$ ). Os dados foram expressos em média (desvio padrão (DP); erro padrão (EP)).

### 7.3 Resultados

O peso vivo (PV) e a circunferência escrotal (CE) dos animais aumentaram ao longo do experimento independente do grupo (Tabela 2) ( $P < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas em relação ao peso vivo (PV) e circunferência escrotal (CE) dos carneiros entre GCA e GCO ao longo do experimento (Tabela 2) ( $P > 0,05$ ). Assim como, o ganho de peso médio/dia (g/dia) ao final do experimento (dados não tabelados) que também não variou entre GCA (126,9 g/dia (27,2; 8,6) e GCO (133,7 g/dia (28,5; 9,0)) (dados não-tabelados) ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 2.** Peso vivo (PV) (kg) e circunferência escrotal (CE) (cm) em carneiros Morada Nova (n=20) alimentados com ou sem farelo de castanha. Valores expressos em média (DP; EP)

	0 dias		45 dias		90 dias	
	Castanha	Controle	Castanha	Controle	Castanha	Controle
PV	35,1 (3,9; 1,2) <sup>a</sup>	35,9 (3,1; 1,0) <sup>a</sup>	41,4 (3,7; 1,2) <sup>b</sup>	41,8 (3,3; 1,1) <sup>b</sup>	47,0 (3,9; 1,2) <sup>c</sup>	48,3 (4,0; 1,3) <sup>c</sup>
CE	31,5 (2,1; 0,7) <sup>a</sup>	30,6 (0,9; 0,3) <sup>a</sup>	32,8 (2,1; 0,7) <sup>ab</sup>	31,6 (1,5; 0,5) <sup>ab</sup>	34,2 (2,4; 0,8) <sup>b</sup>	33,6 (1,4; 0,5) <sup>b</sup>

Letras minúsculas diferentes entre colunas (períodos) representam diferenças significativas entre períodos em um mesmo tratamento (castanha ou controle). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna (períodos) representam diferenças significativas entre tratamentos em um mesmo período (0, 45 ou 90 dias). ( $P > 0,05$ )

**Tabela 3.** Avaliação dos parâmetros seminais em carneiros Morada nova (n=20), alimentados com ou sem farelo de castanha. Valores expressos em média (DP; EP). ( $P < 0.05$ ).

	0 dias		45 dias		90 dias	
	Castanha	Controle	Castanha	Controle	Castanha	Controle
VL	1,8 (0,6; 0,2)	1,8 (0,4; 0,1)	1,6 (0,9; 0,3)	1,5 (0,5; 0,2)	2,0 (0,6; 0,2)	1,8 (0,5; 0,2)
CSPTZ	3,3 (1,3; 0,4)	2,8 (1,3; 0,4)	2,7 (1,2; 0,4)	3,2 (0,7; 0,2)	2,9 (1,7; 0,5)	2,4 (1,0; 0,3)
MM	4,2 (1,1; 0,3)	3,5 (1,1; 0,3)	3,5 (1,0; 0,3)	3,8 (0,6; 0,2)	3,1 (0,9; 0,3)	2,8 (0,9; 0,3)
PM	73,0 (6,8; 2,1)	65,0 (19,6; 6,2) <sup>ab</sup>	71,0 (5,7; 1,8)	77,0 (9,5; 3,0) <sup>a</sup>	69,0 (7,4; 2,3) <sup>A</sup>	60,0 (9,4; 3,0) <sup>BB</sup>
Vigor	3,7 (0,4; 0,1)	3,7 (0,6; 0,2)	3,5 (0,6; 0,2)	3,6 (0,5; 0,2)	3,5 (0,4; 0,1)	3,3 (0,4; 0,1)
DEFTO	9,7 (8,8; 2,8)	11,2 (15,5; 4,9)	14,3 (17,0; 5,4)	9,7 (17,6; 5,6)	15,9 (14,2; 4,5)	14,2 (12,0; 3,8)
DEFMA	2,4 (1,4; 0,3)	4,1 (3,3; 1,0)	3,8 (2,5; 0,8)	2,6 (2,1; 0,7)	3,2 (2,8; 0,9)	4,8 (2,8; 0,9)
DEFME	7,3 (8,6; 2,7)	7,1 (12,5; 4,0)	10,6 (16,6; 2,3)	7,1 (15,7; 9,0)	12,7 (3,9; 4,4)	9,4 (11,8; 3,7)
AT	6,6 (3,3; 1,0) <sup>a</sup>	6,1 (3,7; 1,2)	13,3 (5,6; 1,8) <sup>ab</sup>	10,3 (5,8; 1,8)	16,6 (11,0; 3,5) <sup>b</sup>	19,2 (18,0; 5,7)

Legenda: volume (mL) (VL); concentração espermática (sptz/mL) (CSPTZ); motilidade massal (1-5) (MM), porcentagem de espermatozoides móveis (%) (PM), defeitos totais (%) (DEFTO), maiores (%) (DEFMA) e menores (%) (DEFME), e, azul de toluidina (%) (AT)

Letras minúsculas diferentes entre colunas (períodos) representam diferenças significativas entre períodos em um mesmo tratamento (castanha ou controle). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna (períodos) representam diferenças significativas entre tratamentos em um mesmo período (0, 45 ou 90 dias). ( $P < 0,05$ ).

As avaliações dos parâmetros seminais e do teste de azul de toluidina (AT) não diferiram significativamente entre GCA e controle GCO (Tabela 3). Exceto para porcentagem de espermatozoides móveis (PM) aos 90 dias, que no grupo castanha apresentou 69,0% (7,4; 2,3) contra 60,0% (9,4; 3,0) do grupo controle ( $P < 0.05$ ) (Tabela 3). Adicionalmente, uma redução na PM no GCO foi observada entre os períodos de 45 (77,0% (9,5; 3,0)) e 90 dias (60,0% (9,4; 3,0)) ( $P < 0,05$ ). Embora a porcentagem de espermatozoides com cromatina anormal (positivos) no teste do AT não diferiu entre os grupos. houve uma diferença entre os períodos de 0 (6,6% (3,3; 1,0)) e 90 dias (16,6 (11,0; 3,5)) no grupo GCA ( $P < 0.05$ ).

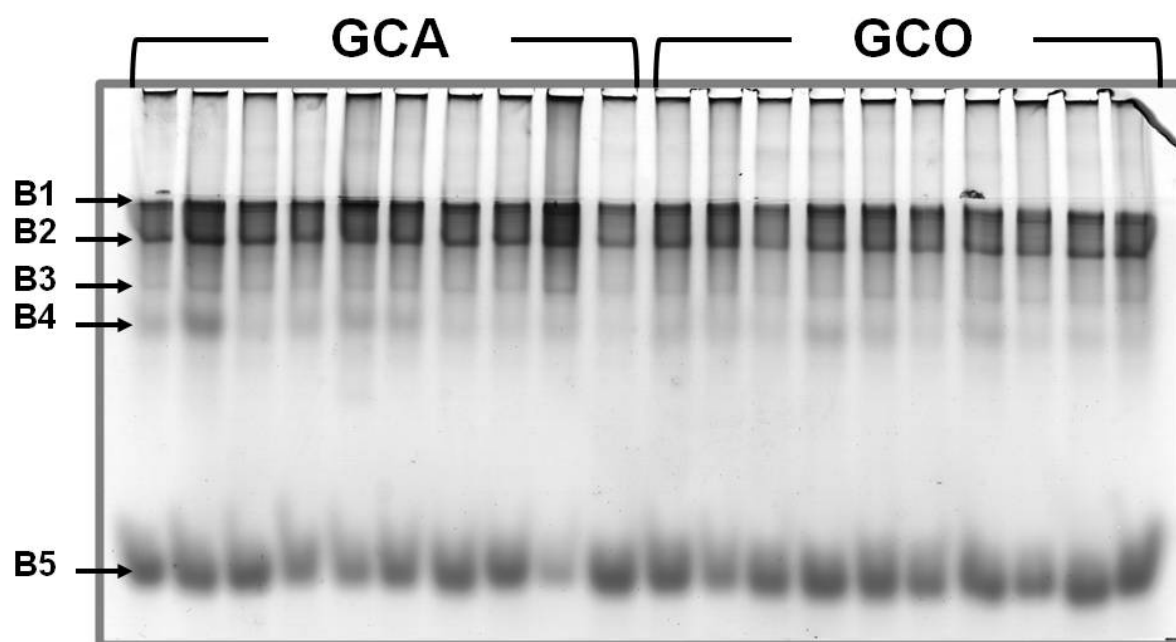
A porcentagem de espermatozoides positivos no teste do AT foi correlacionada negativamente com as notas de motilidade massal (-0,28) e positivamente com a porcentagem de defeitos totais (0,36) e menores (0,38) ( $P < 0,05$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Correlações significativas entre o teste de azul de toluidina (AT) e as avaliações espermáticas de carneiros Morada Nova (n=20).

	MM	PM	Vigor	DEFTO	DEFMA	DEFME
AT	-0,28			0,36		0,38

Legenda: motilidade massal (MM), porcentagem de espermatozoides móveis (PM), defeitos totais (DEFTO), maiores (DEFMA) e menores (DEFME) e, azul de toluidina (AT).

Durante a análise dos géis, cinco bandas de proteínas, que estavam presentes em todos os vinte animais, foram selecionadas para quantificação (B1, B2, B3, B4 e B5) (Figura 1). A expressão das nucleoproteínas espermáticas não apresentou diferença significativa entre os grupos aos 0 e 45 dias. Contudo aos 90 dias, a expressão relativa da B2 foi superior no grupo castanha (GCA: 17,0% (2,3; 0,7); GCO: 13,8% (1,0; 0,3)) ( $P < 0.05$ ) (Tabela 5). E também durante o mesmo período, a B4 apresentou superior expressão no grupo castanha (GCA: 6,7% (2,2; 0,7); GCO: 4,9% (1,2; 0,4)) ( $P < 0.05$ ) (Tabela 5).



**Figura 1.** Gel unidimensional das proteínas espermáticas de carneiros Morada Nova oriundas do grupo castanha (GCA) e controle (GCA) após 90 dias de experimento. Bandas proteicas selecionadas para análise estatística: B1, B2, B3, B4 e B5.

**Tabela 5.** Avaliação da expressão de proteínas espermáticas em carneiros Morada Nova (n=20) alimentados com ou sem farelo de castanha. Os valores expressos correspondem a média (DP; EP) das porcentagens relativas da banda em relação ao total de cada amostra (%). ( $P < 0,05$ ).

	0 dias		45 dias		90 dias	
	Castanha	Controle	Castanha	Controle	Castanha	Controle
B1	11,6 (1,2; 0,4)	11,3 (1,3; 0,4)	11,4 (1,2; 0,4)	12,0 (0,7; 0,2)	18,2 (2,2; 0,7)	17,9 (2,2; 0,7)
B2	9,0 (1,1; 0,4)	9,7 (1,1; 0,4)	10,9 (1,2; 0,4)	12,3 (0,7; 0,2)	17,0 (2,3; 0,7) <sup>A</sup>	13,8 (1,0; 0,3) <sup>B</sup>
B3	2,0 (0,6; 0,2)	2,5 (0,9; 0,3)	4,4 (1,2; 0,4)	4,8 (0,5; 0,2)	4,7 (0,2; 0,3)	5,1 (0,9; 0,3)
B4	1,3 (0,9; 0,3)	1,5 (0,7; 0,2)	9,0 (1,9; 0,6)	9,1 (1,7; 0,6)	6,7 (2,2; 0,7) <sup>A</sup>	4,9 (1,2; 0,4) <sup>B</sup>
B5	44,1 (3,7; 1,2)	41,9 (4,5; 1,4)	29,1 (1,4; 0,7)	28,5 (4,0; 1,3)	34,2 (5,8; 1,8)	37,9 (2,5; 0,8)

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna (períodos) representam diferenças significativas entre tratamentos em um mesmo período (0, 45 ou 90 dias) ( $P < 0,05$ ).

A porcentagem de espermatozoides com cromatina anormal mensurada pelo teste de AT foi correlacionada positivamente com as bandas B1 (0,34); B2 (0,51); B3 (0,40); B4 (0,25) ( $P < 0.05$ ) (Tabela 6). Adicionalmente, a B2 foi negativamente associada com a motilidade massal (-0,32) e positivamente com a porcentagem de defeitos menores (0,27) (Tabela 6). Além disso, a B3 correlacionou-se também negativamente com as avaliações do vigor da motilidade espermática (Tabela 6). Das cinco bandas digeridas para identificação, duas bandas (B1 e B5) apresentaram contaminação com Coomassie, corante utilizado para visualização das proteínas no gel, ao final da digestão impossibilitando sua utilização nas análises de espectrometria de massa. Desta forma, foram apenas passíveis de identificação as proteínas presentes nas bandas B2, B3 e B4. As proteínas identificadas nas bandas B2, B3 e B4 e suas informações de localização e, funções celulares encontram-se resumidas nas Tabelas 7 e 8. A Figura 2 ilustra a localização das quatro proteínas identificadas na célula espermática e também apresenta modelos tridimensionais obtidos nas bases de dados de modelos estruturais de proteínas da University of California (UCSF) (<http://modbase.compbio.ucsf.edu>).

**Tabela 6.** Correlações significativas entre as expressões das proteínas presentes nas bandas B1, B2, B3, B4 e B5 e as avaliações espermáticas de carneiros Morada Nova (n=20) ( $P < 0.05$ ).

	MM	PM	Vigor	DEFTO	DEFMA	DEFME	AT
B1							0,34
B2	-0,32					0,27	0,51
B3			-0,27				0,40
B4							0,25
B5							

Legenda: motilidade massal (MM), porcentagem de espermatozoides móveis (PM), defeitos totais (DEFTO), maiores (DEFMA) e menores (DEFME), e azul de toluidina (AT).

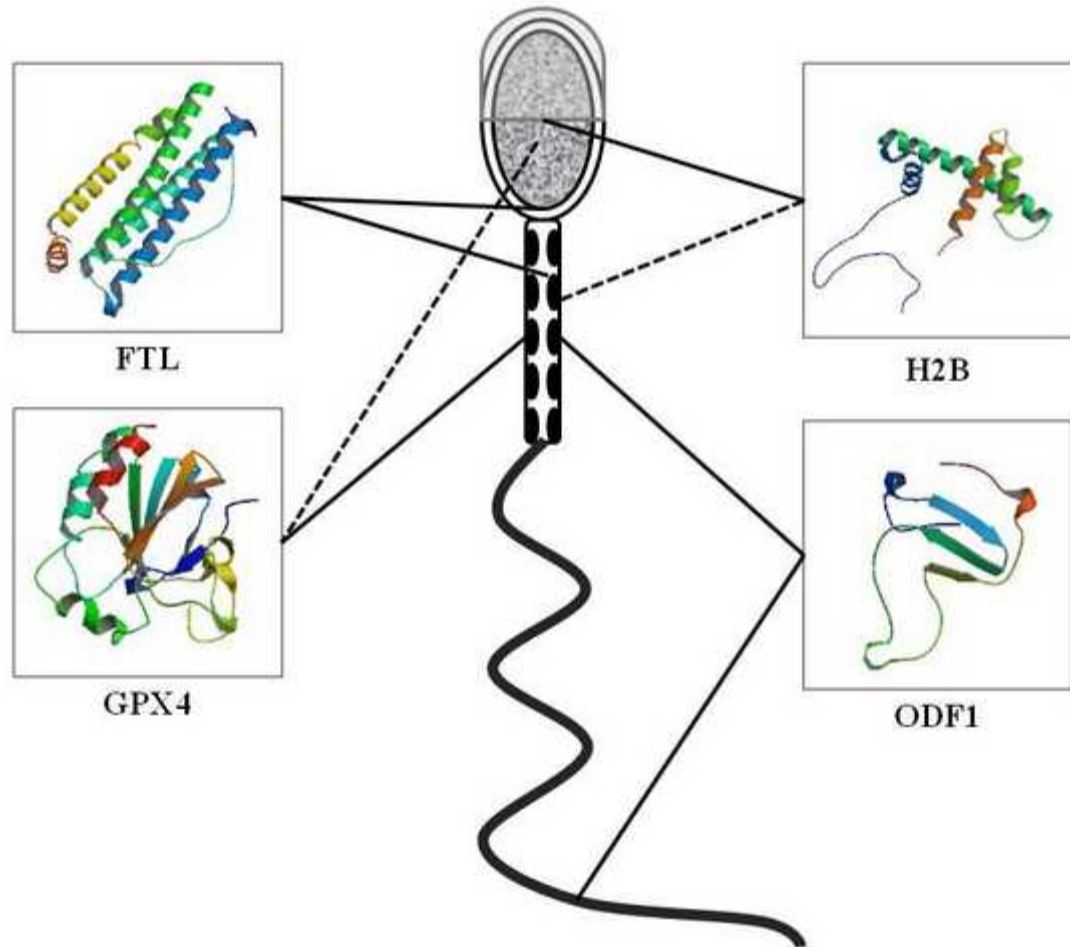
**Tabela 7.** Proteínasespermáticas identificadas (sigla) de carneiros Morada Nova, nas bandas B2, B3 e B4, por espectrometria de massas e seus números de acesso na plataforma NCBI, massas moleculares (kDa)/ pontos isoelétricos (pI), e porcentagens das sequências cobertas (cobertura) (%), pontuações, peptídeos (pontuação do íon peptídicos), relações massa/carga (m/z) e carga (z) dos íons peptídicos, respectivamente.

NCBI	kDa/pI	Cobertura (%)	Pontuação	Peptídeos (pontuação do íon peptídico)	m/z (z)
<b>B2: outer dense fiber protein 1 (ODF1)</b>					
426235768	31.34/8.42	15%	188	<sup>27</sup> CIDEL SAR <sup>34</sup> (52)	482,2322 (2)
				<sup>148</sup> VCVSAER <sup>154</sup> (27)	410,7017 (2)
				<sup>174</sup> EFSLPPCVDEK <sup>184</sup> (40)	660,8113 (2)
				<sup>185</sup> DVTYSYGLGSCVK <sup>197</sup> (69)	724,8416 (2)
<b>B3: phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial (GPX4)</b>					
426230967	24.28/9.0	30%	278	<sup>89</sup> TDVNYTQLVDLHAR <sup>102</sup> (83)	822.9203 (2)
				<sup>103</sup> YAECGLR <sup>109</sup> (42)	434.7011 (2)
				<sup>110</sup> ILAFPCNQFGR <sup>120</sup> (44)	661.8372 (2)
				<sup>121</sup> QEPGSNAEIK <sup>130</sup> (16)	536.7681 (2)
				<sup>131</sup> EFAAGYNVK <sup>139</sup> (29)	499,7511 (2)
				<sup>193</sup> YGPMEEPLVIEK <sup>204</sup> (64)	710,8557 (2)
<b>B3: ferritin light chain-like (FTL)</b>					
426246692	20.05/5.98	25%	254	<sup>93</sup> TQDAMEAALLVEK <sup>105</sup> (106)	717.8631 (2)
				<sup>106</sup> NLNQALLDLHGLASAR <sup>121</sup> (45)	569.3141 (3)
				<sup>155</sup> LAGPQAGLGEYLFER <sup>169</sup> (104)	810.9233 (2)
<b>B4: histone H2B type W-T-like (H2B)</b>					
426257815	19.15/8.61	14%	116	<sup>74</sup> QGNFSSFATYFPR <sup>86</sup> (60)	761.3621 (2)
				<sup>100</sup> ESVNVLDSFVK <sup>110</sup> (55)	618.8268 (2)

**Tabela 8.** Principais processos biológicos, localizações celulares e funções moleculares das proteínas espermáticas de carneiros Morada Nova identificadas por espectrometria de massas obtidos na base de dados Uniprot.

<b>Banda</b>	<b>Proteína</b>	<b>Sigla</b>	<b>Processo biológico</b>	<b>Localização celular principal</b>	<b>Função molecular</b>
B2	outer dense fiber protein 1	ODF1	diferenciação das espermátides	flagelo	estrutural: flagelo
B3	phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	GPX4	resposta ao estresse oxidativo	mitocôndria	enzimática: redução de peróxidos lipídicos
	ferritin light chain-like	FTL		citoplasma	ligação ao Fe enzimática: oxireductase
B4	histone H2B type W-T-like	H2B	composição do nucleossomo	núcleo	regulação: transcrição estrutural: cromatina





**Figura 2.** Localizações espermáticas e modelos tridimensionais das proteínas ferritin light chain-like (FTL), phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial (GPX4), histone H2B type W-T-like (H2B) e outer dense fiber protein 1 (ODF1). Linhas inteiras representam as localizações principais e linhas tracejadas correspondem as localizações secundárias.

## 7.4 Discussão

A nutrição pode influenciar a qualidade seminal principalmente por alterações de fatores metabólicos ou endócrinos que tenham ação no trato reprodutivo masculino (Martin et al., 2010). A principal proposta deste trabalho foi verificar se a inclusão de 13% de FCC na ração afeta a cromatina e expressão de proteínas espermáticas em carneiros da raça Morada Nova. Para tanto, a integridade da cromatina e expressão de proteínas espermáticas foram analisadas por meio do teste do azul de toluidina e pela eletroforese unidimensional, respectivamente. Esta abordagem se enquadra em um campo de pesquisa recente denominado nutriproteômica, o qual explora as interações de componentes da dieta com os proteomas (Ganesh e Hettiarachchy, 2012). A abordagem proteômica na reprodução é bastante difundida em estudos humanos e com animais de laboratório, porém em animais de produção, como pequenos ruminantes, é ainda pouco explorada.

O presente experimento teve duração de 90 dias, durante os períodos de 0, 45 e 90 dias não foram encontradas diferenças significativas entre o GCA e o GCO quanto à integridade de cromatina. Desta forma o FCC não promoveu efeitos significativos sobre as principais fontes de danos à cromatina espermática, as quais são oriundas principalmente de anormalidades espermatogênicas, apoptose e danos oxidativos (Agarwal e Said, 2003). Entretanto, aos 90 dias de experimento foram observadas maiores porcentagens relativa das bandas B2 e B4 nos carneiros alimentados com castanha.

Quanto aos parâmetros clássicos do espermiograma de ovinos, apenas a porcentagem de espermatozoides móveis, aos 90 dias, apresentou diferença significativa entre os grupos GCA (69,00 (7,38; 2,33)) e GCO (60,00 (9,43; 2,98)) ( $P < 0,05$ ). Esta ausência de efeitos negativos da castanha na qualidade seminal de carneiros também foi observada por Medeiros (2005). Durante todo o experimento também não existiram diferenças significativas entre o ganho de peso, peso vivo e a circunferência escrotal entre os grupos. Ratificando estas observações, em experimentos semelhantes, nos quais ovinos também receberam rações isoproteicas e isoenergéticas, a adição de FCC reduziu os custos das inclusões dos farelos de milho e soja na ração, sem influenciar o ganho de peso (Rodrigues et al., 2003) e a fisiologia ruminal (Pimentel et al. 2011). O teste do azul de toluidina (AT) é uma abordagem ainda pouco utilizada na avaliação de carneiros. Porém, demonstrou correlações significativas com a motilidade massal (-0.28) e as porcentagens de defeitos totais (0.36) e menores (0.38) ( $P < 0,05$ ). Os valores médios para espermatozoides positivos para o teste de AT foram superiores a média encontrada por Kamimura et al. (2010), porém estes autores também encontraram correlações positivas entre espermatozoides positivos para o AT

(cromatina anormal) e as alterações morfológicas espermáticas. Da mesma forma, correlações semelhantes foram constatadas em experimentos utilizando coelhos (Beletti e Mello, 2004) e touros (Nava-Trujillo et al, 2011). Confirmando estas observações, espermatozoides defeituosos normalmente possuem danos membranares associados ao estresse oxidativo, ou seja, o excesso de espécies oxigênio reativas em paralelo a insuficiência dos sistemas antioxidantes, promove a peroxidação lipídica (Sanocka e Kurpysz, 2004). Conseqüentemente, os hidroperóxidos lipídicos formados, quando não neutralizados por enzimas antioxidantes, podem se associar com metais gerando aldeídos que danificam a cromatina (De Bont e Van Larebeke, 2004). Adicionalmente, Hodjat et al. (2008) demonstraram em humanos a associação da ubiquitinação espermática, fenômeno molecular presente em espermatozoides defeituosos, com as anormalidades da cromatina por meio do ensaio de AT. Assim, podemos considerar que a avaliação da cromatina espermática pelo ensaio do AT é uma análise interessante para ser adicionada a avaliação de reprodutores ovinos.

O aumento das porcentagens das proteínas B1 (0,34), B2 (0,51), B3 (0,40) e B4 (0,25) foi associada à diminuição da integridade da cromatina espermática. A proteína B2 também foi correlacionada negativamente à motilidade massal (-0.32) e positivamente aos defeitos menores (0.27). Além disso, a proteína B3 foi negativamente relacionada ao vigor espermático (-0.27). Demonstrando, que este grupo de proteínas apresentou uma expressão relativa superior em ejaculados de qualidade seminal inferior.

Na banda B2, foi identificada a proteína ODF1 que constitui parte das fibras densas externas do flagelo espermático, possuindo função estrutural e de proteção a danos físicos (Baltz et al., 1990). Porém, confirmando os achados do presente estudo, em humanos a diminuição da motilidade espermática foi associada à expressão elevada anormal desta proteína (Zhao et al. 2007). Além disso, Curry et al. (2011) encontraram níveis elevados de micro RNA relacionados a ODF1 em espermatozoides suínos com defeitos morfológicos, esses achados fortalecem a hipótese de que esta proteína pode ter sua expressão anormal em populações espermáticas de baixa qualidade.

As proteínas GPX4 (também conhecida pela sigla PHGPx) e FTL estavam presentes na banda B3. A GPX4 é uma proteína fundamental para redução de peróxidos lipídicos e de hidrogênio, sendo encontrada na mitocôndria e no núcleo de espermatozoides (Imai e Nakagawa, 2003; de Mateo et al., 2011). A redução de sua atividade enzimática na população espermática tem sido observada em homens inférteis (Garrido et al., 2004). A radioterapia em ratos reduziu sua expressão nos espermatozoides, a qual foi relacionada à elevação das espécies oxigênio reativas e, conseqüente, redução da motilidade espermática (Li e Zhang et al., 2013). Em touros, a atividade

enzimática da GPX4 nos espermatozoides foi elevada nos reprodutores com qualidades superiores de motilidade e morfologia (Stradaioli et al., 2009). Quanto a FTL, esta é uma proteína envolvida no transporte e armazenamento de Fe e, conseqüentemente, redução da biodisponibilidade deste íon para formação de radicais livres, porém em suínos sua concentração testicular foi associada ao hipogonadismo (Wise et al., 2003). Adicionalmente, o nível de RNA-m de FTL foi superior em espermatozoides humanos que não alcançaram a prenhez durante tratamentos de reprodução assistida (Garcia-Herrero et al. 2011). Sugere-se que as elevações das quantidades de GPX4 e FTL nos espermatozoides estejam envolvidas na redução do estresse oxidativo, que pode ter promovido às reduções do vigor espermático e da qualidade da cromatina.

A histona H2B foi identificada na banda B4. De forma geral, a histona H2B é uma histona que estrutura o nucleossomo, juntamente com as H2A, H3 e H4, esta nucleoproteína também modula a expressão gênica por meio de modificações pós-traducionais, principalmente associadas às acetilações (Wyrick e Parra, 2009). Durante a espermiogênese, fisiologicamente, as histonas são quase totalmente substituídas pelas protaminas, sendo estas últimas responsáveis pela compacta condensação da cromatina espermática (Rousseaux et al. 2004). Contudo, a persistência exagerada de histonas afeta negativamente o adensamento cromatínico dos espermatozoides e é associada a casos de infertilidade em homens (Zhang et al., 2006). Níveis elevados da histona H2B com padrão difuso na cromatina espermática foram relacionados à redução da integridade cromatínica em homens inférteis (Zini et al., 2008).

Embora as dietas tenham sido isoproteicas e isoenergéticas, a ração contendo FCC apresentou um teor de extrato etéreo superior (6,51% contra 2,58%). Isto se deve ao teor lipídico, aproximadamente de 34%, presente no FCC, o qual é rico em ácidos graxos insaturados, como os ácidos oleico (18:1) e linoleico (18:2) (Abitogu e Borokini, 2009). A eficiência da suplementação de ácidos graxos insaturados na dieta de ruminantes depende, ou da utilização destes em forma protegida à biohidrogenação ruminal, ou do fornecimento destes em altas concentrações (Clément et al., 2012). Neste último caso, mesmo que a maior parte dos ácidos graxos insaturados sejam biohidrogenados no rúmen, uma porção segue o trânsito gastrointestinal e é absorvida intacta no intestino delgado, conseqüentemente elevando a disponibilidade sérica dos mesmos para os tecidos (Wood et al., 2008; Herrera-Camacho et al., 2011). Desta forma, dietas ricas em ácidos graxos insaturados têm sido associadas positivamente a qualidade espermática. Por exemplo, estudos demonstraram que dietas ricas em ácidos graxos insaturados afetaram positivamente a morfologia espermática em suínos (Yeste et al., 2011) e coelhos (Mourvaki et al., 2010). Especificamente, em ovinos alimentados com silagem de bagaço de azeitona este efeito benéfico na morfologia dos

espermatozoides foi associado ao aumento da porcentagem de ácidos graxos insaturados na membrana espermática (Faraji et al., 2012). Ainda que, no presente trabalho, a adição de FCC não tenha influenciado a morfologia espermática, foi observado um efeito positivo na porcentagem de espermatozoides móveis após 90 dias ( $P < 0,05$ ).

## 7.5 Conclusões e perspectivas

A inclusão do farelo de castanha em 13% da ração de carneiros da raça Morada Nova não alterou negativamente a qualidade seminal e integridade da cromatina espermática, porém, promoveu uma expressão diferenciada de proteínas espermáticas. Embora a integridade da cromatina não tenha sido afetada, as diferenças na expressão das proteínas espermáticas demandam novas investigações. Para tanto, estudos eletroforéticos bidimensionais e imunocitoquímicos poderão demonstrar alterações pós-traducionais e regionais destas proteínas na população espermática causadas por dietas contendo FCC. Adicionalmente, o impacto da alimentação com FCC sobre a fertilidade *in vitro* e *in vivo* de carneiros também deve receber atenção. Por fim, ressalta-se que os conhecimentos gerados com pesquisas de nutriproteômica associados à reprodução animal irão formar uma nova base para a manipulação da eficiência reprodutiva.

## 7.6 Referências bibliográficas

- ABITOGU, A.; BOROKINI, F.B. Physicochemical parameters and fatty acid composition of cashew nut oil. **Journal of Research in National Development**, v.7, n.2, p.21-27, 2009.
- AGARWAL, A.; SAID, T. M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 4, p. 331-345, 2003.
- BALTZ, J. M.; WILLIAMS, P. O.; CONE, R. A. Dense fibers protect mammalian sperm against damage. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 3, p. 485-491, September 1, 1990 1990.
- BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v. 62, n. 3-4, p. 398-402, Aug 2004.
- BLACHE, D.; MALONEY, S. K.; REVELL, D. K. Use and limitations of alternative feed resources to sustain and improve reproductive performance in sheep and goats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, n. 1-3, p. 140-157, 2008.

BLOM, E. Pathological conditions in genital organs and sperm as a cause for the rejection of breeding bulls for import into and export from Denmark (an andrologic retrospective, 1958-1982). v. 35, n. 3, p. 105-130, 1983.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

CHANG, Y. M. et al. Effects of trait definition on genetic parameter estimates and sire evaluation for clinical mastitis with threshold models. **Animal Science**, v. 79, p. 355-363, 2004.

CHEMINEAU, P., CAGNIE, Y., GUERIN, Y., et al. Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991, 222p.

CLÉMENT, C.; WITSCHI, U.; KREUZER, M. The potential influence of plant-based feed supplements on sperm quantity and quality in livestock: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 132, n. 1-2, p. 1-10, 2012.

CURRY, E.; SAFRANSKI, T. J.; PRATT, S. L. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1532-1539, 2011.

CUTRIM, D. et al. Replacement levels of elephant grass by moist pineapple by-product silage in diets of Santa Inês crossbred sheep: performance and digestibility. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 2, p. 585-592, 2013.

DE BONT, R.; VAN LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**, v. 19, n. 3, p. 169-185, May 1, 2004 2004.

DE YEBRA L & OLIVA R 1993 Rapid Analysis of Mammalian Sperm Nuclear Proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 209, p. 201-203.

DEVENDRA, C.; SEVILLA, C. C. Availability and use of feed resources in crop-animal systems in Asia. **Agricultural Systems**, v. 71, n. 1-2, p. 59-73, 2002.

FARAJI, Z. et al. Effect of feeding olive-pulp silage on the seminal characteristics and fatty acid profile of the sperm plasma membrane in Iranian fat-tailed sheep. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1-3, p. 216-221, 2012.

GANESH, V.; HETTIARACHCHY, N. S. Nutriproteomics: A promising tool to link diet and diseases in nutritional research. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 10, p. 1107-1117, 2012.

GARCÍA-HERRERO, S. et al. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 22, n. 1, p. 25-36, 2011.

GARCIA-MACIAS, V. et al. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. **Int J Androl**, v. 30, n. 2, p. 88-98, Apr 2007.

GARRIDO, N. et al. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 82, Supplement 3, n. 0, p. 1059-1066, 2004.

GUNDOGAN, M. et al. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 200-207, 2010.

HERRERA-CAMACHO, J. et al. Effect of Fatty Acids on Reproductive Performance of Ruminants. In: MANAFI, M. (Ed.). *Artificial Insemination in Farm Animals*. Rijeka: InTech, 2011, p.217-242.

HODJAT, M. et al. Increased sperm ubiquitination correlates with abnormal chromatin integrity. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 17, n. 3, p. 324-330, 2008.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 2, p. 145-169, 2003.

KAMIMURA, C. D. F.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Alterações de cromatina em espermatozoides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado de acridina. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 212-219, 2010.

KATZ-JAFFE, M. G. et al. Aging sperm negatively impacts in vivo and in vitro reproduction: a longitudinal murine study. **Fertility and Sterility**, v. 100, p.262-268, 2013.

LI, H. Y.; ZHANG, H. Proteome analysis for profiling infertility markers in male mouse sperm after carbon ion radiation. **Toxicology**, v. 306, n. 0, p. 85-92, 2013.

- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C. et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: III. Ram. **Theriogenology**, v. 70, n. 6, p. 898-908, 2008.
- MARTIN, G. B. et al. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. **Animal**, v. 4, n. 07, p. 1214-1226, 2010.
- MARTINEZ-PASTOR, F. et al. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1-2, p. 121-133, 2004.
- MEDEIROS, MN. Efeito de dietas com e sem inclusão de farelo de castanha de caju sobre o consumo de matéria seca e parâmetros seminais de ovinos adultos. 2005. 56p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, UFC, Fortaleza, 2005.
- MELLO, M. L. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v. 74, n. 3, p. 387-92, 1982.
- MENDOZA, N. et al. Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 880, n. 0, p. 74-81, 2012.
- MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 287-301, February 1, 2010 2010.
- MOURVAKI, E. et al. Effects of flaxseed dietary supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 629-637, 2010.
- NAVA-TRUJILLO, H. et al. Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 24, p. 116-122, 2011.
- OKOLO, F.A.; OCHEJA, J.O.; LALABE, B.C.; EJIGA, P.A. Digestibility, performance and bio-economics of growing west african dwarf goats fed diets containing graded levels of cashew nut shell. **Int'l journal of agric. and rural dev**, v.15, n. 12, p. 1000-1007, 2012.
- OLIVA, R. Protamines and male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 4, p. 417-435, July 1, 2006 2006.



PEDDINTI, D. et al. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BMC Systems Biology** v. 2, n. 19, 2008.

PIMENTEL, P. G. et al. Intake, apparent nutrient digestibility and ingestive behavior of sheep fed cashew nut meal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1128-1133, 2011.

PIMENTEL, P. G. et al. Parâmetros da fermentação ruminal e concentração de derivados de purina de vacas em lactação alimentadas com castanha de caju. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 959-966, 2012.

ROBINSON, J. J. et al. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3-4, p. 259-276, 2006.

RODRIGUES, M. D. M. et al. Utilização do farelo de castanha de caju na terminação de ovinos em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 240-248, 2003.

ROUSSEAU, S. et al. Organisation nucléaire du spermatozoïde. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 32, n. 9, p. 785-791, 2004.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 1, p. 12, 2004.

SANTOS-FILHO, J. M. et al. Effect of cashew nut supplemented diet, castration, and time of storage on fatty acid composition and cholesterol content of goat meat. **Small Ruminant Research**, v. 57, n. 1, p. 51-56, 2005.

SOUSA, A.P.; SANTOS, J.R.; SANTOS, T.A. The Significance of sperm chromatin integrity in male fertility. *Acta Urológica*, v. 27, p. 37-47, 2010.

STEILMANN, C. et al. Presence of histone H3 acetylated at lysine 9 in male germ cells and its distribution pattern in the genome of human spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 8, p. 997-1011, 2011.

STRADAIOLI, G. et al. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for semen quality analysis. **Theriogenology**, v. 72, n. 1, p. 91-98, 2009.

TSAKMAKIDIS, I. A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. **Small Ruminant Research**, v. 92, n. 1-3, p. 126-130, 2010.

- TSAREV, I. et al. Evaluation of male fertility potential by Toluidine Blue test for sperm chromatin structure assessment. **Hum Reprod**, v. 24, n. 7, p. 1569-74, 2009.
- UNIPROT, C. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D71-5, Jan 2012.
- VAN DER HEIJDEN, G. et al. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. **BMC Developmental Biology**, v. 8, n. 1, p. 34, 2008.
- VAN TILBURG, M. F. et al. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, v. 79, n. 9, p. 1247-1261, 2013.
- WISE, T. et al. Relationships of testicular iron and ferritin concentrations with testicular weight and sperm production in boars. **Journal of Animal Sciences**, v. 81, n. 2, p. 503-11, Feb 2003.
- WOOD, J. D. et al. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. **Meat Science**, v. 78, n. 4, p. 343-358, 2008
- WYRICK, J. J.; PARRA, M. A. The role of histone H2A and H2B post-translational modifications in transcription: A genomic perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1789, n. 1, p. 37-44, 2009.
- YESTE, M. et al. The effects on boar sperm quality of dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids differ among porcine breeds. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 184-196, 2011.
- ZHANG, X.; SAN GABRIEL, M.; ZINI, A. Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. **J Androl**, v. 27, n. 3, p. 414-20, May-Jun 2006.
- ZHAO, C. et al. Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 2, p. 436-438, 2007.
- ZINI, A.; ZHANG, X.; GABRIEL, M. S. Sperm nuclear histone H2B: correlation with sperm DNA denaturation and DNA stainability. **Asian J Androl**, v. 10, n. 6, p. 865-871, 2008.

## 8. CONCLUSÕES GERAIS

- A integridade da cromatina espermática está associada à qualidade espermática em carneiros e a fertilidade em touros.
- A inclusão de 13% de farelo de castanha de caju na dieta de carneiros afeta a expressão de proteínas espermáticas, porém, não interfere na qualidade cromatínica espermática.

## 9. PERSPECTIVAS

- Incluir a avaliação da integridade da cromatina, por meio de técnicas simples baseadas em avaliações microscópicas de esfregaços corados no exame andrológico de ruminantes para o estabelecimento dos limites desejados nas espécies domésticas.
- Estudar a expressão individual de histonas nucleares e suas modificações pós-traducionais na população espermática de touros com diferentes índices de fertilidade.
- Pesquisar os mecanismos biológicos pelos quais a alimentação de ruminantes com dietas ricas em farelo de castanha de caju altera a expressão proteica espermática.
- Investigar os efeitos da inclusão de farelo de castanha de caju na alimentação de reprodutores sobre a fertilidade *in vivo* de ruminantes.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABITOGU, A.; BOROKINI, F.B. Physicochemical parameters and fatty acid composition of cashew nut oil. **Journal of Research in National Development**, v.7, n.2, p.21-27, 2009.

ADEEL, M. et al. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1220-1225, 2009.

AGARWAL, A.; SAID, T. M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 4, p. 331-345, 2003.

AITKEN, R. J.; VERNET, P. Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 53, p. 109-18, 1998.

ALETOR, O.; J.O. AGBEDE, S.A. ADEYEYE; V.A. ALETOR. Chemical and physio-chemical characterization of the flours and oils from whole and rejected cashew nuts cultivated in Southwest Nigeria. **Pak. J. Nutr.**, v.6, p. 89-93, 2007.

AL-GHALBAN, A. M.; TABBAA, M. J.; KRIDLI, R. T. Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks. **Small Ruminant Research**, v. 53, n. 1-2, p. 141-149, 2004.

ALMEIDA, A. M. et al. Scrotal, testicular and semen characteristics of young Boer bucks fed winter veld hay: The effect of nutritional supplementation. **Small Ruminant Research**, v. 73, n. 1-3, p. 216-220, 2007.

ALMODIN, C. G. et al. A bovine protocol for training professionals in preimplantation genetic diagnosis using polymerase chain reaction. **Fertility and Sterility**, v. 84, n. 4, p. 895-899, 2005.

ANDREETTA, A. M.; STOCKERT, J. C.; BARRERA, C. A simple method to detect sperm chromatin abnormalities: cytochemical mechanism and possible value in predicting semen quality in assisted reproductive procedures. **Int J Androl**, v. 18 Suppl 1, p. 23-8, Jun 1995.

AUGER, J. et al. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. **International Journal of Andrology**, v. 13, n. 6, p. 452-462, 1990.

BALL, B. A. et al. Activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of angiotensin II on sperm motility. **Theriogenology**, v. 59, n. 3–4, p. 901-914, 2003.

BALTZ, J. M.; WILLIAMS, P. O.; CONE, R. A. Dense fibers protect mammalian sperm against damage. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 3, p. 485-491, September 1, 1990 1990.

BARTH, A. D.; BRITO, L. F. C.; KASTELIC, J. P. The effect of nutrition on sexual development of bulls. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 485-494, 2008.

BATHGATE, R. Functional integrity of sex-sorted, frozen-thawed boar sperm and its potential for artificial insemination. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1234-1241, 2008.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v. 62, n. 3-4, p. 398-402, Aug 2004.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz. J. Morphol. Sci.** v. 22, n. 2, p.85-90, 2005.

BESERRA et al. Modificação na qualidade da carne caprina secundária a alterações no manejo animal. **Rev. Bras. Promoç. Saúde**, v. 20, n. 1, p. 33-39, 2007.

BIELLI, A. et al. Nutritional management during fetal and postnatal life, and the influence on testicular stereology and Sertoli cell numbers in Corriedale ram lambs. **Small Ruminant Research**, v. 40, n. 1, p. 63-71, 2001.

BLACHE, D.; MALONEY, S. K.; REVELL, D. K. Use and limitations of alternative feed resources to sustain and improve reproductive performance in sheep and goats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, n. 1–3, p. 140-157, 2008.

BLASCHEK, M.; KAYA, A.; ZWALD, N.; MEMILI, E.; KIRKPATRICK, B.W. A whole-genome association analysis of noncompensatory fertility in Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 94 p.4695-4699, 2011.

BLOM, E. Pathological conditions in genital organs and sperm as a cause for the rejection of breeding bulls for import into and export from Denmark (an andrologic retrospective, 1958-1982). v. 35, n. 3, p. 105-130, 1983.

- BOCHENEK, M.; SMORA, G. Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 557-567, 2001.
- BOE-HANSEN, G. B. et al. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1789-1802, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.
- BRASIL, AF. Efeito da Adição de Castanha de Caju na Dieta sobre a Atividade Reprodutiva no Pós-parto de Vacas Leiteiras Criadas no Semi-Árido. 2003. 57p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, UECE, Fortaleza, 2003.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr Rev**, v. 56, n. 11, p. 317-33, Nov 1998.
- BRITO, L. F. C. et al. Effect of improved nutrition during calfhoo on serum metabolic hormones, gonadotropins, and testosterone concentrations, and on testicular development in bulls. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, n. 4, p. 460-469, 2007.
- BRYKCZYNSKA, U. et al. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. **Nat Struct Mol Biol**, v. 17, n. 6, p. 679-687, 2010.
- BYRNE, K. et al. Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. **PROTEOMICS**, v. 12, n. 23-24, p. 3559-79, 2012.
- CARRELL, D. T.; EMERY, B. R.; HAMMOUD, S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? **Human Reproduction Update**, v. 13, n. 3, p. 313-327, May 1, 2007 2007.
- CASAS, I. et al. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 940-950, 2010.
- CASCONE, A. et al. Destabilization of the Outer and Inner Mitochondrial Membranes by Core and Linker Histones. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35357, 2012.
- CESARI, A. et al. Potato aspartic proteases (StAPs) exert cytotoxic activity on bovine and human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 88, n. 4, Supplement, p. 1248-1255, 2007.

CHACON, J.; PEREZ, E.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermiogramme parameters of extensively reared Brahman (*Bos indicus*) bulls in the tropics. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 41-50, Jul 1 2002.

CHANG, Y. M. et al. Effects of trait definition on genetic parameter estimates and sire evaluation for clinical mastitis with threshold models. **Animal Science**, v. 79, p. 355-363, 2004.

CHEMINEAU, P., CAGNIE, Y., GUERIN, Y., et al. Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991, 222p.

CHEN, C. Y.; BLUMBERG, J. B. Phytochemical composition of nuts. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 17 Suppl 1, p. 329-32, 2008.

CHICH, J.-F. A mini review: proteomic analysis, a post-genomic approach. **Lait**, v. 81, n. 1-2, p. 13-18, 2001.

CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; BONNET, M. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 3-22, 2005.

CHIOCCARELLI, T. et al. Cannabinoid receptor 1 influences chromatin remodeling in mouse spermatids by affecting content of transition protein 2 mRNA and histone displacement. **Endocrinology**, v. 151, n. 10, p. 5017-29, Oct 2010.

CHIOU, S.-H.; WU, S.-H. Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology. **Analytica Chimica Acta**, v. 383, n. 1-2, p. 47-60, 1999.

CHOI, Y.-S. et al. Shot-gun proteomic analysis of mitochondrial D-loop DNA binding proteins: identification of mitochondrial histones. **Mol Biosyst**, v. 7, n. 5, p. 1523-1536, 2011.

CHU, D. S. et al. Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors. **Nature**, v. 443, n. 7107, p. 101-105, 2006.

CLÉMENT, C.; WITSCHI, U.; KREUZER, M. The potential influence of plant-based feed supplements on sperm quantity and quality in livestock: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 132, n. 1-2, p. 1-10, 2012.

- CONNER, S.G.; BARRAT, C.R.L. Genomic and proteomic approaches to defining sperm production and function. In: DE JONGE, C.J.; BARRAT, C.R.L. *The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University: United Kingdom Press, 2006, p. 49-71.
- 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, n. 5, p. 721-31, Oct 1 1997.
- COSTA, D. S.; THUNDATHIL, J. C. Characterization and activity of angiotensin-converting enzyme in Holstein semen. **Animal Reproduction Science**, v. 133, n. 1-2, p. 35-42, 2012.
- COULTER, G. H.; COOK, R. B.; KASTELIC, J. P. Effects of dietary energy on scrotal surface temperature, seminal quality, and sperm production in young beef bulls. **J Anim Sci**, v. 75, n. 4, p. 1048-52, Apr 1997.
- CURRY, E.; SAFRANSKI, T. J.; PRATT, S. L. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1532-1539, 2011.
- CUTRIM, D. et al. Replacement levels of elephant grass by moist pineapple by-product silage in diets of Santa Inês crossbred sheep: performance and digestibility. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 2, p. 585-592, 2013.
- D'OCCHIO, M. J.; HENGSTBERGER, K. J.; JOHNSTON, S. D. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Animal Reproduction Science**, v. 101, n. 1-2, p. 1-17, 2007.
- DADOUNE, J.-P. The nuclear status of human sperm cells. **Micron**, v. 26, n. 4, p. 323-345, 1995.
- DADOUNE, J. P.; MAYAUX, M. J.; GUIHARD-MOSCATO, M. L. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. **Andrologia**, v. 20, n. 3, p. 211-7, 1988.
- DADOUNE, J.-P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 56-75, 2003.
- DANA, N.; TEGEGNE, A.; SHENKORU, T. Feed intake, sperm output and seminal characteristics of Ethiopian highland sheep supplemented with different levels of leucaena (*Leucaena leucocephala*) leaf hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 3-4, p. 239-249, 2000.



DE BONT, R.; VAN LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**, v. 19, n. 3, p. 169-185, May 1, 2004 2004.

DE LAMIRANDE, E.; SAN GABRIEL, M. C.; ZINI, A. HUMAN SPERM CHROMATIN UNDERGOES PHYSIOLOGICAL REMODELING DURING IN VITRO CAPACITATION AND ACROSOME REACTION. **J Androl**, p. jandrol.111.015982, March 8, 2012 2012.

DE MATEO, S. et al. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. **PROTEOMICS**, v. 11, n. 13, p. 2714-2726, 2011.

DE YEBRA L & OLIVA R 1993 Rapid Analysis of Mammalian Sperm Nuclear Proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 209, p. 201-203.

DEJARNETTE, J. M. et al. Sustaining the Fertility of Artificially Inseminated Dairy Cattle: The Role of the Artificial Insemination Industry. **Journal of Dairy Science**, v. 87, Supplement, n. 0, p. E93-E104, 2004.

DEVENDRA, C.; SEVILLA, C. C. Availability and use of feed resources in crop–animal systems in Asia. **Agricultural Systems**, v. 71, n. 1–2, p. 59-73, 2002.

DIAS, G. M. et al. Nuclear status of immature and mature stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 354-365, 2006.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212-217, April 14, 2006 2006.

DORUS, S. et al. Sperm proteomics reveals intensified selection on mouse sperm membrane and acrosome genes. **Mol Biol Evol**, v. 27, n. 6, p. 1235-46, 2010.

DORUS, S.; SKERGET, S.; KARR, T. L. Proteomic discovery of diverse immunity molecules in mammalian spermatozoa. **Syst Biol Reprod Med**, v. 58, n. 4, p. 218-28, 2012.

EDDY, E. M. Chapter 1 - The Spermatozoon. In: JIMMY, D. N.;PH.D, *et al* (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. St Louis: Academic Press, 2006. p.3-54.

ENCISO, M. et al. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 23-32, 2011.

ERENPREISA, J. et al. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. **Cytometry A**, v. 52, n. 1, p. 19-27, Mar 2003.

ESKENAZI, B. et al. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. **Human reproduction**, v. 20, n. 4, p. 1006-1012, 2005.

ESMAEILI, V. et al. Saturated, omega-6 and omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen-thawed semen and blood parameters in rams. **Andrologia**, p. n/a-n/a, 2012.

EVANS, T. J. Diminished Reproductive Performance and Selected Toxicants in Forages and Grains. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n. 2, p. 345-371, 2011.

EVENSON, D. P. et al. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. **Reproductive Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 115-125, 1991.

EVENSON, D. P.; THOMPSON, L.; JOST, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 637-651, 1994.

EVENSON, D. P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 979-991, 2006.

EXBRAYAT, J-M. Histochemical and cytochemical methods of visualization. In: Exbrayat, J-M. (Ed.). Histochemical methods. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2013, p.62-136.

FAGIOLI, M. Relação entre a condutividade elétrica de sementes e a emergência de plântulas de milho em campo. 1997. 74f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 1997.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Statistical Databases: FAOSTAT. FAO. 2011. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

FARAJI, Z. et al. Effect of feeding olive-pulp silage on the seminal characteristics and fatty acid profile of the sperm plasma membrane in Iranian fat-tailed sheep. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1-3, p. 216-221, 2012.

FELIPE-PÉREZ, Y. E. et al. Cytoskeletal proteins F-actin and  $\beta$ -dystrobrevin are altered by the cryopreservation process in bull sperm. **Cryobiology**, v. 64, n. 2, p. 103-109, 2012.

FERNANDES, C.C.L. Desenvolvimento in vitro de oócitos oriundos de cabras alimentadas com diferentes níveis de lipídios. 2012. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, UECE, Fortaleza, 2012.

FERNANDEZ, J. L. et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. **J Androl**, v. 24, n. 1, p. 59-66, 2003.

FISCHLE, W. et al. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. **Genes Dev**, v. 17, n. 15, p. 1870-81, Aug 1 2003.

FLORES, E. et al. Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm. **Theriogenology**, v. 69, n. 9, p. 1083-1094, 2008.

FLORES, E. et al. Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1450-1464, 2011.

FORESTA, C. et al. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. **International Journal of Andrology**, v. 15, n. 4, p. 330-337, 1992.

FOURIE, P. J. et al. Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. **Small Ruminant Research**, v. 54, n. 1-2, p. 53-59, 2004.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J. (ed.). **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Churchill Livingstone: Madrid, 1998, p. 197-219.

FRANKEN, D. R. et al. Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. **Andrologia**, v. 31, n. 6, p. 361-6, Dec 1999.

FREITAS, E.R. et al. Farelo de castanha de caju em rações para frangos de corte. **Pesq. agropec. bras.**, v. 41, n. 6, 2006.

FUENTES-MASCORRO, G.; SERRANO, H.; ROSADO, A. Sperm chromatin. **Arch Androl**, v. 45, n. 3, p. 215-25, 2000.

GAMBOA, S.; RAMALHO-SANTOS, J. SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. **Theriogenology**, v. 64, n. 2, p. 275-291, 2005.

GANESH, V.; HETTIARACHCHY, N. S. Nutriproteomics: A promising tool to link diet and diseases in nutritional research. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 10, p. 1107-1117, 2012.

GARCÍA-HERRERO, S. et al. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 22, n. 1, p. 25-36, 2011.

GARCÍA-MACÍAS, V. et al. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. **International Journal of Andrology**, v. 30, n. 2, p. 88-98, 2007.

GARRIDO, N. et al. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 82, Supplement 3, n. 0, p. 1059-1066, 2004.

GATEWOOD, J. M. et al. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. **J Biol Chem**, v. 265, n. 33, p. 20662-6, 1990.

GHOLAMI, H. et al. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1548-1558, 2010.

GILL-SHARMA, M. K. et al. Putative molecular mechanism underlying sperm chromatin remodelling is regulated by reproductive hormones. **Clin Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 23, Dec 17 2012.

GORCZYCA, W.; GONG, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. **Cancer Res**, v. 53, n. 8, p. 1945-51, 1993.

GORG, A. et al. 2-DE with IPGs. **Electrophoresis**, v. 30, p. 122-32, 2009.

GOVINDARAJU, A. et al. Delivering value from sperm proteomics for fertility. **Cell Tissue Res**, v. 349, n. 3, p. 783-93, Sep 2012.

GROSSE-COOSMANN, F.; BOEHM, A.; SICKMANN, A. Efficient analysis and extraction of MS/MS result data from Mascot™ result files. **BMC Bioinformatics**, v. 6, n. 1, p. 290, 2005.

GUNDOGAN, M. et al. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3–4, p. 200-207, 2010.

HALES, B. F. et al. Epigenetic programming: From gametes to blastocyst. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 91, n. 8, p. 652-665, 2011.

HAMMADEH, M. E. et al. Andrology: The effect of chromatin condensation (Aniline Blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. **Human Reproduction**, v. 11, n. 11, p. 2468-2471, November 1, 1996 1996.

HAMMADEH, M. E. et al. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. **Arch Androl**, v. 46, n. 2, p. 99-104, Mar-Apr 2001.

HAMMOUD, S. S. et al. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. **Human Reproduction**, v. 26, n. 9, p. 2558-2569, September 1, 2011 2011.

HAMMOUD, S. S. et al. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. **Nature**, v. 460, n. 7254, p. 473-478, 2009.

HAZZOURI, M. et al. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. **Eur J Cell Biol**, v. 79, n. 12, p. 950-60, 2000.

HERNÁNDEZ-OCHOA, I. et al. Spermatozoa nucleus takes up lead during the epididymal maturation altering chromatin condensation. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 2, p. 171-178, 2006.

HERRERA-CAMACHO, J. et al. Effect of Fatty Acids on Reproductive Performance of Ruminants. In: MANAFI, M. (Ed.). Artificial Insemination in Farm Animals. Rijeka: InTech, 2011, p.217-242.

HINGST, O.; BLOTTNER, S.; FRANZ, C. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. **Andrologia**, v. 27, n. 5, p. 275-9, Sep-Oct 1995.

HODJAT, M. et al. Increased sperm ubiquitination correlates with abnormal chromatin integrity. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 17, n. 3, p. 324-330, 2008.

- HUANG, J. Y. J. et al. High survival and hatching rates following vitrification of embryos at blastocyst stage: a bovine model study. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 14, n. 4, p. 464-470, 2007.
- HUANG, S. Y. et al. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. **Animal Reproduction Science**, v. 63, n. 3-4, p. 231-240, 2000.
- HUBER, L. A. Is proteomics heading in the wrong direction? **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 1, p. 74-80, 2003.
- HUTCHINSON, T. E. et al. Phospholipase-C sensitive GPI-anchored proteins of goat sperm: possible role in sperm protection. **Animal Reproduction Science**, v. 88, n. 3-4, p. 271-286, 2005.
- IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 2, p. 145-169, 2003.
- JANUSKAUSKAS, A. et al. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in sweden. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 641-658, 1999.
- JENKINS, T. G.; CARRELL, D. T. The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. **Reproduction**, v. 143, n. 6, p. 727-734, 2012.
- JOHNSON, D. T. et al. Tissue heterogeneity of the mammalian mitochondrial proteome. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 292, n. 2, p. C689-C697, February 1, 2007 2007.
- KAMIMURA, C. D. F.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Alterações de cromatina em espermatozoides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado de acridina. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 212-219, 2010.
- KASIMANICKAM, V. R. et al. Associations of adiponectin and fertility estimates in Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 766-777.e3, 2013.
- KATZ-JAFFE, M. G. et al. Aging sperm negatively impacts in vivo and in vitro reproduction: a longitudinal murine study. **Fertility and Sterility**, v. 100, p.262-268, 2013.

KAZEROONI, T. et al. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. **J Assist Reprod Genet**, v. 26, n. 11-12, p. 591-6, Nov-Dec 2009.

KHALIFA, T. A. A. et al. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2-4, p. 143-163, 2008.

KLEIMAN, S. E. et al. Histone H4 acetylation and AZFc involvement in germ cells of specimens of impaired spermatogenesis. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 6, p. 1728-1736, 2008.

KOVAC, J. R.; PASTUSZAK, A. W.; LAMB, D. J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertil Steril**, v. 99, n. 4, p. 998-1007, 2013.

KUMAR, N. et al. Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (*Bos indicus* x *Bos taurus*) bulls. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 46, n. 6, p. 663-675, 2006.

KUTSYI, M. P. Histones induce the release of apoptogenic factors from liver mitochondria. **Biology Bulletin**, v. 36, n. 4, p. 328-332, 2009.

LANDRY, D.; CLOUTIER, F.; MARTIN, L. J. Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. **Reproductive Biology**, v. 13, n. 1, p. 1-14, 2013.

LECHNIAK, D.; PERS-KAMCZYC, E.; PAWLAK, P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. **Reproductive Biology**, v. 8, n. 1, p. 23-42, 2008.

LI, Y. et al. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. **Asian J Androl**, v. 10, n. 4, p. 535-541, 2008.

LI, H. Y.; ZHANG, H. Proteome analysis for profiling infertility markers in male mouse sperm after carbon ion radiation. **Toxicology**, v. 306, n. 0, p. 85-92, 2013.

LIPPOLIS, J. D.; REINHARDT, T. A. Utility, limitations, and promise of proteomics in animal science. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 138, n. 4, p. 241-51, 2010.

LOMAX, J. Get ready to GO! A biologist's guide to the Gene Ontology. **Briefings in Bioinformatics**, v. 6, n. 3, p. 298-304, September 1, 2005 2005.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C. et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: III. Ram. **Theriogenology**, v. 70, n. 6, p. 898-908, 2008.

MACHATY, Z.; PEIPPO, J.; PETER, A. Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 937-950, 2012.

MACPHEE, D. J. Methodological considerations for improving Western blot analysis. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 61, n. 2, p. 171-7, 2010.

MAHMOUD, G. B.; ABDEL-RAHEEM, S. M.; HUSSEIN, H. A. Effect of combination of vitamin E and selenium injections on reproductive performance and blood parameters of Ossimi rams. **Small Ruminant Research**, (*in press*).

MARCELLO, M. R. et al. Lack of Tyrosylprotein Sulfotransferase-2 Activity Results in Altered Sperm-Egg Interactions and Loss of ADAM3 and ADAM6 in Epididymal Sperm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13060-13070, 2011.

MARENGO, S. R. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1-2, p. 52-63, 2008.

MARTIN, G. B. et al. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. **Animal**, v. 4, n. 07, p. 1214-1226, 2010.

MARTIN, G. B.; WALKDEN-BROWN, S. W. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 49, p. 437-49, 1995.

MARTINEZ-PASTOR, F. et al. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1-2, p. 121-133, 2004.

MCGARVEY, P.; HUANG, H.; WU, C. H. Chapter 10 - Protein bioinformatics. In: KÁROLY, V.; ANDRÁS, T., *et al* (Ed.). **Medical Applications of Mass Spectrometry**. Amsterdam: Elsevier, 2008. p.203-222.

MEDEIROS, MN. Efeito de dietas com e sem inclusão de farelo de castanha de caju sobre o consumo de matéria seca e parâmetros seminais de ovinos adultos. 2005. 56p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, UFC, Fortaleza, 2005.

MEIRELLES, F. V. et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, n. 0, p. 13-20, 2004.



- MEISTRICH, M. L. et al. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. **Chromosoma**, v. 111, n. 8, p. 483-8, 2003.
- MELLO, M. L. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v. 74, n. 3, p. 387-92, 1982.
- MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v. 8, n. 1, p. 87-96, Feb 2000.
- MENDOZA, N. et al. Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 880, n. 0, p. 74-81, 2012.
- MEYER-FICCA, M. L. et al. Poly(ADP-ribose) metabolism is essential for proper nucleoprotein exchange during mouse spermiogenesis. **Biol Reprod**, v. 84, n. 2, p. 218-28, Feb 2011.
- MEYER-FICCA, M. L. et al. Disruption of poly(ADP-ribose) homeostasis affects spermiogenesis and sperm chromatin integrity in mice. **Biol Reprod**, v. 81, n. 1, p. 46-55, Jul 2009.
- MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 287-301, 2010.
- MITO, Y.; HENIKOFF, J. G.; HENIKOFF, S. Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. **Nat Genet**, v. 37, n. 10, p. 1090-1097, 2005.
- MOORE, K.; THATCHER, W. W. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. **J Dairy Sci**, v. 89, n. 4, p. 1254-66, Apr 2006.
- MOTOISHI, M.; GOTO, K.; TOMITA, K.; OOKUTSU, S.; NAKANISHI, Y. Decondensation of Bull and Human Sperm Nuclei by Dithiothreitol and/or Heparin. **Jornal of Reproduction and Development**, v. 42, p. 7-13, 1996.
- MOURA, A. A. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3-4, p. 169-188, 2007.
- MOURA, A. A. et al. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 2006-2020, 2010.

- MOURVAKI, E. et al. Effects of flaxseed dietary supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 629-637, 2010.
- MUKHOPADHYAY, C. S. et al. Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. **Livestock Science**, v. 136, n. 2–3, p. 114-121, 2011.
- NAIR, K. P. P. 2 - Cashew Nut (*Anacardium occidentale* L.). In: (Ed.). **The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World**. London: Elsevier, 2010. p.21-66. ISBN 978-0-12-384677-8.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.49-85.
- NASCIMENTO, E. N. D. et al. Nutrient intake and quantitative aspects of carcass of finishing sheep fed with diets containing cashew nut meal. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, p. 1099-1111, 2012.
- NAVA-TRUJILLO, H. et al. Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 24, p. 116-122, 2011.
- OEHNINGER, S. et al. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, n. 1–2, p. 3-10, 2000.
- OKOLO, F.A.; OCHEJA, J.O.; LALABE, B.C.; EJIGA, P.A. Digestibility, performance and bio-economics of growing west african dwarf goats fed diets containing graded levels of cashew nut shell. **Int'l journal of agric. and rural dev**, v.15, n. 12, p. 1000-1007, 2012.
- OLIVA, R. Protamines and male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 4, p. 417-435, July 1, 2006 2006.
- OLIVEIRA, L. Z. et al. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science**, v. 137, n. 3–4, p. 145-155, 2013.
- PANFOLI, I. et al. A blue dive: from 'blue fingers' to 'blue silver'. A comparative overview of staining methods for in-gel proteomics. **Expert Rev Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 627-34, 2012.

- PARADOWSKA, A. S. et al. Genome wide identification of promoter binding sites for H4K12ac in human sperm and its relevance for early embryonic development. **Epigenetics**, v. 7, n. 9, p. 1057-70, 2012.
- PAVLOPOULOU, A.; MICHALOPOULOS, I. State-of-the-art bioinformatics protein structure prediction tools (Review). **Int J Mol Med**, v. 28, n. 3, p. 295-310, 2011.
- PEDDINTI, D. et al. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BMC Systems Biology**, v. 2, n. 1, p. 19, 2008.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, n. 7, p. 597-612, 2006.
- PIMENTEL, P. G. et al. Intake, apparent nutrient digestibility and ingestive behavior of sheep fed cashew nut meal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1128-1133, 2011.
- PIMENTEL, P. G. et al. Parâmetros da fermentação ruminal e concentração de derivados de purina de vacas em lactação alimentadas com castanha de caju. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 959-966, 2012.
- PRIGENT, C.; DIMITROV, S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 18, p. 3677-3685, September 15, 2003 2003.
- PUGLISI, R. et al. The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo. **Animal Reproduction Science**, v. 132, n. 1-2, p. 17-28, 2012.
- RAJENDER, S.; AVERY, K.; AGARWAL, A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 727, n. 3, p. 62-71, 2011.
- REKWOT, P. I. et al. The effect of protein intake on body weight, scrotal circumference and semen production of Bunaji bulls and their Friesian crosses in Nigeria. **Animal Reproduction Science**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 1988.
- RIGHETTI, P. G. Electrophoresis: the march of pennies, the march of dimes. **J Chromatogr A**, v. 1079, n. 1-2, p. 24-40, 2005.
- ROBAIRE, B.; HINTON, B.T.; ORGEBIN-CRIST, M-C. The Epididymis. In: NEIL, J.D. (Ed). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. New York: Elsevier, 2006, p.1071-1148

- ROBINSON, J. J. et al. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3–4, p. 259-276, 2006.
- RODRIGUES, M. D. M. et al. Utilização do farelo de castanha de caju na terminação de ovinos em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 240-248, 2003.
- RONCOLETTA, M. et al. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. **Animal Reproduction Science**, v. 91, n. 1–2, p. 77-87, 2006.
- ROUSSEAU, S. et al. Organisation nucléaire du spermatozoïde. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 32, n. 9, p. 785-791, 2004.
- ROUSSEAU, S. et al. Spermiogenèse : l'acétylation des histones déclenche la reprogrammation du génome mâle. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 37, n. 6, p. 519-522, 2009.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4 406-425, 1987.
- SANOCCA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 1, p. 12, 2004.
- SANTIAGO-MORENO, J. et al. Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. **Poult Sci**, v. 88, n. 12, p. 2661-2669, 2009.
- SANTOS-FILHO, J. M. et al. Effect of cashew nut supplemented diet, castration, and time of storage on fatty acid composition and cholesterol content of goat meat. **Small Ruminant Research**, v. 57, n. 1, p. 51-56, 2005.
- SATI, L.; HUSZAR, G. Methodology of Aniline Blue Staining of Chromatin and the Assessment of the Associated Nuclear and Cytoplasmic Attributes in Human Sperm. In: CARRELL, D. T. e ASTON, K. I. (Ed.). **Spermatogenesis**: Humana Press, v.927, 2013. cap. 36, p.425-436.
- SELVARAJU, S. et al. Effect of dietary energy on seminal plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I), serum IGF-I and testosterone levels, semen quality and fertility in adult rams. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 646-655, 2012.
- SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nat Protoc**, v. 1, n. 6, p. 2856-60, 2006.

- SHI, L.-G. et al. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2–4, p. 248-254, 2010.
- SHOJAEI SAADI, H. A. et al. Proteins associated with critical sperm functions and sperm head shape are differentially expressed in morphologically abnormal bovine sperm induced by scrotal insulation. **Journal of Proteomics**, v. 82, n. 0, p. 64-80, 2013.
- SHOKRI, S. et al. Combination of running exercise and high dose of anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate, increases protamine deficiency and DNA damage in rat spermatozoa. **Andrologia**, p. n/a-n/a, 2013.
- SILVA et al. Comportamento ingestivo de cordeiros alimentados com dietas contendo a inclusão de farelo de castanha de caju. **Revista FZVA**, v. 18, n. 1, p. 165-181, 2011.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 958-978, 2006.
- SIMON, L. et al. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 23, n. 6, p. 724-734, 2011.
- SIMON, L.; CARRELL, D. T. Sperm DNA damage measured by comet assay. **Methods Mol Biol**, v. 927, p. 137-46, 2013.
- SMITH, O. B.; AKINBAMIJO, O. O. Micronutrients and reproduction in farm animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, n. 0, p. 549-560, 2000.
- SOLDI, M.; BONALDI, T. The Proteomic Investigation of Chromatin Functional Domains Reveals Novel Synergisms among Distinct Heterochromatin Components. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 3, p. 764-780, March 1, 2013 2013.
- SONNACK, V. et al. Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. **Andrologia**, v. 34, n. 6, p. 384-90, 2002.
- SOUSA, A.P.; SANTOS, J.R.; SANTOS, T.A. The Significance of sperm chromatin integrity in male fertility. *Acta Urológica*, v. 27, p. 37-47, 2010.
- SOUZA, C. E. et al. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **J Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4436-56, Jul 19 2012.

STEGER, K. et al. Effect of Vasectomy on Sperm Nuclear Chromatin Condensation in the Rabbit. **J Androl**, v. 26, n. 2, p. 289-295, March 1, 2005 2005.

STEGER, K. et al. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. **Mol Hum Reprod**, v. 4, n. 10, p. 939-45, 1998.

STEILMANN, C. et al. Presence of histone H3 acetylated at lysine 9 in male germ cells and its distribution pattern in the genome of human spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 8, p. 997-1011, 2011.

STRADAIOLI, G. et al. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1249-1255, 2007.

STRADAIOLI, G. et al. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for semen quality analysis. **Theriogenology**, v. 72, n. 1, p. 91-98, 2009.

STRUHL, K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. **Genes Dev**, v. 12, n. 5, p. 599-606, Mar 1 1998.

SUAREZ, S. S.; PACEY, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 1, p. 23-37, 2006.

SUH, T. K.; SCHENK, J. L.; SEIDEL JR, G. E. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. **Theriogenology**, v. 64, n. 5, p. 1035-1048, 2005.

SULLIVAN, T. M. et al. Dietary manipulation of Bos indicus heifers during gestation affects the prepubertal reproductive development of their bull calves. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2-4, p. 131-139, 2010.

SWAYNE, B. G. et al. Investigating the effects of dietary folic acid on sperm count, DNA damage and mutation in Balb/c mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 737, n. 1-2, p. 1-7, 2012.

TALEBI, A. R. et al. Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. **Andrologia**, v. 44, n. 1, p. 462-70, 2012.

TOVICH, P. R.; OKO, R. J. Somatic Histones Are Components of the Perinuclear Theca in Bovine Spermatozoa. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 34, p. 32431-32438, August 22, 2003 2003.

- TSAKMAKIDIS, I. A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. **Small Ruminant Research**, v. 92, n. 1–3, p. 126-130, 2010.
- TSAREV, I. et al. Evaluation of male fertility potential by Toluidine Blue test for sperm chromatin structure assessment. **Hum Reprod**, v. 24, n. 7, p. 1569-74, 2009.
- TUFARELLI, V. et al. Influence of feeding level on live body weight and semen characteristics of Sardinian rams reared under intensive conditions. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 2, p. 339-345, 2011/02/01 2011.
- UNIPROT, C. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D71-5, Jan 2012.
- VAN DER HEIJDEN, G. W. et al. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. **Developmental Biology**, v. 298, n. 2, p. 458-469, 2006.
- VAN DER HEIJDEN, G. et al. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. **BMC Developmental Biology**, v. 8, n. 1, p. 34, 2008.
- VAN SOOM, A. et al. Gamete origin in relation to early embryo development. **Theriogenology**, v. 68, Supplement 1, n. 0, p. S131-S137, 2007.
- VAN TILBURG, M. F. et al. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, v. 79, n. 9, p. 1247-1261, 2013.
- VIEYTES, A. L.; CISALE, H. O.; FERRARI, M. R. Relationship between the nuclear morphology of the sperm of 10 bulls and their fertility. **Vet Rec**, v. 163, n. 21, p. 625-629, 2008.
- WATANABE, Y. et al. In vitro evaluation of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent for ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 5258-5267, 2010.
- WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 2, p. 190-201, August 1, 2007 2007.
- WISE, T. et al. Relationships of testicular iron and ferritin concentrations with testicular weight and sperm production in boars. **Journal of Animal Sciences**, v. 81, n. 2, p. 503-11, Feb 2003.
- WOOD, J. D. et al. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. **Meat Science**, v. 78, n. 4, p. 343-358, 2008

WYRICK, J. J.; PARRA, M. A. The role of histone H2A and H2B post-translational modifications in transcription: A genomic perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1789, n. 1, p. 37-44, 2009.

YESTE, M. et al. The effects on boar sperm quality of dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids differ among porcine breeds. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 184-196, 2011.

ZHANG, X.; SAN GABRIEL, M.; ZINI, A. Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. **J Androl**, v. 27, n. 3, p. 414-20, May-Jun 2006.

ZHAO, C. et al. Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 2, p. 436-438, 2007.

ZINI, A.; ZHANG, X.; GABRIEL, M. S. Sperm nuclear histone H2B: correlation with sperm DNA denaturation and DNA stainability. **Asian J Androl**, v. 10, n. 6, p. 865-871, 2008.

ZWALD, N.R.; WEIGEL, K.A.; CHANG, Y.M.; WELPER, R.D.; CLAY, J.S. Genetic selection for health traits using producer-recorded data. I. Incidence rates, heritability estimates, and sire breeding values. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p.4287-42942004a.

ZWALD, N.R.; WEIGEL, K.A.; CHANG, Y.M.; WELPER, R.D.; CLAY, J.S. Genetic selection for health traits using producer-recorded data. II. Genetic correlations, disease probabilities, and relationships with existing traits. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.4295-4302, 2004b.