



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

TACIANE ALVES DA SILVA

ASPECTOS REPRODUTIVOS E PRODUTIVOS DE CARNEIROS
DA RAÇA MORADA NOVA SUBMETIDOS A NÍVEIS
CRESCENTES DE SUPLEMENTAÇÃO CONCENTRADA

FORTALEZA

2015

TACIANE ALVES DA SILVA

**ASPECTOS REPRODUTIVOS E PRODUTIVOS DE CARNEIROS
DA RAÇA MORADA NOVA SUBMETIDOS A NÍVEIS
CRESCENTES DE SUPLEMENTAÇÃO CONCENTRADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia. Área de concentração: Reprodução Animal.

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

Coorientador: Dr. Maurício Fraga van Tilburg

FORTALEZA

2015

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

-
- S584a Silva, Taciane Alves da.
Aspectos reprodutivos e produtivos de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação concentrada / Taciane Alves da Silva. – 2015.
74 f.: il., color. enc.; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Mestrado em Zootecnia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Produção e Melhoramento Animal.
- Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.
Coorientação: Dr. Mauricio Fraga Van Tilburg.
1. Eletroforese. 2. Sêmen. 3. Nutrição animal. I. Título.

CDD 636.08

TACIANE ALVES DA SILVA

**ASPECTOS REPRODUTIVOS E PRODUTIVOS DE CARNEIROS
DA RAÇA MORADA NOVA SUBMETIDOS A NÍVEIS
CRESCENTES DE SUPLEMENTAÇÃO CONCENTRADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia. Área de concentração: Reprodução Animal.

Aprovada em 09/02/2015.

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

Coorientador: Dr. Maurício Fraga van Tilburg

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Maurício Fraga van Tilburg (Coorientador)

Universidade Federal do Ceará (UECE)



Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)



Dra. Paula Rodriguez Villamil

Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe Francisca Dagmar (In memoriam).

Aos meus avós, Aguiar e Expedita (In memoriam).

Aos meus lindos irmãos Robson, Tatiana e Natiele.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças para seguir em frente e correr atrás de meus objetivos.

À minha mãe, que sempre será minha musa inspiradora, meu exemplo de força e de garra.

Aos meus irmãos, obrigado por todo o amor que vocês sempre me deram, amo vocês.

À Universidade Federal do Ceará, por atuar de forma ímpar na minha formação, desde a graduação e no mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura, obrigado por ter me dado à oportunidade de aprender junto à sua equipe de trabalho no laboratório. Muito obrigado por todos os ensinamentos e por sempre estar disposto a me ajudar.

Ao meu coorientador Dr. Maurício Fraga van Tilburg, pelo profissional e pessoa encantadora que é. Obrigado por todos os conselhos, ensinamentos, ajuda e amizade durante todo o trabalho. Obrigado por me arrancar sorrisos mesmo nos dias em que eu não estava muito bem.

À CAPES pela bolsa de estudo, que foi essencial para que eu pudesse me manter nessa jornada.

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, à coordenação e todos os professores, pelos ensinamentos que foram passados.

Aos participantes da banca examinadora, principalmente ao Dr. Rodrigo Vasconcelos e a Dra. Paula Rodriguez pelas valiosas sugestões e colaborações.

Aos meus familiares, tios, tias, primos, a toda a família de sangue e de coração, muito obrigada pelo apoio.

A Solange, companheira de laboratório, uma amiga que se tornou muito importante nessa caminhada, obrigado pela ajuda de sempre.

A toda a equipe do Laboratório de Fisiologia Animal da UFC, os que já fizeram parte e os que ainda fazem parte da equipe. Obrigado por tornar o dia-a-dia de trabalho mais leve.

Ao Prof. Dr. Magno José Duarte Cândido e aos doutorandos Alano Luna e Elayne Cristina pela parceria do trabalho. Obrigado, eu aprendi muito com vocês.

Aos pós-graduandos e amigos que fizeram parte da minha vida durante esses dois anos, em especial, Aline Moreira, Kassia, Rebeca, Rafaela, Leane, Weiber, Gilson, Thaís, Andres, obrigado por existirem.

A todos os amigos dentro e fora da universidade, muito obrigada.

Por fim, o meu sincero e eterno agradecimento, a todos os animais que fizeram parte da minha vida e a todos que ainda passarão por ela.

*“A verdadeira descoberta não consiste em buscar
novas paisagens, mas em ter novos olhos.”*

- Marcel Proust -

RESUMO

O estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes níveis de suplementação concentrada sobre o peso corporal, parâmetros seminais, medidas de biometria testicular, perfil proteico do plasma seminal e perfil proteico do músculo *Longissimus dorsi* de carneiros da raça Morada Nova. Foram utilizados 22 carneiros com sete meses de idade. Os tratamentos consistiam em diferentes níveis de concentrado (0%, 0,6%, 1,2% e 1,8% do peso corporal do animal com base na matéria seca). Os animais foram mantidos em sistema de pastejo rotacionado em pasto de capim Aruana (*Panicum maximum*). As amostras de sêmen foram coletadas por eletroejaculação ao final do experimento, quando os animais obtiveram 10 meses de idade. Após o abate, os testículos e o músculo *Longissimus dorsi* foram coletados. Os testículos foram mensurados e as proteínas seminais e musculares foram analisadas por meio de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. Os mapas proteicos foram analisados por meio do aplicativo PDQuest, version 8.0; Bio Rad, USA. Houve diferença significativa no peso corporal e na expressão dos *spots* proteicos do músculo *Longissimus dorsi* ($P < 0,05$), porém não houve diferença significativa para os parâmetros seminais, biometria testicular e para a expressão de proteínas do plasma seminal. Os *spots* diferencialmente expressos ($P < 0,05$) foram digeridos com tripsina e submetidos à identificação por espectrometria de massa (ESI-Q-TOF). Conclui-se, portanto, que os níveis de concentrado fornecido aos animais alteram o peso corporal e a expressão de proteínas do músculo *Longissimus dorsi*, porém não influenciam as medidas de biometria testicular, os parâmetros seminais e a expressão de proteínas do plasma seminal.

Palavras-chave: Dieta, eletroforese 2-D, *Longissimus dorsi*, plasma seminal, proteína.

ABSTRACT

The study was conducted in order to evaluate the effects of different levels of concentrated supplementation on body weight, seminal parameters, testicular biometry measurements, protein profile of seminal plasma and protein profile of the *Longissimus dorsi* muscle of the breed of sheep Morada Nova. 22 seven months old sheep were used. The treatments consisted in different levels of concentrated (0%, 0.6%, 1.2% and 1.8% of the animals' body weight based on dry matter). The animals were kept under a rotational grazing system, on Aruana grass (*Panicum maximum*). The semen samples were collected through electroejaculation at the end of the experiment, when the animals reached the age of 10 months. After slaughtering, the testicles and the muscle *Longissimus dorsi* were collected. The testicles were measured and the seminal and muscle proteins were analyzed through two-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gel. The proteic maps were analyzed using the PDQuest application, version 8.0; Bio Rad, USA. There were significant differences over body weight and over the expression of the proteic spots of the muscle ($P < 0.05$), but there was no significant difference for the seminal parameters, testicular biometry and the expression of seminal plasma proteins. The spots differentially expressed ($P < 0.05$) were digested with trypsin and subjected to identification through mass spectrometry (ESI-Q-TOF). It is concluded, therefore, that the levels of concentrated provided to the animals change the body weight and influence the expression of the *Longissimus dorsi* muscle proteins, but do not modify the testicular biometry, the seminal parameters and the expression of seminal plasma proteins.

Keywords: Diet, electrophoresis 2-D, *Longissimus dorsi*, seminal plasma, protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Eletroforese 2-D das proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação com ração concentrada na dieta.....40
- Figura 2.** Eletroforese 2-D das proteínas do músculo *Longissimus dorsi* de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação com ração concentrada na dieta.....41
- Figura 3.** Intensidade das proteínas do músculo *Longissimus dorsi* que diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos.....42
- Figura 4.** Redes de interação interproteica das proteínas: Miosina de cadeia leve (MYL1), Tropomiosina α -1 (TPM1), Proteína do choque térmico β -1 (HSPB1), Precursor de albumina (ALB), Fosfoglucomutase-1 (PGM1), Triosefosfatoisomerase (TPI1) e Creatina quinase tipo-M (CKM), obtidas com base no banco de dados STRING, mostrando as interações no modo evidência.....43
- Figura 5.** Redes de interação interproteica das proteínas que foram diferencialmente expressas no músculo *Longissimus dorsi*, obtidas com base no banco de dados STRING, mostrando as interações no modo evidência (A) Miosina de cadeia leve (MYL1), (B) Tropomiosina α -1 (TPM1), (C) Precursor de albumina (ALB), (D) Creatina quinase tipo-M (CKM), (E) Proteína do choque térmico β -1 (HSPB1), (F) Triosefosfatoisomerase (TPI1) e (G) Fosfoglucomutase-1 (PGM1).....44-47

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Composição da ração concentrada fornecida aos animais experimentais com base na matéria natural.....29
- Tabela 2.** Valores de média e erro padrão do peso corporal de carneiros Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação com ração concentrada, no final do experimento.....37
- Tabela 3.** Valores de média e erro padrão dos parâmetros seminais de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação com ração concentrada na dieta.....38
- Tabela 4.** Valores de média e erro padrão das medidas de biometria testicular de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação com ração concentrada na dieta.....39
- Tabela 5.** Identificação das proteínas que diferiram significativamente no músculo *Longissimus dorsi* de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação com ração concentrada. Os *spots* numerados referem-se aos *spots* mostrados na Figura 2.....72-74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
CE	Circunferência escrotal
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-propano-sulfonato
Cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
Da	Daltons
DT	Defeitos totais
DTT	Ditiotreitól
H	Horas
kDa	KiloDaltons
Kg	Kilograma
Km	Kilometro
LH	Hormônio Luteinizante
M	Molar
mA	Miliamperes
mL	Mililitro
Mm	Milimetro
mm ³	Milimetro cúbico
mM	MiliMolar
MS	Matéria seca
µg	Micrograma
µL	Microlitro
MOT	Motilidade
Nm	Nanômetro
PC	Peso corporal
pH	Potencial hidrogeniônico
pkl	Peak list files
NRC	National Research Council
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Vh	Volt hora

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Parâmetros seminais e medidas de biometria testicular	18
2.2. Proteínas do plasma seminal	19
2.3. Proteínas do músculo <i>Longissimus dorsi</i>	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Localização do experimento e grupos experimentais	29
3.2. Coleta e processamento do sêmen	30
3.3. Parâmetros seminais e biometria testicular	30
3.4. Coleta e extração das proteínas do músculo <i>Longissimus dorsi</i>	30
3.5. Quantificação da concentração de proteína total no plasma seminal e do músculo <i>Longissimus dorsi</i>	31
3.6. Eletroforese bidimensional	31
3.7. Eletroforese bidimensional das proteínas do músculo <i>Longissimus dorsi</i>	33
3.8. Digitalização e análises dos géis do plasma seminal	34
3.9. Digitalização e análises dos géis de músculo <i>Longissimus dorsi</i>	34
3.10. Análise estatística	34
3.11. Digestão das proteínas	34
3.12. Espectrometria de massa – (ESI-Q-TOF) (<i>Eletrospray ionization-quadrupole-time of flight</i>)	35
3.13. Pesquisa em banco de dados	36
3.14. Análise das redes de interação das proteínas	36

4. RESULTADOS	37
4.1. Peso corporal, parâmetros seminais e biometria testicular	37
4.2. Eletroforese bidimensional das proteínas do plasma seminal	39
4.3. Eletroforese bidimensional e Esi-Q-ToF das proteínas do músculo <i>Longissimus dorsi</i>	40
4.4. Interação proteína-proteína	43
5. DISCUSSÃO	48
5.1. Peso Corporal	48
5.2. Parâmetros seminais e biometria testicular	48
5.3. Eletroforese 2-D das proteínas do plasma seminal	51
5.4. Eletroforese 2-D, Esi-Q-ToF e interação das proteínas do músculo <i>Longissimus dorsi</i>	51
6. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

O aumento mundial no interesse pela ovinocultura pode ser comprovado através do número de pesquisas realizadas nos últimos anos com estes animais, inclusive no Brasil. Dentre estes, destacam-se os interesses por aspectos nutricionais, uma vez que o ajuste no sistema alimentar pode apresentar melhora em aspectos reprodutivos como qualidade seminal e em aspectos produtivos como a qualidade da carne.

Dentre as raças nativas do nordeste brasileiro destaca-se a raça Morada Nova que é uma das principais raças de ovinos deslanados criados na região. A raça apresenta animais de pequeno porte, elevado valor adaptativo para as condições de produção do semiárido nordestino, sendo capaz de apresentar elevadas taxas de fertilidade, mesmo sob condições pouco favoráveis. Portanto, a raça Morada Nova se constitui em material genético de extrema importância para o produtor rural do Nordeste Brasileiro (ARAÚJO FILHO et al., 2010). Para que ocorra maior viabilidade da raça é necessário que a produção seja técnica e economicamente viável, propiciando ao animal condições de exteriorizar o desempenho de suas potencialidades, podendo alcançar melhores resultados produtivos e reprodutivos.

Um dos problemas no sistema alimentar de ovinos é a sazonalidade na oferta de forragens que torna os animais bastante vulneráveis a deficiência alimentar. A suplementação surge, portanto, para regular a oferta de alimento e aumentar o rendimento animal, pois o aumento na quantidade de suplemento resulta em menor contribuição da pastagem, pois, dependendo do tipo de suplemento, há elevação da capacidade de suporte do pasto (Euclides, 2002). Dessa forma, a suplementação contribui no aumento do ganho de peso do animal por área, não comprometendo a estrutura do pasto.

Os nutrientes existentes na dieta influenciam nas concentrações circulantes de hormônios e metabolitos que são requeridos para o sucesso de processos reprodutivos específicos como a puberdade (DA SILVA et al., 2001; MILLER ET al., 2007) e viabilidade do espermatozoide (OYEYEMI, 2006) e influenciam também, direta ou indiretamente, a qualidade do principal produto da ovinocultura de corte que é a carne. Alterações na composição físico-químico e nos aspectos sensoriais são cada vez mais

frequentes e podem causar impactos positivos, nos casos de diferenciação de produtos, ou negativos quando incorporam características não desejáveis aos produtos.

Resultados favoráveis na suplementação concentrada de cordeiros terminados a pasto, quanto ao desempenho e as características da carcaça, têm sido relatados (GARCIA, et al., 2003; BORTON et al., 2005). Porém, seria interessante conhecer o ponto ótimo de fornecimento de suplemento, considerando a resposta em qualidade do sêmen e qualidade de carne.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de níveis crescentes de suplementação concentrada sobre os parâmetros seminais e biometria testicular, perfil proteico do plasma seminal e perfil proteico do músculo *Longissimus dorsi* de carneiros da raça Morada Nova.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Parâmetros seminais e medidas de biometria testicular

O objetivo da avaliação seminal é conhecer o número de células estrutural e funcionalmente normais relacionados com a capacidade fecundante do sêmen (PEÑA, 1997). Entretanto, nenhum teste, isoladamente, é capaz de prever a fertilidade de um ejaculado, mas a combinação de vários testes pode ser utilizada para selecionar ejaculados com maior potencial de fertilidade (HAFEZ e HAFEZ, 2003). Deste modo, têm-se buscado identificar animais capazes de produzir ejaculados com um maior número de espermatozoides morfolologicamente normais, dotados de motilidade progressiva e aptos a executar a fertilização (GARCIA, 2006).

Normalmente, o volume seminal está em torno de 1,0 mL, o aspecto de leitoso à cremoso e a coloração de branco à pérola (CBRA, 1998). O sêmen deve apresentar aspecto variando de leitoso a cremoso, estando relacionado à concentração espermática (CBRA, 1998). O aspecto do sêmen constitui-se em importante parâmetro na determinação diagnóstica de algumas patologias do aparelho reprodutor, haja vista que alterações desta característica correspondem à presença de elementos estranhos como sangue, pus e urina que, por sua vez, afetam a viabilidade dos espermatozoides (SORRIBAS, 1995).

O exame do turbilhamento avalia o movimento em forma de ondas em uma gota de sêmen puro sob lâmina, em um microscópio sob aumento de 100-200x. A motilidade (%) representa a proporção de células espermáticas com motilidade e, é avaliada em um gota de sêmen diluído sob uma lâmina coberta com lamínula (37°C) em um microscópio, sob aumento de 100-400x.

A avaliação da motilidade pode ser realizada de forma subjetiva, utilizando microscópio ou, de forma mais acurada, através de programas de computação (SOUZA, 2003; SILVA et al., 2003). A força do movimento espermático, conhecida como vigor (1-5), é quantificada em conjunto com a motilidade.

A concentração espermática corresponde ao número de espermatozoides por mililitro de sêmen e pode ser determinada através da contagem celular em câmara de Neubauer ou a partir da espectrofotometria (CARDOSO e SILVA, 1997), de modo que o valor normal para a espécie ovina está em torno de 3 bilhões por mililitro (CBRA, 1998).

As características morfológicas dos espermatozoides são analisadas em esfregaços corados ou preparação úmida sob aumento de 1000x em objetiva de imersão. As anormalidades espermáticas podem acometer: cabeça, peça intermediária ou peça principal. Além disso, podem estar associadas à presença de gotas citoplasmáticas ou pseudogotas, alterações de inserção da cauda e etc (CBRA, 1998). Classicamente, as anormalidades espermáticas podem ser divididas em defeitos maiores e menores (Bloom, 1972). Nesta classificação, os defeitos maiores são relacionados a infertilidade e patologias testiculares ou epididimárias e, os defeitos menores a subfertilidade.

A morfologia espermática determina a percentagem de espermatozóides patológicos dentro da população, não devendo ultrapassar os 10%, nos pequenos ruminantes, principalmente para utilização em inseminação artificial (CBRA, 1998), visto que espermatozoides mortos e anormais apresentam efeitos adversos sobre a fertilidade potencial do sêmen (MAXWELL e WATSON, 1996). Todos os ejaculados contêm alguns espermatozoides anormais, mas amostras com alto percentual de espermatozoides defeituosos resultam em baixa fertilidade (EVANS & MAXWELL, 1987).

Tradicionalmente, também faz parte do processo de seleção e avaliação de reprodutores a medição das características biométricas testiculares como: circunferência escrotal, largura e comprimento testicular (NOTTER et al., 1981). O potencial das medições testiculares, em particular da circunferência escrotal, como critério de seleção para a fertilidade masculina em carneiros, já foi demonstrado (MATOS *et al.*, 1992).

2.2. Proteínas do plasma seminal

O plasma seminal é uma secreção fisiológica complexa, composta por fluídos oriundos dos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias (ampolas, glândulas vesiculares e bulbo-uretrais), servindo como meio de transporte para os espermatozoides durante a ejaculação e sobrevivência no trato reprodutivo feminino (EVANS; MAXWELL, 1987). Possui um significado fisiológico importantíssimo, servindo como meio de transporte para as células espermáticas até o trato genital da fêmea (EVANS e MAXWELL, 1990), previne a capacitação espermática prematura (YANAGIMACHI, 1994; EVANS e MAXWELL, 1990) e protege as células espermáticas contra danos oxidativos (SCHONECH et al., 1996).

O espermatozoide é uma célula alongada (GARNER e HAFEZ, 2004), formada por duas regiões altamente especializadas: a cabeça, na qual está contido o DNA, pequena quantidade de citoplasma e o acrossomo, uma vesícula contendo enzimas hidrolíticas, vital para a penetração do espermatozoide através da zona pelúcida; e o flagelo, envolvido com a motilidade da célula; neste segmento encontra-se a peça intermediária, contendo as mitocôndrias, relacionadas com a produção de energia (YANAGIMACHI, 1994). Toda a característica estrutural especializada do espermatozoide está voltada para sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozóiide para o oócito, onde a união dos pronúcleos masculino e feminino ocorre (fertilização), produzindo o zigoto (EDDY e O'BRIEN, 1994).

A composição iônica do plasma seminal varia nas diferentes espécies, sendo os principais íons: sódio, potássio, cloreto, cálcio, magnésio e zinco (WHITE, 1988). Sua composição ainda inclui aminoácidos, açúcares, ácido cítrico, minerais, prostaglandinas, enzimas e outras proteínas (EVANS e MAXWELL, 1990). As interações entre as células espermáticas e o fluido seminal iniciam-se desde a espermatogênese, contudo, durante a passagem pelo epidídimo, a membrana plasmática dos espermatozoides sofre extensivas alterações biológicas (TULSIANI et al., 1997, NAABY-HANSEN et al., 1997). Como os espermatozoides perdem toda a capacidade de sintetizar e secretar proteínas na espermatogênese (SHABANOWITZ e KILLIAN, 1987), novas proteínas são aderidas pela interação da célula espermática com o meio. Todas as modificações na membrana plasmática, durante a maturação epididimal, regulam a capacidade espermática para movimentação e ligação à zona pelúcida (VARRICCHIO et al., 1996).

O conteúdo proteico do plasma seminal de mamíferos varia de 3 a 7%, dependendo da espécie (WHITE, 1998). Atualmente, com o avanço das técnicas de biologia molecular, muitas proteínas foram identificadas e caracterizadas (AYYAGARI et al., 1987; KILLIAN et al., 1993; FRAZER e BUCCI, 1996; MOREAU e MANJUNATH, 1999; RONCOLETTA et al., 2006), muitas destas proteínas secretadas nos fluidos do trato reprodutivo masculino, em especial no plasma seminal, estão associadas a inúmeros aspectos da função reprodutiva em ruminantes (KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1998; SPROTT et al., 2000; MOURA et al., 2006a). Diversos autores sugerem a presença, ausência ou concentração de proteínas no plasma seminal como responsável pela fertilidade espermática em reprodutores bovinos (HENAULT e

KILLIAN, 1996), suínos (FLOWERS, 1998) e equinos (BRANDON et al., 1999) e com a congelabilidade (RONCOLETTA, 1999; RONCOLETTA et al., 1997, 1999, 2000) e a viabilidade do sêmen (AL SOMAI et al., 1994; BARRIOS et al., 2000). O plasma seminal possui componentes capazes de modular a motilidade dos espermatozoides (Baas et al., 1983) e suas habilidades de ligação à zona pelúcida e a fertilização do oócito (Amann & Hammerstedt, 1993; Töpfer-Petersen et al., 2000).

Em bovinos, HENAULT e KILLIAN (1996) notaram aumento na taxa de penetração de ovócitos por espermatozoides de animais de baixa fertilidade devido à adição de plasma seminal de animais de alta fertilidade. Na espécie equina, a adição de plasma seminal de garanhões de alta fertilidade em espermatozoides de animais de baixa fertilidade elevou a resistência dos espermatozoides a congelamento e descongelamento, concluindo que a composição do plasma seminal é um fator que determina a susceptibilidade individual de garanhões para criopreservação do sêmen (AURICH e HOPPE, 1996). As proteínas do plasma seminal parecem ser importantes para a manutenção da motilidade em carneiros, para a melhoria da viabilidade espermática, e por protegerem a membrana plasmática dos espermatozoides de ovinos dos danos causados pelas baixas temperaturas de preservação (BARRIOS et al., 2000; PÉREZ-PE et al., 2001).

A maioria dos atuais procedimentos de análise seminal não consegue prever a fertilidade potencial dos reprodutores, provavelmente porque eles não levam em consideração importantes etapas no processo de fertilização, como a capacitação espermática e a reação acrossômica (AMMAN; HAMMERSTEDT, 1993). O estudo das proteínas do plasma seminal torna-se importante para o setor de biotecnologia aplicada à reprodução animal, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de estratégias para a identificação de componentes do plasma seminal de carneiros deslanados.

A potencial influência das proteínas seminais sobre a fertilidade veio à tona devido a estudos mostrando que sua expressão está relacionada, significativamente, com taxas de não retorno ao estro (KILLIAN et al., 1993; BRANDON et al., 1999; PARENT et al., 1999; BRAUNDMIEIER & MILLER, 2001), taxas de penetração *in vitro* de oócitos (HENAULT et al., 1995; HENAULT & KILLIAN, 1996) e motilidade espermática (AMMAN et al., 1987; DIAMANDIS et al., 1999).

Para combater a ação de ROS sobre os espermatozóides, o epidídimo dispõe diversas enzimas antioxidantes, presentes em diferentes quantidades, de acordo com a região do epidídimo, atuando sobre diferentes substratos (HINTON et al., 1996), estas proteínas intervêm de forma direta ou indireta na proteção dos espermatozóides. Dentre elas, já foram identificadas glutathione S-transferase, tioredoxina peroxidase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e gama-glutamyl-transpeptidase (ALVAREZ; STOREY, 1983; JEULIN et al., 1989; FOUCHÉCOURT et al., 2000; DACHEUX et al., 2006). A glutathione peroxidase (GSHPx) constitui um dos principais meios enzimáticos de proteção espermática, ela está presente no epidídimo e no espermatozóides em diversas espécies (PERRY et al., 1992; DACHEUX et al., 2005). Esta proteína foi identificada no plasma seminal de carneiros (ARAÚJO, 2000), e possui a propriedade de liga-se aos espermatozóides durante o trânsito epididimário (JIN et al., 1997) ou durante a ejaculação (THALER et al., 1990) e é provável que estes efeitos estejam relacionados à sua capacidade de sequestrar ferro iônico, prevenindo a formação de peróxidos lipídicos, danosos à membrana espermática (WAKABAYASHI et al., 1999).

A clusterina é uma glicoproteína presente em inúmeros tecidos e fluidos fisiológicos, como o leite e o sêmen (WATTS et al., 1990; KOUNNAS et al., 1995), tendo sido isolada, pela primeira vez, do fluido da *rete testis* de carneiros. Algumas de suas funções incluem interações intercelulares (FRITZ et al., 1983), maturação espermática, regulação da ativação do sistema complemento (JENNE; TSCHOPP, 1989), metabolismo de lipídeos, secreção endócrina (TENNISWOOD et al., 1992) e remodelamento da membrana celular (SYLVESTER et al., 1991; BAILEY; GRISWOLD, 1999; HUMPHREYS et al., 1999). A albumina possui a capacidade de absorver peróxidos de lipídeos contribuindo com este efeito protetor tanto na membrana quanto na motilidade espermática (ALVAREZ; STOREY, 1995). A proteína conhecida como *acidic seminal fluid protein* (aSFP) pertencente a família das espermadesinas também possui um importante papel no controle do estresse oxidativo (SCHONECK et al., 1996).

O plasma seminal possui diversos componentes capazes de afetar a motilidade dos espermatozóides. Parte destes componentes integra um sistema enzimático conhecido como Kalikreína-Cininas que na espécie bovina e ovina melhoram a motilidade espermática (BRATANOV et al., 1978ab). A enzima conversora da

angiotensina 1 (ACE) é secretada pelos testículos, epidídimos e próstata (KRASSNIG et al., 1989). A ACE presente no plasma seminal do carneiro é secretada pelas células germinativas e é liberada da membrana espermática ao longo do trânsito epididimal (GATTI et al., 1999). De acordo com esses estudos, utilizando 2D-PAGE, a ACE estava totalmente ausente no fluido epididimal de carneiros azoospermicos. É possível que esta enzima atue na maturação espermática (KÖHN et al., 1998), evitando ativação prematura da motilidade, mas isto ainda não foi confirmado. A atividade seminal da ACE ovina está relacionada significativamente com a concentração espermática do ejaculado. Em um estudo a campo, carneiros de baixa fertilidade tenderam a apresentar menor atividade da ACE que aqueles de alta fertilidade. Algumas proteínas presentes no fluido das glândulas sexuais acessórias também possuem potencial influência na motilidade espermática (MOURA et al., 2007a), incluindo a Binder of Sperm Protein 1 (BSP-1) (SANCHEZ-LUENGO et al., 2004; MANJUNATH et al., 2009), a SFP (SCHONECK et al., 1996) e fosfolipase A2 (BAO et al., 2004). Segundo ARAÚJO (2000) a lactoferrina possui efeitos benéficos sobre a motilidade espermática, percentual de espermatozoides móveis e frequência de batimento flagelar *in vitro* em carneiros.

O plasma seminal de inúmeras espécies contém proteínas ligadoras de fosfolípídeos, coletivamente denominadas de BSPs (*Binder of Sperm Proteins*) que são secretadas pelas glândulas vesiculares e ampolas e atuam na capacitação espermática (MANJUNATH et al., 1987, 2009; DESNOYERS et al., 1994; VILLEMURE et al., 2003; BERGERON et al., 2005; LUSIGNAN et al., 2007). Estas proteínas compõem a maior parte do fluido das glândulas sexuais acessórias e do plasma seminal (MANJUNATH et al., 1987; MOURA et al., 2006a). As fosfolipases A2 (PLA2) são enzimas que variam de 14 a 20 kDa, encontradas em fluidos corporais (DENNIS, 1994). No trato reprodutivo, a PLA2 regula a maturação espermática e a reação acrossômica (UPRETI et al., 1994).

A osteopontina (OPN) é uma das proteínas associadas à fertilidade presentes no plasma seminal de touros (KILLIAN et al., 1993; CANCEL et al., 1997; MOURA et al., 2006a, 2008). Considerando que a OPN é uma molécula que atua na adesão celular, esta proteína está envolvida diretamente na interação entre espermatozóide e oócito (GONÇALVES et al., 2007). Trabalhos recentes com fertilização *in vitro* em bovinos trazem evidências que apóiam a hipótese da participação da OPN no processo de

fertilização, e mostram efeitos benéficos dessa proteína sobre o desenvolvimento embrionário inicial (MONACO et al., 2009)

A prostaglandina D sintetase (PGDS) identificada no plasma seminal de touro foi detectada em maior quantidade no sêmen de animais de alta fertilidade comparados com aqueles de média e baixa fertilidade, utilizados em centrais de inseminação artificial (IA) (KILLIAN et al., 1993). Em carneiros, PGDS mRNA foi detectado apenas na cabeça do epidídimo, e sua secreção representou cerca de 25% da quantidade total de proteínas secretadas no tecido.

2.3. Proteínas do músculo *Longissimus dorsi*

Dentre os músculos esqueléticos, o músculo *Longissimus dorsi* é o maior e mais longo músculo do corpo. Trata-se de um músculo amplo e triangular, apresentando um formato de um prisma trilateral que se origina nos processos espinhosos das vértebras torácicas e lombares (GETTY, 2000). Trata-se de um músculo correspondente a um dos cortes de maior valor comercial, e por isso, ele vem sendo amplamente utilizado em estudos e pesquisas para a avaliação da qualidade da carne em espécies domésticas.

A qualidade da carne é uma característica influenciada pelos componentes genéticos, raça, idade, sexo, manejo dos animais durante a produção, transporte e abate, e pelo manejo da carne durante o processo de abate e armazenamento (PARDI et al., 1995; SILVA SOBRINHO & GONZAGA NETO, 2004). Das características sensoriais da carne, a maciez é considerada a mais importante característica de qualidade.

Imediatamente após o abate, ocorre nos tecidos e em todos os órgãos uma mudança nos processos bioquímicos em resposta a parada do sistema respiratório e da circulação sanguínea. Nos tecidos musculares, as mudanças morfológicas e ultraestruturais, bem como, as mudanças no metabolismo energético que ocorrem no período *post mortem* tem sido bem descritas (LAWRIE, 1998) e atualmente já se sabe que a taxa e a extensão com que os processos metabólicos *post mortem* são executados tem importante influência nas características como a maciez, capacidade de retenção de água e propriedades sensoriais da carne (LAWRIE, 1998).

Marcadores *post mortem* detectados durante as primeiras 48 horas de armazenamento pós abate, incluem proteínas estruturais (actina, miosina e troponina T),

enzimas metabólicas, como a mioquinase, piruvatoquinase e glicogênio fosforilase (LAMETSCH et al., 2002), as enzimas metabólicas específicas de acumulação e fragmentos específicos de actina e miosina que foram observados e correlacionados com a maciez da carne (LAMETSCH et al., 2003).

De forma geral, a composição da carne é de aproximadamente 75% de água, 20% de proteínas, 3% de substâncias não proteicas solúveis e 2% de gordura (JAY, 2005). As proteínas dos músculos podem ser divididas em três classes: miofibrilares, sarcoplasmáticas e estromáticas. As proteínas miofibrilares são representadas pela miosina, actina, proteína C, proteína M, tropomiosina, α -actina e β -actina. São proteínas que formam os miofilamentos grossos e finos que constituem a miofibrila, organela que desempenha a função de contração muscular. Representam 52% a 56% das proteínas musculares (SGARBIERI, 1996).

No animal vivo, as pontes de actina e miosina (actomiosina) são transitórias, pois durante a fase de relaxamento do ciclo de contração estas pontes são rompidas. Tropomiosina, troponina T, proteína M, α -actina, β -actina e proteína C são também denominadas proteínas reguladoras, apresentando função de controle direto e indireto no complexo adenosina-trifosfato-actina-miosina (LUCHIARI FILHO, 2000).

Mudanças relacionadas a fatores físico-químicos (GOLL et al., 1964), propriedades histoquímicas (BROCKS et al., 1998), temperatura (MONIN et al., 1995), genótipos e muitos outros fatores, influenciam o metabolismo *post mortem*, mas a relação com a qualidade da carne permanece pouco conhecida. Em geral, fatores que alteram o começo do rigor podem ter um efeito significativo na maciez, incluindo a estimulação elétrica (HILDRUM et al., 1999), estresse (SCANGA et al., 1998), taxa de arrefecimento e status nutricional durante a vida do animal.

Existem três sistemas enzimáticos responsáveis pela proteólise dos componentes estruturais das miofibrilas: o sistema das catepsinas, o complexo multicatalítico de proteases (MCP) e o sistema enzimático das calpaínas. As catepsinas são as proteases ácidas presentes nos lisossomos, tendo como substratos a actina, a miosina e a linha Z (KOOHMARAIE, 1994). Uma importante característica dessas catepsinas é que elas atuam até em pH mais baixo (pH<6,0) que as calpaínas, e degradam não só proteínas miofibrilares (como as calpaínas o fazem) como também exercem ação sobre as proteínas do tecido conjuntivo (colágeno), o que pode indicar um

sinergismo com o sistema enzimático das calpaínas. O complexo multicatalítico de proteases (MCP) atua preferencialmente em peptídeos, em Ph neutro ou alcalino, e em temperaturas de 45°C, apresentando por esta razão pouca importância. O sistema enzimático denominado calpaínas é considerado o principal mecanismo relacionado com a proteólise que conduz ao amaciamento da carne. DRANSFIELD (1993) demonstrou que 65% da variação na maciez da carne pode ser explicada pela variação na atividade da calpaína-I. De forma semelhante, GOLL et al. (1992), com base em algumas evidências, ressaltaram que as calpaínas são responsáveis por 90% ou mais do amaciamento *post mortem* da carne.

O sistema enzimático das calpaínas é formado por duas calpaínas (proteínase ativada por concentração micromolar de cálcio ou μ -calpaína ou calpaína tipo I e protéinase ativada por concentração milimolar de cálcio ou m-calpaína ou calpaína tipo II) ativadas pelo cálcio livre (não retido no retículo sarcoplasmático ou nas mitocôndrias) e inibidas por uma outra enzima denominada calpastatina (KOOHMARAIE, 1992).

Uma série de trabalhos tem relatado as mudanças proteômicas no processo *post mortem* da carne suína (LAMETSCH & BENDIXEN, 2001; LAMETSCH et al., 2003; LAMETSCH et al., 2002; MORZEL et al., 2004) e bovina (JIA et al., 2006a; BJARNADÓTTIR et al., 2010; JIA et al., 2007; JIA et al., 2006b). A combinação de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa tem demonstrado uma grande força para o estudo das alterações metabólicas, proteólise *post mortem* e mudanças induzidas pelo ambiente e condições de processamento da carne (HOLLUNG et al., 2007).

A relação do tipo de fibra e as características de qualidade da carne como a suculência, sabor, aroma e maciez, e especialmente a influência do tipo de fibra na maciez da carne ainda não está claro. Modelos animais com fenótipos de crescimento bem caracterizado e uma característica de maciez única, incluindo os bovinos de dupla musculatura (FIEMS et al., 1995) e os ovinos com características do calipígeo (TAYLOR & KOOHMARAIE, 1998), contribuiu significativamente para o entendimento de como o crescimento muscular e as características de qualidade estão interrelacionadas. Esses são os modelos de escolha para o estudo de abordagens proteômicas, com o intuito de esclarecer cada vez mais os mecanismos moleculares que relacionam crescimento e características de qualidade da carne.

A maciez tende a ser maior em animais jovens e diminuir com a idade, devido ao acúmulo e a maturação do tecido conjuntivo da matriz extracelular do tecido muscular, entretanto, a suculência e o sabor da carne estão relacionados com a gordura intramuscular (marmorização) a qual aumenta com a idade e o acabamento do animal (OCKERMAN et al., 1984; MALTIN et al., 2001). Segundo Renand et al. (2001), existem várias diferenças na relação entre maciez e alguns parâmetros como lipídios musculares e tipos de fibras musculares; os autores atribuem essas diferenças as variações nas condições de mensuração e enfatizam a importância em se estabelecer uma padronização para o abate, seja pelo peso ou pela idade.

Com relação à cor da carne, parâmetro que tem influência significativa na decisão da compra pelo consumidor, que associa esta característica com o produto fresco e saudável, ou seja, de qualidade, pode-se esperar que músculos vermelhos contêm maiores teores de mioglobina e de suprimento sanguíneo, quando comparados aos músculos brancos. A função da mioglobina no animal vivo e o armazenamento de oxigênio, assim, o nível é mais alto nos músculos que são utilizados constantemente, ou seja, em músculos que possuem maior quantidade de fibras de metabolismo oxidativo (PEARSON & YOUNG, 1989). Neste contexto, pode-se dizer que os músculos dos animais produzidos em sistema extensivo provavelmente são mais escuros que nos animais criados em sistema intensivo (VARNAM & SUTHERLAND, 1998).

Além de ser usado para estudo dos processos *post mortem* e efeito de alterações genéticas, ambos sobre a qualidade da carne, muitos estudos proteômicos tem sido realizados com o objetivo de descrever as diferentes proteínas que estão presentes em uma amostra de músculo. Essa abordagem pode ser descrita como perfil ou mapeamento proteômico. Um estudo do mapeamento proteômico do músculo semitendinoso bovino usando uma combinação de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa permitiu a detecção de aproximadamente 500 *spots* de proteína reproduzíveis (BOULEY et al., 2004). A estratégia do mapeamento também tem sido usada para comparar a expressão de proteínas sarcoplasmáticas entre 4 diferentes músculo ovinos (HAMELIN et al., 2006).

Mapas 2-D de algumas espécies e tecidos tem sido publicados nas últimas décadas, incluindo os mapas de músculo suíno (LAMETSCH et al., 2002; MORZEL et al., 2004), bovino (BOULEY et al., 2004) e de frangos (DOHERTY et al., 2004).

Alguns desses mapas têm sido utilizados para a busca de marcadores moleculares relacionados com características de qualidade da carne.

Baseado no exposto é notável que a proteômica venha se tornando uma ferramenta poderosa e eficaz na ciência da carne ao longo dos últimos anos produzindo informações sobre as diferenças nos músculos de uma carcaça, alterações que ocorrem no processo *post mortem* e sobre marcadores moleculares de qualidade. Por conseguinte, a técnica também pode ser usada na avaliação de proteínas expressas em resposta aos fatores do ambiente, como uma alimentação diferenciada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização do experimento e grupos experimentais

O manejo dos animais foi realizado durante os meses de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013, na Fazenda Experimental Vale do Curu – FEVC, a qual pertence à Universidade Federal do Ceará. A fazenda é localizada no município de Pentecostes/Ce, há 120 Km de Fortaleza, situada nas latitudes 3°40' a 3°51'18" sul e longitudes 39°10'19" e 39°18'13" oeste, em uma região cujo clima, segundo a classificação de Köppen, é do tipo BSw'h', semiárido quente, com precipitação média anual de 806,5mm, distribuída no período de janeiro a abril.

Foram utilizados 22 carneiros da raça Morada Nova, com idade média de 10 meses. Os animais foram mantidos com alimentação a pasto, em sistema de lotação rotativa, com água e sal mineral à vontade. O pasto era formado de capim-aruaana, que é uma cultivar de *Panicum maximum*. Os animais iniciaram o experimento com sete meses de idade e foram abatidos aos dez meses de idade.

Os níveis de suplementação corresponderam a 0,0% (tratamento 1); 0,6% (tratamento 2); 1,2% (tratamento 3) e 1,8% (tratamento 4) do peso corporal dos ovinos, considerando uma capacidade de consumo diária de matéria seca sendo 3,6% PC para ovinos deslanados, em pastejo, na fase de terminação (POMPEU, 2006). O suplemento concentrado foi formulado com base no NRC (2007), considerando-se a categoria de cordeiros em terminação de 20 kg de peso corporal e crescimento moderado. A ração concentrada foi formulada à base de milho, soja, ureia, calcário e fosfato bicálcico, com a composição ilustrada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição da ração concentrada fornecida aos animais experimentais com base na matéria natural.

INGREDIENTES	QUANTIDADE Kg
Milho Grão	90,08
Soja Farelo	6,72
Ureia	2,00
Calcário	1,05
Fosfato bicálcico	0,15

3.2. Coleta e processamento do sêmen

O sêmen foi coletado ao final do período experimental, por meio de eletroejaculação. A variável peso corporal e circunferência escrotal foram obtidas no momento da coleta de sêmen.

As amostras de sêmen foram centrifugadas a 700 x g, a 4° C, por 20 minutos para separação do plasma seminal e espermatozoides. Em seguida, o plasma seminal foi centrifugado novamente a 5000 x g, a 4° C, por 60 minutos para a retirada de debris e possíveis espermatozoides ainda existentes nas amostras. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e precipitado com acetona, 10 vezes o volume da amostra, durante duas horas a -20 ° C. Após, o sobrenadante precipitado foi centrifugado a 5000 x g, a 4° C, por 40 minutos, então, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi seco *overnight* a 4° C na geladeira e depois ressuspendido em 50 µL de tampão de amostra (7 M ureia, 2 M tioureia, 40 mM ditioneitol-DTT, anfólitos livres 2% (IPG buffer, pH 4-7 (GE LifeSciences), 4% 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanossulfonato). Após a precipitação, as amostras de plasma seminal foram colocadas em microtubos identificados, e armazenadas a -20°C.

3.3. Parâmetros seminais e biometria testicular

Imediatamente após a coleta, foram analisados os seguintes parâmetros seminais: motilidade, motilidade progressiva, vigor, concentração espermática, turbilhonamento, volume de sêmen e aspecto do sêmen. Uma amostra de sêmen foi diluída (1:400) em solução de formol salina, para determinação da concentração espermática, que foi determinada por espectrofotometria. Em seguida, foram feitas lâminas para avaliação da morfologia espermática (coradas com azul de bromofenol) segundo Medeiros, (2004) e avaliadas de acordo com a metodologia de COLAS (1980) contando 200 células/animal (Souza et al., 2010).

Os animais foram abatidos num frigorífico modelo na cidade de Fortaleza. Após o abate dos animais, os testículos foram coletados, enrolados em sacos plásticos identificados, refrigerados e levados ao laboratório. Com um auxílio de um paquímetro foram medidas as variáveis de comprimento, largura, espessura dos testículos. Os pesos dos testículos direitos e esquerdos foram mensurados com o auxílio de uma balança.

3.4. Coleta e extração das proteínas do músculo *Longissimus dorsi*

A coleta do músculo *Longissimus dorsi* foi realizada logo após o abate dos animais, num abatedouro modelo na cidade de Fortaleza. O músculo coletado foi refrigerado num isopor com gelo e levados ao laboratório para as posteriores análises. As amostras foram pesadas, liofilizadas, e novamente pesadas para ter-se a certeza de que as amostras perderam 80% de seu peso, estando secas para serem extraídas as proteínas. A liofilização ocorreu por um período de aproximadamente 24h. Após a liofilização, as amostras foram maceradas e armazenadas a - 20° C. Cinco mg de cada amostra foi reidratada em água ultrapura com 1% de Triton-x 100. As amostras permaneceram na geladeira por 60 minutos, sob leve agitação de 15 em 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 400 µL de tampão de amostra (7 M ureia, 2 M tioureia, 40 mM ditiotretitol-DTT, anfólitos livres 2% (IPG buffer, pH 4-7 (GE LifeSciences), 4% 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanossulfonato). O extrato obtido foi sonicado em tubos de vidro, no Ultra Sonic Clean 1600A, da marca Unique, durante 3 minutos e posteriormente centrifugado por 30 minutos a 5000g sob 4°C. O sobrenadante foi reservado e a quantificação de proteínas foi realizada utilizando o método de Bradford (1976).

3.5. Quantificação da concentração de proteína total no plasma seminal e do músculo *Longissimus dorsi*

Inicialmente foi feita uma curva analítica de calibração obtida a partir de soluções padrões, com concentrações de proteínas conhecidas, como a BSA (Albumina Sérica Bovina). A concentração de proteínas nas amostras de plasma seminal foi determinada pelo método de Bradford (1976). O reagente de Bradford utilizado contém como seu principal componente o corante Coomassie Blue G-250 em solução ácida, e este ao ligar-se às proteínas, têm a sua absorbância alterada de 465 nm para 595 nm. Esta interação entre o corante Coomassie com a proteína estabiliza a forma aniônica do corante, causando uma visível mudança de coloração inicialmente castanha para tons de azul, de acordo com a concentração de proteínas. O aparelho utilizado para a leitura das concentrações de proteínas foi o Nanodrop 2000c Spectrophotometer, da marca Thermo Scientific. A comparação dos resultados com uma curva padrão permite a determinação da concentração da proteína em estudo.

3.6. Eletroforese bidimensional das proteínas do plasma seminal

O método de eletroforese bidimensional foi realizado conforme descrito previamente por (Moura et al., 2006a; Souza et al., 2012; Rodrigues et al., 2013; Rego et al., 2010), com modificações.

As tiras de IPG, *Immobiline Drystrip* com faixa linear de pH 4-7 e 13 cm de comprimento (*GE Healthcare*, USA) foram rehidratadas em 250 μ L da solução de rehidratação (7 M uréia, 2 M tiouréia, 2% CHAPS, 2% tampão IPG pH 4-7, 0,002% azul de bromofenol - *GE Healthcare*), contendo 400 μ g de proteínas do plasma seminal por aproximadamente 20 horas, em bandeja de rehidratação (*Reswell tray; IPGbox; GE Healthcare*, USA). Após este período, as tiras de IPG foram focalizadas no aparelho IPGphor III (*GE Healthcare*, USA), com a seguinte programação: 250V (3h), 500V (1h), 800V (1h), 1000V (1h), 8000 (9000 Vh), 8000 (24000 Vh) e 100V (24h), totalizando 38450 Vh, onde as proteínas foram separadas na primeira dimensão, de acordo com o seu potencial isoeletrico, horizontalmente.

Após a focalização, as tiras foram equilibradas por 20 minutos em 6 M uréia, 29.3% glicerol, 2% SDS, 75 mM Tris pH 8.8 e 1% DTT e por mais 20 minutos em 6 M uréia, 29.3% glicerol, 2% SDS, 75 mM Tris pH 8.8 e 5% Iodoacetamida. Após estarem equilibradas, as proteínas foram separadas na segunda dimensão em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) à 12,5%. Foi utilizado o aparelho SE 600 Ruby™ a 25 mA/gel até a finalização da corrida. A corrida dos géis foi realizada com o sistema refrigerado à 15°C (*Multitemp II – Amersham*). Foi adicionado marcadores moleculares variando de 12 a 225 kDa, (*GE Healthcare – Padrão de peso molecular para proteína*). Após a separação das proteínas na segunda dimensão, os géis permaneceram em contato com uma solução de fixação contendo etanol (30%), ácido fosfórico (2%) e água destilada, por um período de aproximadamente 15h.

No dia seguinte, os géis passaram por três lavagens em solução contendo ácido fosfórico (2%) e água destilada, permanecendo em contato com a solução de lavagem por 20 minutos, cada lavagem. Após a última lavagem, os géis permaneceram em contato com uma solução contendo ácido fosfórico (2%), etanol (18%), sulfato de amônio (15%) e água destilada. Ao passar 30 minutos em contato com essa solução, foi adicionado o corante Coomassie Blue G-250 (Blue silver). O corante permaneceu em contato com os géis por aproximadamente 96 horas. Após este período, a solução

contendo o corante foi desprezada e os géis lavados com água destilada até ficarem descorados, marcados com o corante apenas os *spots*.

3.7. Eletroforese bidimensional das proteínas do músculo *Longissimus dorsi*

As proteínas foram solubilizadas em solução de reidratação (7 M uréia, 2 M tiouréia, 2% CHAPS, 2% tampão IPG pH 4–7, 0,002% azul de bromofenol - GE Healthcare). As tiras de IPG, 13 cm, com uma faixa de pH 4 – 7 linear foram reidratadas em 250 µL da solução de reidratação contendo 400 µg de proteínas do músculo *Longissimus dorsi* por aproximadamente 20 horas. Após este período, as tiras de IPG foram focalizadas no aparelho IPGphor III (GE Healthcare, USA), com a seguinte programação: 100V (1h), 250V (1h), 500V (1h), 8000V (12750 Vh), 8000 (48000 Vh) e 100V (24h), totalizando 64000 Vh, onde as proteínas foram separadas na primeira dimensão, de acordo com o seu potencial isoelétrico, horizontalmente.

Após a focalização, as tiras foram equilibradas por 20 minutos em 6 M uréia, 29.3% glicerol, 2% SDS, 75 mM Tris pH 8.8, 1% DTT e por mais 20 minutos em 6 M uréia, 29.3% glicerol, 2% SDS, 75 mM Tris pH 8.8, 5% Iodoacetamida. Após estarem equilibradas, as proteínas foram separadas na segunda dimensão em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS) usando o aparelho SE 600 Ruby™ a 25 mA/gel até a finalização da corrida. A corrida dos géis foi realizada com o sistema refrigerado à 15°C (*Multitemp II – Amersham*). Foi adicionado marcadores moleculares variando de 12 a 225 kDa, (GE Healthcare – Padrão de peso molecular para proteína). Após a separação das proteínas na segunda dimensão, os géis permaneceram em contato com uma solução de fixação contendo etanol (30%), ácido fosfórico (2%) e água destilada, por um período de aproximadamente 15h.

No dia seguinte, os géis passaram por três lavagens em solução contendo ácido fosfórico (2%) e água destilada, permanecendo em contato com a solução de lavagem por 20 minutos, cada lavagem. Após a última lavagem, os géis permaneceram em contato com uma solução contendo ácido fosfórico (2%), etanol (18%), sulfato de amônio (15%) e água destilada. Ao passar 30 minutos em contato com essa solução, foi adicionado o corante Coomassie Blue G-250 (Blue silver). O corante permaneceu em contato com os géis por aproximadamente 96 horas. Após este período, a solução contendo o corante foi desprezada e os géis lavados com água destilada até ficarem descorados, marcados com o corante apenas os *spots*.

3.8. Digitalização e análises dos géis de plasma seminal

Foram confeccionados 19 géis 2-D das proteínas do plasma seminal. Estes foram digitalizadas utilizando o scanner *ImageScanner III* (*GE Healthcare*, USA) na resolução de 300 dpi modo transparente e filtro verde. As imagens foram salvas como arquivos *TIFF* (tif) e analisadas utilizando o aplicativo PDQuest versão 8.0.1 (*Bio-Rad Laboratories*, USA). Um gel representativo foi criado com base nos géis de todos os indivíduos. A quantificação dos *spots* foi dada em partes por milhão (ppm) da densidade óptica integrada total de cada gel, fornecida pelo aplicativo (MOURA et al., 2006a).

3.9. Digitalização e análises dos géis de músculo *Longissimus dorsi*

Foram confeccionados 22 géis 2-D das proteínas do músculo *Longissimus dorsi*. Estes foram digitalizadas utilizando o scanner *ImageScanner III* (*GE Healthcare*, USA) na resolução de 300 dpi modo transparente e filtro verde. As imagens foram salvas como arquivos *TIFF* (tif) e analisadas utilizando o aplicativo PDQuest versão 8.0.1 (*Bio-Rad Laboratories*, USA). Um gel representativo foi criado com base nos géis de todos os indivíduos. A quantificação dos *spots* foi dada em partes por milhão (ppm) da densidade óptica integrada total de cada gel, fornecida pelo aplicativo (MOURA et al., 2006a).

3.10. Análise estatística

Os dados de peso corporal, biometria testicular, parâmetros seminais e as intensidades dos *spots* do plasma seminal e dos *spots* do músculo foram analisados através do Programa SYSTAT 12 ® (*SYSTAT Software, Inc.*, EUA), utilizando ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.11. Digestão das proteínas

As proteínas foram digeridas com tripsina segundo metodologia descrita por (MOURA et al., 2006a; ROCHA et al., 2009). Os *spots* diferencialmente expressos entre os tratamentos foram cortados individualmente de pelo menos 2 géis, em pedaços de 1mm^3 e transferidos para tubos limpos. Os *spots* foram descorados por meio de três lavagens de 15 minutos com solução contendo $400\mu\text{L}$ de solução de acetonitrila 50%/bicarbonato de amônio (25mM, pH 8,0). Os *spots* foram desidratados com $200\mu\text{L}$ de acetonitrila por 5 minutos e, em seguida, secos completamente no Speed Vac. Foi

acrescentado às amostras uma solução contendo tripsina (Promega, cat. # V5111, Madison, WI, USA), ácido acético e bicarbonato de amônio 50mM, após 5 minutos essa solução foi retirada e acrescentou-se 20µl de bicarbonato de amônio 50mM. As amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C por, aproximadamente, 18 horas. Os peptídeos foram extraídos por meio de duas lavagens com solução de ácido fórmico 5%/ acetonitrila 50% por 30 minutos. Os extratos foram acondicionados em microtubos e secos no Speed Vac.

3.12. Espectrometria de massa – (ESI-Q-TOF) (Eletrospray ionization-quadrupole-time of flight)

Os peptídeos oriundos da digestão trípica foram analisados conforme a metodologia descrita por Tilburg et al., 2013. Os peptídeos (5µl) foram injetados em solvente A (acetonitrila:água:ácido fórmico, correspondendo a 5:94,9:0,1, respectivamente) utilizando a bomba auxiliar da unidade de UPLC para interagir com uma coluna Waters Symmetry 300TM(C-18, filme de 5µm; 0,3mm×5mm) para dessalinização em linha e pré-concentração. Depois da lavagem durante 3min com solvente A com 5ml/min, os peptídeos foram então eluídos num gradiente de concentração para a coluna analítica nanoACQUITY HSS T3 (C-18, 0,075mm x 150mm). A coluna analítica foi corrida num gradiente (5 a 42% de solvente B; acetonitrila:água:ácido fórmico, correspondendo a 95:5:0,2, durante 40min). O espectrômetro de massa foi calibrado utilizando fragmentos de íons do peptídeo Glu-1-fibrinopeptídeo B (Glu-Fib), para manter a precisão em 10 partes por milhão. O espectrômetro de massas foi operado para obter espectros MS/MS dos peptídeos trípticos em modo dependente de dados (data-dependent acquisition; DDA) para o íon precursor usando o reconhecimento de estado de carga e limite de intensidade como critérios de seleção, utilizando o aplicativo MassLynx 4.1. Para obter os dados MS/MS, uma varredura (2 seg.) foi executada nos dados de relação massa/carga (m/z) entre 400-1500. A partir de cada varredura, baseando-se nos critérios de seleção foram escolhidos até quatro íons mais intensos, para obtenção da produção dos espectros resultantes da dissociação induzida por colisão (CID) na presença de argônio. Os espectros iônicos resultantes (6-8 seg.) foram processados utilizando o aplicativo Protein Lynx Global Server 2.4 e convertidos em arquivos de lista de picos (peak list files; PKL) para posteriormente ser feita a pesquisa em banco de dados.

3.13. Pesquisa em banco de dados

Com objetivo de identificar as proteínas, foram feitas buscas utilizando os arquivos pkl contra os bancos de dados do NCBIInr, utilizando a ferramenta de busca MASCOT (Matrix Science Inc., Boston, MA, EUA). As buscas foram feitas de acordo com os seguintes critérios: máximo de uma clivagem perdida da tripsina, peptídeos monoisotópicos com carga +1, +2 e +3, com modificação variável de oxidação da metionina e variação fixa de carbamidometilação das cisteínas. Os limites selecionados de tolerância para variação da massa dos peptídeos e dos fragmentos foram de ± 1.2 Da e $\pm 0,6$ Da, respectivamente. A identificação foi considerada não ambígua quando o escore da proteína for significativo ($p < 0,05$), e pela coincidência próxima da massa molecular e pI teóricos e experimentais da proteína.

3.14. Análise das redes de interação das proteínas

As proteínas que foram expressas diferencialmente entre os grupos foram analisadas a partir da base de dados STRING 9.0 (<http://string-db.org>), a partir de predições coletadas baseando-se em associações diretas (físicas) ou indiretas (funcionais), integrando evidências de várias fontes, bem como contexto genômico, experimentos em larga escala, co-expressão e dados obtidos a partir de publicações de pesquisa (SZKLARCZYK et al., 2011).

4. RESULTADOS

4.1. Peso corporal, parâmetros seminais e biometria testicular

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos para peso corporal dos animais ao final do experimento, onde os animais suplementados com 1,8% do PC (% MS/DIA) de ração concentrada na dieta obtiveram os maiores pesos corporais como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Valores de média e erro padrão do peso corporal, ao final do período experimental, de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação com ração concentrada.

TRATAMENTO	PESO CORPORAL (Kg)
1 (n=5)	27,4±0,9 ^a
2 (n=5)	30,4±1,3 ^{ab}
3 (n=6)	29,5±0,8 ^a
4 (n=4)	33,5±0,3 ^b

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para as variáveis de parâmetros seminais, como concentração espermática, motilidade, motilidade progressiva, turbilhonamento, vigor, volume, defeitos totais, defeitos maiores e defeitos menores, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Valores de média e erro padrão dos parâmetros seminais de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação com ração concentrada.

PARÂMETROS SEMINAIS	TRAT 1 (n=5)	TRAT 2 (n=4)	TRAT 3 (n=6)	TRAT 4 (n=4)
CONC (n° de sptz x10 ⁹ /ml)	1,3±0,4	1,8±0,4	1,2±0,3	1,5±0,5
MOT (%)	74,0±9,3	82,5±7,5	75,0±4,3	57,5±18,9
PROG (%)	54,0±6,8	60,0±4,1	58,3±4,8	37,5±18,9
TURB (1 a 5)	3,0±0,6	3,6±0,1	3,6±0,4	2,7±1,0
VIGOR (1 a 5)	4,4±0,4	4,1±0,1	4,0±0,4	2,7±1,0
VOL (ml)	0,5±0,04	0,9±0,21	0,8±0,06	0,9±0,05
DEFTO (%)	22,8±5,0	18,0±5,7	17,3±1,9	17,9±3,2
DEFMA (%)	1,2±0,4	1,1±0,4	3,5±1,3	2,5±0,5
DEFME (%)	21,6±5,0	17,4±5,8	13,8±1,4	15,4±3,4

TRAT: tratamento; CONC: concentração espermática; MOT: motilidade espermática; PROG: motilidade progressiva; TURB: turbilhonamento; VOL: volume de sêmen; DEFTO: defeitos totais; DEFMA: defeitos maiores; DEFME: defeitos menores.

Não houve diferença significativa para as variáveis como circunferência escrotal, comprimento do testículo direito, espessura do testículo direito, largura do testículo direito, peso do testículo direito, comprimento do testículo esquerdo, espessura do testículo esquerdo, largura do testículo esquerdo e peso do testículo esquerdo, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Valores de média e erro padrão das medidas de biometria testicular de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação com ração concentrada.

BIOMETRIA TESTICULAR	TRAT 1 (n=5)	TRAT 2 (n=4)	TRAT 3 (n=6)	TRAT 4 (n=4)
CE (cm)	26,7±0,4	28,9±0,9	27,8±1,2	28,5±0,4
CTD (cm)	7,2±0,1	7,7±0,3	7,6±0,3	7,7±0,5
CTE (cm)	7,3±0,1	8,0±0,4	7,6±0,3	7,7±0,5
ETD (cm)	5,1±0,2	5,6±0,2	5,4±0,2	5,2±0,4
ETE (cm)	5,2±0,1	5,7±0,2	5,5±0,2	5,3±0,4
LTD (cm)	5,3±0,2	6,0±0,2	5,8±0,2	5,5±0,3
LTE (cm)	5,4±0,2	5,9±0,2	5,8±0,2	5,6±0,3
PTD (g)	107,8±6,7	132,1±12,0	120,6±13,3	138,4±11,2
PTE (g)	112,4±6,3	134,8±10,9	121,8±13,4	142,5±9,4

TRAT: tratamento; CE: circunferência escrotal; CTD: circunferência do testículo direito; ETD: espessura do testículo direito; LTD: largura do testículo direito; PTD: peso do testículo direito; CTE: circunferência do testículo esquerdo; ETE: espessura do testículo esquerdo; LTE: largura do testículo esquerdo; PTE: peso do testículo esquerdo.

4.2. Eletroforese bidimensional das proteínas do plasma seminal

No presente estudo, para os géis de plasma seminal, com faixa de pH 4-7 foi observada a média de $174 \pm 11,62$ spots por gel no *match set*, de acordo com o aplicativo PDQuest®. Os spots do plasma seminal não apresentaram expressões diferencialmente expressas entre os grupos. A Figura 1 ilustra um gel 2-D das proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Morada Nova.

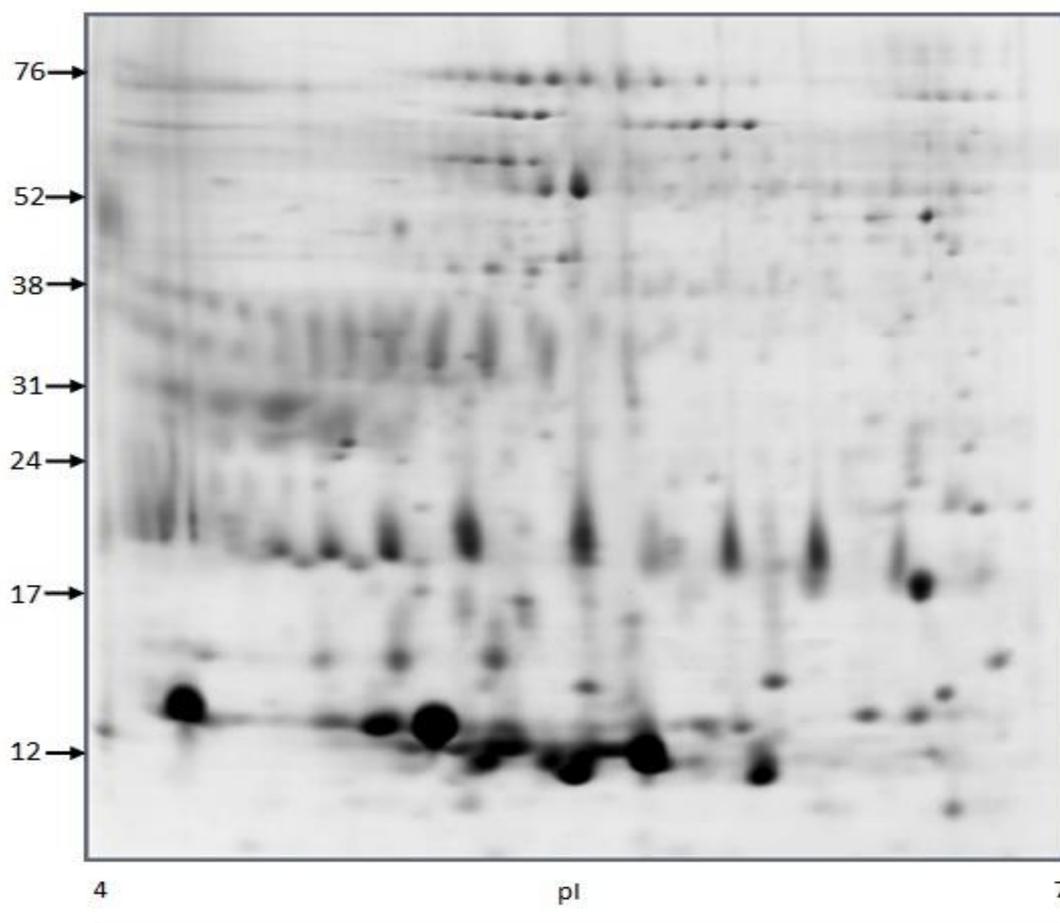


Figura 1. Eletroforese 2-D das proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação com ração concentrada na dieta.

4.3. Eletroforese bidimensional e Esi-Q-Tof das proteínas do músculo *Longissimus dorsi*

No presente estudo, para os géis de músculo, analisados com faixa de pH 4-7 foi observado a média de $140 \pm 8,73$ spots por gel no *match set*. De acordo com a análise estatística, oito spots foram diferencialmente expressos entre os grupos, correspondendo a sete proteínas diferentes, como mostra a Figura 2.

As proteínas identificadas são as seguintes: Miosina de cadeia leve 1 (MYL1), Tropomiosina alfa-1 (TPM1), Proteína de choque térmico beta-1 (HspB1), Albumina sérica Precursor (ALB), Fosfoglucomutase-1 (PGM1), Triosefosfatoisomerase (TPI1) e Creatina quinase M-type (CKM).

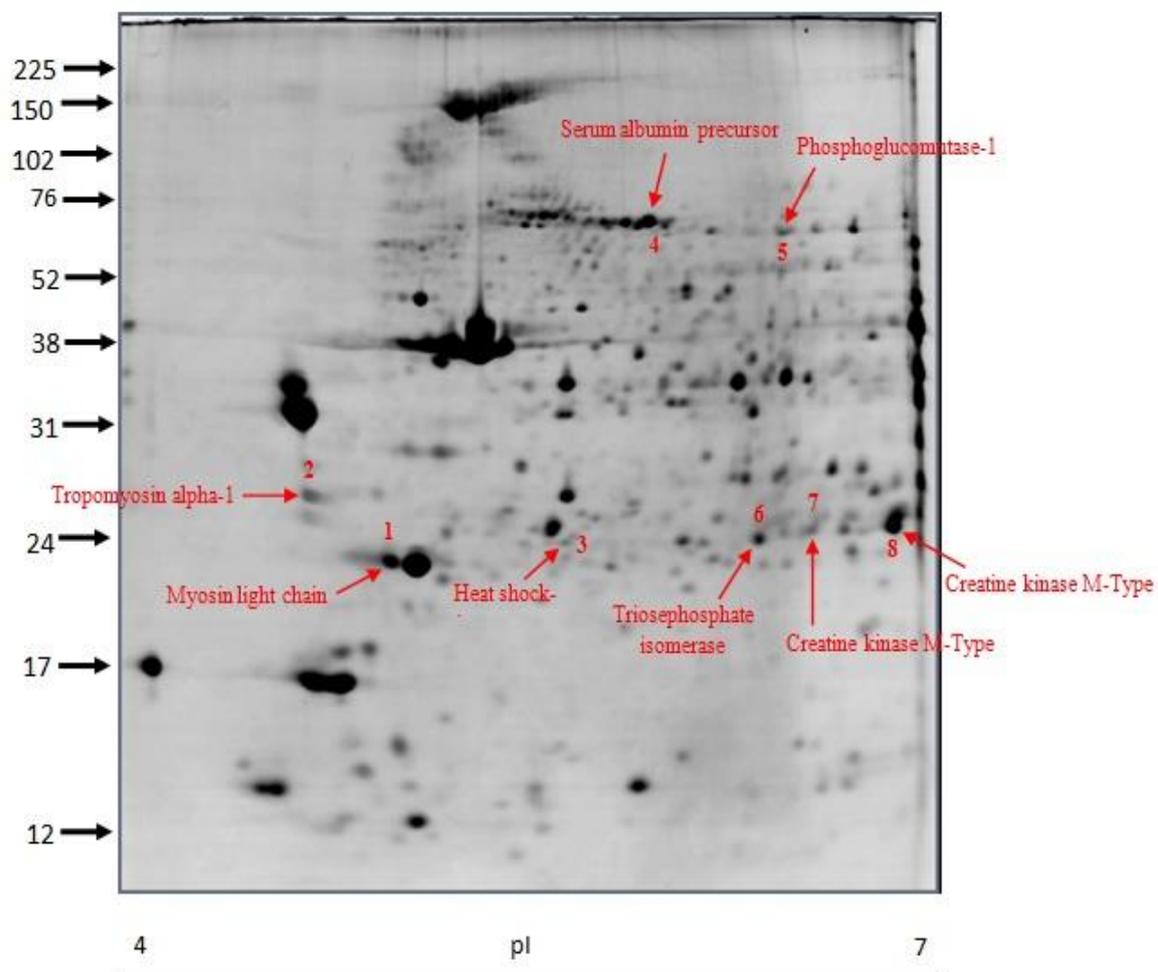


Figura 2. Eletroforese 2-D das proteínas do músculo *Longissimus dorsi* de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação com ração concentrada na dieta.

A figura a seguir mostra a intensidade dos *spots* do músculo *Longissimus dorsi* que diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

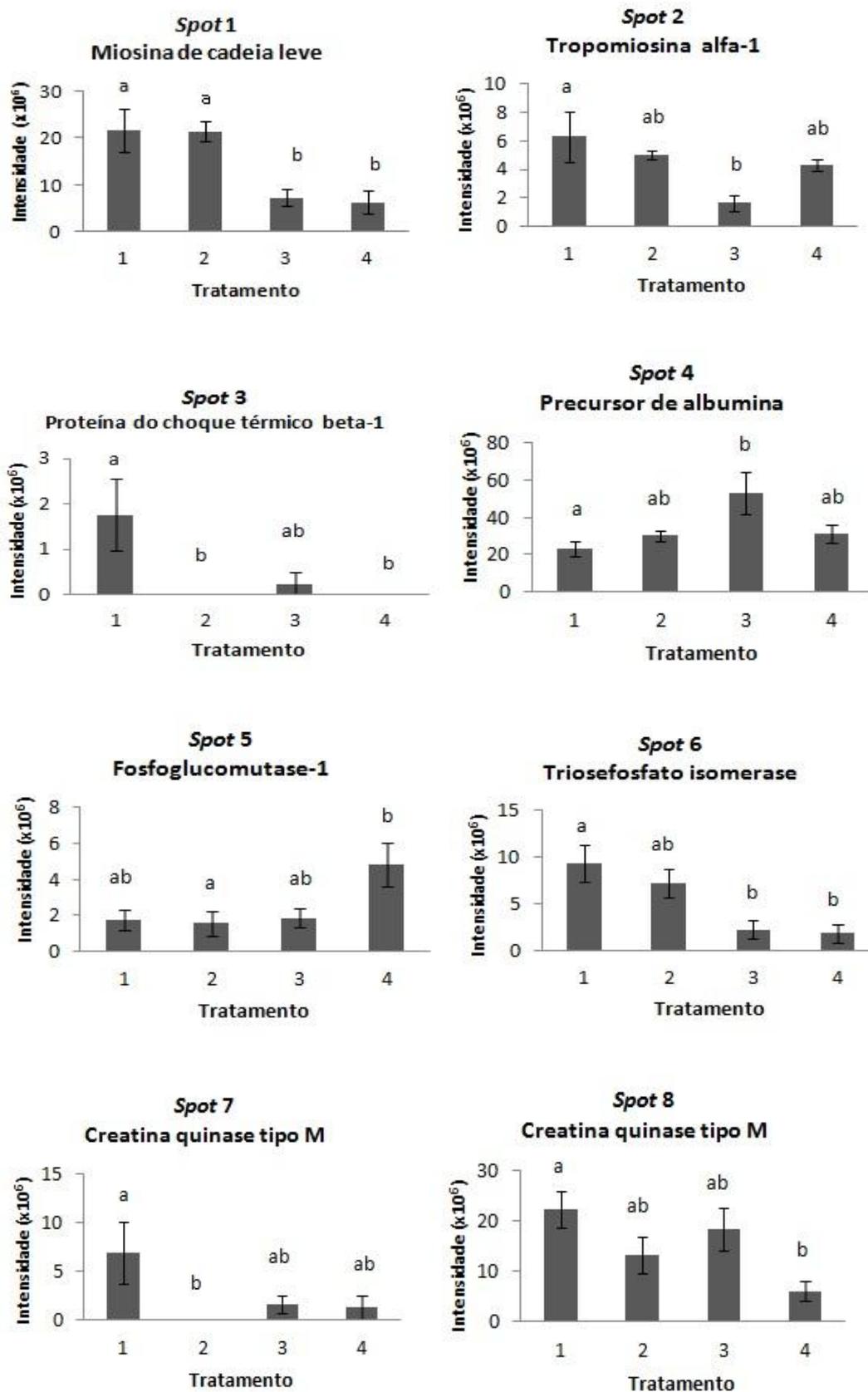


Figura 3. Intensidade dos *spots* do músculo *Longissimus dorsi* que diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

O *spot 1* (MYL1) teve maiores intensidades nos tratamentos 1 e 2 do que nos tratamentos 3 e 4. O *spot 2* (TPM1), *spot 3* (HSPB1), *spot 6* (TPI1) e os *spots 7 e 8* (CKM) tiveram maiores intensidades no tratamento 1, ou seja, animais que não receberam suplementação com ração concentrada. O *spot 4* (ALB) teve maior intensidade no tratamento 3. E o *spot 5* (PGM1) teve maior intensidade no tratamento 4, onde os animais consumiram o maior nível de suplementação.

4.4. Interação proteína-proteína

As proteínas identificadas por espectrometria de massas e diferencialmente expressas no músculo *Longissimus dorsi* foram analisadas através do STRING. As análises de interação interproteica feitas com as sete proteínas que diferiram significativamente ($P < 0,05$) mostram que houve interação entre elas, com exceção da HSPB1. A Figura 4 mostra a rede de interação entre as proteínas que diferiram no presente trabalho.

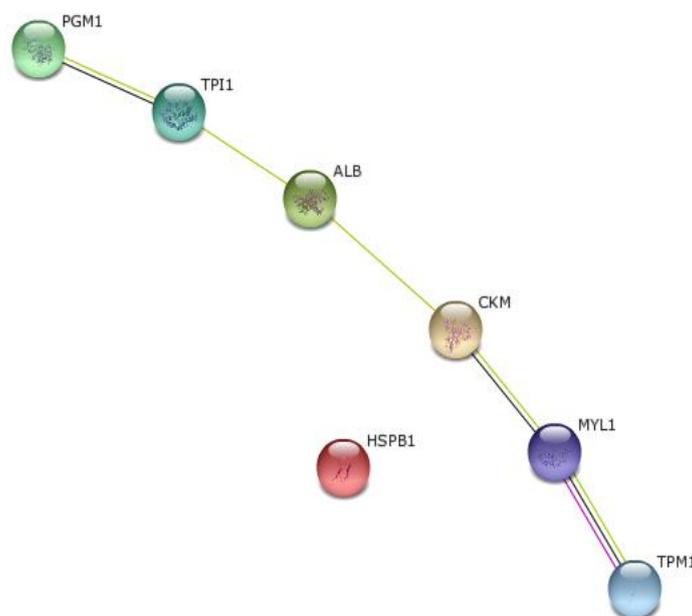
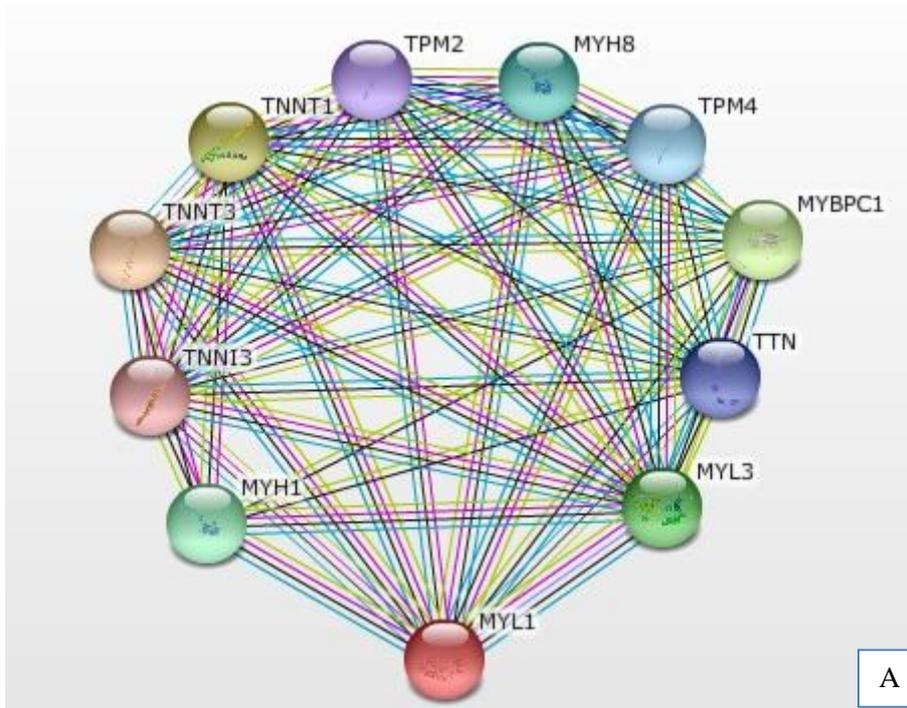
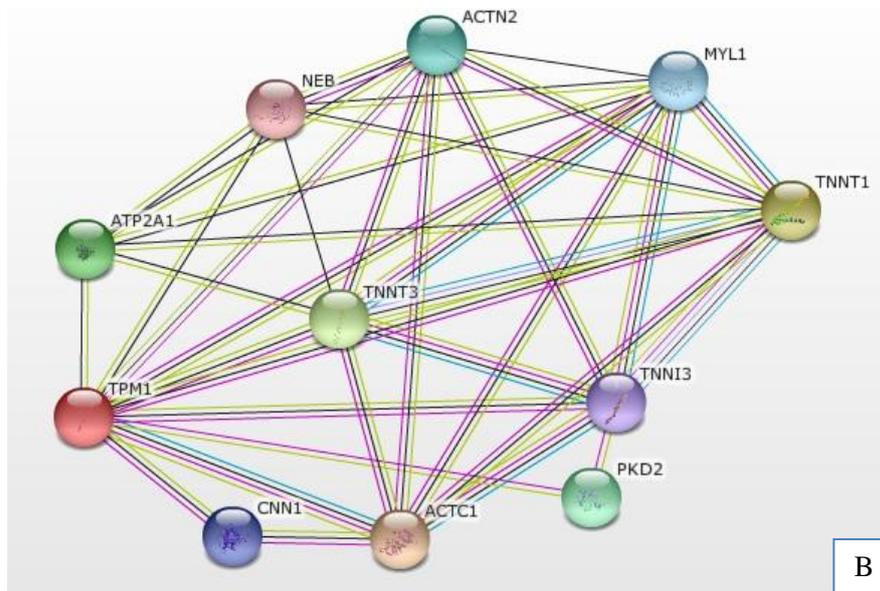


Figura 4. Redes de interação interproteica das proteínas: Myosin Light Chain (MYL1), Tropomyosin alpha-1 (TPM1), Heat Shock-1 (HSPB1), Serum albumin precursor (ALB), Phosphoglucomutase-1 (PGM1), Triosephosphate isomerase (TPI1) e Creatine kinase M-Type (CKM), obtidas com base no banco de dados STRING, mostrando as interações no modo evidência.

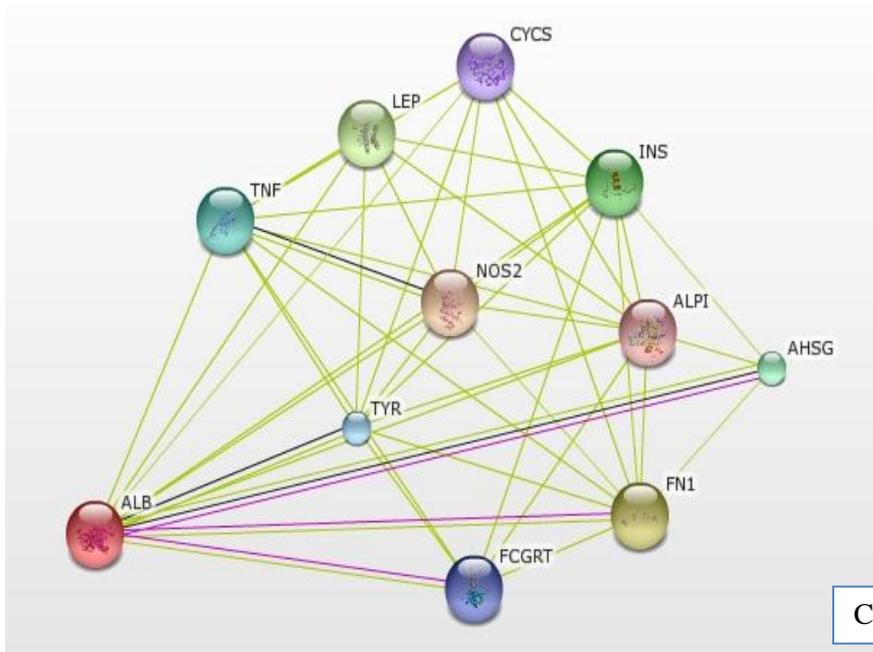
A figura a seguir mostra as redes de interação de cada proteína com as 10 proteínas mais próximas, ou seja, de maior interação, assim podemos entender um pouco melhor a função de cada uma delas.



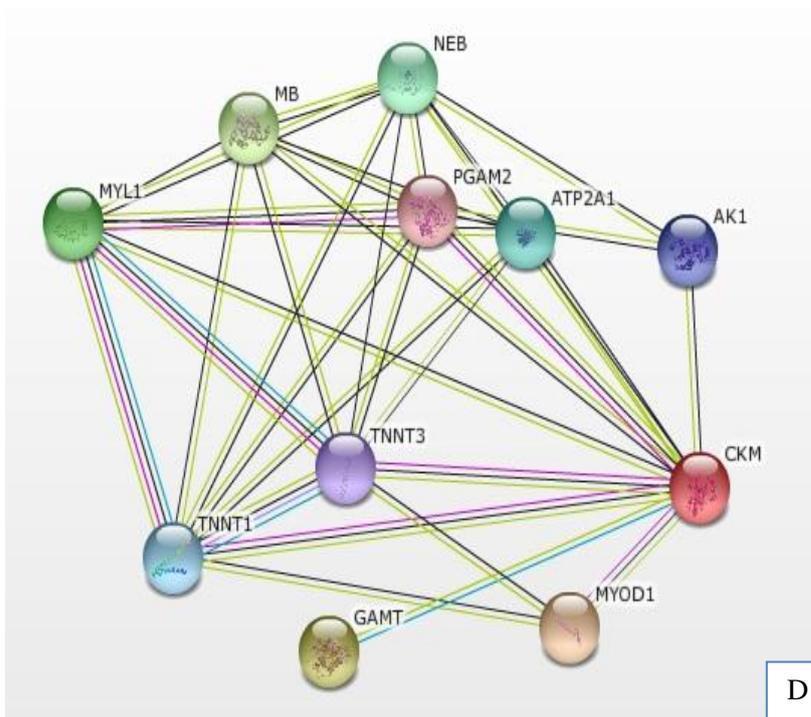
MYH1 e MYH8: isoformas de miosina de cadeia pesada, MYL3: miosina de cadeia leve; TTN: fragmento proteico de conexão; TNNI3, TNNT3, TNNT1: isoformas de Troponina; MYBPC1: miosina de ligação da proteína C; TPM2 e TPM4: isoformas de tropomiosina;



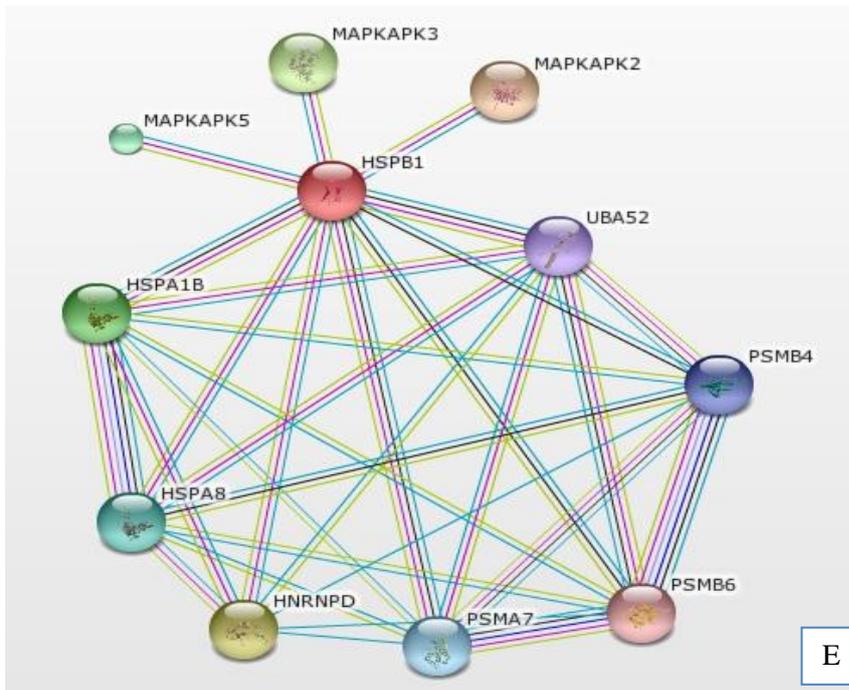
ATP2A1: ATPase de cálcio do retículo endoplasmático; TNNI3, TNNT3 e TNNT1: isoformas de troponina; ACTN2 e ACTC1: isoformas de actina; NEB: fragmento de nebulina; MYL1: miosina de cadeia leve; PKD2: policistina-2 e CNN1: calponina 1.



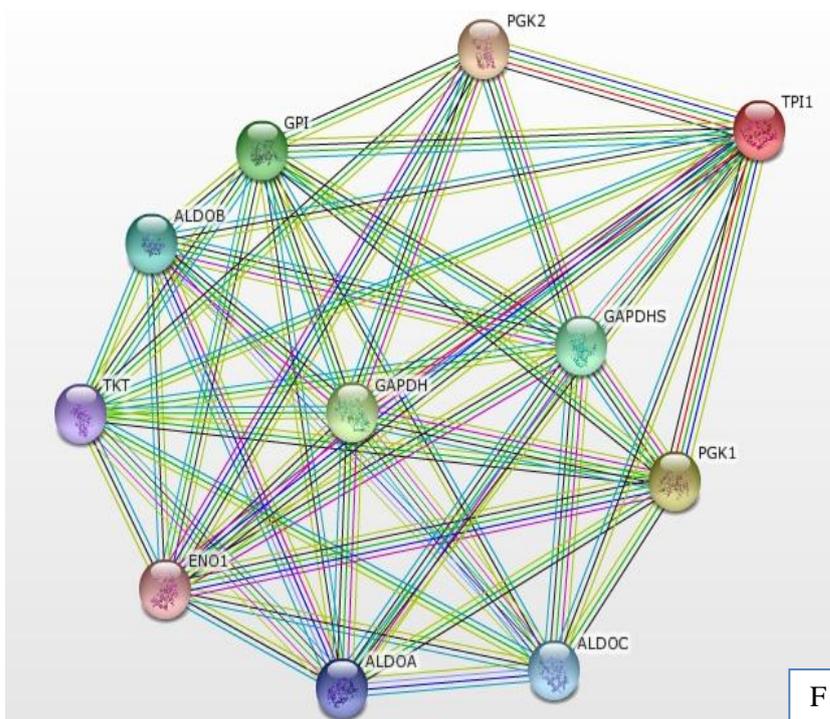
FCGRT: fragmento Fc de Imunoglobulinas; TYR: precursor de tyrosinase; TNF: precursor de necrose tumoral; LEP: precursor de leptina; NOS2: óxido nítrico sintase; FN1: precursor de fibronectina; ALPI: fosfatase alcalina; AHSG: glicoproteína; INS: precursor de insulina e CYCS: citocromo c.



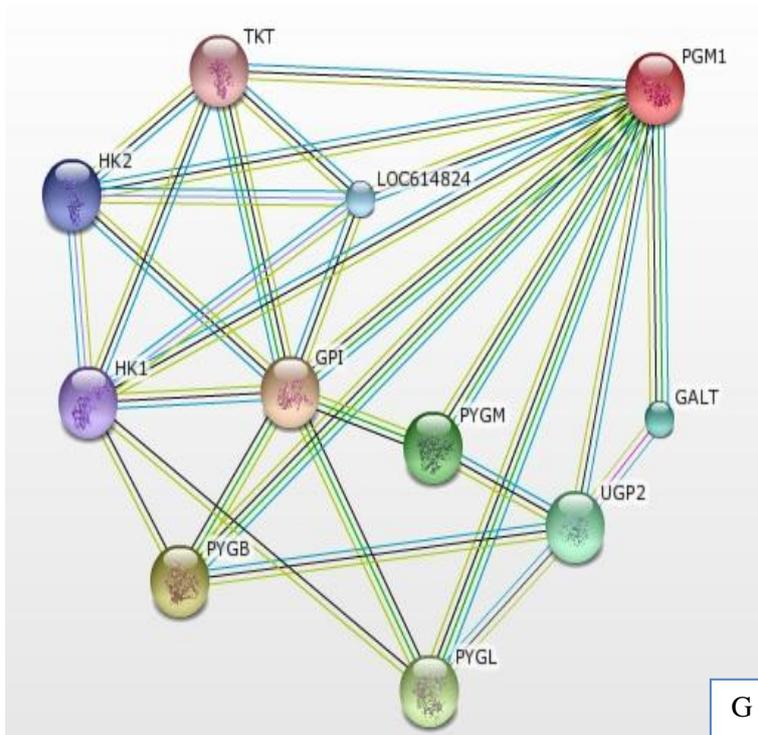
TNNT1, TNNT3: isoformas de troponina; NEB: fragmento de nebulina; MYL1: miosina de cadeia leve; MB: mioglobina; GAMT: guanidinoacetato N-metiltransferase; PGAM2: fosfoglicerato mutase-2; ATP2A1: ATPase de cálcio do retículo endoplasmático; MYOD1: mioblasto e AK1: adenilato.



PSMB4, PSMB6 e PSMA7: isoformas de proteassomas; HNRNPD: proteína de ligação ao RNA; HSPA1B: proteína de choque térmico 70KDa; HSPA8: proteína de choque térmico 71KDa; UBA52: ubiquitin; MAPKAPK2, MAPKAPK3 e MAPKAPK5: isoformas de proteína quinase.



PGK1 e PGK2: isoformas de fosfoglicerato quinase; GAPDHS e GAPDH: isoformas de desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato; ALDOA, ALDOB e ALDOC: isoformas de aldolase; ENO1: alpha enolase; TKT: transcetolase; GPI: glicose 6-fosfato isomerase.



GALT: galactose 1-fosfato; UGP2: UDP-glucose pirofosforilase; PYGM, PYGB e PYGL: isoformas de glicogênio fosforilase; LOC614824: RNA bovinos; TKT: transcetolase; HK1 e HK2: isoformas de hexoquinase e GPI: glicose 6-fosfato isomerase.

Figura 5. Redes de interação interproteica das proteínas que foram diferencialmente expressas no músculo *Longissimus dorsi*, obtidas com base no banco de dados STRING, mostrando as interações no modo evidência (A) Miosina de cadeia leve (MYL1), (B) Tropomiosina α -1 (TPM10), (C) Precursor de albumina (ALB), (D) Creatina quinase tipo-M (CKM), (E) Proteína do choque térmico β -1 (HSPB1), (F) Triosefosfatoisomerase (TPI1) e (G) Fosfoglucomutase-1 (PGM1).

5. DISCUSSÃO

5.1. Peso Corporal

Estudos relacionando suplementação com ganho de peso em ovinos são frequentes e a grande maioria desses estudos mostra que animais suplementados tendem a ter maiores ganhos de pesos, porém, excesso nos níveis energéticos podem ter efeitos negativos sobre a qualidade do sêmen. Desta forma é importante saber qual o nível de suplementação adequado para carneiros da raça Morada Nova.

No presente estudo os animais obtiveram os seguintes pesos corporais aos 300 dias de idade, 27,4, 30,4, 29,5 e 33,5 Kg, suplementados com 0, 0,6, 1,2 e 1,8% do peso corporal de ração concentrada. Resultados semelhantes foram encontrados por Figueiredo et al. (1982) que verificaram que animais das raças Morada Nova e Somalis atingiram peso de abate (23,25 e 22,86 kg) aos 285,40 e 294,05, respectivamente.

VALHO et al. (2006) e DANTAS et al. (2008), trabalhando com cordeiros da raça Santa Inês em pastagem nativa enriquecida com capim buffel, sem suplementação e suplementados com concentrado em 1% e 1,5% PC, observaram que o aumento na suplementação concentrada, em regime de pastejo, proporcionou aumento linear dos pesos ao abate e de carcaça.

5.2. Parâmetros seminais e biometria testicular

A avaliação dos parâmetros seminais e da biometria testicular é fundamental para a seleção de reprodutores ovinos. Diante disso, um dos objetivos do presente estudo é avaliar a influencia de níveis de suplementação sobre os parâmetros seminais e medidas de biometria testicular. As variáveis de parâmetros seminais analisadas foram: concentração espermática, motilidade, motilidade progressiva, vigor, aspecto do sêmen, volume do sêmen, turbilhonamento e morfologia espermática. As medidas de biometria testicular analisadas foram: circunferência escrotal, comprimento, largura, espessura e peso dos testículos.

Os principais métodos de coleta são a vagina artificial e a eletroejaculação (Ott e Menon, 1980). Contudo, a eletroejaculação possui como desvantagem a obtenção de amostras seminais com menor concentração espermática (Marco-Jiménez et al., 2005). Os valores de concentração espermática obtidos no presente trabalho foram semelhantes

aos obtidos por Souza et al. (2003), quando verificaram valores de $1,87 \times 10^9$ spz/ml, em ovinos Santa Inês com 40 semanas de idade e sêmen coletado por vagina artificial e concentração espermática avaliada por espectrofotômetro.

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), os valores recomendados para motilidade e defeitos totais são (MOT > 70% e DT < 20%). No presente estudo os animais que foram suplementados com 1,8% do peso corporal de ração concentrada foram o único grupo de animais que obtiveram valores de motilidade inferiores aos recomendados pelo CBRA, 1998. Já para a variável de defeitos totais, os animais que não receberam suplementação foram o único grupo de animais que obtiveram valores superiores aos recomendados pelo CBRA, 1998, como mostra a tabela 3.

As aferições das medidas testiculares são consideradas importantes uma vez que, quando determinadas em animais jovens, podem fornecer indicação confiável do desempenho reprodutivo do animal adulto (YARNEY e SANFORD, 1993).

Os valores de biometria testicular não sofreram diferença significativa ($P < 0,05$) com relação aos níveis de suplementação fornecidos aos animais. Resultados esses semelhantes aos encontrados por SELAIVE-VILLARROEL et al. (1985) que suplementaram a dieta de carneiros com 1 kg de grãos de aveia/carneiro/dia por dez semanas e também não observaram aumento significativo na circunferência escrotal. No entanto, OLDHAM et al. (1978), alimentando carneiros com dieta com alto teor de proteína (28%) por um período de nove semanas, observaram aumentos de 67% no volume testicular e de 32% no peso corporal, o que indicou a maior susceptibilidade dos testículos a alterações nutricionais. GHERARDI et al. (1980) demonstraram que a melhora da nutrição resultou no aumento dos testículos, e os carneiros foram capazes de acasalar com maior número de fêmeas. THWAITES (1995) observou que a subnutrição levou a uma redução considerável do tamanho testicular. Assim, de um modo geral, evidencia-se que o nível nutricional pode ser um fator limitante no desenvolvimento testicular (MATOS & THOMAS, 1992). MARTIN et al. (1994) observaram que os efeitos das mudanças na dieta sobre o tamanho do testículo de carneiros são causados parcialmente por mudanças na atividade do sistema hipotalâmico controlador da secreção de gonadotrofinas.

Os valores de circunferência escrotal obtidos neste trabalho, $28,0 \pm 0,7$ cm, foram similares aos encontrados por FREITAS et al. (1991), quando compararam a

circunferência escrotal em ovinos das raças Santa Inês e Morada Nova, em diversas faixas etárias, onde observaram valores de 29,0 e 26,2 cm entre 24 e 48 semanas de idade; 30,2 e 28,8 cm entre 48 e 96 semanas; 30,2 e 31,2 cm entre 96 e 144 semanas; e finalmente 31,8 e 33,0 cm em animais com mais de 144 semanas, respectivamente, para as duas raças.

O peso corporal e a idade são as duas maiores fontes de efeitos sobre a CE, devendo ser levados em consideração no momento da seleção dos reprodutores (LÔBO, 1996). A CE está correlacionada positivamente com o peso corporal e a idade (JOBIM *et al.*, 1989; FREITAS *et al.*, 1991; OSINOWO *et al.*, 1992), sendo as correlações entre CE e PC sempre maiores que aquelas entre CE e idade (LÔBO, 1996). Entretanto, esses efeitos são particularmente pronunciados em animais jovens (ODABASIOGLU *et al.*, 1992).

MURRAY *et al.* (1990) encontraram correlações ($r = 0,85$) entre a ingestão de energia e o crescimento testicular em cordeiros Merino. Em animais deslanados, FREITAS & NUNES (1992) observaram diferenças significativas para o valor da CE em animais sem raça definida, criados em sistema semi-intensivo, entre as estações seca e chuvosa, com valores maiores nesta última, refletindo maior abundância de alimentos. Os efeitos da nutrição sobre o desenvolvimento testicular envolvem respostas a curto ou longo prazo (BLACHE *et al.*, 2000). Os efeitos em curto prazo agem principalmente no sistema neuroendócrino que controla a atividade testicular (MARTIN *et al.*, 1994), enquanto aqueles em longo prazo agem sobre o desenvolvimento testicular propriamente dito e produção espermática (OLDHAM *et al.*, 1978).

O valor médio para peso testicular no presente trabalho foi de 252,6g, para os animais experimentais com 10 meses de idade, ou seja, 40 semanas. BIELLI *et al.* (2000), comparando os efeitos da nutrição sobre o desenvolvimento testicular de animais lanados, os valores obtidos para peso testicular variaram de 10 a 41g, em ovinos Corriedale às 25 semanas de idade criados a pasto (BIELLI *et al.*, 2001) e de 130 a 275g para animais com pelo menos 144 semanas de idade, da mesma raça, respectivamente, para animais criados em pastagem nativa ou em pastagem melhorada com suplementação (BIELLI *et al.*, 1999), resultados esses semelhantes aos encontrados no presente trabalho. HOCHEREAUDE-REVIERS *et al.* (1990) obtiveram valores médios para peso testicular de 173 e 255g, respectivamente, para animais das raças Romanov e Ile-de-France, às 72 semanas de vida. Já em cordeiros Suffolk às 24

semanas de vida, WROBEL et al. (1995) encontraram peso testicular de 113g. Estes achados ilustram que o peso testicular apresenta grandes variações em diferentes raças.

5.3. Eletroforese 2-D das proteínas do plasma seminal

A relação entre a nutrição e a capacidade reprodutiva dos machos tem recebido uma especial atenção nos últimos anos, porém o presente trabalho é o primeiro a avaliar os efeitos de níveis de suplementação com ração concentrada sobre as proteínas do plasma seminal em carneiros Morada Nova.

Conforme mostrado anteriormente, os níveis de suplementação não influenciaram a expressão das proteínas do plasma seminal. Foram detectados $174 \pm 11,62$ spots por gel no *match set*, valor este superior ao obtido por Sousa (2010), em géis 2-D das proteínas do plasma seminal de carneiros Morada Nova, com 42 semanas de idade, onde foram detectados $103,3 \pm 18,5$ spots por gel no *match set* e semelhante ao obtido por Fonseca (2013), em géis 2-D das proteínas do plasma seminal de carneiros Morada Nova, com 18 meses de idade, onde foram detectados $178,0 \pm 8,83$ spots por gel no *match set*, porém esse último autor utilizou tiras de 18 cm de comprimento.

5.4. Eletroforese 2-D, Esi-Q-ToF e interação das proteínas do músculo *Longissimus dorsi*

Com o intuito de investigar a influência da nutrição sobre a qualidade da carne de carneiros Morada Nova, decidimos pesquisar o perfil das proteínas do músculo *Longissimus dorsi*, através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Desta forma, o presente trabalho é o primeiro a avaliar o efeito de níveis de suplementação com ração concentrada sobre o perfil de proteínas do músculo *Longissimus dorsi* de carneiros Morada Nova.

Foram detectados $140 \pm 8,73$ spots por gel no *match set*. Kim et. al (2008) e Kim et al. (2009), ao avaliarem o músculo *Longissimus dorsi* de bovinos detectaram aproximadamente 400 spots, no entanto nos dois estudos os géis foram corados por prata, coloração essa mais sensível que o *Comassie Blue Coloidal G250*. Na confecção do mapa das proteínas do músculo esquelético bovino, Bouley et al. (2004) também

detectaram 400 *spots*, contudo a tira utilizada nesse trabalho foi de 18 cm, permitindo assim uma melhor separação das proteínas.

Oito *spots* diferiram de forma significativa ($P < 0,05$), correspondendo a sete proteínas diferentes. As proteínas identificadas com os respectivos valores de massa e pI são ilustradas na Tabela 5 e são: Myosin Light Chain (MYL1), Tropomyosin alpha-1 (TPM1), Heat Shock-1 (HSPB1), Serum albumin precursor (ALB), Phosphoglucomutase-1 (PGM1), Triosephosphate isomerase (TPI1) e Creatine kinase M-Type (CKM).

A miosina corresponde a 54% das proteínas miofibrilares. É constituída por duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves e é concomitantemente uma proteína estrutural e uma enzima. Sendo responsável pela atividade ATPase (DUBOWITZ, 1985). Hoh (1975) foi o primeiro pesquisador a identificar essa proteína em sua forma nativa pelo método de Eletroforese em gel de poliacrilamida. Posteriormente foram identificadas por 2-D diferentes isoformas das cadeias leves e pesadas da molécula de miosina, exibindo pesos moleculares que variavam entre 16 e 27 kDa., para as cadeias leves, e entre 200 kDa e 204 kDa para as cadeias pesadas (BARANY; BARANY; GIOMETTI, 1995). Shinshkin, Kovalyov e Kovalyova (2004), em sua revisão sobre estudos proteômicos de proteínas musculares, afirmam que as cadeias pesadas de miosina possuem mais de 6 genes, que codificam cerca de 10 isoformas e se organizam em dímeros espiralados, formando o filamento espesso de miosina. Enquanto as cadeias leves de miosina, encontradas nas extremidades das cadeias pesadas, possuem mais de 5 genes codificando cerca de 7 isoformas, subdivididas em cadeias leves essenciais e regulatórias. A miosina de cadeia leve-1 desempenha um papel de ajuste na atividade motora da miosina, adicionando versatilidade a sua cinética enzimática (CHOI; KIM, 2009). A habilidade da molécula de miosina em cumprir as diferentes necessidades funcionais necessárias reside na existência de múltiplas isoformas de MHC e MLC. Isoformas são proteínas muito similares, com ligeiras alterações em suas sequencias de aminoácidos, capazes de substituir umas as outras com pequenas diferenças estruturais e funcionais (REGGIANI; BOTTINELLI; STIENEN, 2000).

A tropomiosina-1 tem a função de estabilizar o filamento de actina e posicionar a molécula de troponina, sensível ao cálcio, em relação ao filamento de actina, durante a interação actinmiosina. É uma molécula de dupla hélice correspondendo a uma

sequência de 284 aminoácidos (DUBOWITZ, 1985). Os vertebrados têm pelo menos quatro genes para tropomiosina, que são nomeados TPM1, TPM2, TPM3 e TPM4. A TPM1 codifica a alfa-tropomiosina rápida e a TPM3 relaciona-se à alfa-tropomiosina lenta e a TPM2 codifica a beta-tropomiosina). A dupla hélice da tropomiosina é formada por uma isoforma alfa e uma isoforma beta, e reage com sete moléculas de actina. A expressão das isoformas de tropomiosina é diferente nos tipos de fibras musculares: nas fibras musculares de contração lenta, há a isoforma alfa-tropomiosina lenta e a beta-tropomiosina; nas fibras de contração rápida, encontram-se as isoformas alfa-tropomiosina rápida e beta-tropomiosina. Mutações nos genes TPM3 e TPM2 estão relacionadas com a miopatia nemalínica (LAING *et al.*, 1995; MICHELE *et al.*, 1999; TAN *et al.*, 1999). A tropomiosina juntamente com a actina e a troponina formam os filamentos finos, que durante a interação com os filamentos espessos de miosina também são responsáveis pelo processo de contração muscular. No músculo esquelético a tropomiosina é formada por duas subunidades, classificadas em forma α (rápida) e a β (lenta). Após separação em eletroforese SDS-PAGE, foi visto que a forma α apresenta uma isoforma nas fibras de contração rápida e outra isoforma nas fibras de contração lenta, enquanto a forma β é a mesma entre ambos os tipos de fibra. Todas apresentam um peso molecular de aproximadamente 33 kDa e pI entre 5.25 e 5.30 (BARANY; BARANY; GIOMETTI, 1995).

A creatina quinase tipo-M catalisa reversivelmente a transferência de fosfato e de ATP entre vários compostos que contém fósforo (por exemplo, fosfato de creatina). Isoenzimas creatina quinase desempenham um papel central na transdução de energia em tecidos com grandes flutuações da procura de energia, como o músculo esquelético, coração, cérebro e espermatozoides. De acordo com o banco de dados do STRING, a CKM interage com isoformas de troponina, ATPases de cálcio do retículo endoplasmático, mioblasto e como foi mostrado na Figura 4, interage também com a miosina de cadeia leve.

A albumina do soro é a principal proteína do plasma, tem uma boa capacidade de ligação de água, Ca, Na, K, ácidos gordos, hormônios, bilirrubina e drogas. Sua principal função é a regulação da pressão osmótica coloidal de sangue. A ALB é a maior transportadora de zinco no plasma, liga-se tipicamente cerca de 80% de todo o zinco no plasma. Segundo o banco de dados do STRING, a ALB interage com fragmentos de Imunoglobulinas, precursor de tyrosinase, que é uma oxidase que

funciona na formação de pigmentos, precursor de leptina, óxido nítrico sintase, que produz óxido nítrico, que é uma molécula mensageira com diversas funções em todo o corpo, precursor de fibronectina, que estão envolvidas na adesão celular, motilidade celular, cicatrização de feridas e manutenção da forma da célula, glicoproteínas com afinidade por íons de cálcio e bário, precursor de insulina, que diminui a concentração de glicose no sangue e citocromo c que é uma proteína transportadora de elétrons.

A fosfoglucomutase-1 é uma enzima que participa tanto da quebra como da síntese de glicose. Esta proteína transfere um grupo fosfato de um monômero de glicose a partir de posição 1 'a 6' na direção para a frente ou na posição 6 'e 1' na direção inversa. Possui função biológica na glicogenólise e na glicogênese. Segundo o banco de dados do STRING, a PGM1 interage com isoformas de glicogênio fosforilase e isoformas de hexoquinase, dentre outras.

A triosefosfatoisomerase (TPI1) é uma enzima, pertencente à classe das isomerases e sub-classe das oxidoredutases intramoleculares (Knowles 1991). A TPI apresenta-se em sua forma ativa como homodímero, sendo responsável pela conversão reversível de diidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato. Esta reação está relacionada com importantes vias metabólicas, como glicólise, gliconeogênese e síntese de ácidos graxos, responsáveis principalmente pela produção de energia (Meyerhof & Beck 1944; Knowles 1991). O monômero da enzima apresenta cerca de 250 resíduos de aminoácidos e uma estrutura secundária composta de 8 regiões de cadeia beta e 8 regiões de alfa hélice, que determinam uma estrutura terciária em forma de barril ($\beta\alpha$)₈. A estrutura é altamente conservada em vários organismos, desde bactérias até eucariotos superiores, apesar de ocorrerem algumas diferenças consideráveis na sequência de aminoácidos (Jiménez et al. 2000).

A proteína do choque térmico β -1, 27 kDa, é conhecida pelas funções de proteção e organização celular. Pertence a família das 'Hsps' e é denominada *heat shock beta 1*. A HSPB1 age na organização do sistema de miofilamentos de actina e é uma proteína envolvida na resistência ao estresse e à organização de actina. Em alguns estudos ela foi encontrada em maior quantidade nos grupos de menor força de cisalhamento (Creagh et al., 2000; Fischer et al., 2002; Carvalho, 2012). As informações obtidas a partir do banco de dados do STRING, mostraram que a HSPB1 interage com proteassomas, que são complexos de proteinases multicatalíticas que se

caracterizam pela sua capacidade de clivar peptídeos, possuem uma atividade proteolítica dependente de ATP. A HSPB1 interage também com proteínas de choque térmico 70 KDa, que são proteínas também envolvidas nas sequências de danos induzidas por estresse.

É importante salientar que para maciez, inúmeros marcadores podem ser identificados, mas são muitas vezes específicos para um tipo de animal (adulto ou jovem) de uma raça ou de condições ambientais (HOCQUETTE et al., 2007) e até mesmo para um determinado músculo (GUILLEMIN et al., 2011a).

6. CONCLUSÃO

Quando bem manejados e alimentados com um pasto de boa qualidade nutricional, os carneiros de raças nativas, como a raça Morada Nova, mostram-se bem adaptados às condições da região Nordeste, sofrendo pouca influência da suplementação sobre a qualidade do sêmen. Tanto os animais que se alimentaram apenas com volumoso como os animais que tiveram uma dieta com a relação volumoso:concentrado de 50:50 produziram sêmen de boa qualidade.

No presente estudo, os resultados mostram que a dieta influenciou na expressão de proteínas do músculo *Longissimus dorsi*. Esses resultados irão favorecer as pesquisas futuras, aumentando as possibilidades de traçarem um perfil de algumas proteínas, para assim identificarem amostras que proporcionem carne de maior maciez em ovinos da raça Morada Nova, que é uma das raças mais criadas no Nordeste do Brasil.

REFERÊNCIAS

- ADAM C.L, FINDLAY P.A, KYLE C.E, YOUNG P, MERCER J.G. Effect of chronic food restriction on pulsatile luteinizing hormone secretion and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in castrate male sheep. **Journal Endocrinology**, v.152,p.329–337.1997.
- AMANN R.P. & HAMMERSTEDT R.H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v.14, p.397-406, 1993.
- ARAÚJO FILHO, J.T; COSTA, R.G; FRAGA, A.B; SOUZA, W.H; CEZAR, M.F; BATISTA, A.S.M. Desempenho e composição da carcaça de cordeiros deslançados terminados em confinamento com diferentes dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p.363-371, 2010.
- AURICH, J.E.; HOPPE, H. Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p.791-797, 1996.
- AYYAGARI RR, FAZLEABAS AT, DAWOOD MY. Seminal plasma proteins of fertile and infertile men analyzed by two-dimensional electrophoresis. **Am J Obstet Gynecol**, v.157, p.1528-33, 1987.
- BAAS J.W. et al. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.68, p.275-280, 1983.
- BADGER T.M., LYNCH E.A, FOX P.H. Effects of fasting on luteinizing hormone dynamics in the male rat. **Journal Nutrition**, v.115.p.788–797.1985.
- BÁRÁNY, K.; BÁRÁNY, M.; GIOMETTI, C. S. Polyacrilamide gel electrophoretic methods in separation of structural muscle proteins. **Journal of Chromatography A**. v. 698, p. 301-32, 1995.
- BARRIOS, B.; PEREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑOBLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1531-1537, 2000.

BELLIN ME, OYARZO JN, HAWKINS HE, ZHANG H, SMITH RG, FORREST DW, SPROTT LR, AX RL. Fertility associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **J Anim Sci**, v.76, p.2032-2039, 1998.

BIANCHINI, D.; CARRIEL, J.M.; LEINZ, F.F. et al. Viabilidade de doze capins tropicais para a criação de ovinos. **Boletim de Indústria Animal**, v.56, n.2, p.163-167, 1999.

BIELLI, A. *et al.* Influence of pre- and postpubertal grazing regimes on adult testicular morphology in extensively reared Corriedale rams. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.73-86, 2000.

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

BIELLI, A. Testicular morphology in Corriedale rams: Influence of feeding management under extensive rearing conditions in the Rio de la Plata grasslands. (Doctoral Thesis) – Department of Anatomy and Histology. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 1999. 43 p.

BLACHE, D. *et al.* Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.120, p.1-11, 2000.

BJARNADÓTTIR, S. G., HOLLUNG, K., FÆRGESTAD, E. M. E VEISETH – KENT, E. Proteome Changes in Bovine Longissimus Thoracis Muscle during the First 48 h Postmortem: Shifts in Energy Status and Myofibrillar Stability. **J. Agric. Food Chem.** 58, 7408–7414. 2010.

BOULEY, J., CHAMBON, C., & PICARD, B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, 4, 1811–1824. 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Anal Biochem**, v.72, 248–254, 1976.

BRANDON, C. I.; HEUSNER, G. L.; CAUDLE, A. B.; FAYRER-HOUKEN, R. A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52, . 5, p. 863. 1999.

BROCKS, L., HULSEGG, B., & MERKUS, G. Histochemical characteristics in relation to meat quality properties in the Longissimus lumborum of fast and lean growing lines of large white pigs. **Meat Science**, 50(4), 411–420. 1998.

CAGAMPANG F.R.A, MAEDA K-I, YOKOYAMA A, ÔTA K. Effect of food deprivation on the pulsatile LH release in the cycling and ovariectomized female rat. *Hormone Metabolism Research*, v.22,p.269–272. 1990.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Relação entre o espectrofotômetro e a câmara de Neubauer na determinação da concentração espermática do sêmen canino. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UECE, 6, 1997, Fortaleza-Ce. **Anais**. Fortaleza, Ce : Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 1997. V.1. 472p. p.284.

CARVALHO, M.E.; Estudo de genes associados com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. 1998.

CHOI, Y. M.; KIM, B. C. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. **Livestock Science**. v. 122, p. 105-118, 2009.

COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France II-étude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. **Reproduction Nutrition and Development**, Paris, v. 20, n. 6, p. 1789-1799, 1980.

CREAGH, E.M.; SHEEHAN, D.; COTTER, T.E. Heat shock proteins modulators of apoptosis in tumor cells. *Leukemia*, London, v. 14, p. 1161-1173, 2000.

CUNHA, E. A.; SANTOS. L. E., BUENO; M.S. et al. Sistema intensivo de produção ovina, Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1999. 22p.

DA SILVA, P.; AITKEN, R.P.; RHIND, S.M.; RACEY, P.A.; WALLACE, J.M. Effect of maternal overnutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and gonadal morphology in female and male foetal sheep at day 103 of gestation. *Placenta*, v.24, p.248–257, 2001.

DOHERTY, M. K.; MCLEAN, L.; HAYTER, J. R.; PRATT, J. M.; ROBERTSON, D. H. L.; EL-SHAFEI, A.; GASKELL, S. J. AND BEYNON, R. J. The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. *Proteomics*, 4, 2082–2093. 2004.

DRANSFIELD, E. Modeling postmortem tenderization. IV - Role of calpain and calpastatin in conditioning. *Meat Science*, v. 34, n. 2, p. 217- 234, 1993.

DUBOWITZ, V. *Muscle Biopsy A Practical Approach*. 2. ed.. London; Bailliere Tindall, 1985. pp.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **The physiology of reproduction**. cap. 2, p. 29-77. New York: Raven Press. 1994.

EUCLIDES, V. P. B. Estratégias de suplementação em pasto: uma visão crítica. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 2002, Viçosa, MG. **Anais**. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa, 2002. p. 437-469.

EVANS, G. & MAXWELL, W.M.A. Salamon's artificial insemination of sheep of goats. Sydney, **Butterworths**, 1987. 194 p.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Semen y sus características. Inseminación artificial de ovejas y cabras. **Zaragoza**: Editorial Acribia, 191p., 1990.

FIEMS, L. O., HOOF, J. V., UYTTERHAEGEN, L., BOUCQUE, C. V., & DEMEYER, D. Comparative quality of meat from double-musled and normal beef cattle. In A. Ouali, D. Demeyer, & F. Smulders (Eds.), *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality* (pp. 381–391). Utrecht: ECCEAMST Series. 1995.

FISCHER, D.; MATTEN, J.; REIMANN, J. BONNEMANN, C.; SCHRODER, R. Expression, localization and functional divergence of alpha-B-crystallin and heat- shock

protein 27 in core myopathies and neurogenic atrophy. *Acta Neuropathologica*, Berlin, v. 101, p. 297-302, 2002.

FLORES, J.; BERMELL, S. Propriedades funcionales de las proteínas miofibrilares: capacidad de retención de água. **Revista de Agroquímica e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.2, p.151-158, 1984.

FLOWERS, W. L. New ideas on boar and sow fertility examined. **Feedstuffs**, v.12, n.3, p.19-23, 1998.

FONSECA, L. S. Desempenho, consumo de matéria seca, parâmetros seminais e proteômica do plasma seminal e da membrana espermática de carneiros Morada Nova alimentados com dieta à base de castanha de caju. 2013. 65p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

FOSTER D.L, OLSTER D.H. Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb: patterns of tonic luteinizing hormone (LH) secretion and competency of the LH surge system. *Endocrinology*, v.116,p.375–381.1985.

FRAZER GS, BUCCI DM. Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by twodimensional polyacrilamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v.46, p.1389-1402, 1996.

FREITAS, V.J.F.; NUNES, J.F. Parâmetros andrológicos e seminais de carneiros deslanados criados na região litorânea do Nordeste brasileiro em estação seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.16, n.3-4, p.95-104, 1992.

GARCIA, A. R. O uso das sondas fluorescentes na avaliação morfofuncional de espermatozoides bovinos. In: Congresso norte/nordeste de reprodução animal. 3. Belém. **Anais**. Pará: CBRA. 2006. CR-ROM.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*, Malone: Barueri, ed. 7, cap. 7, p. 97-110, 2004.

GETTY, R. Anatomia dos animais domésticos. **Guanabara Koogan**. vol. 2. 2000.

GHERARDI, P.B.; LINDSAY, D.R.; OLDHAM, C.M. Testicular size in rams and flock fertility. **Animal Production Australia**, v.13, p. 48-50, 1980.

GOLL, D. E., HENDERSON, D. W., & KLINE, E. A. Postmortem changes in physical and chemical properties of bovine muscle. **Journal of Food Science**, 29 (5), 590–596. 1964.

GOLL, D.E.; TAYLOR, R.G.; CHRISTIANSEN, J.A. Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. In: ANNUAL MEAT CONFERENCE, 44., 1992, Chicago. Proceedings. Chicago: National Livestock and Meat Board, 1992. p. 25-36.

GUILLEMIN, N.; CASSAR-MALEK, I.; HOCQUETTE, J.F.; RENAND, E.; PICARD, B. Variations in the abundance of 24 proteins biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal tipe. *Animal*, New York, v. 5, p. 885-894, 2011a.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed., São Paulo: Manole, 2003. 530 p.

HAMELIN, M., SAYD, T., CHAMBON, C., BOUIX, J., BIBE, B., MILENKOVIC, D., ET AL. Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy. **Journal of Animal Science**, 84, 3266–3276. 2006.

HENAULT, M.A., KILLIAN, G.J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, v.108, p.199-204, 1996.

HILDRUM, K. I., SOLVANG, M., NILSEN, B. N., FRØYSTEIN, T., & BERG, J. Combined effects of chilling rate, low voltage electrical stimulation and freezing on sensory properties of bovine *M. longissimus dorsi*. **Meat Science**, 52(1), 1–7. 1999.

HOCHEREAU-de-REVIERS, M.T. *et al.* Comparisons of endocrinological and testis parameters in 18-month-old Ile-de-France and Romanov rams. **Domestic Animal Endocrinology**, v.7, n.1, p.63-73, 1990.

HOCQUETTE, J.F.; LEHNERT, S.; BARENDSE, W.; CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal*, New York, v. 1, p. 159-173, 2007.

HOH, F. Y. Neural regulation of mammalian fast and slow muscle myosins. Electrophoretic analysis. **Biochemistry**, v. 14, n. 4, p. 742–747, 1975.

HOLLUNG, K., VEISETH, E., JIA, X., FRGESTAD, E. M., & HILDRUM, K. I. Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. **Meat Science**, 77, 97–104. 2007.

JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

JIA, X., HILDRUM, K. I., WESTAD, F., KUMMEN, E., AASS, L. E HOLLUNG, K. Changes in Enzymes Associated with Energy Metabolism during the Early *Post Mortem* Period in Longissimus Thoracis Bovine Muscle Analyzed by Proteomics. **Journal of Proteome Research**, 5, 1763-1769. 2006a.

JIA, X., HOLLUNG, K., THERKILDSEN, M., HILDRUM, K. I. E BENDIXEN, E. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and M. semitendinosus. **Proteomics**, 6, 936–944. 2006b.

JIA, X., EKMAN, M., GROVE, H., FÆRGESTAD, E. M., AASS, L., HILDRUM, K. I. E HOLLUNG, K. Proteome Changes in Bovine Longissimus Thoracis Muscle During the Early Postmortem Storage Period. **Journal of Proteome Research**, 6, 2720-2731, 2007.

JIMÉNEZ L, Vibanco-Pérez N, Navarro L, Landa A 2000. Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *Int J Parasitol* 30:1007-1012.

JOBIM, M.J.M. *et al.* Biometria testicular em ovinos de raças de corte. I. Reprodutores racionados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.13 (Supl.4), p.247-254, 1989.

KILLIAN GJ, CHAPMAN DA, ROGOWSKI L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol Reprod**, v.49, p1202-7, 1993.

KNOWLES JR 1991. Enzyme catalysis: not different, just better. **Nature** 350:121-124.

KOOHMARAIE, M. Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness. In: **RECIPROCAL MEAT CONFERENCE**, 45.,

1992, Knoxville. Proceedings. Knoxville: American Meat Science Association, 1992. p. 63-71.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 36, n. 3, p. 93-104, 1994.

LAINING, N.G.; WILTON, S.D.; AKKARI, P.A.; DOROSZ, S.; BOUNDY, K.; KNEEBONE, C.; BLUMBERGS, P.; WHITE, S.; WATKINS, H.; LOVE, D.R.; HAAN, E. A Mutation in the alfa-tropomiosin gene TPM3 associated with autosomal dominant nemaline myopathy. **Nat Genet**, v. 9, p. 75-79, 1995.

LAMETSCH, R., & BENDIXEN, E. Proteome analysis applied to meat science: characterizing postmortem changes in porcine muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(10), 4531–4537. 2001.

LAMETSCH, R., ROEPSTORFF, P., & BENDIXEN, E. Identification of protein degradation during postmortem storage of pig meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(20), 5508–5512. 2002.

LAMETSCH, R., KARLSSON, A., ROSENVOLD, K., ANDERSEN, H. J., ROEPSTORFF, P., & BENDIXEN, E. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(24), 6992–6997. 2003.

LAWRIE, R. A. The eating quality of meat. In *Meat Science*, 6th ed.; Woodhead Publishing: Cambridge, England; pp 212-254, 1998.

LÔBO, R.N.B.; MARTINS FILHO, R.; FERNANDES, A.A.O. Correlações entre o desenvolvimento da circunferência escrotal e características de crescimento em ovinos da raça Morada Nova. **In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. REUNIÃO ANUAL**, 33, 1996, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1996, p. 151-153.

LUCHIARI FILHO, A. *Pecuária da carne bovina*. São Paulo: Luchiari Filho, 2000. 135p.

MALTIN, C. A. et al. Factors influencing beef eating quality 2. Effects of nutritional regimen and genotype on muscle fibre characteristics. **Animal Science**, v. 72, p. 279-287, 2001.

MARTIN, G.B.; TJONDRONEGORO, S.; BLACKBERRY, M.A. Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotrophins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p.121-128, 1994.

MARTIN, L.C. *et al.* Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 4006-4017, 1992.

MATOS, C.A.P.; THOMAS, D.L. Physiology and genetics of testicular size in sheep: a review. **Livestock Production Science**, v. 32, p. 1-30, 1992.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-65, 1996.

MEDEIROS, A. A. Utilização do azul de bromofenol como método de coloração vital para avaliação da morfologia do espermatozoide ovino. Fortaleza, 2004. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, 2004.

MEYERHOF O, Beck LV 1944. Triosephosphate isomerase. **J Biol Chem** 156:109-120.

MICHELE, D.E.; ALBAYYA, F.P.; METZGER, J.M. A nemaline myopathy mutation in alfa-tropomyosin causes defective regulation of striated muscle force production. **J Clin Invest**, v. 104, p. 1575-1581, 1999.

MIES FILHO, A. Inseminação Artificial. 6 a edição. Porto Alegre: **Sulina**, 1987. 750p.

MILLER.D.W, HARRISON.J.L., BENNETT.E.J, FINDLAY.P.A, CLARE.A.L. Nutritional Influences on Reproductive Neuroendocrine Output: Insulin, Leptin, and Orexigenic Neuropeptide Signaling in the Ovine Hypothalamus. **Endocrinology**. v. 148(11), p.5313–5322, 2007.

MONIN, G., LAMBOOY, E., & KLONT, R. Influence of temperature variation on the metabolism of pig muscle in situ and after exercise. **Meat Science**, 40(2), 149–158. 1995.

MOREAU R, MANJUNATH P. Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins. **Bioch Bioph Acta**, v.1438, p.175-184, 1999.

MORZEL, M., CHAMBON, C., HAMELIN, M., Santé -Lhoutellier, T., Sayd, T., & Monin, G. Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. **Meat Science**, 67(4), 689–696. 2004.

MOURA A.A. et al. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididimal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.214-222, 2006a.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN GJ. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.27, p.201–211, 2006a.

MURRAY, P.J. *et al.* The effect of nutrition on testicular growth in the Merino ram. **Australian Journal Agricultural Research**, v.41, p. 185-195, 1990.

NAABY-HANSE, S.; FLICKINGER, C.J.; HERR, J.C.; Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.56, p.771-87, 1997.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL- NRC. **Nutrient requirements of small ruminants**, New York: National Academy of Sciences, 2007, 362 p.

NOTTER, D.R.; LUCAS, J.R.; McCLAUGHERTY, F. S. Accuracy of estimation of testis weight from in situ testis measures in ram lambs. **Theriogenology**, v. 15, n. 3, p.227-234, 1981.

OCKERMAN, H. W. et al. Castration and sires effects on carcass traits, meat palatability and muscle fiber characteristics in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v.59, n.4, p.981-990, 1984.

ODABASIOGLU, F.; KARACA, O.; ALTIN, T. Some testis characters in Red Karaman yearlings and adults. **Veteriner Fakultesi Dergisi**, Selcuk Univeristesi, Turkey, v. 8, p. 32- 33, 1992.

OLDHAM, C.M.; ADAMS, N.R.; GHERARDI, P.B.; LINDSAY, D.R.; MACKINTOSH, J.B. The influence of level o feed intake on sperm-producing capacity of testicular tissue in the ram. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, p.173-179, 1978.

OSINOWO, O.A.; MARIRE, B.N.; EKPE, G.A. Preliminary study of postnatal growth and reproductive tract development in Yankasa rams. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 27, p. 49-54, 1992.

OYEYEMI.M.O, ADETUNJI.V.O, OYEBANJI OLUBUKOLA.O. Effects of different planes of meat offals and soybean meal on the morphological characteristics of West African dwarf buck's spermogram. **Veterinarski Arhiv**, v. 76 (2), p.159-165, 2006.

PEARSON, A.M.; YOUNG, R.B. Skeletal muscle fibers. In: PEARSON, A.H.; YOUNG, R.B. *Muscle and meat biochemistry*. San Diego: **Academic Press**, 1989. p.235-265.

PENÃ, A. Supervivencia y Fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación, 1997. 329 f. Tesis – Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Espana.

PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, A. Sperm washing method alters the hability of seminal plasma proteins to revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *International Journal of Andrology*, **Zaragoza**, v. 24, p. 352-359. 2001.

POMPEU, R. C. F. F. Morfofisiologia do dossel e desempenho bioeconômico de ovinos em capim Tanzânia sob lotação rotativa com quatro níveis de suplementação concentrada. Fortaleza : UFC, 2006. 82p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal do Ceará, 2006.

REGGIANI, C.; BOTTINELLI, R.; STIENEN, G. J. M. Sarcomeric myosin isoforms: fine tuning of a molecular motor. **News Physiol. Sci.** v.15, p. 26-33, 2000.

REGO J.P.A. et al. Reproductive criteria of tropically-adapted Morada Nova Rams from Brazil. In: **Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction**, 43, 2010, Portland, OR. Madison, WI: SSR, 2010.

RENAND, G. et al. Relationship between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. **Meat Science**, v. 59, p. 49-60, 2001.

ROCHA, S. L. G. et al. Crotalid Snake Venom Subproteomes Unraveled by the Antiophidic Protein DM43. **Journal of Proteome Research**, v.8, p.2351–2360, 2009.

RODRIGUES, M. A. M. et al. Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility in Santa Ines rams. **Small Ruminant Research**, v. 109, n. 2–3, p. 94-100, 2013.

RONCOLETTA, M.; FRANCHESCHINI, P. H.; LIMA, V.F.M.H. et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal, e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. **Arquivos de Veterinária**, v.13, n.2, p. 135-140, 1997.

RONCOLETTA, M. Perfil em SDS-PAGE das proteínas de espermatozóides e plasma seminal relacionados com a congelabilidade de sêmen de touros. 1999. 109p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 1999.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C.; FRANCESCHINI, P.H.; RAMOS, P.R.R. Caracterização da proteínas 26kDa no plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRRS**, Porto Alegre, v.28,n.1, p.323, 2000.

RONCOLETTA M, MORANI ESC, ESPER CR, BARNABE VH, FRANCESCHINI PH. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. **Anim Reprod Sci**, v.91, p.77-87, 2006.

SCANGA, J. A., BELK, K. E., TATUM, J. D., GRANDIN, T., & SMITH, G. C. Factors contributing to the incidence of dark cutting beef. **Journal of Animal Science**, 76(8), 2040–2047. 1998.

SCHÖNECH, C., BRAUN, J., EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSPF: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, Amsterdam v.45, p.633-642, 1996.

SELAIVE-VILLARROEL, A.B.; MIES FILHO, A.; JOBIM, M.I.M. Estudo sobre produção de sêmen em carneiros. 2) Efeito da suplementação alimentar pré-acasalamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 9, n. 4, p. 181-190, 1985.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos. São Paulo, SP: **Varela**, 1996. p. 517.

SHABANOWITZ RB, KILLIAN GJ. Two-dimensional electrophoresis of proteins in principal cells, spermatozoa, and fluid associated with the rat epididymis. **Biol Reprod**, v.36, p.753-68, 1987.

SHISHKIN, S. S.; KOVALYOV, L. I.; KOVALYOVA, M. A. Proteomic studies of human and other vertebrate muscle protein. *Biochemistry (Moscow)*. v. 69, n. 11, p. 1283-1298, 2004.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D. C.e. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freeze and thaw process. **Theriogenology**, v. 59, p. 821-29, 2003.

SILVA SOBRINHO, A.G.; GONZAGA NETO, S. Produção de carne caprina e cortes da carcaça. 2004.

SILVA SOBRINHO, A.G.; PURCHAS, R.W.; KADIM, I.T.; YAMOTO, M.S.; Características de Qualidade da Carne de Ovinos de Diferentes Genótipos e Idades ao Abate. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p. 1070-1078, 2005.

SORRIBAS, C. E. Reproduccion em los animales pequeños. Buenos Aires: **Intermédica**, 1995, 152 p.

SOUSA, F. M. L. Estudo das características do aparelho reprodutivo, epitélio seminífero e mapas eletroforéticos bidimensionais do plasma seminal de carneiros Morada Nova. 2010. 92p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

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

SOUZA, C. E. et al. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. ***Journal of Proteomics***, v. 75, n. 14, p. 4436-56, Jul 19 2012.

SOUZA, F. F. Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino. 2003. 98 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SPROTT, L.R. et al. Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. ***Journal of Animal Science***, Savoy, v.78, p.795-798, 2000.

TAN, P.; BRINER, J.; BOLTSHAUSER, E.; DAVIS, M.R.; WILTON, S.D.; NORTH, K.; WALLGREN-PETTERSSON, C.; LAING, N.G. Homozygosity for a nonsense mutation in the alfa-tropomyosin slow gene TPM3 in a patient with severe infantile nemaline myopathy. *Neuromusc Disord*,v. 9, p. 573-579, 1999.

TAYLOR, R. G., & KOOHMARAIE, M. Effects of postmortem storage on the ultrastructure of the endomysium and myofibrils in normal and callipyge longissimus. ***Journal of Animal Science***, 76(11), 2811–2817. 1998.

THOMAS G.B, MERCER J.E, KARALIS T, RAO A, CUMMINS JT, CLARKE IJ. Effect of restricted feeding on the concentrations of growth hormone (GH), gonadotropins, and prolactin (PRL) in plasma, and on the amounts of messenger ribonucleic acid for GH, gonadotropin subunits, and PRL in the pituitary glands of adult ovariectomized ewes. *Endocrinology*, v.126,p.1361–1367.1990.

THWAITES, C.J. The comparative effects of undernutrition, exercise and frequency of ejaculation on the size and tone of the testes and on semen quality in the ram. ***Animal Reproduction Science***, v. 37, p. 299-309, 1995.

TÖPFER-PETERSEN E. et al. Oocyte–sperm interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 653-662, 2000.

TULSIANI, D.R. P.; YOSHIDA-KOMIYA, H., ARAKI, Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. **Biology of Reproduction**, v.57, p.487-94, 1997.

VAN TILBURG, M. F. et al. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams, **Theriogenology**, v. 79, p. 1247-1261, 2013.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. *Carne y productos cárnicos: tecnología, química y microbiología*. Zaragoza: Acribia, 1998. 423 p.

VARRICCHIO, E., LANGELLA, M., MAHARAJAN, V., PAINO, G. Structure and function of the mammalian epididymis. **Acta Med Vet**, v.42, p.221-34, 1996.

WROBEL, K.H.; REICHOLD, J.; SCHIMMEL, M. Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. **Annals of Anatomy**, v.177, p.1-14, 1995.

WHITE, I.G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. (Eds.). *Reprodução animal*. 4^a.ed. São Paulo: Manole, , p.212-28. 1988.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, Cambridge, v.3, p.371-372, 1994.

ANEXO

Tabela 5. Identificação das proteínas que diferiram significativamente no músculo *Longissimus dorsi* de carneiros da raça Morada Nova submetidos a níveis crescentes de suplementação com ração concentrada. Os *spots* numerados referem-se aos *spots* mostrados na Figura 2

Protein	Experimental ¹ kDa/pI	NCBI accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Matched peptides	Ion score	m/z	z
Myosin Light Chain [Ovis Aires]								
Spot 1	19.34/4.94	426221484	480	53	⁽⁹⁾ K.KPAAAAAPAPAPAPAPAPAPAPPK.E ⁽³²⁾	49	1.397.1094	3
					⁽⁹⁾ K.KPAAAAAPAPAPAPAPAPAPAPPKEEK.I ⁽³⁵⁾	84	1.861.5122	4
					⁽⁹⁾ K.KPAAAAAPAPAPAPAPAPAPAPPKEEK.I ⁽³⁵⁾	47	1.654.5664	3
					³⁶⁾ K.IDLSAIK.I ⁽⁴²⁾	31	378.2116	2
					⁵⁵⁾ K.EAFLLYDR.T ⁽⁶²⁾	57	511.7515	2
					⁽⁶⁸⁾ K.ITLSQVGDVLR.A ⁽⁷⁸⁾	100	598.8232	2
					⁽⁶⁸⁾ K.ITLSQVGDVLR.A ⁽⁷⁸⁾	18	598.8397	2
					⁽⁷⁹⁾ R.ALGTNPTNAEVK.K ⁽⁹⁰⁾	47	605.8096	2
					⁽¹²³⁾ K.DQGTIEDFVEGLR.V ⁽¹³⁵⁾	38	762.8397	2
					⁽¹³⁶⁾ R.VFDKEGNGTVMGAELR.H+Oxidation(M) ⁽¹⁵¹⁾	43	1.157.5512	3
					⁽¹⁵²⁾ R.HVLATLGEK.M ⁽¹⁶⁰⁾	30	482.269	2
Cardiac Alpha Tropomyosin [Sus scrofa]								
Spot 2	24.06/4.65	1927	409	17	⁽³⁸⁾ K.QLEDELVSLQK.K ⁽⁴⁸⁾	53	649.3376	2
					⁽⁵²⁾ K.ATEDELDKYSEALK.D ⁽⁶⁵⁾	43	1.072.8382	3
					⁽⁷⁷⁾ K.KATDAEADVASLNR.R ⁽⁹⁰⁾	130	728.8574	2
					⁽⁷⁷⁾ K.KATDAEADVASLNR.R ⁽⁹⁰⁾	33	972.1462	3
					⁽⁷⁸⁾ K.ATDAEADVASLNR.R ⁽⁹⁰⁾	91	664.8113	2
					⁽⁷⁸⁾ K.ATDAEADVASLNR.R ⁽⁹⁰⁾	65	664.8118	2
					⁽¹⁶⁸⁾ R.KLVIIESDLER.A ⁽¹⁷⁸⁾	45	655.8727	2
					⁽¹⁶⁹⁾ K.LVIIESDLER.A ⁽¹⁷⁸⁾	47	591.8267	2
Heat shock protein beta-1 [Bos Taurus]								
Spot 3	20.59/5.60	71037405	428	41	⁽⁴³³⁾ R.RVPFSLLR.G ⁽⁴³³⁾	31	494.2988	2
					⁽⁴³³⁾ R.VPFSLLR.G ⁽⁴³³⁾	55	414.2445	2
					⁽⁴³³⁾ R.DWYPAHSR.L ⁽⁴³³⁾	31	514.2276	2
					⁽⁴³³⁾ R.LFDQAFGLPR.L ⁽⁴³³⁾	60	580.3029	2
					⁽⁴³³⁾ R.VSLDVNHFPEELTVK.T ⁽⁴³³⁾	19	1196.9472	3
					⁽⁴³³⁾ R.VSLDVNHFPEELTVK.T ⁽⁴³³⁾	11	1197.4562	3
					⁽⁴³³⁾ R.VSLDVNHFPEELTVK.T ⁽⁴³³⁾	26	897.4639	2
					⁽⁴³³⁾ K.TKDGVEITGK.H ⁽⁴³³⁾	29	571.8105	2
					⁽⁴³³⁾ K.DGVVEITGK.H ⁽⁴³³⁾	53	457.2371	2
					⁽⁴³³⁾ K.DGVVEITGK.H ⁽⁴³³⁾	44	457.2388	2
					⁽⁴³³⁾ R.KYTLPPGVDPTLVSSSLSPGTLTVEAPLPK.S ⁽⁴³³⁾	92	2127.4796	3
					⁽⁴³³⁾ K.YTLPPGVDPTLVSSSLSPGTLTVEAPLPK.S ⁽⁴³³⁾	50	2042.0818	3
Serum albumin precursor [Ovis aries]								
Spot 4	54.92/5.93	57164373	886	29	⁽⁶⁹⁾ K.ELTEFAK.T ⁽⁷⁵⁾	9	417.2087	2
					⁽⁸⁹⁾ K.SLHTLFGDELCK.V ⁽¹⁰⁰⁾	29	944.7832	3
					⁽⁸⁹⁾ K.SLHTLFGDELCK.V ⁽¹⁰⁰⁾	47	708.3384	2
					⁽¹³⁹⁾ K.LKPEPDTLCAEFK.A ⁽¹⁵¹⁾	47	1030.1732	3
					⁽¹³⁹⁾ K.LKPEPDTLCAEFK.A ⁽¹⁵¹⁾	89	772.3815	2

					(161) K.YLYEVAR.R ⁽¹⁶⁷⁾	31	455.225	2
					(184) K.YNGVFOECCQAEDK.G ⁽¹⁹⁷⁾	17	872.3472	2
					(184) K.ADFTDVTK.I ⁽²⁵⁶⁾	28	446.7079	2
					(257) K.IVTDLTK.V ⁽²⁶³⁾	25	393.2258	2
					(347) K.DVFLGSFLYEYSR.R ⁽³⁵⁹⁾	52	796.3812	2
					(347) K.DVFLGSFLYEYSR.R ⁽³⁵⁹⁾	62	796.3832	2
					(375) K.EYEATLEDCCAK.E ⁽³⁸⁶⁾	56	742.792	2
					(402) K.HLVDEPQNLIK.K ⁽⁴¹²⁾	44	651.3344	2
					(414) K.NCELFEK.H ⁽⁴²⁰⁾	27	468.2035	2
					(421) K.HGEYGFQNALIVR.Y ⁽⁴³³⁾	45	1000.837	3
					(421) K.HGEYGFQNALIVR.Y ⁽⁴³³⁾	103	750.3791	2
					(437) R.KAPQVSTPTLVEISR.S ⁽⁴⁵¹⁾	55	1082.2742	3
					(437) R.KAPQVSTPTLVEISR.S ⁽⁴⁵¹⁾	68	811.457	2
					(438) K.APQVSTPTLVEISR.S ⁽⁴⁵¹⁾	57	747.4068	2
					(469) R.MPCTEDYLSLILNR.L +Oxidation(M) ⁽⁴⁸²⁾	43	1158.876	3
					(469) R.MPCTEDYLSLILNR.L +Oxidation(M) ⁽⁴⁸²⁾	88	868.9082	2
					(483) R.LCVLHEK.T ⁽⁴⁸⁹⁾	10	447.7323	2
					(549) K.QTALVELLK.H ⁽⁵⁵⁷⁾	37	505.796	2
					(569) K.TVMENFVAFVDK.C ⁽⁵⁸⁰⁾	93	698.3402	2
					(569) K.TVMENFVAFVDK.C +Oxidation(M) ⁽⁵⁸⁰⁾	36	706.334	2
					(569) K.TVMENFVAFVDK.C +Oxidation(M) ⁽⁵⁸⁰⁾	79	706.334	2
Phosphoglucomutase-1 [Bos taurus]								
Spot 5	67.25/6.51	11600423	751	24	(53) R.QEATLVVGGDGR.F ⁽⁶⁴⁾	70	599.3018	2
					(69) K.EAIQLIVR.I ⁽⁷⁶⁾	73	469.28	2
					(201) R.NIFDFNALK.E ⁽²⁰⁹⁾	17	539.2751	2
					(222) R.IDAMHGVPYVK.K +Oxidation(M) ⁽²³⁴⁾	42	932.8014	2
					(222) R.IDAMHGVPYVK.K +Oxidation(M) ⁽²³⁴⁾	46	699.3514	3
					(334) R.SMPTSGALDR.V + Oxidation(M) ⁽³⁴³⁾	18	523.7369	2
					(350) K.IALYETPTGWK.F ⁽³⁶⁰⁾	71	637.8269	3
					(361) K.FFGNLMDASK.L ⁽³⁷⁰⁾	51	563.2596	2
					(361) K.FFGNLMDASK.L + Oxidation (M) ⁽³⁷⁰⁾	49	571.253	2
					(428) R.YDYEEVEAEGANK.M ⁽⁴⁴⁰⁾	74	756.8165	3
					(444) K.ELEALISDR.S ⁽⁴⁵²⁾	46	521.2694	2
					(471) K.IDNFEYSDPVDGSISR.N ⁽⁴⁸⁶⁾	72	905.4045	2
					(492) R.LLFADGSR.I ⁽⁴⁹⁹⁾	61	437.7269	2
					(504) R.LSGTGSAGATIR.L ⁽⁵¹⁵⁾	110	543.7848	2
					(504) R.LSGTGSAGATIR.L ⁽⁵¹⁵⁾	87	543.7852	2
					(516) R.LYIDSYEK.D ⁽⁵²³⁾	42	513.7449	2
Triosephosphate isomerase [Bos taurus]								
Spot 6	20.85/6.39	61888856	602	51	(34) K.VPADTEVVCAPPTAYIDFAR.Q ⁽⁵³⁾	45	1459.7016	3
					(34) K.VPADTEVVCAPPTAYIDFAR.Q ⁽⁵³⁾	83	1094.5297	2
					(70) K.VANGAFTGEISPGMIK.D ⁽⁸⁵⁾	36	794.4005	2
					(70) K.VANGAFTGEISPGMIK.D +Oxidation(M) ⁽⁸⁵⁾	25	802.3893	2
					(70) K.VANGAFTGEISPGMIK.D +Oxidation(M) ⁽⁸⁵⁾	62	802.3893	2
					(86) K.DLGATWVVLGHSER.R ⁽⁹⁹⁾	54	1024.8498	3

					⁽⁸⁶⁾ K.DLGATWVVLGHSER.R ⁽⁹⁹⁾	91	768.3901	2
					⁽¹⁰¹⁾ R.HVFGESDELIGQK.V ⁽¹¹³⁾	65	727.8393	2
					⁽¹⁰¹⁾ R.HVFGESDELIGQK.V ⁽¹¹³⁾	42	970.8056	3
					⁽¹¹⁴⁾ K.VAHALAEGLGVIACIGEK.L ⁽¹³¹⁾	64	1203.6374	3
					⁽¹⁴³⁾ K.VVFEQTK.V ⁽¹⁴⁹⁾	25	423.7249	2
					⁽¹⁶¹⁾ K.VVLAYEPVWAIGTGK.T ⁽¹⁷⁵⁾	64	799.9335	2
					⁽¹⁶¹⁾ K.VVLAYEPVWAIGTGK.T ⁽¹⁷⁵⁾	32	799.9374	2
					⁽¹⁹⁵⁾ K.SNVSDAVAQSAR.I ⁽²⁰⁶⁾	64	600.7872	2
					⁽²⁰⁷⁾ R.IIYGGSVTGATCK.E ⁽²¹⁹⁾	85	661.8224	2
Creatine kinase M-type [Ovis aries]								
<i>Spot 7</i>	21.51/6.60	426243021	270	14	⁽¹⁶⁾ K.AEEEEYDLSK.H ⁽²⁵⁾	16	588.7598	2
					⁽³³⁾ K.ALTLEIYK.K ⁽⁴⁰⁾	33	473.7697	2
					⁽⁸⁷⁾ K.DLFDPIIQDR.H ⁽⁹⁶⁾	52	614.3076	2
					⁽¹¹⁷⁾ K.GGDDLDPHYVLSSR.V ⁽¹³⁰⁾	41	1018.803	3
					⁽¹¹⁷⁾ K.GGDDLDPHYVLSSR.V ⁽¹³⁰⁾	62	763.8538	2
					⁽¹⁵⁷⁾ K.LSVEALNSLTGEFK.G ⁽¹⁷⁰⁾	108	752.3923	2
<i>Spot 8</i>	21.90/6.90	426243021	266	14	⁽¹⁶⁾ K.AEEEEYDLSK.H ⁽²⁵⁾	13	588.7588	2
					⁽¹⁶⁾ K.AEEEEYDLSK.H ⁽²⁵⁾	14	588.762	2
					⁽³³⁾ K.ALTLEIYK.K ⁽⁴⁰⁾	46	473.7674	2
					⁽³³⁾ K.ALTLEIYK.L ⁽⁴¹⁾	37	537.8173	2
					⁽⁸⁷⁾ K.DLFDPIIQDR.H ⁽⁹⁶⁾	65	614.3075	2
					⁽¹¹⁷⁾ K.GGDDLDPHYVLSSR.V ⁽¹³⁰⁾	36	1018.7986	3
					⁽¹¹⁷⁾ K.GGDDLDPHYVLSSR.V ⁽¹³⁰⁾	82	763.8487	2
					⁽¹⁵⁷⁾ K.LSVEALNSLTGEFK.G ⁽¹⁷⁰⁾	22	752.3946	2