



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

NHAIRA MAIA VILARINHO

**PROTEOMA DO MÚSCULO (*PECTORALIS MAJOR*) E DO SISTEMA REPRODUTOR
DE CODORNAS EUROPEIAS (*COTURNIX COTURNIX COTURNIX*) ALIMENTADAS
COM ANACARDATO DE CÁLCIO E ÁCIDO CÍTRICO**

FORTALEZA

2023

NHAIRA MAIA VILARINHO

PROTEOMA DO MÚSCULO (*PECTORALIS MAJOR*) E DO SISTEMA REPRODUTOR DE
CODORNAS EUROPEIAS (*COTURNIX COTURNIX COTURNIX*) ALIMENTADAS COM
ANACARDATO DE CÁLCIO E ÁCIDO CÍTRICO

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

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

Co-orientadora: Prof. Dra. Denise Damasceno Guerreiro.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V751p Vilarinho, Nhaira Maia.
Proteoma do músculo (Pectoralis major) e do sistema reprodutor de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*) alimentadas com anacardato de cálcio e ácido cítrico / Nhaira Maia Vilarinho. – 2023.
100 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.
Coorientação: Profa. Dra. Denise Damasceno Guerreiro.
1. Tecido testicular. 2. Proteômica. 3. Codornas - Reprodução. 4. Codornas - Histologia. 5. Codornas - Alimentação e rações. I. Título.

CDD 636.08

NHAIRA MAIA VILARINHO

PROTEOMA DO MÚSCULO (*PECTORALIS MAJOR*) E DO SISTEMA REPRODUTOR DE
CODORNAS EUROPEIAS (*COTURNIX COTURNIX COTURNIX*) ALIMENTADAS COM
ANACARDATO DE CÁLCIO E ÁCIDO CÍTRICO

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

Aprovada em: 14/11/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Aderson Martins Viana Neto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Leilane Rocha Barros Dourado
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof. Dr. Emilio de Castro Miguel
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

E durante essa caminhada **Ele** vem me surpreendendo. Mostrando que os seus planos são melhores do que eu poderia imaginar. Durante a caminhada alguns acontecimentos acabam influenciando, nos deixando vulneráveis, inseguras e pensativas. Apesar de todos os vendavais, reviravoltas, escolhas, erros, medos e pensamentos negativos o **Senhor** se fez presente. E quando ninguém mais podia chegar ao nível de solidão e tristeza, **Ele** veio e me abraçou. Fez do meu pecado uma benção e dos meus erros um aprendizado. Não sei o porquê desse amor, não mereço, mas agradeço. Até aqui o **Senhor** me ajudou. **Obrigado Deus!**

Sou grata também a minha amada família, por todo amor, paciência, companheirismo, por serem abrigo e paz, em especial minha mãe Eliete, irmãos Diego e Ítallo, meu companheiro e amigo Márcio e meus filhos Alice e Isaac, vocês foram essenciais nessa caminhada. Minha eterna gratidão.

Agradecer a oportunidade concedida ao meu orientador Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura, pela compreensão em meio a uma pandemia, tranquilidade transmitida e pelos ensinamentos durante o curso. Ao coorientador Fábio Vasconcelos pelos ensinamentos repassados e apoio durante a condução das análises laboratoriais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Aos membros que participaram das bancas de qualificação e defesa, por todas as contribuições para a melhoria do trabalho, foi uma honra tê-los em minha formação profissional. Aos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos (NPDM) pela valorosa contribuição Dr.^a Claudia do Ó e Dr.^a Maria Elisabete Moraes e técnicos Laís Brasil, Carlos Paier e Islay Magalhães. Muito obrigado!

Aos amigos pelos momentos de descontrações, risadas, conversas, companheirismo, momentos, amizade em especial a Bárbara e Rafael. Aos colegas de Pós-graduação Kamila, Ylana, Bruna, Adalia, Gleyson, Samilly, Iury e Eduardo. Enfim, agradeço a todos os que contribuíram de alguma maneira para que esse trabalho fosse realizado. Meus sinceros agradecimentos!

“Eis que faço uma coisa nova; agora está saindo à luz; porventura não a percebeis? Até no deserto vou abrir um caminho e riachos no ermo” (Isaías 43: 19).

RESUMO

A presente tese teve dois objetivos: Estudo 1) descrever o proteoma do músculo *Pectoralis Major*, testículo, epidídimo e glândula acessória submetidos a diferentes níveis contendo anacárdico de cálcio e ácido cítrico, assim como, análise histológica do testículo de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*) utilizando a espectrometria de massas. Estudo 2) descrever o proteoma do tecido testicular de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*). Para isso, 63 codornas europeias, no período de 21 semanas de idade, foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado de nove tratamentos e sete repetições. Os tratamentos consistiram em: T1- ração sem adição do anacardato de cálcio (ANC); T2- ração com adição de 0,25 % de ANC; T3- ração com adição de 0,25 % de ANC e 0,25 % de ácido cítrico (AC); T4- ração com adição de 0,50 % de ANC; T5- ração com adição de 0,50 % de ANC e 0,25 % de AC; T6- ração com adição de 0,50 % de ANC e 0,50 % de AC; T7- ração com adição de 0,75 % de ANC; T8- ração com adição de 0,75 % de ANC e 0,25 % de AC; T9- ração com adição de 0,75 % de ANC e 0,50 % de AC. Após o abate dos animais, foram pesadas e feitas mensurações, posteriormente, liofilizados, procedendo a realização da extração de proteínas, seguidas de digestão trípica, eletroforese 1 D e análise dos peptídeos por LC-MS/MS. Foram identificadas 64 proteínas no gel do músculo, 44 proteínas testículo, 60 proteínas epidídimo e 66 proteínas glândula acessória. Os tratamentos contendo a partir 0,50% anacardato de cálcio e 0,25% de ácido cítrico apresentaram maior intensidade na expressão de proteínas no tecido testicular, tendo como proteínas: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Tudor domain-containing protein 7, Myosin-binding protein C, fast-type, Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a, Heat shock protein HSP 90-alpha, Superoxide dismutase [Cu-Zn], Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2, Creatine kinase B-type, Peroxiredoxin-1, dentre outras. O presente trabalho sugere que a inclusão dos ácidos na dieta de codornas deve ser utilizada de 0,25 % a 0,50% de anacardato de cálcio associado a 0,25% de ácido cítrico. Para o estudo 2, após o abate dos animais, os tecidos do tratamento controle foram coletados, liofilizados, procedendo a realização da extração de proteínas, seguidas de digestão trípica, dessanilização e análise dos peptídeos por LC-MS/MS. Nessa categoria foram identificadas 2.784 proteínas, no qual heat shock proteins, tubulin, creatine kinase, actina, ATP synthase, transitional endoplasmic reticulum ATPase, pyruvate, endoplasmic reticulum chaperonin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase foram confirmadas como as mais abundantes. Os dados foram analisados com o auxílio de ferramentas de

bioinformática de acordo com a miRNAs através de seleção dos genes, ontologia gênica, agrupamento de proteínas, interação proteína-proteína e vias metabólicas. O upload de 2784 códigos de acesso Uniprot através da plataforma DAVID correspondeu a 1.563 genes, que estavam relacionados principalmente a ligação de ATP, constituinte estrutural de ribossomo, tradução, dentre outros. O trabalho fornece a primeira caracterização do proteoma do tecido testicular de codornas europeias.

Palavras-chave: tecido testicular; proteômica; antioxidante; reprodução.

ABSTRACT

The present thesis had two objectives: Study 1) describe the proteome of the Pectoralis Major muscle, testis, epididymis and accessory gland subjected to different levels containing anacardic calcium and citric acid, as well as, histological analysis of the testis of European quails (*Coturnix coturnix coturnix*) using mass spectrometry. Study 2) describe the proteome of the testicular tissue of European quails (*Coturnix coturnix coturnix*). For this, 63 European quails, aged 21 weeks, were distributed in a completely randomized design of nine treatments and seven replications. The treatments consisted of: T1- food without the addition of calcium anacardate (ANC); T2- food with addition of 0.25% ANC; T3- food with addition of 0.25% ANC and 0.25% citric acid (CA); T4- food with addition of 0.50% ANC; T5- food with addition of 0.50% ANC and 0.25% AC; T6- food with addition of 0.50% ANC and 0.50% AC; T7- food with addition of 0.75% ANC; T8- food with addition of 0.75% ANC and 0.25% AC; T9- ration with addition of 0.75% ANC and 0.50% AC. After slaughtering the animals, they were weighed and measurements were taken, subsequently lyophilized, proceeding with protein extraction, followed by tryptic digestion, 1 D electrophoresis and analysis of the peptides by LC-MS/MS. We identified 64 proteins in the muscle gel, 44 testis proteins, 60 epididymis proteins and 66 accessory gland proteins. Treatments containing 0.50% calcium anacardate and 0.25% citric acid showed greater intensity in the expression of proteins in testicular tissue, with the following proteins: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Tudor domain-containing protein 7, Myosin -binding protein C, fast-type, Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a, Heat shock protein HSP 90-alpha, Superoxide dismutase [Cu-Zn], Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2, Creatine kinase B-type, Peroxiredoxin-1, among others. The present work suggests that the inclusion of acids in the quail diet should include 0.25% to 0.50% of calcium anacardate associated with 0.25% of citric acid. For study 2, after the slaughter of the animals, the tissues from the control treatment were collected, lyophilized, proceeding with protein extraction, followed by tryptic digestion, desalination and analysis of the peptides by LC-MS/MS. In this category, 2,784 proteins were identified, in which heat shock proteins, tubulin, creatine kinase, actin, ATP synthase, transitional endoplasmic reticulum ATPase, pyruvate, endoplasmic reticulum chaperonin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were confirmed as the most abundant. The data was analyzed with the aid of bioinformatics tools according to miRNAs through gene selection, gene ontology, protein grouping, protein-protein interaction and metabolic pathways. The upload

of 2784 Uniprot access codes through the DAVID platform corresponded to 1,563 genes, which were mainly related to ATP binding, structural constituent of the ribosome, translation, among others. The work provides the first characterization of the proteome of European quail testicular tissue.

Keywords: testicular tissue; proteomics; antioxidant; reproduction.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
1 D	Unidimensional
A.C	Ácido cítrico
Aca	Anacardato de cálcio
ACN	Acetonitrila
ADP	Difosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DDA	Data dependent acquisition
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HSP	Proteína de choque térmico
IAA	Iodoacetamida
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGS	Índice gonadossomático do testículo
KEEG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
LAEX	Laboratório de Extração
LCC	Líquido extraído da castanha de caju
m/z	Massa/carga
miRNAs	Micro-RNAs/ Pequenos RNAs não-codantes
mm	Milímetro
°C	Grau Celsius
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
RNA	Ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	11
2	CAPÍTULO I: ABORDAGEM PROTEÔMICA DO MÚSCULO <i>PECTORALIS MAJOR</i> E TESTÍCULO, EPIDÍDIMO E GLÂNDULA ACESSÓRIA DE CODORNAS EUROPEIAS (<i>COTURNIX COTURNIX COTURNIX</i>) ALIMENTADAS COM ANACARDATO DE CÁLCIO E ÁCIDO CÍTRICO	12
2.1	Introdução.....	15
2.2	Material e Métodos	16
2.3	Resultados.....	20
2.4	Discussão	23
2.5	Conclusão.....	27
3	CAPÍTULO II: PERFIL PROTEÔMICO DO TECIDO TESTICULAR DE CODORNAS (<i>COTURNIX COTURNIX COTURNIX</i>)	61
3.1	Introdução.....	63
3.2	Materiais e métodos	65
3.3	Resultados	70
3.4	Discussão	72
3.5	Conclusão.....	76
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICE A– LISTA DE FIGURAS.....	98
	APÊNDICE B - LISTA DE TABELAS.....	100

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os extratos vegetais têm se tornado uma realidade como aditivo nas dietas de aves, podendo exercer diferentes funções, sendo uma delas antioxidante. A propriedade antioxidante dos produtos de origem vegetal se deve, sobretudo a seus compostos fenólicos (SILVA et al., 2010). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelos vegetais tanto durante seu desenvolvimento normal, quando em resposta a condições de estresse (HAMAD & MUBOFU, 2015). Nesse cenário, um composto fenólico amplamente estudado devido a sua atividade antioxidante é o ácido anacárdico, encontrado nas diferentes partes do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) e em maior proporção na castanha do caju (TREVISAN et al., 2006). Muitos estudos destacaram o efeito sinérgico de diferentes antioxidantes quando administrados em combinação (POSTAIRE et al., 1997; MARRAZZO et al., 2019; ANGELONI et al., 2020), assim, outro antioxidante utilizado na avicultura para melhorar o desempenho das aves é o ácido cítrico. A principal ação do ácido cítrico é a redução do pH gástrico, fazendo com que as enzimas possam atuar em um ambiente adequado, também é metabolizado através do ciclo do ácido cítrico como fonte de energia (PARTANEN & MROZ, 1999).

Alimentos com propriedade antioxidante são essenciais na remoção de radicais livres e atuam em sinergia com as enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase (SURAI, 2020), diminuindo assim a formação de radicais lipídicos, melhorando a qualidade da carne (ESTEVEZ & PETRACCI, 2019), o desempenho produtivo e reprodutivo (SURAI et al., 2019). Nesse cenário, estudos utilizando espectrometria de massa geraram mapas proteomicos detalhados de tecidos muscular e testicular de animais de produção. Apesar do notável conhecimento disponível sobre os perfis proteicos do tecido muscular e testicular de alguns animais, há informações limitadas sobre o proteoma em resposta ao uso de antioxidantes. A hipótese do trabalho que o anacardato de cálcio associado ao ácido cítrico na alimentação de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*), possa induzir alterações nas proteínas tecidual no testículo, epidídimo, glândula acessória e músculo (*Pectoralis major*), morfológicas e histológicas no testículo de codornas.

2. CAPÍTULO I: ABORDAGEM PROTEÔMICA DO MÚSCULO *PECTORALIS MAJOR E* TESTÍCULO, EPIDÍDIMO E GLÂNDULA ACESSÓRIA DE CODORNAS EUROPEIAS (*COTURNIX COTURNIX COTURNIX*) ALIMENTADAS COM ANACARDATO DE CÁLCIO E ÁCIDO CÍTRICO

1 **Abordagem proteômica do músculo *Pectoralis Major*, testículo, epidídimo e glândula**
2 **accessória de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*) alimentadas com anacardato**
3 **de cálcio e ácido cítrico**
4

5 **RESUMO**
6

7 O trabalho teve dois objetivos: 1) descrever o proteoma do tecido muscular *Pectoralis Major*,
8 testículo, epidídimo e glândula accessória de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*)
9 submetidos a diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico. 2) análise histológica do
10 tecido testicular de codornas europeias submetidos a diferentes níveis de anacardato de cálcio
11 associado ou não ao ácido cítrico. Foram abatidas 63 codornas europeias machos com 21 semanas
12 de idade, ofertado ração com diferentes tratamentos contendo 0,25 a 0,75 % de anacardato de cálcio
13 e 0,25 a 0,50 % de ácido cítrico. Posteriormente, os animais foram abatidos, após a extração das
14 proteínas dos tecidos foram separadas por eletroforese unidimensional e identificadas por
15 espectrometria de massa. Em média, um total de 26 bandas no gel do músculo, 24 bandas no gel
16 testículo, 25 bandas no gel epidídimo e 27 bandas no gel glândula accessória foram identificados
17 por espectrometria de massa. Identificando um total de 64 proteínas no gel do músculo, 44
18 proteínas testículo, 60 proteínas epidídimo e 66 proteínas glândula accessória, a dieta não apresentou
19 efeito sobre a intensidade bandas de proteínas no músculo *Pectoralis Major*, epidídimo e glândula
20 accessória de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*). Os tratamentos contendo a partir de 0,50%
21 anacardato de cálcio e 0,25% de ácido cítrico apresentaram maior intensidade na expressão de
22 proteínas. As proteínas em destaque foram Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Tudor
23 domain-containing protein 7, Myosin-binding protein C, fast-type, Ubiquitin-40S ribosomal
24 protein S27a, Heat shock protein HSP 90-alpha, Superoxide dismutase [Cu-Zn], Ubiquitin-
25 conjugating enzyme E2 variant 2, Creatine kinase B-type, Peroxiredoxin-1, Triosephosphate
26 isomerase, Apolipoprotein A-I, L-lactate dehydrogenase A chain, Actin, cytoplasmic 1 e
27 Endoplasmin. Concluindo que a inclusão dos ácidos na dieta de codornas deve ser utilizada de 0,25
28 % a 0,50% de anacardato de cálcio associado a 0,25% de ácido cítrico.

29 **Palavras-chaves:** Espectrometria de massa; dieta; antioxidante, proteoma; sistema reprodutor.
30

31 **Proteomic approach of the Pectoralis Major muscle and testis, epididymis and accessory**
32 **gland of European quails (*Coturnix coturnix coturnix*) fed with calcium anacardate and**
33 **citric acid**

34
35 **ABSTRACT**

36
37 The study was two objectives: 1) to describe the proteome of the Pectoralis Major muscle tissue,
38 testis, epididymis and accessory gland of European quail (*Coturnix coturnix coturnix*) subjected to
39 different levels of calcium anacardate and citric acid. 2) histological analysis of testicular tissue
40 from European quails subjected to different levels of calcium anacardate associated or not with
41 citric acid. 63 21-week-old male European quails were slaughtered and offered feed with different
42 treatments containing 0.25 to 0.75% calcium anacardate and 0.25 to 0.50% citric acid.
43 Subsequently, the animals were slaughtered, after extraction of proteins from the tissues, they were
44 separated by one-dimensional electrophoresis and identified by mass spectrometry. On average, a
45 total of 26 bands in the muscle gel, 24 bands in the testis gel, 25 bands in the epididymis gel, and
46 27 bands in the accessory gland gel were identified by mass spectrometry. Identifying a total of 64
47 proteins in the muscle gel, 44 testis proteins, 60 epididymis proteins and 66 accessory gland
48 proteins, the diet showed no effect on the intensity of protein bands in the Pectoralis Major muscle,
49 epididymis and accessory gland of quail (*Coturnix coturnix coturnix*). Treatments containing from
50 0.50% calcium anacardate and 0.25% citric acid showed greater intensity in protein expression.
51 The highlighted proteins were Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Tudor domain-
52 containing protein 7, Myosin-binding protein C, fast-type, Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a,
53 Heat shock protein HSP 90-alpha, Superoxide dismutase [Cu-Zn], Ubiquitin-conjugating enzyme
54 E2 variant 2, Creatine kinase B-type, Peroxiredoxin-1, Triosephosphate isomerase, Apolipoprotein
55 A-I, L-lactate dehydrogenase A chain, Actin, cytoplasmic 1 and Endoplasmin. Concluding that the
56 inclusion of acids in the quail diet should include 0.25% to 0.50% of calcium anacardate associated
57 with 0.25% of citric acid.

58
59
60 **Keywords:** Mass spectrometry; diet; antioxidant, proteome; reproductive system.
61

2.1 Introdução

Os compostos de extratos vegetais exercem efeitos favoráveis para saúde e desempenho animal (BATIHA et al., 2020), o ácido anacárdico é um extrato vegetal amplamente estudado devido a sua atividade antioxidante. Podendo ser encontrado em diferentes partes do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) principalmente na castanha de caju (TREVISAN et al., 2006; HAMAD & MUBOFU, 2015). Na alimentação de aves o ácido anacárdico é utilizado na forma de anacardato de cálcio (ANC) (HOLLANDS et al., 2016), podendo ser adicionado a ração até 1%, considerando um período de 21 semanas de idade para codornas (SANTOS, 2014) e 42 dias para frango de corte (CRUZ, 2015). A utilização desse ácido apresenta efeito positivo na prevenção de lesões provocadas por coccidiose (TOYOMIZU et al., 2003), capacidade antioxidante relacionada à inibição da formação de superóxidos e xantina oxidase, no entanto, se consumido em excesso, pode levar a problemas de toxicidade (TREVISAN et al., 2006; ACHANATH et al., 2010).

As aves possuem grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), susceptíveis ao ataque de radicais livres que degradam lipídios, proteínas e núcleos de DNA. Os PUFAs são degradados causando reação em cadeia, podendo prejudicar o desempenho produtivo e reprodutivo (SURAI, 2016). Sendo assim, a inclusão de antioxidantes naturais pode ser uma alternativa viável na nutrição de aves, podendo atuar em sinergia com enzimas antioxidantes como dismutase de superóxido, glutathione peroxidase e catalase (SURAI, 2020). O ácido cítrico também é utilizado na avicultura, substituindo os antibióticos tendo como o principal efeito a redução do pH gástrico, proporcionando um ambiente adequado a enzimas, sendo metabolizado através do ciclo do ácido cítrico (PARTANEN & MROZ, 1999). O efeito sinérgico de diferentes compostos naturais tem ação positiva no desempenho animal (ANGELONI et al., 2020).

Considerando que as informações genômica permanecem constantes durante a vida do animal, os produtos gênicos como proteínas alteram seus níveis de expressão regulada por uma infinidade de fatores fisiológicos e ambientais (ZAMPIGA et al., 2018). Com os avanços das tecnologias, a espectrometria de massa é aplicada rotineiramente para identificar e quantificar o proteoma de diferentes tecidos, melhoraram assim, a compreensão sobre os processos biológicos (PAN et al., 2012). Dentro desse contexto, objetivou-se analisar os proteomas dos tecidos musculo (*Pectoralis Major*), testículo, epidídimo, glândula acessória e análise histológica do tecido

92 testicular de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*) submetidas a diferentes níveis de
93 anacardato de cálcio associado ou não ao ácido cítrico na ração.

94

95 **2.2 Material e Métodos**

96

97 **2.2.1. Animais e delineamento experimental**

98

99 Todos os procedimentos foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em
100 Experimentação Animal da Universidade Federal do Ceará (CEUA/UFC/2552250718/ 2018). O
101 experimento foi conduzido no Setor de Avicultura (DZ/CCA/UFC), utilizando 63 codornas
102 europeias machos de 21 semanas de idade, alojadas em um galpão convencional de produção,
103 provido de gaiolas de arame galvanizado medindo (35 x 25 x 20 cm) com capacidade de cinco
104 codornas por gaiola, dispostas em sistema piramidal e equipadas com comedouro linear tipo calha
105 e bebedouro tipo nipple. As aves foram selecionadas com base no peso corporal, distribuídos
106 uniformemente nas gaiolas, utilizando um delineamento inteiramente casualizado com nove
107 tratamentos e sete repetições, unidade experimental constituída de quatro fêmeas e um macho.

108 O ácido anacárdico foi adicionado às dietas na forma de anacardato de cálcio, um produto
109 intermediário do processo de obtenção do ácido puro, oriundo do líquido extraído da castanha de
110 caju (LCC). Foi adicionado 550 ml do LCC em um Becker de 4 L com 150 ml de água destilada
111 e 2850 ml de etanol a 99,5 °C, aquecida e agitado até 50 °C, permanecendo nessa condição por 4
112 horas e mantendo essa temperatura constante (TREVISAN et al. 2006). Em intervalo de 10 minutos
113 foram incorporados à mistura 250 g de hidróxido de cálcio. O ácido anacárdico presente no LCC
114 reage com o hidróxido de cálcio formando o anacardato de cálcio, que se precipita no fundo do
115 recipiente separando-se dos demais componentes da mistura, ficando posteriormente, em
116 decantação por 1 hora em temperatura ambiente, logo em seguida, o sobrenadante foi retirado e
117 adicionado 800 ml de etanol, a mistura foi submetida as mesmas condições de agitação e
118 aquecimento por 1 hora. Procedeu-se a decantação por 1 hora e retirada do sobrenadante,
119 procedimento realizado outra vez para obter uma lavagem mais eficaz (PARAMASHIVAPPA et
120 al., 2001). Posteriormente, realizou-se a secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72
121 horas, moído e peneirado, procedimentos realizados no Laboratório de Extração (LAEX) da UFC.

122 Os tratamentos aplicados foram: 0,0% sem adição de aditivo (tratamento 1 controle); 0,25
123 % de anacardato de cálcio (tratamento 2); 0,25 % de anacardato de cálcio e 0,25 % de ácido cítrico
124 (tratamento 3); 0,50 % de anacardato de cálcio (tratamento 4); 0,50 % de anacardato de cálcio e
125 0,25 % de ácido cítrico (tratamento 5); 0,50 % de anacardato de cálcio e 0,50 % de ácido cítrico
126 (tratamento 6); 0,75 % de anacardato de cálcio (tratamento 7); 0,75 % de anacardato de cálcio e
127 0,25 % de ácido cítrico (tratamento 8); 0,75 % de anacardato de cálcio e 0,50 % de ácido cítrico
128 (tratamento 9). As dietas experimentais foram formuladas para serem isonutrientes e isoenergéticas
129 (**Tabela 2**) (COSTA & SILVA, 2009), para o cálculo das dietas foi considerado valores
130 nutricionais dos ingredientes proposto por Rostagno et al. (2011).

131 Duração do experimento foi de 210 dias, durante todo o período experimental foram
132 oferecidas ração e água à vontade. Utilizou-se o programa de luz de 16 horas (natural e artificial).
133 Ao final os animais foram pesados e um macho de cada parcela foi selecionado para avaliação dos
134 tecidos. Os 63 animais foram abatidos por deslocamento cervical, procedendo posteriormente, à
135 dissecação e retirada dos tecidos músculo *Pectoralis Major*, testículos, epidídimo e glândula
136 acessória. Um dos testículos foi separado para a histologia, pesados e medidos (comprimento e
137 diâmetro) (**Tabela 1**). As demais amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas
138 (aproximadamente 24 horas), maceradas e armazenadas a -20°C.

139

140 **2.2.2 Extração de proteínas**

141

142 Utilizou-se 10 mg das amostras liofilizada do músculo (*Pectoralis Major*), testículo,
143 epidídimo e glândula acessória, foram ressuspensas em 500 µl de solução de lise Triton X-100
144 de 0,1%, homogeneizados no “vortex” e mantidos a 4° C por 1 hora sobre leve agitação a cada 10
145 minutos. Em seguida adicionado 400 µl tampão de amostra (7 M ureia, 2 M tiourea, 40 mM
146 ditiotreitol, 4% 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanossulfonato) sonicadas por 1
147 minuto. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 4° C a 12.000 g, o
148 sobrenadante reservado para quantificação, pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

149

150 **2.2.3 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)**

151

152 Para eletroforese utilizou-se amostras de 50 µg de proteínas do músculo, 20 µg do testículo,
153 60 µg do epidídimo e 60 µg da glândula acessória, respectivamente, realizadas separadamente, no
154 entanto, seguindo o mesmo procedimento descrito abaixo.

155 As amostras foram ressuspensas (1:1) com o tampão de amostra (0,125 M Tris-HCl, pH
156 6,8, 4% SDS, 20% (v/v) glicerol, 1, 0,2 M de DTT, 0,02% de azul de bromofenol), aquecidas em
157 água por 90 segundos e aplicadas nos poços do gel de poliacrilamida a 12,5%, utilizando o sistema
158 SE 600 Ruby™ (GE Life Sciences, EUA), sobre correntes de 25 mA/ gel, 500 V e 90 W. Em
159 seguida, os géis foram corados com solução azul brilhante de Coomassie (GE Healthcare®, EUA)
160 por 12 horas, seguido de descoloração com solução contendo metanol (40%) e ácido acético (7%),
161 escaneado a 300 dpi (Scanner Imagem, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) e analisados
162 utilizando Software Quantity One®, versão 4.6.3 (Bio-Rad, Rockville, MD, EUA). As bandas
163 foram identificadas, combinadas para determinar peso molecular e intensidade utilizando marcador
164 molecular Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker – Full Range.

165

166 **2.2.4 Espectrômetria de massa (ESI-Q-TOF) e busca de dados**

167

168 As bandas proteicas separadas por eletroforese foram recortadas do gel (~1 mm) e
169 submetidas a digestão por tripsina (FERNANDES et al., 2018). Resumidamente, as bandas foram
170 descoradas com 25 mM de bicarbonato de amônio (pH 8,0) em solução de acetonitrila 50 %,
171 desidratada por acetonitrila por 5 minutos e desnaturada sob solução DTT (10 mM). Os peptídeos
172 foram alquilados com iodoacetamida (50 mM) por 30 minutos e digeridos com tripsina (Promega,
173 Madison, WI, EUA) a 37 °C, por 20 horas. Ressuspensado em ácido fórmico a 5% e acetonitrila
174 50 % concentrado em microtubos usando um concentrador de vácuo de velocidade (Eppendorf,
175 Hauppauge, NY, EUA). Em seguida, foram injetados em um sistema nanoAcquity™ (Waters
176 Corp., Milford, MA, EUA), usando uma coluna BEH300 C18 (100 µm x100 mm) e eluídos a 600
177 µL/minuto com um gradiente de acetonitrila (5 - 85%) contendo 0,1% de ácido fórmico. O sistema
178 de cromatografia líquida foi conectado a uma fonte de ionização de massa de nanospray (SYNAPT
179 HDMS system, Waters Corp., USA).

180 O espectrômetro de massa foi operado em modo positivo usando capilar 90°C e voltagem
181 capilar de 3,5 kV, calibrado com fragmentos de [Glu1] -fibrinopeptídeo B duplamente protonado
182 (m/z 785.84), o *Lock-mass* usado foi o íon intacto. O procedimento de LC-MS/MS foi realizado de

183 acordo com o método de aquisição dependente de dados (DDA), selecionando os íons precursores
184 MS/MS dupla ou tripla carga. Os íons foram fragmentados por dissociação de colisão induzida
185 usando argônio como gás de colisão e energia de colisão em rampa que variava de acordo com o
186 estado de carga do íon precursor selecionado. A aquisição de dados feita em um intervalo m/z de
187 300 - 1200 para os dados de pesquisa do MS e um intervalo m/z de 50 - 2500 para MS/MS. Os
188 dados foram coletados com o Software MassLynx 4.1 e processados usando o Protein Lynx Global
189 Server 2.4 (Global Server), sendo convertidos para arquivos de lista de picos (.pkl) e enviados para
190 o servidor MASCOT (Matrix Science, Londres, Reino Unido, v.2.6) para buscas no banco de dados
191 NCBIprot e SwissProt.

192

193 **2.2.5 Ontologia gênica, Interação entre proteínas**

194

195 As proteínas identificadas em amostras do músculo *Pectoralis Major*, testículo, epidídimo
196 e glândula acessória foram avaliadas de acordo com os termos da ontologia gênica associadas a
197 processo biológico, função molecular, componente celular e classe proteica, utilizando a
198 plataforma Panther (<http://www.pantherdb.org/>), obtidos da base de dados do UniProtKB
199 (BHATIA et al., 2009). As interações entre proteínas foram recuperadas do banco de dados
200 STRING, versão 11.0, proteínas de busca e FDR 1%.

201

202 **2.2.6 Histologia**

203

204 Os testículos foram fixados em solução de formaldeído a 4%, posteriormente, clivados para
205 a obtenção de tamanhos próximos a 5 mm. Seguidos de etapas: lavagem (álcool etílico a 50%),
206 desidratação (álcool etílico a 50%, 70%, 90%, 100%), infiltração (historresina) e emblocamento
207 (historresina e hardener por 24 horas). Foram realizados cortes de 0,6 μ m seguido de coloração
208 com solução azul de toluidina 1%. Para análise das imagens utilizou-se software ZEN lite 2.1 e
209 ImageJ 1.8.0. Foram analisados a quantidade de células, comprimento e diâmetro testicular.

210

211 **2.2.7 Análise estatística**

212

213 Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan ($P < 0,05$),
214 todas as análises foram realizadas utilizando o programa R (versão 3.4.4), a 5% de probabilidade.

215

216 **2.3 Resultados**

217

218 **2.3.1 Dados morfométricos**

219

220 A análise estatística não houve diferença significativa dos tratamentos sobre as variáveis
221 analisadas, como peso do testículo, comprimento, diâmetro, índice gonadossomático do testículo
222 (IGS) e peso da codorna europeia submetida aos diferentes tratamentos (**Tabela 1**).

223

224 **2.3.2 Análise histológica dos testículos**

225 A dieta com adição de anacardato de cálcio e/ou associação com ácido cítrico provocou
226 alterações nas células germinativas nos testículos de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*). O
227 grupo experimental contendo a partir de 0,50 % ANC associado ao AC apresentou alargamento
228 dos túbulos seminíferos, no entanto, a quantidade de células germinativas houve uma diminuição.
229 O diâmetro dos túbulos seminíferos das codornas não foi influenciado pelos tratamentos ($p < 0,005$)
230 (**Tabela 1**). Na **Tabela 5** apresenta a quantidade de células presente no túbulo seminífero dos
231 testículos de codornas europeias, níveis crescentes de ANC afetaram ($p < 0,05\%$) o número de
232 espermatogônias.

233 O tratamento contendo a partir de 0,75 % ANC associado com AC inibiu o citoesqueleto
234 normal da espermatogênese, podendo assim, diminuir a capacitação de colesterol pelas células de
235 Leydig e conseqüentemente diminuí a síntese de testosterona. Muitas células germinativas
236 degeneradas e apoptóticas foram observadas, a membrana basal estava espessada e irregular.
237 Nesses tratamentos observou-se grande espaço no epitélio seminífero, onde alguns túbulos
238 apresentaram lúmens contraídos, enquanto em outros túbulos a parede tubular apresentava
239 vacúolos e espaços (**Fig. 6. b, c, d e e**).

240 A adição de 0,25 a 0,50 % de ANC e/ ou associado a 0,25 % de AC evidenciou estrutura e
241 organização celular normal nos túbulos seminíferos, com distribuição, maturação e diferenciação
242 celular durante a produção de espermatozoides (**Fig. 1. a**). Os tratamentos não apresentaram
243 alterações morfológicas, desorganização celular ou alterações na espermatogênese. Ao todo, o uso

244 de níveis elevados de anacardato de cálcio associado ou não ao ácido cítrico leva a danos
245 histológicos no tecido testicular de codornas europeia.

246

247 **2.2.3 Perfil proteômico do músculo *Pectoralis Major***

248

249 As proteínas identificadas nas amostras do músculo *Pectoralis Major* de codornas
250 (*Coturnix coturnix coturnix*) alimentadas com anacardato de cálcio associado ao não ao ácido
251 cítrico encontra-se na **Tabela 3**. A análise de eletroforese SDS-PAGE, mostrou 26 bandas em
252 comum entre os tratamentos, respectivamente. Um total de 64 proteínas no gel foram identificadas
253 por espectrometria de massa, com peso molecular teórico que variam 10 a 225 kDa, ilustrada na
254 **Fig. 1**. A dieta não apresentou efeito sobre a intensidade das bandas de proteínas no músculo de
255 codornas (*Coturnix coturnix coturnix*).

256 As categorias e termos da ontologia gênica para processo biológico, classes proteicas,
257 função molecular e componentes celulares de proteínas do músculo *Pectoralis Major* de codornas
258 (*Coturnix coturnix coturnix*) são mostrados na **Fig. 2 a**. Os principais processos biológicos foram
259 caracterizados como processos celulares, metabólicos e resposta ao estímulo. Quanto às classes de
260 proteínas avaliadas pela plataforma Panther (<http://www.pantherdb.org>), as proteínas foram
261 identificadas como enzima de interconversão de metabólitos, chaperone e proteína do
262 citoesqueleto. As funções moleculares mais importantes relacionadas às proteínas identificadas são
263 atividade catalítica e ligação; o componente celular definido principalmente como entidade
264 anatômica celular e complexos de proteínas. A análise *in silico* utilizando a plataforma String
265 detectou múltiplas interações envolvendo proteínas do músculo (**Fig. 3 a**).

266

267 **2.2.4 Perfil proteômico do tecido testicular, epidídimo e glândula acessória**

268

269 As proteínas identificadas no tecido testicular de codornas europeias (*Coturnix coturnix*
270 *coturnix*) alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico, estão
271 representadas na **Tabela 4**. O perfil eletroforético das proteínas no tecido testicular mostrou 24
272 bandas em comum entre todos os animais testados (**Fig. 4**).

273

274 Na comparação entre os tratamentos para a intensidade de banda, 17 bandas de proteínas (1
ao 16, e 18) tiveram expressão afetada pela dieta. Observou-se baixa intensidade das bandas com

275 tratamentos contendo adição de 0,25 a 0,50% de anacardato de cálcio associado ou não a 0,25 %
 276 de ácido cítrico. Apresentaram maior intensidade os tratamentos contendo adição de 0,50 a 0,75%
 277 de anacardato de cálcio associado com 0,25 ou 0,50% ao ácido cítrico. O tratamento contendo
 278 0,75% de anacardato de cálcio associado a 0,50% de ácido cítrico, diferiu do tratamento controle
 279 em todas as bandas. Seguido do tratamento com 0,75% de anacardato de cálcio associado a 0,25%
 280 de ácido cítrico (14 bandas diferentes) e o tratamento com 0,50% de anacardato de cálcio associado
 281 a 0,50% de ácido cítrico (7 bandas diferentes) (**Fig. 5**). Os tratamentos T6 (0,50% anacardato de
 282 cálcio (ACA) e 0,50% de ácido cítrico (A.C)), T8 (0,75% ACA e 0,25% A.C) e T9 (0,75% ACA e
 283 0,50% A.C) apresentaram uma maior intensidade na expressão de proteínas foram Glyceraldehyde-
 284 3-phosphate dehydrogenase, Tudor domain-containing protein 7, Myosin-binding protein C, fast-
 285 type, Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a, Heat shock protein HSP 90-alpha, Superoxide
 286 dismutase [Cu-Zn], Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2, Creatine kinase B-type,
 287 Peroxiredoxin-1, Triosephosphate isomerase, Apolipoprotein A-I, L-lactate dehydrogenase A
 288 chain, Actin, cytoplasmic 1 e Endoplasmic.

289 A identificação do ESIQ-ToF das bandas foi de 44 proteínas, com peso molecular teórico
 290 que varia de 11 a 225 KDa. Entre as proteínas identificadas, 24 proteínas estão localizadas no
 291 citosol e funções relacionadas: atividade antioxidante (Banda 7, 8, 8, 10, 11, 12 e 13), ligação ligase
 292 proteína ubiquitina (Banda 13 e 14), ligação de íon de zinco (Banda 14), vinculação ATP (Banda
 293 9,12, 14, 15, 16), processo glicolítico (Banda 1, 4, 5, 14, 15), vinculação de actina (Banda 3),
 294 processo metabólico piruvato (Banda 13) e processo catabólico xenobiotico (Banda 12 e 13). As
 295 demais funções das proteínas estão relacionadas: vinculação de íons metabólicos (Banda 6),
 296 espermatogênese (Banda 2), processo biossintético do colesterol (Banda 13 e 14), dobramento de
 297 proteínas (Banda 16), ubiquitina ligada a proteína K63 (Banda 8) e atividade D-threo-aldose 1
 298 desidrogenase (Banda 18).

299 As proteínas foram agrupadas de acordo com ontologia gênica para processo biológico,
 300 classes proteicas, função molecular e componentes celulares. Os principais processos biológicos
 301 foram caracterizados como processos celulares, metabólicos, resposta ao estímulo, reprodução e
 302 localização. As classes de proteínas identificadas foram enzima de interconversão de metabólitos,
 303 chaperone e proteína adaptadora. As funções moleculares são atividade catalítica e ligação; para o
 304 componente celular entidade anatômica celular e complexos de proteínas (**Fig. 2 b**). A análise da

305 rede proteica considerando o padrão de expressão entre grupos, indicou que as proteínas
306 interagiram entre-se estando relacionados com a estrutura do tecido testicular (**Fig. 3 b**).

307 O perfil proteômico do epidídimo apresentou 25 bandas em comum, e identificou 60
308 proteínas, com peso molecular teórico que variou de 10 a 225 KDa. O perfil proteômico da glândula
309 acessória mostrou 27 bandas e foram identificadas 66 proteínas, com peso molecular teórico de 12
310 a 225 KDa (**Tabela suplementar**). As amostras do epidídimo e glândula acessória não
311 apresentaram diferença significativa na intensidade das bandas em codornas (*Coturnix coturnix*
312 *coturnix*) submetidas as dietas contendo diferentes níveis de anacardato de cálcio associado ou não
313 ao ácido cítrico.

314 As proteínas também foram agrupadas de acordo com ontologia gênica, os principais
315 processos biológicos do epidídimo foram processos celulares e localização. As classes das
316 proteínas mais importante identificadas foram proteína do citoesqueleto, transferência/ transporte
317 e enzima de interconversão de metabólitos. Para a glândula acessória os processos biológicos
318 foram: processo celular, resposta ao estímulo, regulação biológica e processo de organização
319 multicelular. As classes das proteínas foram proteína do citoesqueleto, chaperone, proteína da
320 matriz extracelular e enzima de interconversão de metabólitos. As funções moleculares e
321 componente celular para ambas são atividade catalítica, ligação; e entidade anatômica celular e
322 complexos de proteínas (**Fig. 2 c e d**). A análise da rede proteica do epidídimo e glândula acessória
323 indicou que as proteínas interagiram entre-se (**Fig. 3 c ed**).

324

325 **2.4 Discussão**

326

327 No presente trabalho, os tratamentos não tiveram diferença significativa ($p < 0,005\%$) em
328 relação ao ganho de peso corporal (SANTOS, 2014; CRUZ, 2015; SILVA, 2019; FERREIRA et
329 al., 2023) e as medidas morfológicas do testículo de codornas europeias, corroboram com os relatos
330 na literatura utilizando o ANC (FERREIRA et al., 2023). A estabilização no peso testicular em
331 codornas acontece aos 60 dias de idade, 3,59 g respectivamente (SANTOS et al., 2012), podendo
332 ser por esse motivo que a dieta não afetou as medidas morfológicas do testículo. Os túbulos
333 seminíferos sofrem uma regressão leve a extremo com um declínio no número de espermatogônias
334 e espermátides em galos senescentes, como resultado de maior estresse oxidativo (NASIRIKHAH
335 et al., 2019).

336 Rocha (2022) avaliou os efeitos da adição do ANC associado com o AC em rações para
337 aves entre a 1ª e 8ª semanas de idade criadas sobre piso e concluiu que essa associação pode reduzir
338 a concentração de ácido úrico no sangue, porém, sem problemas ao desempenho nas diferentes
339 fases de crescimento e maturidade sexual. A utilização a partir de 0,50% de ambos os ácidos pode
340 reduzir o desempenho no início do ciclo de postura, sugerindo a utilização de apenas 0,25% desses
341 ácidos associados, podendo ser utilizado com segurança, proporcionando assim, melhores índices
342 no desempenho na fase de desenvolvimento e início do ciclo de postura. A adição do ANC
343 associado ao AC na ração de matrizes de codornas europeia (*Coturnix coturnix coturnix*) e poedeira
344 linhagem *Hy-Line W-36*, afeta a oxidação lipídica da gema (SILVA, 2019; WATANABE, 2021),
345 o nível de 0,75% de ANC apresentou melhor atividade antioxidante no sistema reprodutivo de
346 poedeiras (WATANABE, 2021).

347 As alterações morfológicas nos tratamentos contendo a adição a partir de 0,50 % de ANA
348 associado ou não ao AC nos túbulos seminíferos como comprometimento da disposição celular no
349 epitélio seminífero e espaço entre as células germinativas, é sugestivo de possível efeito deletério
350 dos tratamentos ao interromper a barreira hemato-testicular. Em aves a fertilização depende da
351 liberação dos espermatozoides, do movimento ciliar ativo e da integridade estrutural das células
352 germinativas (KIMARO, 2016). Alguns tratamentos apresentaram formação de vacúolo entre as
353 células germinativas, sugerindo que esses podem indicar a perda de conexão celular ou a redução,
354 podendo ser considerado como um dos sinais de apoptose (MOHAMADGHASEMI et al., 2010).
355 A dieta pode afetar a morfologia testicular, podendo atuar negativamente na reprodução,
356 corroborando com a literatura (MIGLIACCIO et al., 2019; RASHIDI et al., 2023).

357 A análise histologia dos testículos mostrou que a utilização de ANC associado ou não ao
358 AC teve efeito negativo no desenvolvimento testicular a partir da adição de 0,50% de ambos os
359 ácidos. Uma das propriedades desejáveis para a seleção de antioxidantes utilizadas na ração são:
360 eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); fácil aplicação e compatibilidade com o
361 alimento; estável nas condições de processo e armazenamento; os produtos de oxidação não podem
362 ser tóxicos, mesmo em doses maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento
363 (BARREIROS et al., 2006; RAMALHO & JORGE, 2006).

364 As proteínas constituem cerca de 20% da carne e servem de ligação entre o perfil genético
365 e a qualidade da carne (NAIR & ZHAI, 2020), sendo divididas em três categorias com base em sua
366 solubilidade: sarcoplasmática, miofibrilar e estromais (tecido conjuntivo). As proteínas

367 sarcoplasmáticas constituem aproximadamente 25 a 30% das proteínas musculares totais e estão
368 localizadas no sarcoplasma (citoplasma) das células musculares (YAMASHITA & YOSHIOKA,
369 1992). As proteínas miofibrilares constituem cerca de 50 a 60% das proteínas totais da carne, são
370 em grande parte responsáveis pelas propriedades texturais e estruturais da carne (NAIR & ZHAI,
371 2020), representadas pela miosina, actina, proteína C, proteína M, tropomiosina, alfa actina e beta
372 actina (SGARBIERI, 1996).

373 A utilização de polifenóis como a folha de eucalipto pode intensificar o teor de atividade
374 da glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione (GSH) no músculo (*Pectoralis Major*), na análise
375 proteômica o metabolismo dessas proteínas foram as duas vias metabólicas cruciais responsáveis
376 pelo aumento da capacidade antioxidante no músculo (WEI et al., 2020). As proteínas
377 superabundantes ($p < 0,05$) em amostras do músculo (*Pectoralis Major*) de aves são creatina
378 quinase tipo M (DESAI et al., 2016; CAI et al., 2018), triosefosfato isomerase (SOGLIA et al.,
379 2016; ZAMBONELLI et al., 2016; CAI et al., 2018), fosfoglycerato mutase-1, alfa- enolase
380 (DESAI et al., 2016) e alfa tropomiosina (NASIRIFAR et al., 2021), proteínas encontradas no
381 trabalho.

382 A creatina quinase é uma enzima que catalisa uma reação reversível na qual o ATP pode
383 ser gerado a partir de difosfato de adenosina (ADP) utilizando fosfato de creatina (YAMASHITA
384 & YOSHIOKA, 1992), que é um composto químico servindo de armazenamento para o fosfato de
385 alta energia necessário para regenerar ATP a partir de ADP. O triosefosfato isomerase é uma
386 enzima essencial em todas as células vivas, associada a via glicólítica. Durante a glicólise, o
387 triosefosfato isomerase catalisa a conversão de fosfato de dihidroxilato ao gliceraldeído-3-fosfato.
388 Gliceraldeído-3-fosfato e NAD⁺ são catalisados por gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase à
389 conversão reversível de NADH e 1,3-bisfosfoglicetato, o que por sua vez favorece a geração de
390 fosfoglicato e ATP (KIM & DANG, 2005). A abundância de triosefosfato isomerase no gel foi
391 correlacionada com o envelhecimento prolongado em galinha indígena tailandesa (TELTATHUM
392 & MEKCHAY, 2009). A fosfoglycerato mutase-1 é uma enzima que converte 3-fosfoglicatoato
393 em 2-fosfoglycerato usando 2,3-bisfosfoglicetato como cofator no ciclo glicolítico. No ciclo
394 glicolítico, a enzima 6-fosfofructokinase dependente de ATP, sendo uma enzima limitante da taxa
395 que converte em frutose-1,6-bisfosfato. A frutose 1,6-bisfosfato catalisa a hidrólise da frutose 1,6-
396 bisfosfato à frutose 6-fosfato (ENGLAND et al., 2014).

397 A alfa-enolase atua como uma proteína de choque térmico, na manutenção da homeostase
398 celular, na resposta a doenças musculares, regeneração, contração, organizar e proteção a estrutura
399 miofibrilar no esqueleto muscular (XUE et al., 2009), esta proteína está envolvida no
400 desenvolvimento e crescimento do músculo de aves e interfere no dobramento de proteínas
401 desnaturadas (NASIRIFAR et al., 2021). Pesquisas indicam que extratos vegetais são boas fontes
402 de antioxidantes naturais na carne (SHAH et al., 2014; WEI et al., 2020; FERREIRA et al., 2023).

403 As proteínas de choque térmico estão correlacionadas a diminuição de danos ao estresse
404 oxidativo, influenciando assim, positivamente a fertilidade nas aves (FERREIRA, 2019). No
405 testículo uma das proteínas mais abundantes reguladas pelo desenvolvimento é a HSP70-2,
406 necessária para a atividade da quinase CDC2 para meiose I (ZHU et al., 1997) e durante prófase
407 meiótica em espermatócitos, qualquer declínio prejudica a meiose e os espermatócitos, e assim,
408 aumenta significativamente a apoptose (ZHU et al., 1997). A expressão de HSP está presente no
409 desenvolvimento pós-natal de células espermatogênicas e é crucial para a espermatogênese
410 (SARGE et al., 2000), sendo altamente expressa no citoplasma de todas as células
411 espermatogênicas, tendo alta expressão nas espermatogônias e espermatócitos primários (Wang et
412 al., 2014).

413 A proteína peroxiredoxin-1 apresenta um sinal fraco na espermatogônia do testículo durante
414 a primeira semana e posteriormente difundido em direção às células espermatogênicas em outras
415 etapas. Durante o desenvolvimento testicular essa proteína localiza-se nas células de Leydig
416 (HUANG et al., 2008). A proteína Ubiquitin está presente no desenvolvimento de espermátides
417 (NAKAMURA, 2013).

418 A Apolipoproteína A-I desempenha um papel no metabolismo da lipoproteína de alta
419 densidade (HDL) (PAZ et al., 2006), as células de Sertoli absorvem o colesterol para o metabolismo
420 celular principalmente pela via da apolipoproteína E (APO E) (FOFANA et al., 2000). Na ausência
421 de APO E, as células podem usar HDL para regular a esteroidogênese via apolipoproteína A-I
422 (TRAVERT et al., 2000). Os níveis mais altos do APOA1 é durante os estágios iniciais do
423 desenvolvimento testicular, quando a proporção de células de Leydig é maior do que no adulto,
424 diminuindo em vias metabólicas nos testículos à medida da fase reprodutiva (PAZ et al., 2006).
425 Além disso, a apolipoproteína A-I é altamente expressa na espermatogônia (HUANG et al., 2008;
426 HUANG & SHA, 2011) e está envolvida na resposta ao estresse oxidativo e homeostase lipídica
427 (JARVI et al., 2020).

428 **2.5 Conclusão**

429

430 Conclui-se, que a inclusão de 0,50 a 0,75% de anacardato de cálcio associado ou não a 0,25
431 e 0,50% de ácido cítrico na dieta influência nas proteínas do tecido testicular em codornas, de forma
432 negativa a reprodução, sugerindo a utilização de apenas 0,25 % a 0,50% de anacardato de cálcio
433 associado a 0,25% de ácido cítrico.

434

435 **Conflitos de interesse**

436

437 Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

438

439

440 ACHANATH, Radha; SRINIVAS, Malladi; RAMADOSS, Candadal Seshadri. **Antimicrobial**
441 **derivatives of anacardic acid and process for preparing the same**. U.S. Patent n. 8,338,638,
442 25 dez. 2012.

443

444 ANGELONI, Cristina; BUSINARO, Rita; VAUZOUR, David. The role of diet in preventing and
445 reducing cognitive decline. **Current opinion in psychiatry**, v. 33, n. 4, p. 432-438, 2020.

446

447 BARREIROS, André LBS; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação
448 entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, p. 113-123,
449 2006.

450

451 BATIHA, Gaber El-Saber et al. Uncaria tomentosa (Willd. ex Schult.) DC.: A review on
452 chemical constituents and biological activities. **Applied Sciences**, v. 10, n. 8, p. 2668, 2020.

453

454 BHATIA, Vivek N. et al. Software tool for researching annotations of proteins: open-source
455 protein annotation software with data visualization. **Analytical chemistry**, v. 81, n. 23, p. 9819-
456 9823, 2009.

457

458 BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Greggi. Radicais livres e os
459 principais antioxidantes da dieta. **Revista de nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

460

461 BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
462 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.
463 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

464

465 CRUZ, C. E. B. **Anacardato de cálcio como fonte de ácido anacárdico na alimentação de**
466 **frangos de corte**. 2015. Tese (doutorado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia,
467 Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

468

469 DA COSTA, Anderson Luiz Pena; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e
470 Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-
471 57, 2017.

472

473 FERNANDES, César Carneiro Linhares et al. Proteome of the perioovulatory oviduct and uterus
474 of goats as related to nutritional balance. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 5, p.
475 1085-1095, 2018.

476

477 FERREIRA, R. S. **Morfologia, histologia e proteômica do testículo de codornas europeias**
478 **alimentadas com anacardato de cálcio**. 2019. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) –
479 Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

480

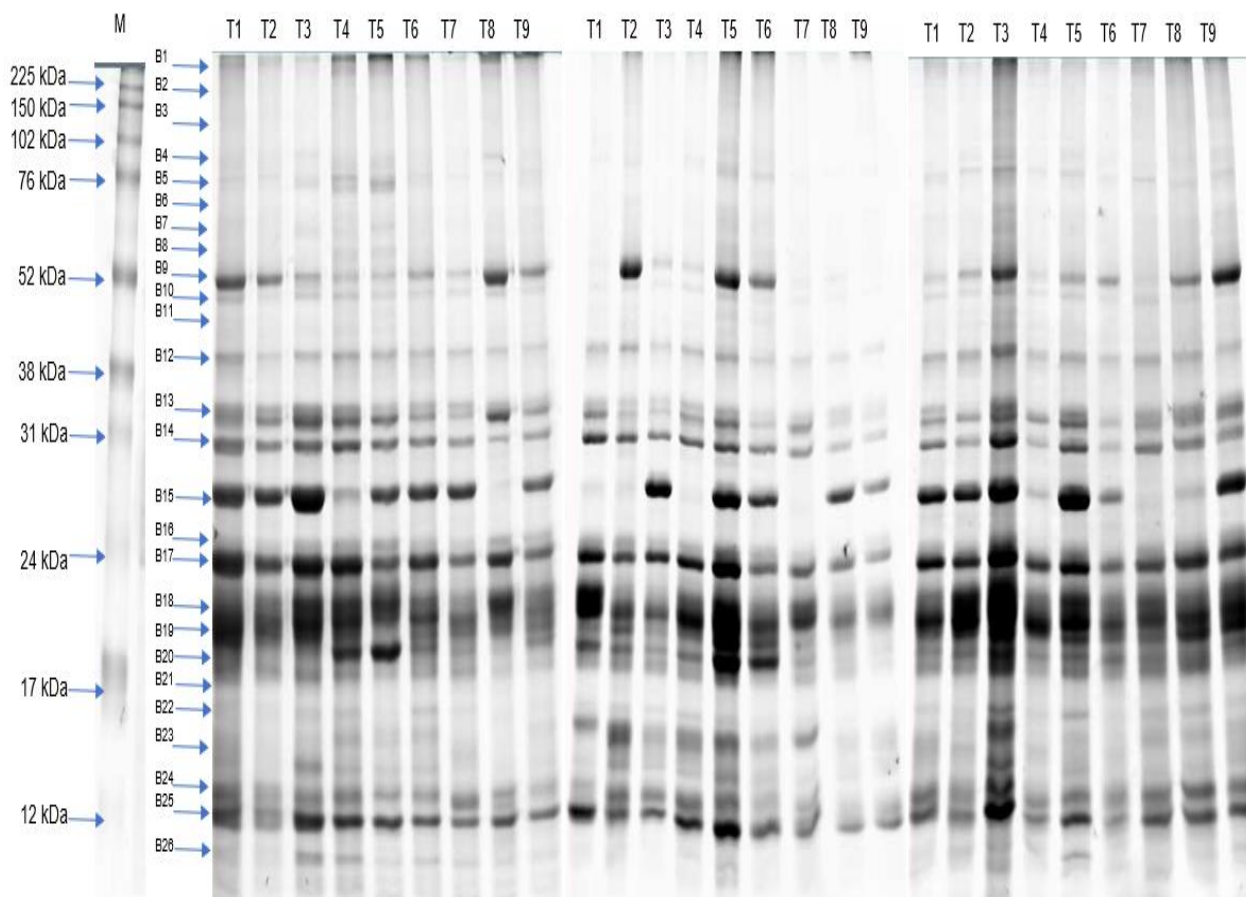
- 481 FOFANA, M. et al. Evaluation of cholesteryl ester transfer in the seminiferous tubule cells of
482 immature rats in vivo and in vitro. **Journal of reproduction and fertility**, v. 118, n. 1, p. 79-84,
483 2000.
- 484
- 485 GHASEMI, Fahimeh Mohamad et al. Effect of melatonin on proliferative activity and apoptosis
486 in spermatogenic cells in mouse under chemotherapy. **Journal of Reproduction and**
487 **Contraception**, v. 21, n. 2, p. 79-94, 2010.
- 488
- 489 HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, J. M. The definition and measurement of antioxidants in
490 biological systems. **Free radical biology & medicine**, v. 18, n. 1, p. 125-126, 1995.
- 491
- 492 HAMAD, Fatma B.; MUBOFU, Egid B. Potential biological applications of bio-based anacardic
493 acids and their derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 8569-
494 8590, 2015.
- 495
- 496 HOLLANDS, Andrew et al. Natural product anacardic acid from cashew nut shells stimulates
497 neutrophil extracellular trap production and bactericidal activity. **Journal of Biological**
498 **Chemistry**, v. 291, n. 27, p. 13964-13973, 2016.
- 499
- 500 HUANG, Xiao-yan et al. Construction of a proteome profile and functional analysis of the
501 proteins involved in the initiation of mouse spermatogenesis. **Journal of proteome research**, v.
502 7, n. 8, p. 3435-3446, 2008.
- 503
- 504 HUANG, Xiao-Yan; SHA, Jia-Hao. Proteomics of spermatogenesis: from protein lists to
505 understanding the regulation of male fertility and infertility. **Asian journal of andrology**, v. 13,
506 n. 1, p. 18, 2011.
- 507
- 508 HUYGHEBAERT, Gerard; DUCATELLE, Richard; VAN IMMERSEEL, Filip. An update on
509 alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, v. 187, n.
510 2, p. 182-188, 2011.
- 511
- 512 JARVIS, S. et al. High fat diet causes distinct aberrations in the testicular
513 proteome. **International Journal of Obesity**, v. 44, n. 9, p. 1958-1969, 2020.
- 514
- 515 KARRE, Liz; LOPEZ, Keyla; GETTY, Kelly JK. Natural antioxidants in meat and poultry
516 products. **Meat science**, v. 94, n. 2, p. 220-227, 2013.
- 517
- 518 MIGLIACCIO, Vincenzo et al. High-fish oil and high-lard diets differently affect testicular
519 antioxidant defense and mitochondrial fusion/fission balance in male wistar rats: Potential
520 protective effect of ω 3 polyunsaturated fatty acids targeting mitochondria
521 dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 3110, 2019.
- 522
- 523 NAKAMURA, Nobuhiro. Ubiquitination regulates the morphogenesis and function of sperm
524 organelles. **Cells**, v. 2, n. 4, p. 732-750, 2013.
- 525
- 526 NASIRIKHAH, Ali et al. Dietary Guanidinoacetic acid modulates testicular histology and
527 expression of c-Kit and STRA8 genes in roosters. **Theriogenology**, v. 130, p. 140-145, 2019.

- 528
529 PAN, Zhiyong et al. An integrative analysis of transcriptome and proteome provides new insights
530 into carotenoid biosynthesis and regulation in sweet orange fruits. **Journal of proteomics**, v. 75,
531 n. 9, p. 2670-2684, 2012.
- 532
533 PARAMASHIVAPPA, R. et al. Novel method for isolation of major phenolic constituents from
534 cashew (*Anacardium occidentale* L.) nutshell liquid. **Journal of Agricultural and Food
535 Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2548-2551, 2001.
- 536
537 PARTANEN, Krisi H.; MROZ, Zdzislaw. Organic acids for performance enhancement in pig
538 diets. **Nutrition research reviews**, v. 12, n. 1, p. 117-145, 1999.
- 539
540 PAZ, María; MORÍN, Matías; DEL MAZO, Jesús. Proteome profile changes during mouse testis
541 development. **Comparative biochemistry and physiology Part D: Genomics and proteomics**,
542 v. 1, n. 4, p. 404-415, 2006.
- 543
544 RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e
545 alimentos gordurosos. **Química nova**, p. 755-760, 2006.
- 546
547 RASHIDI, Ali et al. The histopathological changes of liver and testis of Japanese quail chicks fed
548 different levels of dietary L-valine. **Veterinary and Animal Science**, v. 21, p. 100302, 2023.
- 549 ROCHA, L. L. C. V. **Anacardato de cálcio associado com ácido cítrico na ração de
550 crescimento para poedeiras leves criadas no piso**. 2022. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)
551 –Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- 552
553 ROSTAGNO, H. S. et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e
554 exigências nutricionais de aves e suínos. 3ª edição. **Viçosa, MG: UFV**, 2011.
- 555
556 SANTOS, R. C. **Anacardato de cálcio como fonte de ácido anacárdico na alimentação de
557 codornas japonesas em postura**. 2014. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento
558 de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- 559
560 SANTOS, Tatiana C. et al. Desenvolvimento corporal e testicular em machos de codornas de
561 corte e de postura de 25 a 360 dias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1205-1212, 2012.
- 562
563 SHAH, Manzoor Ahmad; BOSCO, Sowriappan John Don; MIR, Shabir Ahmad. Plant extracts as
564 natural antioxidants in meat and meat products. **Meat science**, v. 98, n. 1, p. 21-33, 2014.
- 565
566 SHEWEITA, Salah A.; TILMISANY, Abdulkarim M.; AL-SAWAF, Hussein. Mechanisms of
567 male infertility: role of antioxidants. **Current drug metabolism**, v. 6, n. 5, p. 495-501, 2005.
- 568
569 SILVA, C. P. **Anacardato de cálcio e sua associação com ácido cítrico na ração para
570 matrizes de codornas de corte**. 2019. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de
571 Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- 572
573 SILVA, JHV da; COSTA, FGP2009. Tabela para codornas japonesas e europeias. **Jaboticabal,
574 SP: Funep**, v. 110, 2009.

- 575
576 SURAI, Peter F. Antioxidant systems in poultry biology: superoxide dismutase. **Journal of**
577 **Animal Research and Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 8, 2016.
578
- 579 SURAI, Peter F. Antioxidants in poultry nutrition and reproduction: An update. **Antioxidants**, v.
580 9, n. 2, p. 105, 2020.
581
- 582 TOYOMIZU, Masaaki et al. Reducing effect of dietary anacardic acid on body fat pads in
583 rats. **Animal science journal**, v. 74, n. 6, p. 499-504, 2003.
584
- 585 TRAVERT, Carine et al. Rat Leydig cells use apolipoprotein E depleted high density lipoprotein
586 to regulate testosterone production. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 213, p. 51-59,
587 2000.
588
- 589 TREVISAN, M. T. S. et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium*
590 *occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical toxicology**, v.
591 44, n. 2, p. 188-197, 2006.
592
- 593 WANG, Jing et al. In-depth proteomic analysis of whole testis tissue from the adult rhesus
594 macaque. **Proteomics**, v. 14, n. 11, p. 1393-1402, 2014.
595
- 596 WATANABE, G. C. A. **Anacardato de cálcio e suas associações com ácido cítrico na**
597 **alimentação de poedeiras comerciais**. 2021. Tese (doutorado em Zootecnia) Universidade
598 Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.
599
- 600 ZAMPIGA, Marco et al. Application of omics technologies for a deeper insight into quali-
601 quantitative production traits in broiler chickens: A review. **Journal of animal science and**
602 **biotechnology**, v. 9, p. 1-18, 2018.
603
- 604 ZHU, Dahai; DIX, David J.; EDDY, E. M. HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in
605 meiosis I of mouse spermatocytes. **Development**, v. 124, n. 15, p. 3007-3014, 1997.
606

607 **FIGURAS E TABELAS**

608



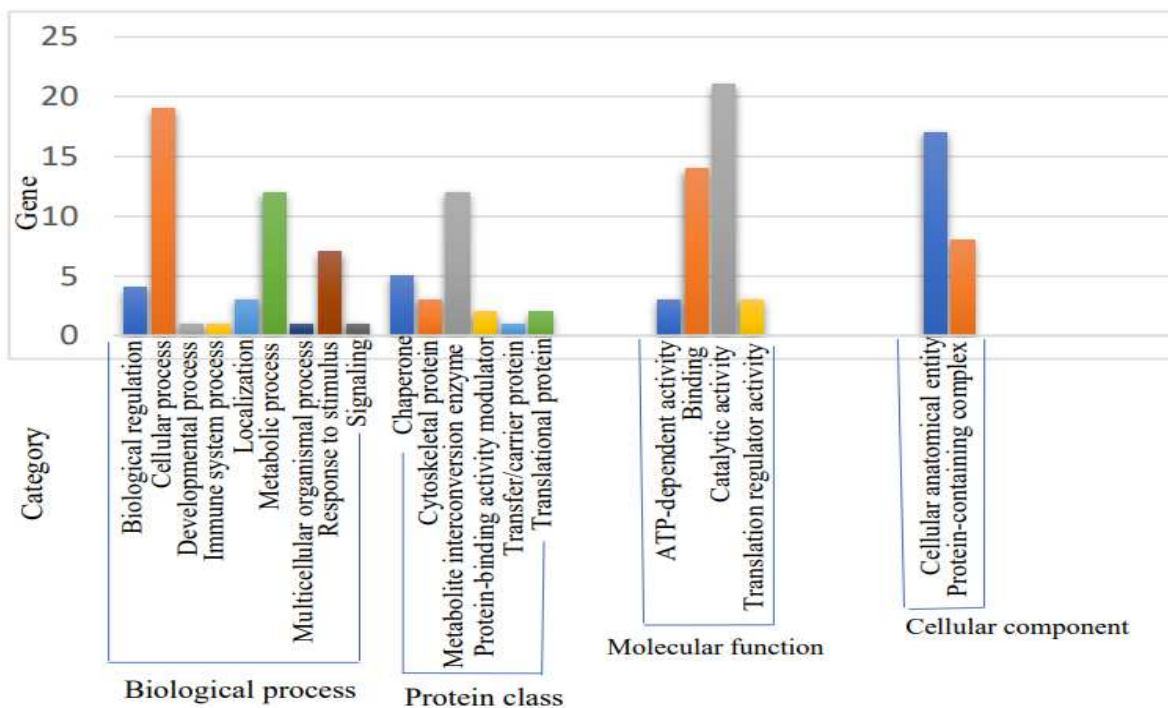
609

610 **Figura 1.** Gel de poliacrilamida do músculo Pectoralis Major de codornas (*Coturnix coturnix*
 611 *coturnix*), alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico. M- marcador;
 612 T1 - ração controle; T2 - 0,25% ANC; T3 - 0,25% ANC e 0,25% AC; T4 - 0,50% ANC; T5 - 0,50%
 613 ANC e 0,25% AC; T6 - 0,50% ANC e 0,50% AC; T7 - 0,75% ANC; T8 - 0,75% ANC e 0,25%
 614 AC; T9 - 0,75% ANC e 0,50% AC; respectiva quantidade de anacardato de cálcio (ANC) e ácido
 615 cítrico (AC). SDS-PAGE de 12,5% corado com comassie R-250.

616

617

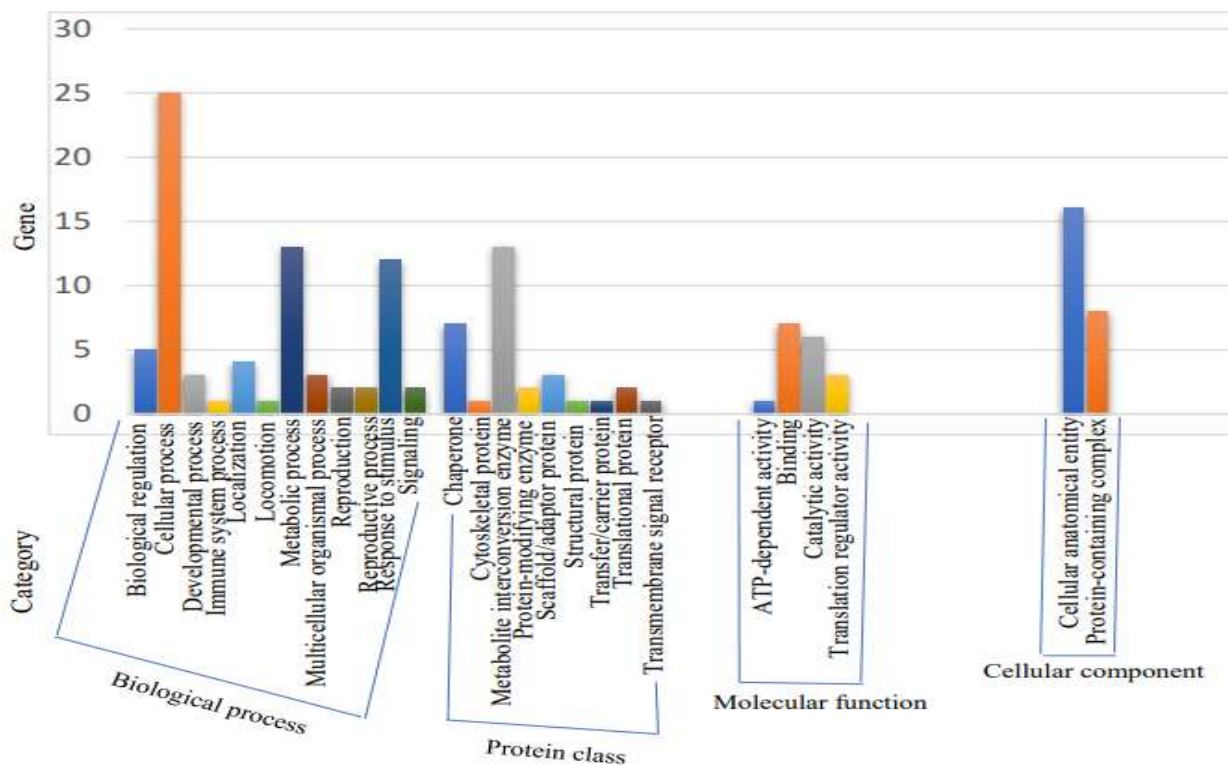
618 a)



619

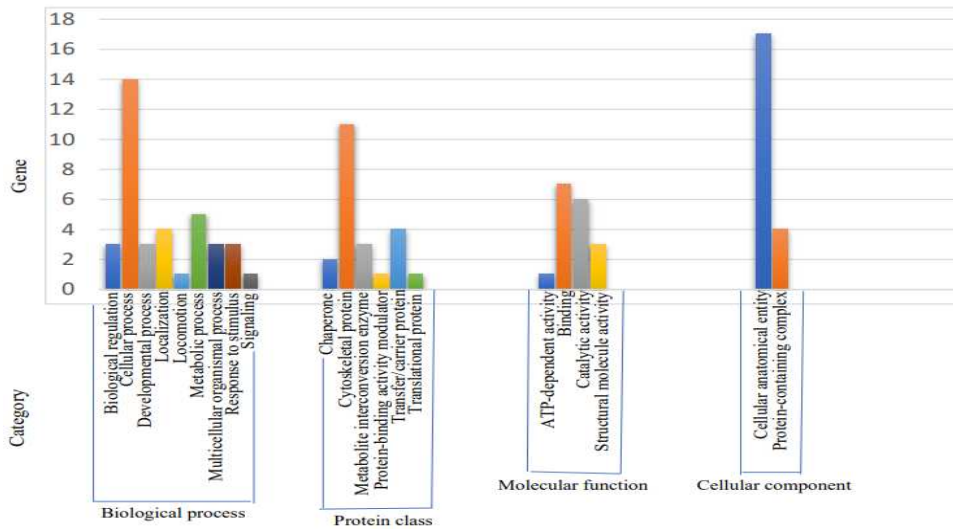
620 b)

621



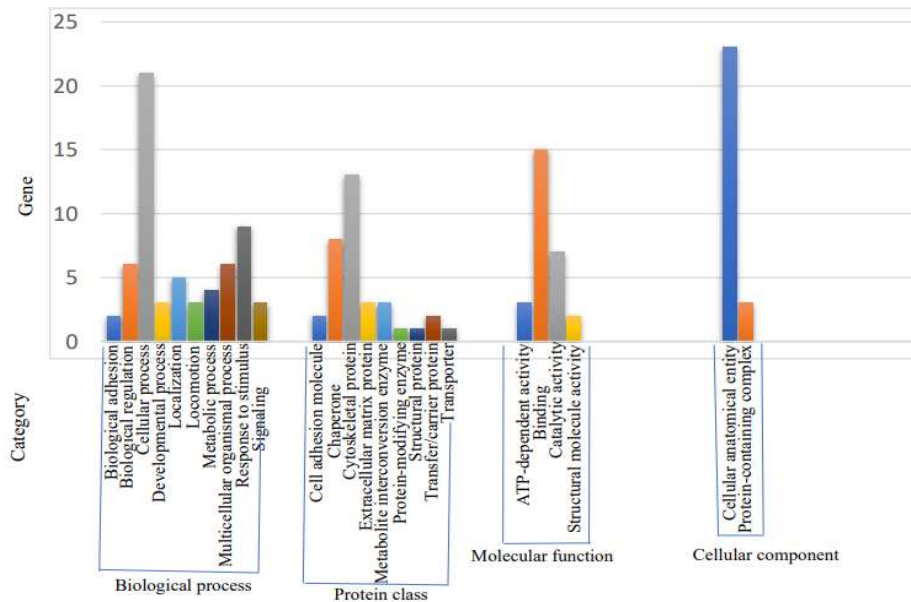
622

623 c)



624

625 d)

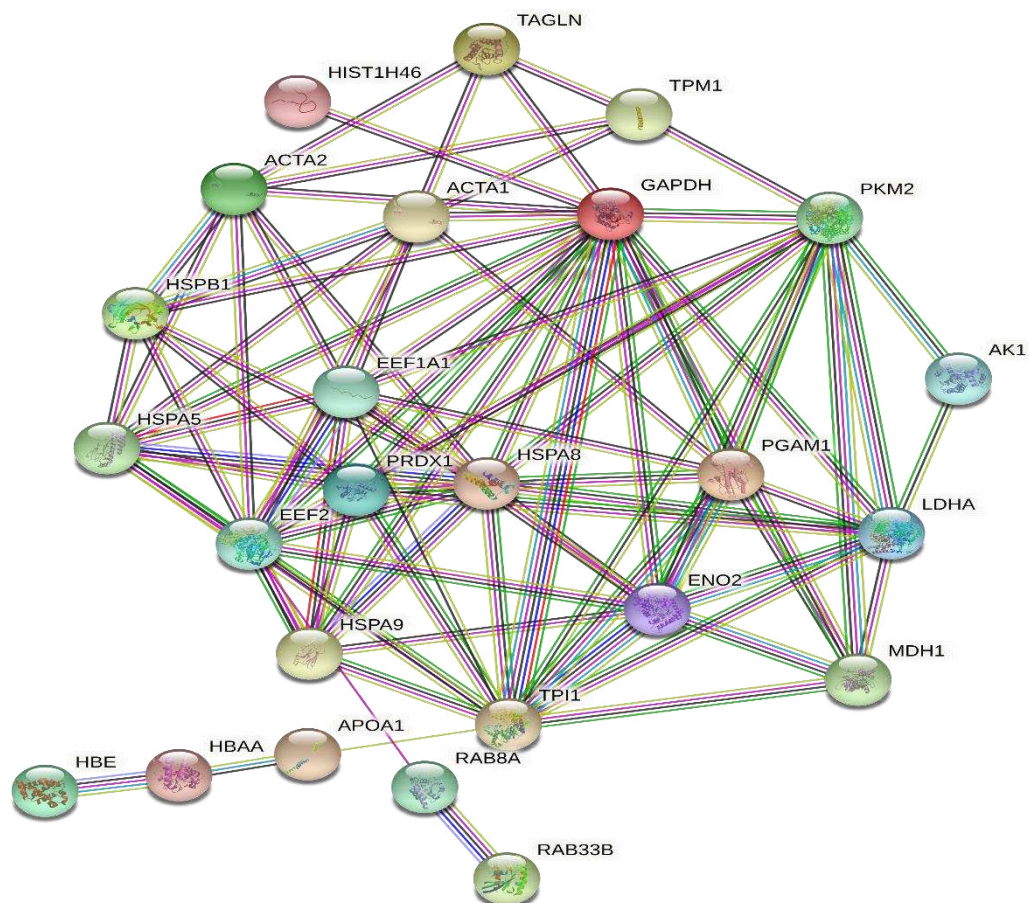


626

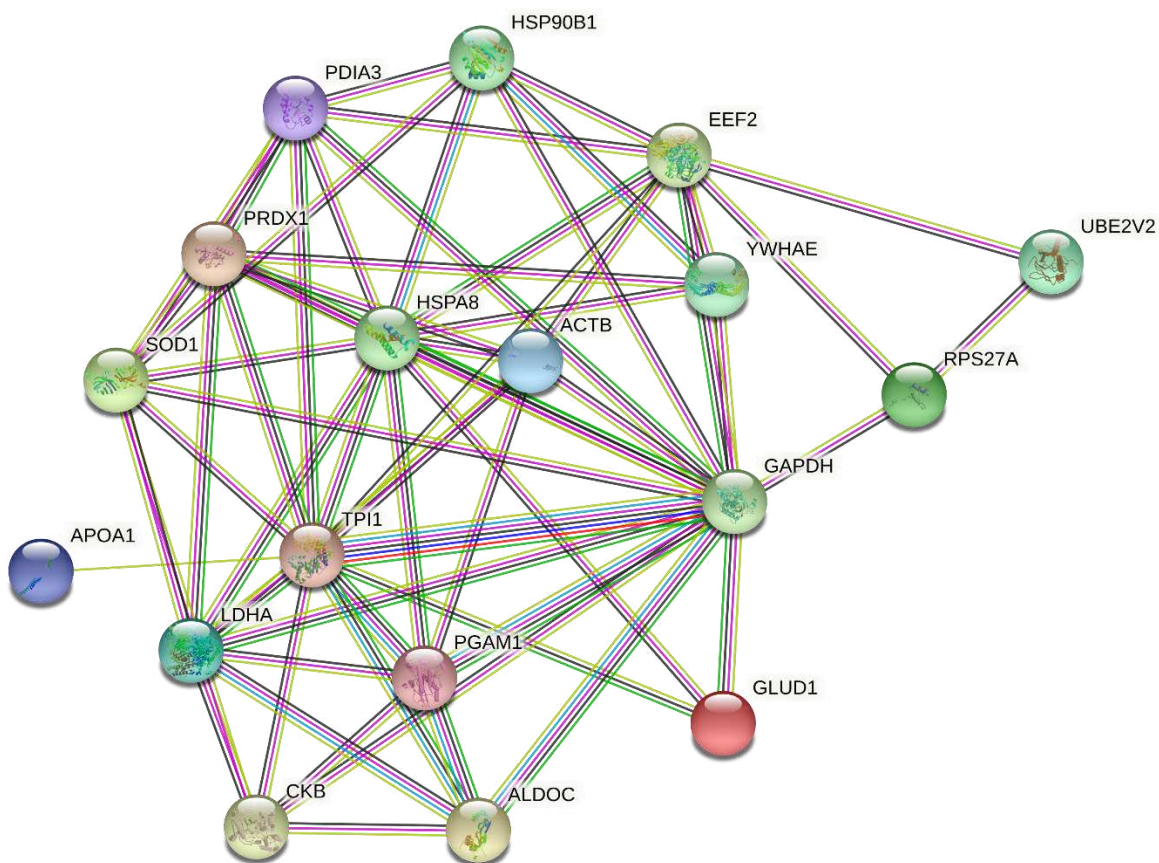
627 **Figura 2.** Termos de ontologia gênica de proteínas do músculo Pectoralis Major (a), testículo (b),
 628 epidídimo (c) e glândula acessória (d) de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*) submetidas a
 629 diferentes níveis de dieta com anacardato de cálcio associado ao ácido cítrico, associados ao
 630 processo biológico, classe proteica, função molecular e componente celular. Os dados e a
 631 identificação das proteínas foram analisados pelo sistema de classificação Panther
 632 (<http://geneontology.org/>) e com base no banco de dados UniprotKB.

633

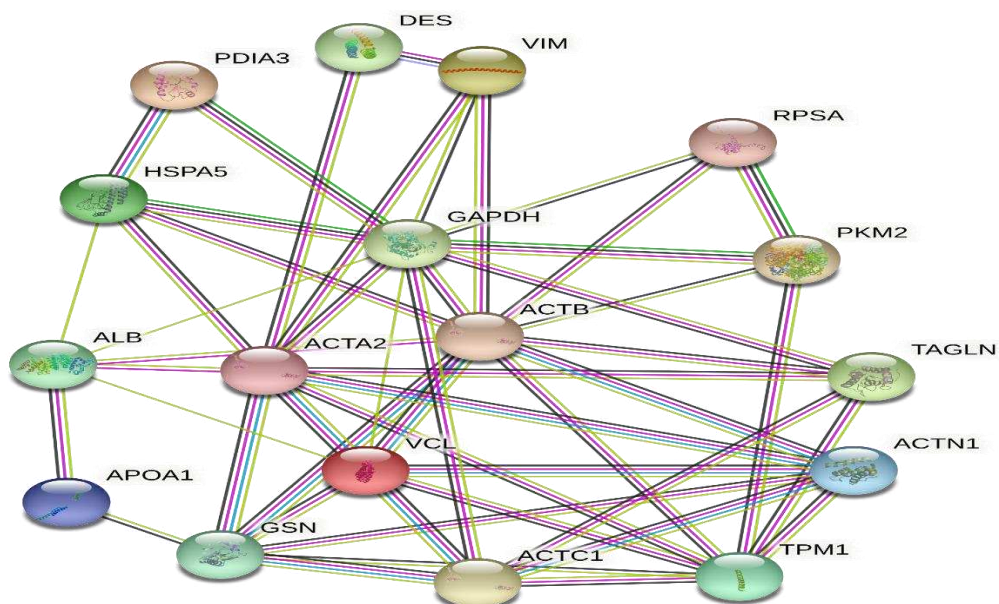
a)



b)



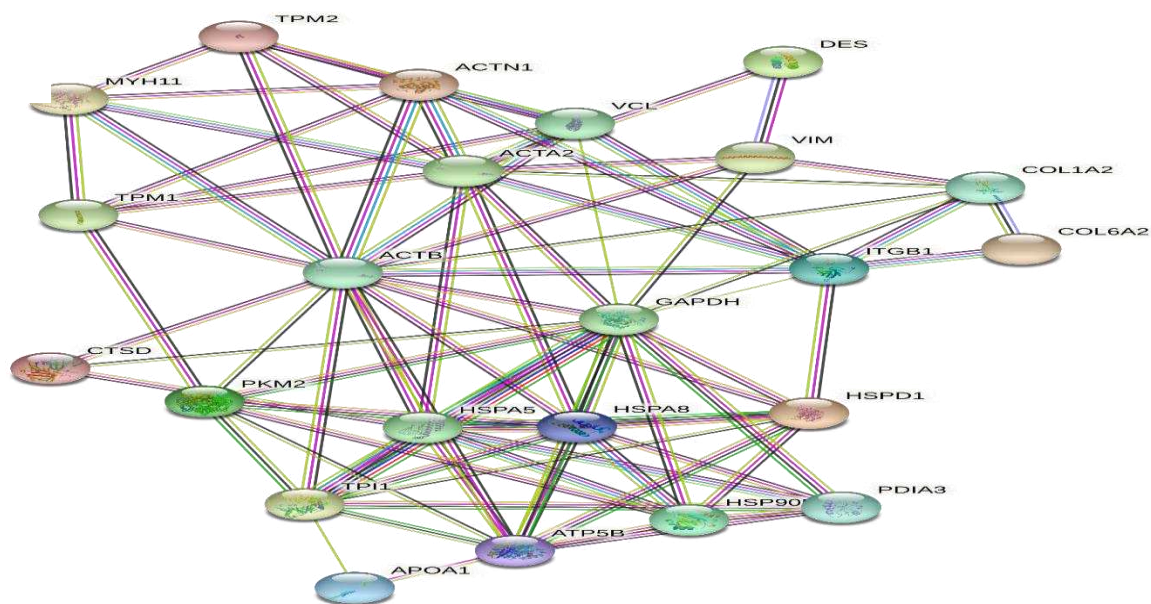
c)



635

636

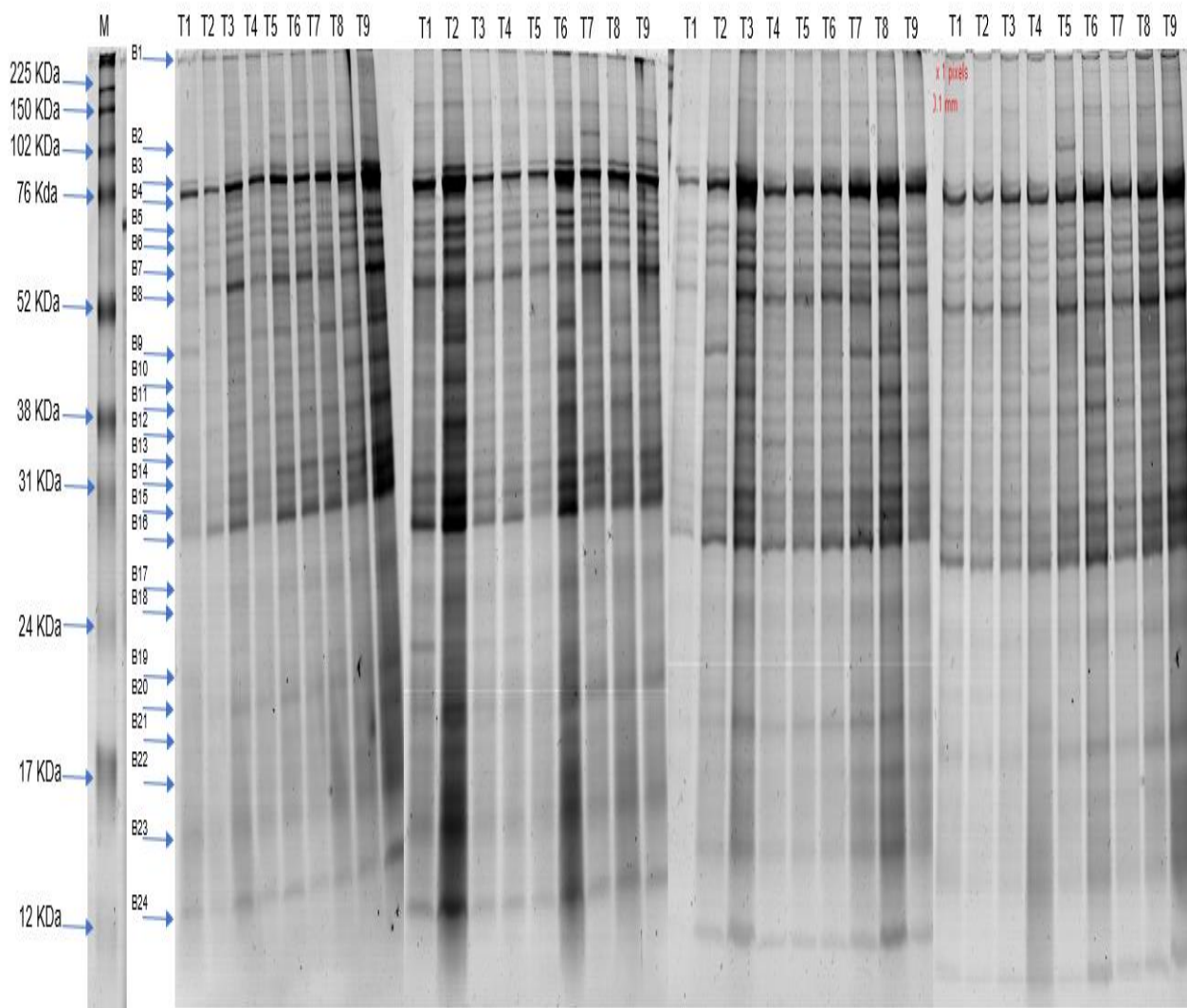
d)



637

638 **Figura 3.** Análise in silico das interações proteicas do músculo Pectoralis Major (A), testículo (B),
 639 epidídimo (C) e glândula acessória (D) em codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*)
 640 determinadas por STRING software version 11.0. A análise inclui todas as proteínas incluídas na
 641 tabela suplementar, mas com exceção das que não tiveram interação.

642



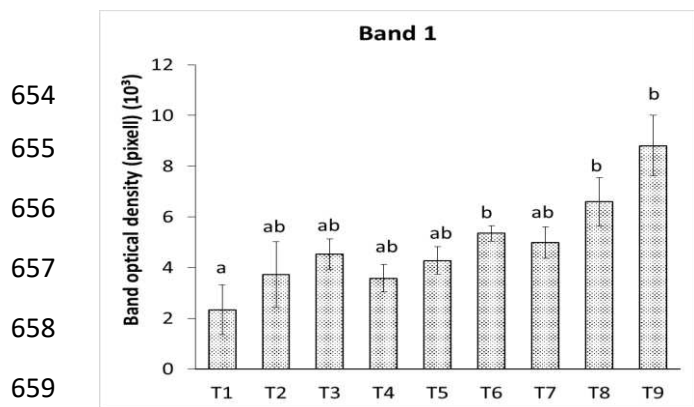
643 Fonte: Autor

644 **Figura 4.** Gel de poliacrilamida do tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*),
 645 alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico. M- marcador; T1 - ração
 646 controle; T2 - 0,25% ANC; T3 - 0,25% ANC e 0,25% AC; T4 - 0,50% ANC; T5 - 0,50% ANC e
 647 0,25% AC; T6 - 0,50% ANC e 0,50% AC; T7 - 0,75% ANC; T8 - 0,75% ANC e 0,25% AC; T9 -
 648 0,75% ANC e 0,50% AC; representam a respectiva quantidade de anacardato de cálcio (ANC) e
 649 ácido cítrico (AC) fornecido nas dietas dos animais durante o período experimental. SDS-PAGE
 650 de 12,5% corado com comassie R-250.

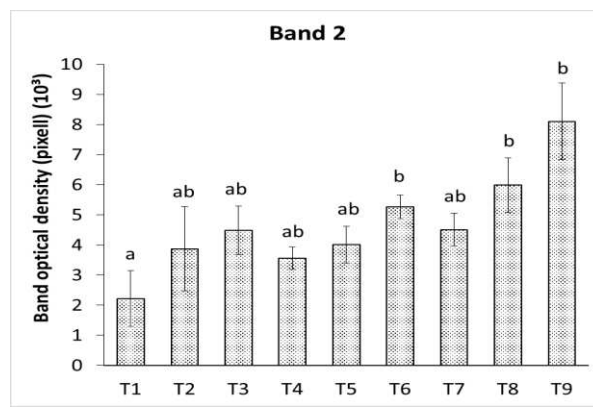
651 .

652

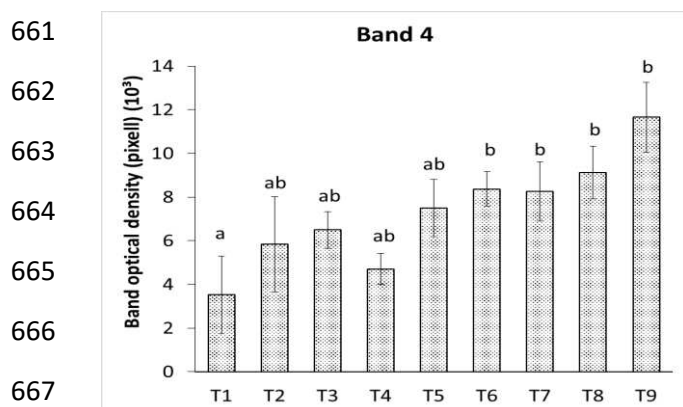
653



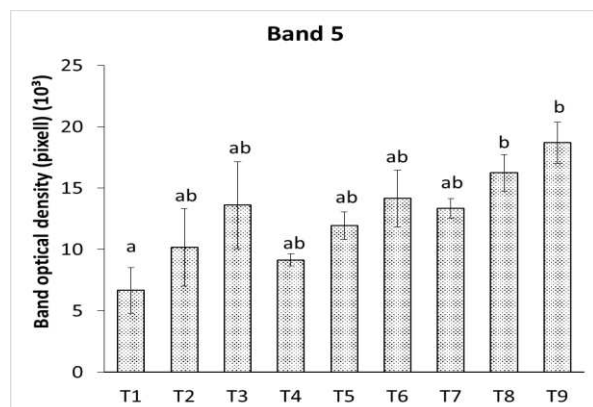
660 1) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;



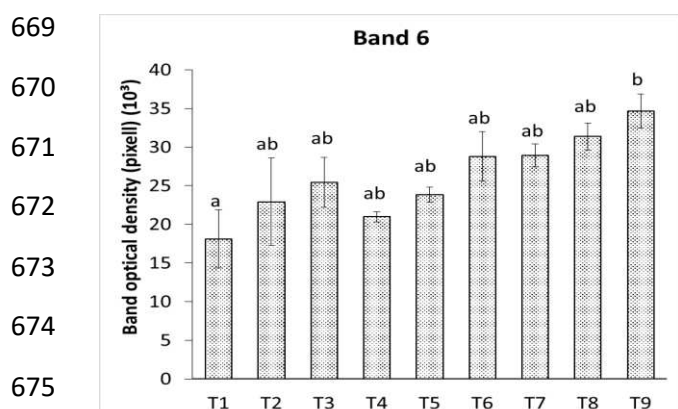
2) Tudor domain-containing protein 7;



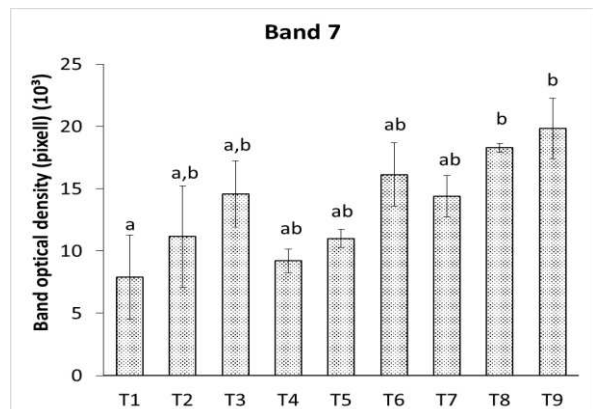
668 4) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;



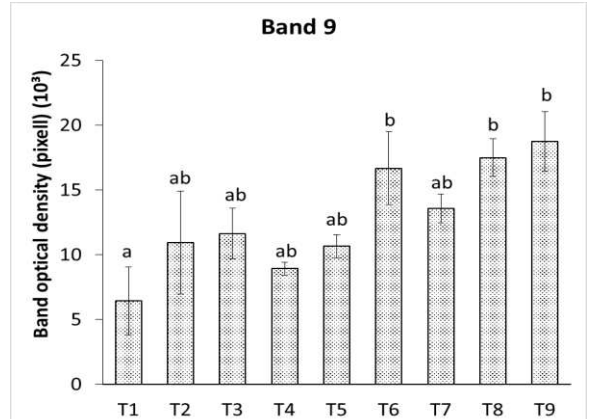
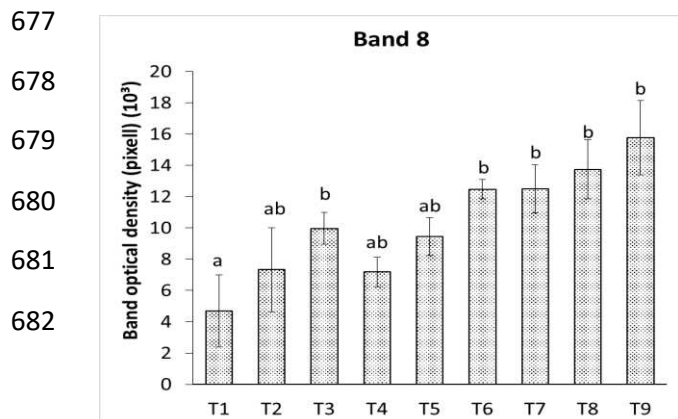
5) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;



676 6) Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a;



677 7) Heat shock protein HSP 90-alpha;



683

684

685

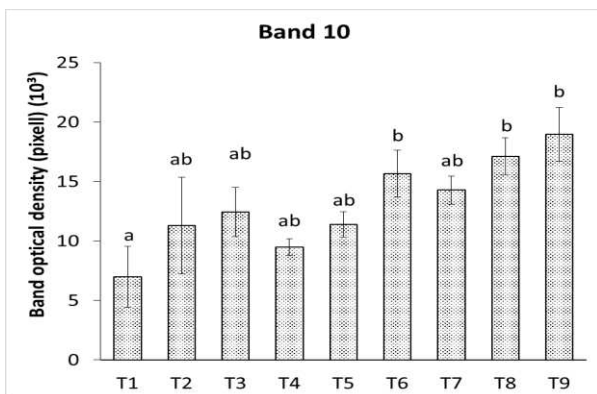
686

687

688

689

690



10) Peroxiredoxin-1;

691

692

693

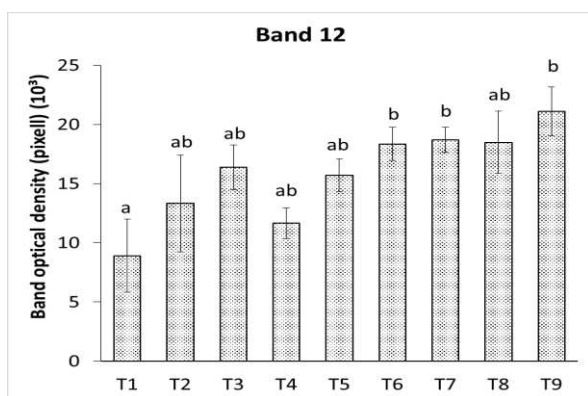
694

695

696

697

698



12) Heat shock protein HSP 90-alpha; Glutathione S-transferase 3; Glutathione S-transferase 2;

699

700

701

702

703

704

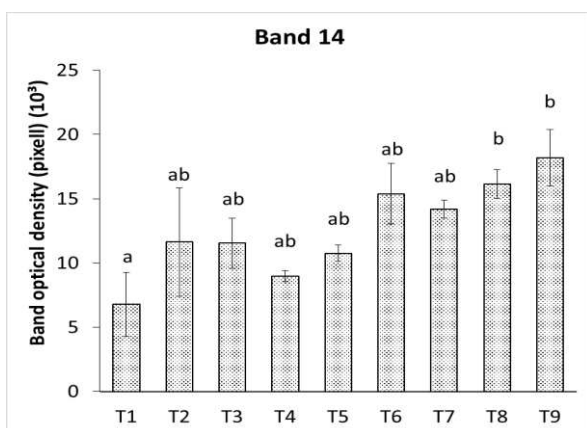
705

706

707

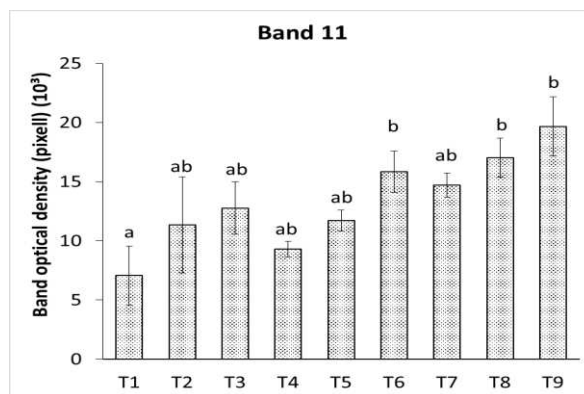
708

709

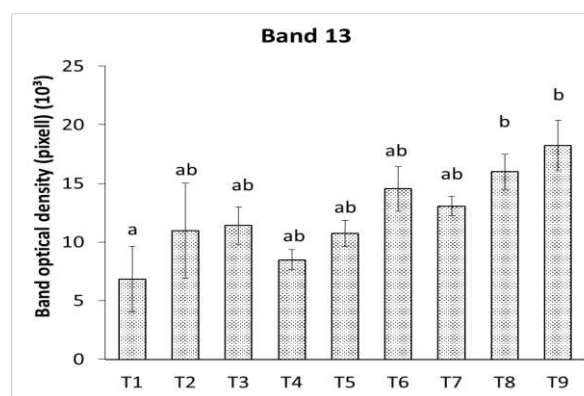


14) Carbonic anhydrase 2; Apolipoprotein A-I; Actin, cytoplasmic 1; 14-3-3 protein epsilon; Phosphoglycerate mutase 1

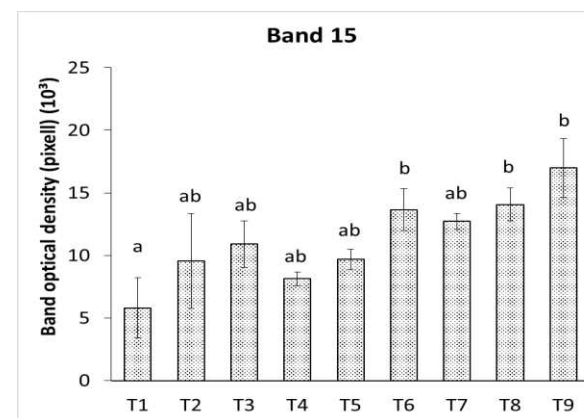
710



11) Peroxiredoxin-1;



13) Triosephosphate isomerase; Apolipoprotein A-I; Glutathione S-transferase 2; L-lactate dehydrogenase A chain; Heat shock protein HSP 90-alpha;



15) Actin, cytoplasmic 1; Phosphoglycerate mutase 1;

711

712

713

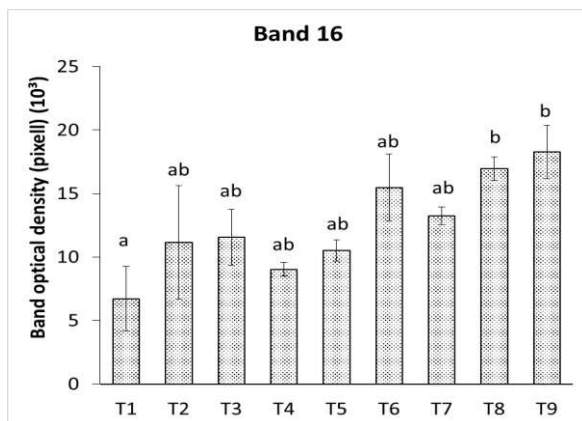
714

715

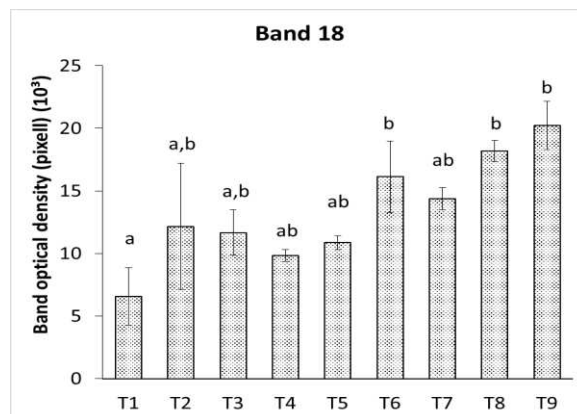
716

717

718



16) Actin, cytoplasmic 1; Endoplasmin;



18) Rho crystallin;

719

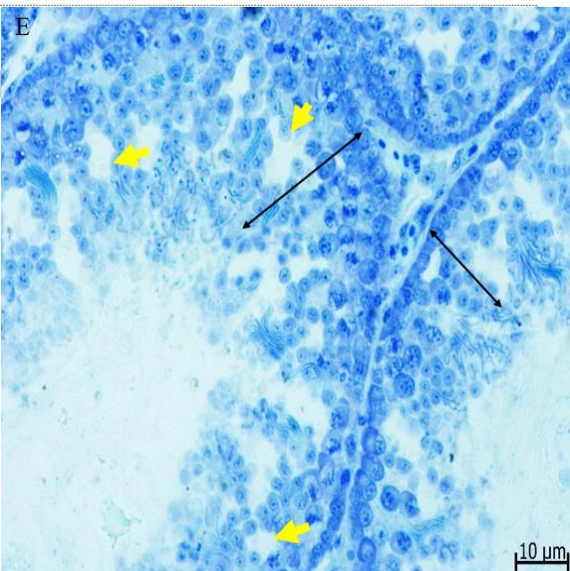
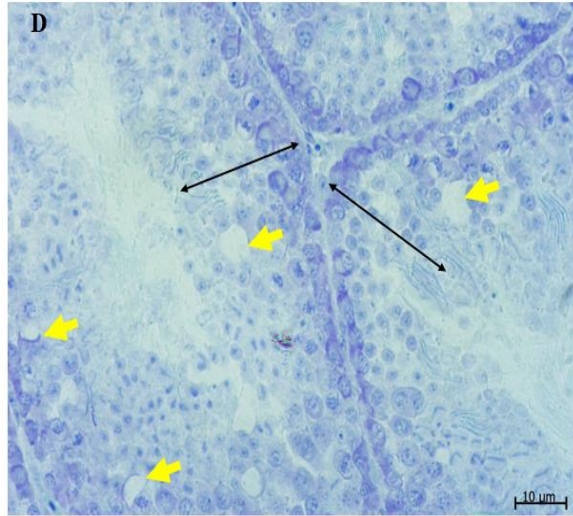
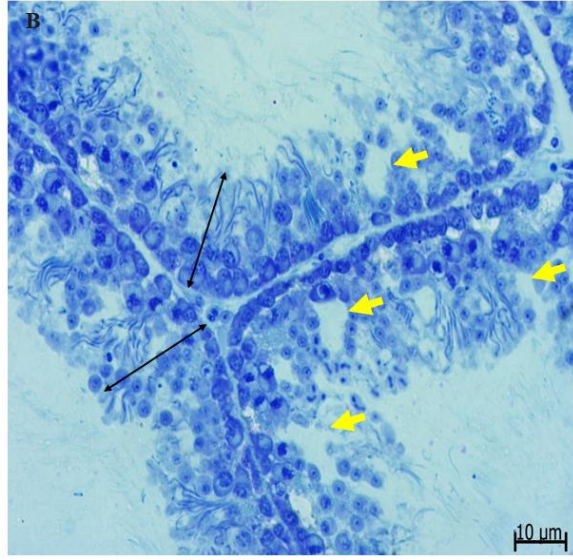
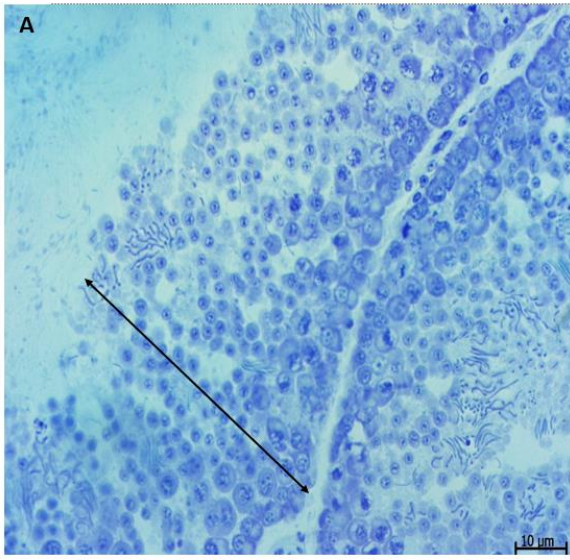
720

721 **Figura 5.** Comparação entre bandas de proteínas identificadas do tecido testicular de codornas

722 (Coturnix coturnix coturnix) alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido

723 cítrico. As letras diferentes diferem ($P < 0,05$).

724



726 **Figura 6-** Imagens de microscopia óptica do túbulo seminífero de codornas europeias alimentadas
727 com diferentes níveis de anacardato de cálcio (ANC) associado ou não ao ácido cítrico (AC) 40X.
728 Tratamento controle (A) apresentaram organização celular normal no epitélio seminífero, com
729 correta distribuição, maturação e diferenciação celular durante a produção de espermatozoides
730 (mostrado pela seta preta); Formação de vacúolos entre células germinativas nos tratamentos
731 0,50% ANC e 0,50% AC (B); 0,75% ANC (C), 0,75% ANC e 0,25% AC (D) e 0,75% ACN e
732 0,50% AC (E) respectivamente (mostrados pela seta amarela).

733 **Tabela 1.** Média e desvio padrão dos dados morfométricos do testículo e peso das codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*)
 734 alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico

	Tratamentos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
Peso ave (g)	296,0±8,5 ^a	327,3±14,7 ^{bc}	304,1±16,1 ^{ace}	312,1±14,8 ^{ace}	294,1±18,5 ^{adeg}	313,2±14,4 ^{aceg}	323,1±18,7 ^{aceg}	297,3±13,2 ^{adegi}	339,3±11,3 ^{bcfhj}
Peso testículo (g)	4,19±0,9 ^a	3,68±0,5 ^{ab}	4,4±0,6 ^{ab}	4,71±0,8 ^{ac}	4,23±0,9 ^{ab}	3,9±0,4 ^{ab}	4,79±1,2 ^{ac}	4,58±1,0 ^{ab}	4,33±1,1 ^{ab}
Comprimento (mm)	23,9±3,7 ^a	24,6±2,9 ^{ac}	25,9±3,1 ^{ac}	28,2±2,7 ^{bde}	23,5±2,9 ^{acfg}	24,5±0,9 ^{acfg}	24,6±2,3 ^{acfg}	24,0±2,7 ^{acfg}	26,6±2,7 ^{aceh}
Diâmetro (mm)	16,9±2,0 ^a	17,6±0,8 ^{ac}	17,6±0,9 ^{ace}	19,5±1,4 ^{bdfg}	17,8±1,6 ^{aceg}	17,1±1,3 ^{acehi}	17,1±2,4 ^{acehi}	18,8±1,2 ^{bcegi}	18,8±1,8 ^{bcegi}
IGS	1,4±0,4	1,2±0,1	1,4±0,3	1,5±0,3	1,6±0,3	1,3±0,2	1,4±0,5	1,4±0,2	1,3±0,3

735 Representam: índice gonadossomático (IGS); T1 - ração controle; T2 - 0,25% Anacardato de cálcio; T3 - 0,25% Anacardato de cálcio e 0,25% ácido
 736 cítrico; T4 - 0,50% Anacardato de cálcio; T5 - 0,50% Anacardato de cálcio e 0,25% ácido cítrico; T6 - 0,50% Anacardato de cálcio e 0,50% ácido
 737 cítrico; T7 - 0,75% Anacardato de Cálcio; T8 - 0,75% Anacardato de Cálcio; e 0,25% ácido cítrico; T9 - 0,75% Anacardato de Cálcio e 0,50% ácido
 738 cítrico. Letra minúsculas na mesma linha semelhantes não diferem estatisticamente.

739 **Tabela 2.** Composição percentual e nutricional calculada das rações experimentais

INGREDIENTES	QUANTIDADE (%)
Milho	41,05
Farelo de soja	40,79
Calcário calcítico	7,55
Óleo de soja	6,60
Fosfato bicálcico	1,67
DL- Metionina	0,27
L-Lisina	0,05
L- Treonina	0,07
Premix vitamínico ¹	0,10
Premix mineral ²	0,05
Inerte	1,25
Sal	0,55
TOTAL	100,00
COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL CALCULADA	
Energia metabolizável (kcal/kg)	2800
Proteína bruta (%)	21,00
Cálcio (%)	3,00
Fósforo disponível (%)	0,30
Lisina digestível (%)	1,100
Met + cist digestível (%)	0,700
Metionina digestível (%)	0,419
Treonina digestível (%)	0,810

740 ¹Composição por kg do produto: Vit. A – 9.000.000,00 UI; Vit. D3 – 2.500.000,00 UI; Vit. E –
741 20.000,00 mg; Vit. K3 – 2.500,00 mg; Vit. B1 – 2.000,00 mg; Vit. B2 – 6.000,00 mg; Vit. B12 –
742 15,00 mg; Niacina – 35.000,00 mg; Ácido pantotênico – 12.000,00 mg; Vit. B6 – 8.000,00 mg;
743 Ácido fólico – 1.500,00 mg; Selênio – 250,00 mg; Biotina – 100,00 mg; ²Composição por kg do
744 produto: Ferro – 100.000,00 mg; Cobre – 20,00 g; Manganês – 130.000,00 mg; Zinco – 130.000,10
745 mg; Iodo – 2.000,00

746 **Tabela 3-** Proteínas do músculo *Pectoralis Major* de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*) alimentadas com diferentes níveis de
 747 anacardato de cálcio e ácido cítrico. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE unidimensional e identificadas por espectrometria de
 748 massa tandem (ESI-Q-ToF)

Band	Protein name	Gene	Accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Matched peptides	Ion score	m/z
1	Pyruvate kinase PKM	PKM	KPYM_CHICK	49	7	⁽⁸⁾ TFIAIKPDGVQR ⁽¹⁹⁾	49	4489232
2	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	HS90A_CHICK	54	2	⁽²¹⁾ AGFAGDDAPR ⁽³⁰⁾	54	4887269
3	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	GRP75_CHICK	488	14	⁽²⁷⁾ VEIANDQGNR ⁽³⁷⁾	63	614.8145
						⁽³⁸⁾ TTPSYVAFTDTER ⁽⁵⁰⁾	71	744.3443
						⁽³⁸⁾ TTPSYVAFTDTER ⁽⁵⁰⁾	63	744.3503
						⁽¹²⁸⁾ MKEIAEAYLGK ⁽¹³⁸⁾	48	626.8311
						⁽¹²⁸⁾ MKEIAEAYLGK ⁽¹³⁸⁾	42	423.5498
						⁽¹²⁸⁾ MKEIAEAYLGK ⁽¹³⁸⁾	82	634.8255
						⁽¹⁶¹⁾ DAGTITGLNVMR ⁽¹⁷²⁾	74	624.3301
						⁽¹⁶¹⁾ DAGTITGLNVMR ⁽¹⁷²⁾	42	632.3185
						⁽¹⁷³⁾ IINEPTAAAIAYGLDK ⁽¹⁸⁸⁾	68	830.4514
						⁽¹⁷³⁾ IINEPTAAAIAYGLDKK ⁽¹⁸⁹⁾	85	596.6685
						⁽¹⁷³⁾ IINEPTAAAIAYGLDKK ⁽¹⁸⁹⁾	85	596.9997
						⁽²²⁴⁾ STAGDTHLGGEDFDNR ⁽²³⁹⁾	53	564.5747
						⁽³⁰³⁾ ARFEELNADLFR ⁽³¹⁴⁾	89	740.8808
3	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	HSP7C_CHICK	96	3	⁽⁴⁴⁷⁾ APIIAVTR ⁽⁴⁵⁴⁾	41	420.7654
						⁽⁴⁸⁹⁾ VNLGMNVGK ⁽⁴⁹⁷⁾	56	466.2552
						⁽⁴⁸⁹⁾ VNLG ⁽⁴⁹⁷⁾	55	474.2574
4	Heat shock 70 kDa protein		HSP70_CHICK	42	2	⁽⁸⁸⁾ TTPSVVAFTADGER ⁽¹⁰¹⁾	42	7258617
4	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	HSP7C_CHICK	105	4	⁽¹³⁷⁾ TFAPEEISAMVLTk ⁽¹⁵⁰⁾	63	776.8956
						⁽¹³⁷⁾ TFAPEEISAMVLTk ⁽¹⁵⁰⁾	52	776.8957
						⁽¹⁹⁶⁾ IINEPTAAAIAYGLDK ⁽²¹¹⁾	47	830.4481
5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	HSPA5	BIP_CHICK	63	4	⁽²⁶⁾ VEIANDQGNR ⁽³⁶⁾	51	614.8209
						⁽¹⁷²⁾ IINEPTAAAIAYGLDKK ⁽¹⁸⁸⁾	43	596.6612
5	Heat shock 70 kDa protein		HSP70_CHICK	41	10	⁽¹⁸⁾ IAGHAEYGAELDR ⁽³²⁾	41	5345883
6	Elongation factor 2	EEF2	EF2_CHICK	56	1	⁽⁴¹⁶⁾ VFSGLVSTGLK ⁽⁴²⁶⁾	56	5543284

7	Hemoglobin subunit alpha-A	HBAA	HBA_COTJA	118	6	(38)TTPSYVAFTDTER ⁽⁵⁰⁾ (173)IINEPTAAAIAYGLDK ⁽¹⁸⁸⁾ (305)FEELNADLFR ⁽³¹⁴⁾	84 47 52	744.3486 830.4481 627.3065
7	Histone H4	H4-I	H4_CHICK	509	18	(26)VEIANDQGNR ⁽³⁶⁾ (37)TTPSYVAFTDTER ⁽⁴⁹⁾ (37)TTPSYVAFTDTER ⁽⁴⁹⁾ (57)NQVAMNPTNTVFDK ⁽⁷¹⁾ (57)NQVAMNPTNTVFDK ⁽⁷²⁾ (57)NQVAMNPTNTVFDK ⁽⁷²⁾ (89)HWPFTVVNDAGRPK ⁽¹⁰²⁾ (113)SFYP EEISSMVLTK ⁽¹²⁶⁾ (113)SFYP EEISSMVLTK ⁽¹²⁶⁾ (127)MKEIAEAYLGK ⁽¹³⁷⁾ (127)MKEIAEAYLGK ⁽¹³⁷⁾ (127)MKEIAEAYLGK ⁽¹³⁷⁾ (172)IINEPTAAAIAYGLDK ⁽¹⁸⁷⁾ (172)IINEPTAAAIAYGLDKK ⁽¹⁸⁸⁾ (172)IINEPTAAAIAYGLDKK ⁽¹⁸⁸⁾ (221)STAGDTHLGGEDFDNR ⁽²³⁶⁾ (510)LSKEDIER ⁽⁵¹⁷⁾	63 71 63 57 55 55 50 49 49 48 42 82 68 85 85 53 44	614.8145 744.3443 744.3503 833.3928 607.9647 608.2928 541.9455 815.9050 815.9081 626.8311 423.5498 634.8255 830.4514 596.6685 596.9997 564.5747 330.5116
8	Nucleoside diphosphate kinase		NDK_CHICK	65	9	(47)ISGLIYEETR ⁽⁵⁶⁾	65	5908156
8	Actin, aortic smooth muscle	ACTA2	ACTA_CHICK	178	4	(335)ALLFVPR ⁽³⁴¹⁾ (383)GVVDS EDLPLNISR ⁽³⁹⁶⁾ (486)HVYYITGETK ⁽⁴⁹⁵⁾	51 86 41	408.2578 757.3955 605.8098
9	Ras-related protein Rab-8A	RAB8A	RAB8A_CHICK	73	6	(160)VVLAYEPVWAIGTGK ⁽¹⁷⁴⁾	73	8019425
9	Transgelin	TAGLN	TAGL_CHICK	50	2	(21)AGFAGDDAPR ⁽³⁰⁾	50	4887250
9	Ras-related protein Rab-33B	RAB33B	RB33B_CHICK	62	5	(59)LQIWDTAGQER ⁽⁶⁹⁾	62	6588323

9	Ras-related protein Rab-6A	RAB6A	RAB6A_CHICK	437	43	(47)ASGKDAISQFESSAVGK ⁽⁶³⁾ (51)DAISQFESSAVGK ⁽⁶³⁾ (69)LADNLDLTSAAAAK ⁽⁸²⁾ (69)LADNLDLTSAAAAK ⁽⁸²⁾ (83)LREDMTPYYR ⁽⁹²⁾ (120)IRPFLDQFSAK ⁽¹³⁰⁾ (142)LAPVAQELKDLTK ⁽¹⁵⁴⁾ (164)LTPVAEEVR ⁽¹⁷²⁾ (197)LSQKLEEIR ⁽²⁰⁵⁾ (208)GIPQASEYQAK ⁽²¹⁸⁾ (230)MTPLVQEFKER ⁽²⁴⁰⁾ (230)MTPLVQEFKER ⁽²⁴⁰⁾ (252)LIDLLDEVQK ⁽²⁶¹⁾	49 78 103 72 42 65 89 46 55 41 67 74 50	561.2798 669.8262 687.3554 687.3588 672.3217 661.3596 713.4125 507.2823 372.5477 596.2991 459.9072 465.2398 593.3366
9	Heat shock protein beta-1	HSPB1	HSPB1_CHICK	44	6	(31)LLIVYPWTQR ⁽⁴⁰⁾	44	6448706
10	Triosephosphate isomerase	TPI1	TPIS_CHICK	207	22	(79)IPDSPPTMVFK ⁽⁸⁹⁾ (79)IPDSPPTMVFK ⁽⁸⁹⁾ (90)QMEQIAQFLK ⁽⁹⁹⁾ (173)NIIGLQMGTKN ⁽¹⁸³⁾ (173)NIIGLQMGTKN ⁽¹⁸³⁾ (184)GASQAGMSYGRPR ⁽¹⁹⁶⁾ (184)GASQAGMSYGRPR ⁽¹⁹⁶⁾	50 45 47 48 49 96 53	616.3259 624.3158 618.3259 594.8210 602.8220 446.5476 451.8820
10	Apolipoprotein A-I	APOA1	APOA1_COTJA	52	4	(70)LTQSNAILR ⁽⁷⁸⁾	52	5082919
10	Hemoglobin subunit beta	HBB	HBB_COTJA	55	2	(199)GYSFVTTAER ⁽²⁰⁸⁾ (199)GYSFVTTAER ⁽²⁰⁸⁾	48 48	565.7761 566.2786
10	Glutathione S-transferase 2	GSTM2	GSTM2_CHICK	62	4	(82)IQLWDTAGQER ⁽⁹²⁾	62	6588323
10	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1	ACTS_CHICK	62	5	(64)LQLWDTAGQER ⁽⁷⁴⁾	62	6588323
11	Actin, aortic smooth muscle	ACTA2	ACTA_CHICK	48	7	(139)KYTLPPGVEATAVR ⁽¹⁵²⁾	48	5012803
12	Gamma-enolase	ENO2	ENOG_CHICK	48	3	(299)FVEGLPINDFSR ⁽³¹⁰⁾	48	6973668
12	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A	EF1A_CHICK	57	3	(359)LAQSHGWGVMVSHR ⁽³⁷²⁾	57	5275913
12	Beta-enolase	ENO3	ENOB_CHICK	61	3	(92)IQLVEEELDR ⁽¹⁰¹⁾	61	6223277

13	Actin, aortic smooth muscle	ACTA2	ACTA_CHICK	223	18	(161)VIHDFGIVEGLMTTVHAITA	84	653.5873
						TQK ⁽¹⁸⁴⁾	66	871.1198
						(161)VIHDFGIVEGLMTTVHAITA	71	685.3674
						TQK ⁽¹⁸⁴⁾	46	685.8610
						(199)GAAQNIIPASTGAAK ⁽²¹³⁾	50	398.2107
						(199)GAAQNIIPASTGAAK ⁽²¹³⁾	76	778.9101
						(226)LTGMAFR ⁽²³²⁾		
(233)VPNPNVSVVDLTCR ⁽²⁴⁶⁾								
13	Creatine kinase M-type	CKM	KCRM_CHICK	120	11	(161)VIHDFGIVEGLMTTVHAITA	50	653.5881
						TQK ⁽¹⁸⁴⁾	62	653.5907
						(161)VIHDFGIVEGLMTTVHAITA	62	685.3722
						TQK ⁽¹⁸⁴⁾		
						(199)GAAQNIIPASTGAAK ⁽²¹³⁾		
14	Phosphoglycerate kinase	PGK	PGK_CHICK	44	3	(157)LGDVVYVNDAFGTAHR ⁽¹⁷¹⁾	44	5456004
14	Creatine kinase M-type	CKM	KCRM_CHICK	178	18	(87)DLFDPVIQDR ⁽⁹⁶⁾	70	609.3079
						(267)AGHPFMWTEHLGYILTCPSN	46	732.8551
						LGTGLR ⁽²⁹²⁾	44	732.8554
						(267)AGHPFMWTEHLGYILTCPSN	63	736.8530
						LGTGLR ⁽²⁹²⁾	64	736.8567
						(267)AGHPFMWTEHLGYILTCPSN	49	940.4761
						LGTGLR ⁽²⁹²⁾	42	628.6484
						(267)AGHPFMWTEHLGYILTCPSN		
LGTGLR ⁽²⁹²⁾								
(342)LGFSEVEQVMVVDGVK ⁽³⁵⁸⁾								
(366)KLEQNPIDDMPAQK ⁽³⁸¹⁾								
15	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	383	29	(117)VIISAPSADAPMFVMGVNHE	51	659.5708
						KYDK ⁽¹⁴⁰⁾	106	649.5911
						(161)VIHDFGIVEGLMTTVHAITA	77	871.1202
						TQK ⁽¹⁸⁴⁾	53	685.3687
						(161)VIHDFGIVEGLMTTVHAITA	58	685.8613
						TQK ⁽¹⁸⁴⁾	47	398.2109
						(199)GAAQNIIPASTGAAK ⁽²¹³⁾	69	778.3774
						(199)GAAQNIIPASTGAAK ⁽²¹³⁾	104	778.9002
						(226)LTGMAFR ⁽²³²⁾	88	875.3943
						(226)LTGMAFRVPTPNVSVVDLTCR ⁽²⁴⁶⁾		
(233)VPNPNVSVVDLTCR ⁽²⁴⁶⁾								
(308)LVSWYDNEFGYSNR ⁽³²¹⁾								
15	Beta-enolase	ENO3	ENOB_CHICK	106	6	(184)VGAEVYHSLK ⁽¹⁹³⁾	47	551.7988
						(229)AAIAQAGYTDK ⁽²³⁹⁾	69	554.7834
						(413)IEEALGDK ⁽⁴²⁰⁾	59	437.7262

16	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1	TPM1_COTJA	39	6	(133)HIADLAGNSDLILPVPFNVINGGSH AGNK ⁽¹⁶²⁾	39	7536428
16	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	84	8	(21)AGFAGDDAPR ⁽³⁰⁾ (199)GYSFVTTAER ⁽²⁰⁸⁾ (318)EITALAPSTMK ⁽³²⁸⁾	53 62 41	488.7299 565.7764 581.3131
17	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	MDHC_CHICK	56	2	(256)IGGIGTVPVGR ⁽²⁶⁶⁾	56	5133106
17	Beta-enolase	ENO3	ENOB_CHICK	53	2	(87)DLFDPVIQDR ⁽⁹⁶⁾	53	6093076
17	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	391	17			
						(82)ISVVEQEKIDK ⁽⁹²⁾	53	429.9110
						(82)ISVVEQEKIDK ⁽⁹²⁾	53	430.2375
						(229)AAIAQAGYTDK ⁽²³⁹⁾	83	554.2958
						(229)AAIAQAGYTDK ⁽²³⁹⁾	62	554.7760
						(229)AAIAQAGYTDK ⁽²³⁹⁾	83	554.7847
						(229)AAIAQAGYTDK ⁽²³⁹⁾	62	555.2781
						(240)VVIGMDVAASEFCR ⁽²⁵³⁾	64	785.3741
						(344)VNQIGSVTESIQACK ⁽³⁵⁸⁾	101	817.4103
						(359)LAQSHGWGMVSHR ⁽³⁷²⁾	60	527.5947
						(413)IEEALGDK ⁽⁴²⁰⁾	42	437.7254
						(413)IEEALGDKAK ⁽⁴²²⁾	55	537.2977
17	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1	TPM1_COTJA	284	21	(78)ATDAESEVASLNR ⁽⁹⁰⁾ (78)ATDAESEVASLNR ⁽⁹¹⁾ (92)IQLVEEELDR ⁽¹⁰¹⁾ (92)IQLVEEELDRAQER ⁽¹⁰⁵⁾ (141)MEIQEIQLK ⁽¹⁴⁹⁾ (168)KLVIIEGDLER ⁽¹⁷⁸⁾ (169)LVIIEGDLER ⁽¹⁷⁸⁾ (252)SIDDLEDELYAQK ⁽²⁶⁴⁾	77 56 66 48 43 80 68 91	681.8201 506.9171 622.3292 576.6379 574.3013 642.8825 578.8373 769.8691
18	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	LDHA_CHICK	51	2	(229)AAIAQAGYTDK ⁽²³⁹⁾	51	5547842
18	Pyruvate kinase PKM	PKM	KPYM_CHICK	81	13	(161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAITA TQK ⁽¹⁸⁴⁾ (199)GAAQNIIPASTGAAK ⁽²¹³⁾ (226)LTGMAFR ⁽²³²⁾	40 48 47	653.5912 685.3720 406.2092

18	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	74	10	(160)VVLAYEPVWAIGTGK ⁽¹⁷⁴⁾ (194)SHVSDAVAQSTR ⁽²⁰⁵⁾	50 51	801.9511 629.3120
18	Beta-enolase	ENO3	ENOB_CHICK	182	18	(11)HGSAWNLENR ⁽²¹⁾ (91)HYGALTGLNK ⁽¹⁰⁰⁾ (91)HYGALTGLNK ⁽¹⁰⁰⁾ (163)ALPFWNEEIVPQIK ⁽¹⁷⁶⁾ (181)VLIAAHGNSLR ⁽¹⁹¹⁾	88 43 43 46 83	656.8048 537.2840 537.7849 842.4616 575.8377
18	Creatine kinase M-type	CKM	KCRM_CHICK	42	2	(294)GDLGIEIPA EK ⁽³⁰⁴⁾	42	5713055
19	Beta-enolase	ENO3	ENOB_CHICK	45	2	(229)AAIAQAGYTDK ⁽²³⁹⁾	45	5547866
19	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	LDHA_CHICK	120	6	(91)LVIVTAGAR ⁽⁹⁹⁾ (91)LVIVTAGAR ⁽⁹⁹⁾ (158)VIGSGCNLDSAR ⁽¹⁶⁹⁾	52 54 89	450.2802 450.2842 624.7997
19	Pyruvate kinase PKM	PKM	KPYM_CHICK	57	2	(229)AAIAQAGYTDK ⁽²³⁹⁾	57	5547864
20	Pyruvate kinase PKM	PKM	KPYM_CHICK	52	2	(91)LVIVTAGAR ⁽⁹⁹⁾	52	4502849
20	Beta-enolase	ENO3	ENOB_CHICK	117	4	(383)EAEAA MFHR ⁽³⁹¹⁾ (447)APIIAVTR ⁽⁴⁵⁴⁾ (447)APIIAVTR ⁽⁴⁵⁴⁾ (447)APIIAVTR ⁽⁴⁵⁴⁾ (489)VNLGMNVGK ⁽⁴⁹⁷⁾	51 55 45 55 49	539.2448 420.7574 420.7611 421.2612 474.2497
21	Beta-enolase	ENO3	ENOB_CHICK	43	2	(294)GDLGIEIPA EK ⁽³⁰⁴⁾	43	5713153
22	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	110	13	(161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAITA TQK ⁽¹⁸⁴⁾ (199)GAAQNIIPASTGAAK ⁽²¹³⁾ (226)LTGMAFR ⁽²³²⁾	59 62 46	653.5870 685.3695 406.2079
23	Triosephosphate isomerase	TPI1	TPIS_CHICK	55	2	(229)AAIAQAGYTDK ⁽²³⁹⁾	55	5547833
23	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	PGAM1_CHICK	67	10	(224)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁶⁾ (267)AGHPFMWTEHLGYILTCPSN LGTGLR ⁽²⁹²⁾	55 46	553.2827 736.8592
24	Triosephosphate isomerase	TPI1	TPIS_CHICK	46	6	(160)VVLAYEPVWAIGTGK ⁽¹⁷⁴⁾	46	8019463
24	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	63	7	(161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAITA TQK ⁽¹⁸⁴⁾	63	6535879

24	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	LDHA_CHICK	181	18	(11)IIFVVGPGSGK ⁽²²⁾	70	565.8309
						(11)IIFVVGPGSGK ⁽²²⁾	58	565.8314
						(33)YGYTHLSTGDLLR ⁽⁴⁵⁾	77	499.2473
						(33)YGYTHLSTGDLLR ⁽⁴⁵⁾	58	748.3787
						(157)ATEPVIAFYK ⁽¹⁶⁶⁾	43	569.8001
25	Triosephosphate isomerase	TPI1	TPIS_CHICK	78	5	(68)ITLSQVGDIVR ⁽⁷⁸⁾	78	6008565
25	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	38	2	(226)LTGMAFR ⁽²³²⁾	38	4062078
25	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1	KAD1_CHICK	40	5	(72)GAFTGEISPAMIK ⁽⁸⁴⁾	40	6693403
26	Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform		MLE1_CHICK	64	5	(141)QITINDLPVGR ⁽¹⁵¹⁾	47	613.3489
						(141)QITINDLPVGR ⁽¹⁵¹⁾	47	613.3492
26	Triosephosphate isomerase	TPI1	TPIS_CHICK	449	53	(5)KFFVGGNWK ⁽¹³⁾	43	541.7874
						(72)GAFTGEISPAMIK ⁽⁸⁴⁾	44	661.3502
						(100)HVFGESEDELIGQK ⁽¹¹²⁾	53	729.8593
						(113)VAHALAEGLGVIACIGEK ⁽¹³⁰⁾	52	603.3216
						(113)VAHALAEGLGVIACIGEK ⁽¹³⁰⁾	69	603.3235
						(149)AIADNVKDWSK ⁽¹⁵⁹⁾	56	416.2140
						(149)AIADNVKDWSK ⁽¹⁵⁹⁾	60	623.8226
						(160)VVLAYEPVWAIGTGK ⁽¹⁷⁴⁾	77	801.9403
						(194)SHVSDAVAQSTR ⁽²⁰⁵⁾	71	419.8797
						(194)SHVSDAVAQSTR ⁽²⁰⁵⁾	64	629.3177
						(194)SHVSDAVAQSTR ⁽²⁰⁵⁾	59	629.3201
						(194)SHVSDAVAQSTR ⁽²⁰⁵⁾	64	629.8067
						(206)IYGGSVTGGNCK ⁽²¹⁸⁾	93	663.3297
						(219)ELASQHDVDGFLVGGASLKP EFVDIINAK ⁽²⁴⁷⁾	39	768.1477
						26	Peroxiredoxin-1	PRDX1
(161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAITA TQK ⁽¹⁸⁴⁾	49	653.5955						
(161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAITA TQK ⁽¹⁸⁴⁾	51	685.3761						
(161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAITA TQK ⁽¹⁸⁴⁾	39	406.2116						
(199)GAAQNIIPASTGAAK ⁽²¹³⁾ (226)LTGMAFR ⁽²³²⁾	63	778.9170						
(233)VPTPNVSVVDLTCR ⁽²⁴⁶⁾								
27	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	51	6	(91)LVIVTAGAR ⁽⁹⁹⁾	43	450.2934
						(233)QVVD SAYEVIK ⁽²⁴³⁾	48	625.8308

750 **Tabela 4-** Proteínas do tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*) alimentadas com diferentes níveis de anacardato de
 751 cálcio e ácido cítrico. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE unidimensional e identificadas por espectrometria de massa tandem
 752 (ESI-Q-ToF)

Band	Protein name	Gene	Accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Matched peptides	Ion score	m/z
1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	65	6	⁽¹⁹⁹⁾ GAAQNIIPASTGAAK ⁽²¹³⁾ ⁽²²⁶⁾ LTGMAFR ⁽²³²⁾	58 40	685.3765 405.6972
2	Tudor domain-containing protein 7	tdrd7	TDRD7_XENLA	42	0	⁽¹¹⁾ NGVPLHK ⁽¹⁷⁾	42	3822374
3	Myosin-binding protein C, fast-type	MYBPC2	MYPC2_CHICK	45	0	⁽²⁹⁶⁾ YVFENVGLKR ⁽³⁰⁵⁾	45	4088935
4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	56	6	⁽¹⁹⁹⁾ GAAQNIIPASTGAAK ⁽²¹³⁾ ⁽²²⁶⁾ LTGMAFR ⁽²³²⁾	41 46	685.3772 406.2094
5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	46	4	⁽¹⁹⁹⁾ GAAQNIIPASTGAAK ⁽²¹³⁾	46	6853850
6	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RPS27A	RS27A_CHICK	68	5	⁽⁶⁴⁾ ESTLHLVLR ⁽⁷²⁾ ⁽⁶⁴⁾ ESTLHLVLR ⁽⁷²⁾	68 65	534.3129 534.3153
7	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	HS90A_CHICK	59	1	⁽¹⁰⁰⁾ ADLVNNLGTIAK ⁽¹¹¹⁾	59	6148440
8	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	HS90A_CHICK	48	1	⁽⁸⁷⁾ TLTIVDTGIGMTK ⁽⁹⁹⁾	48	6833644
8	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1	SODC_CHICK	49	7	⁽⁸¹⁾ HVGD LGNVTAK ⁽⁹¹⁾	49	555.7976
8	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	UBE2V2	UB2V2_CHICK	42	6	⁽⁷²⁾ YPEAPPTVR ⁽⁸⁰⁾	42	5152767
9	Creatine kinase B-type	CKB	KCRB_CHICK	50	1	⁽³⁰⁸⁾ FGEVLKR ⁽³¹⁴⁾	50	4247534
10	Peroxiredoxin-1	PRDX1	PRDX1_CHICK	61	10	⁽¹⁴¹⁾ QITINDLPVGR ⁽¹⁵¹⁾ ⁽¹⁵⁹⁾ LVQAFQFTDK ⁽¹⁶⁸⁾	47 42	613.3441 598.8142
11	Peroxiredoxin-1	PRDX1	PRDX1_CHICK	59	5	⁽¹⁴¹⁾ QITINDLPVGR ⁽¹⁵¹⁾	59	6133485
12	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	HS90A_CHICK	61	1	⁽¹⁰⁰⁾ ADLVNNLGTIAK ⁽¹¹¹⁾	61	6148448

12	Glutathione S-transferase 3	GSTM3	GSTA3_CHICK	142	15	(139)VLKDHGQDFLVGNR ⁽¹⁵²⁾	82	533.2814
						(142)DHGQDFLVGNR ⁽¹⁵²⁾	46	629.2996
						(188)ISSIPTIKK ⁽¹⁹⁶⁾	53	493.8114
						(205)KPISSDDKYVETVR ⁽²¹⁷⁾	50	517.2750
12	Glutathione S-transferase 2	GSTM2	GSTM2_CHICK	84	4	(70)LTQSNAILR ⁽⁷⁸⁾	84	5082954
						(72)GAFTGEISPAMIK ⁽⁸⁴⁾	49	661.3652
13	Triosephosphate isomerase	TPI1	TPIS_CHICK	301	28	(72)GAFTGEISPAMIK ⁽⁸⁴⁾	50	669.3369
						(72)GAFTGEISPAMIK ⁽⁸⁴⁾	56	669.3391
						(113)VAHALAEGLVACIGEK ⁽¹³⁰⁾	59	603.3291
						(113)VAHALAEGLVACIGEK ⁽¹³⁰⁾	72	603.3304
						(113)VAHALAEGLVACIGEK ⁽¹³⁰⁾	77	801.9437
						(160)VVLAYEPVWAIGTGK ⁽¹⁷⁴⁾	79	629.3198
						(194)SHVSDAVAQSTR ⁽²⁰⁵⁾	82	663.3266
						(206)IIYGGSVTGGNCK ⁽²¹⁸⁾		
13	Apolipoprotein A-I	APOA1	APOA1_COTJA	123	12	(69)LADNLDLSAAAAK ⁽⁸²⁾	62	687.8587
						(185)NLAPYSSELR ⁽¹⁹⁴⁾	46	575.2961
						(185)NLAPYSSELR ⁽¹⁹⁴⁾	56	575.7911
						(219)VVEQLSNLR ⁽²²⁷⁾	71	529.3013
13	Glutathione S-transferase 2	GSTM2	GSTM2_CHICK	84	4	(70)LTQSNAILR ⁽⁷⁸⁾	62	507.7900
						(70)LTQSNAILR ⁽⁷⁸⁾	62	508.2952
13	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	LDHA_CHICK	42	3	(233)QVVD SAYEVIK ⁽²⁴³⁾	42	6258337
13	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	HS90A_CHICK	59	1	(100)ADLVNNLGTIAK ⁽¹¹¹⁾	59	6148472
14	Carbonic anhydrase 2	CA2	CAH2_CHICK	71	5	(77)SVLQGGALDGVYR ⁽⁸⁹⁾	71	6678566
14	Apolipoprotein A-I	APOA1	APOA1_COTJA	42	3	(185)NLAPYSSELR ⁽¹⁹⁴⁾	42	5757936
14	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	ACTB_CHICK	51	2	(197)GYSFTTTAER ⁽²⁰⁶⁾	51	5667668
14	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	1433E_CHICK	48	4	(143)EAAENSLVAYK ⁽¹⁵³⁾	48	5978044
14	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	PGAM1_CHICK	54	4	(181)VLIAAHGNSLR ⁽¹⁹¹⁾	54	3842249
15	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	ACTB_CHICK	49	2	(197)GYSFTTTAER ⁽²⁰⁶⁾	49	5667631
15	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	PGAM1_CHICK	45	4	(181)VLIAAHGNSLR ⁽¹⁹¹⁾	45	3842219
16	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	ACTB_CHICK	56	2	(197)GYSFTTTAER ⁽²⁰⁶⁾	56	5667652
16	Endoplasmin	HSP90B1	ENPL_CHICK	58	1	(384)SILFVPNSAPR ⁽³⁹⁴⁾	58	6008431
17	Endoplasmin	HSP90B1	ENPL_CHICK	76	1	(384)SILFVPNSAPR ⁽³⁹⁴⁾	76	6008393

17	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	ACTB_CHICK	55	2	(197)GYSFTTTAER ⁽²⁰⁶⁾	55	5667672
17	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	HS90A_CHICK	68	1	(383)GVVDSLEDLPLNISR ⁽³⁹⁶⁾	68	7573943
18	Rho crystallin	RHO-I	CRO_LITCT	45	2	(177)ILNKPLK ⁽¹⁸⁴⁾	45	4417914
19	Fructose-bisphosphate aldolase C (Fragment)	ALDOC	ALDOC_CHICK	48	8	(78)ALQASALSAWR ⁽⁸⁸⁾	48	5873262
19	Creatine kinase B-type	CKB	KCRB_CHICK	47	1	(308)FGEVLKR ⁽³¹⁴⁾	47	4247540
19	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	HS90A_CHICK	76	1	(496)DQVANSFAVER ⁽⁵⁰⁶⁾	76	6183016
20	Creatine kinase B-type	CKB	KCRB_CHICK	59	1	(308)FGEVLKR ⁽³¹⁴⁾	59	4247486
21	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	HSP7C_CHICK	48	2	(172)IINEPTAAAIAYGLDKK ⁽¹⁸⁸⁾ (172)IINEPTAAAIAYGLDKK ⁽¹⁸⁸⁾	39 39	596.3160 596.6669
22	Elongation factor 2	EEF2	EF2_CHICK	43	0	(499)FSVSPVVR ⁽⁵⁰⁶⁾	43	4457595
22	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	HS90A_CHICK	41	1	(486)HVVYITGETK ⁽⁴⁹⁵⁾	41	6058105
23	Tubulin beta-1 chain		TBB1_CHICK	42	3	(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	42	5462791
23	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (Fragment)	GLUD1	DHE3_CHICK	53	3	(426)HG GTIPVVPTAEFQDR ⁽⁴⁴⁾ 1)	53	5752846
24	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	PDIA3_CHICK	64	2	(61)LAPEYEAATR ⁽⁷¹⁾	64	5963029

754 **Tabela 5.** Quantidade de células presente no túbulo seminífero de testículos de codornas europeias suplementadas com diferentes níveis
755 de anacardato de cálcio e ácido cítrico.

Células	Tratamentos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
ESPG	157	140	137	154	153	84	90	106	84
ESPD	183	177	170	169	166	103	114	111	123
ESPTC	257	247	218	220	246	103	133	166	144

756 ESPG: Espermatogônia; ESPD: Espermatócitos; ESPTC: Espermatídes; T1 - ração controle; T2 - 0,25% Anacardato de cálcio; T3 - 0,25% Anacardato de cálcio e
757 0,25% ácido cítrico; T4 - 0,50% Anacardato de cálcio; T5 - 0,50% Anacardato de cálcio e 0,25% ácido cítrico; T6 - 0,50% Anacardato de cálcio e 0,50% ácido
758 cítrico; T7 - 0,75% Anacardato de Cálcio; T8 - 0,75% Anacardato de Cálcio; e 0,25% ácido cítrico; T9 - 0,75% Anacardato de Cálcio e 0,50% ácido cítrico.

Tabela suplementar: Proteínas do músculo *Pectoralis Major* e do sistema reprodutor de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*) alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE unidimensional e identificadas por espectrometria de massa tandem (ESI-Q-ToF)

Protein	Accession number	m/z	muscle	Reproductive tract region		
				Testis	epididymis	Accessory gland
14-3-3 protein epsilon	1433E_CHICK	5978044		X		
40S ribosomal protein SA	RSSA_CHICK	602.3283			X	
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_CHICK	4692627				X
Actin,	ACTC_CHICK	895.9432				X
Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_CHICK	1122.5310			X	
Actin, alpha skeletal muscle	ACTS_CHICK	6588323			X	
Actin, aortic smooth muscle	ACTA_CHICK	757.3955	X		X	X
Actin, cytoplasmic 1	ACTB_CHICK	5667668		X	X	X
Actin, gamma-enteric smooth muscle	ACTH_CHICK	895.9485				X
Adenylate kinase isoenzyme 1	KAD1_CHICK	6693403	X			
Albumin	ALBU_CHICK	756.4123			X	
Alpha-actinin-1	ACTN1_CHICK	7153834			X	X
Apolipoprotein A-I	APOA1_COTJA	687.8587	X	X	X	X
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_CHICK	801.4056				X

Beta-enolase	ENOB_CHICK	6223277	X		
Carbonic anhydrase 2	CAH2_CHICK	6678566		X	
Cathepsin D	CATD_CHICK	895.9485			X
Clusterin	CLUS_COTJA	687.3632			X
Collagen alpha-2(I) chain	CO1A2_CHICK	5858271			X
Collagen alpha-2(VI) chain	CO1A2_CHICK	7408619			X
Collectin-10	COL10_CHICK	4887309			X
Creatine kinase B-type	KCRB_CHICK	4247534		X	
Creatine kinase M-type	KCRM_CHICK	940.4761	X		
Desmin	DESM_CHICK	622.3286			X
Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYL2_CHICK	542.8226			X
Elongation factor 1-alpha 1	EF1A_CHICK	5275913	X		
Elongation factor 2	EF2_CHICK	4457595	X	X	
Endoplasmic reticulum chaperone BiP	BIP_CHICK	614.8209	X		X
Endoplasmin	ENPL_CHICK	6008431		X	X
Fructose-bisphosphate aldolase C (Fragment)	ALDOC_CHICK	5873262		X	
Gamma-enolase	ENOG_CHICK	6973668	X		

Gelsolin	GELS_CHICK	6108272			X	
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (Fragment)	DHE3_CHICK	5752846		X		
Glutathione S-transferase 2	GSTM2_CHICK	5082954	X	X		
Glutathione S-transferase 3	GSTA3_CHICK	629.2996		X		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_COTJA	685.3765	X	X	X	X
Heat shock 70 kDa protein	HSP70_CHICK	7258617	X		X	
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_CHICK	596.3160	X	X		X
Heat shock protein beta-1	HSPB1_CHICK	6448706	X			
Heat shock protein HSP 90-alpha	HS90A_CHICK	6833644	X	X		X
Hemoglobin subunit alpha-A	HBA_COTJA	830.4481	X			
Hemoglobin subunit beta	HBB_COTJA	566.2786	X		X	X
Histone H4	H4_CHICK	833.3928	X			
Integrin beta-1	ITB1_CHICK	4887273				X
L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_CHICK	6258337	X	X		
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_CHICK	5133106	X			
Mimecan	MIME_COTJA	711.3896			X	
Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	MLE1_CHICK	613.3492	X			
Myosin-11	MYH11_CHICK	687.3580				X

Myosin-binding protein C, fast-type	MYPC2_CHICK	4088935		X		
Nucleoside diphosphate kinase	NDK_CHICK	5908156	X			
Ovotransferrin	TRFE_CHICK	457.2428				X
Peroxiredoxin-1	PRDX1_CHICK	613.3441	X	X		
Phosphoglycerate kinase	PGK_CHICK	5456004	X			
Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_CHICK	3842249	X	X		
Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_CHICK	5963029		X	X	X
Pyruvate kinase PKM	KPYM_CHICK	4489232	X		X	X
Ras-related protein Rab-14	RAB14_CHICK	685.3758			X	
Ras-related protein Rab-33B	RB33B_CHICK	6588323	X			
Ras-related protein Rab-6A	RAB6A_CHICK	713.4125	X			
Ras-related protein Rab-8A	RAB8A_CHICK	8019425	X			
Rho crystallin	CRO_LITCT	4417914		X		
Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75_CHICK	830.4514	X			
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC_CHICK	555.7976		X		
Transgelin	TAGL_CHICK	4887250	X		X	
Triosephosphate isomerase	TPIS_CHICK	801.9437	X	X		X
Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_COTJA	7536428	X		X	X

Tropomyosin beta chain	TPM2_CHICK	728.3461			X
Tubulin beta-1 chain	TBB1_CHICK	5462791	X		
Tubulin beta-3 chain	TBB3_CHICK	788.4381			X
Tubulin beta-4 chain	TBB4_XENLA	933.4505		X	X
Tubulin beta-7 chain	TBB7_CHICK	933.4505			X
Tudor domain-containing protein 7	TDRD7_XENLA	3822374	X		
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_CHICK	534.3129	X		
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	UB2V2_CHICK	5152767	X		
Vimentin	VIME_CHICK	793.9381		X	X

3 CAPÍTULO II: PERFIL PROTEÔMICO DO TECIDO TESTICULAR DE CODORNAS
(*COTURNIX COTURNIX COTURN*)

1 **Perfil proteômico do tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*)**

2 Nhaira M. Vilarinho¹, Rafael S. Ferreira¹, Fábio R. Vasconcelos¹, Kamila S. Otávio¹ Ednardo R.
3 Freitas¹, Denise D. Guerreiro¹, Laís L. B. Oliveira², Guilherme G. C. Carvalho², Carlos R. K.
4 Paier², Claudia Pessoa², Maria Elisabete A. Moraes², Arlindo A. Moura^{1,2*}

5 ¹ Department of Animal Science, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

6 ² Center for Research and Drug Development, School of Medicine, Federal University of Ceará,
7 Fortaleza, Brazil.

8

9 * Corresponding author: arlindo.moura@gmail.com.

10 Department of Animal Science - Federal University of Ceará (UFC)

11 Av. Mister Hull, s/n Campus do Pici

12 Fortaleza, Ceará, Brazil 60440-554

13

14 **Resumo**

15 Objetivou-se avaliar o proteoma do tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*).

16 Foram coletadas quatro amostras do tecido testicular de codornas, liofilizadas, as proteínas

17 extraídas foram digeridas com tripsina, dessalinizadas e analisadas por LC-MS/MS. Para pesquisa

18 de espectro de peptídeo utilizou a plataforma PatternLab V. Foram identificadas 2784 proteínas

19 das amostras, dessas proteínas as mais abundantes foram: heat shock proteins, tubulin, creatine

20 kinase, actina, ATP synthase, transitional endoplasmic reticulum ATPase, pyruvate, endoplasmin

21 e glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Posteriormente foram selecionadas quatro

22 proteínas, para modulação potencial por miRNAs através da seleção dos genes, e submetidos as

23 análises de enriquecimento funcional, essas relacionavam-se a expressão de genes envolvidos na

24 via de sinalização mediada por hormônio, proliferação celular, envelhecimento, ciclo celular e

25 morte celular. Os principais processos biológicos ligados as proteínas do tecido testicular foram
26 tradução, transporte intracelular de proteínas e dobramento proteico. As funções moleculares das
27 proteínas estavam relacionadas a ligações de ATP, RNA, GTP, entre outras, o componente celular
28 as proteínas foram localizadas no citoplasma, citosol, microtúbulo, entre outros. O upload de 2784
29 códigos de acesso Uniprot através da plataforma DAVID correspondeu a 1.563 genes, que estavam
30 relacionados a ligação de ATP, constituinte estrutural de ribossomo, tradução, entre outros. As
31 análises com STRING resultaram em interações significativas ($P < 0,05$) de enriquecimento PPI:
32 $1,0 \times 10^{-16}$. Análise obtida pelo DAVID foram estabelecidas as vias KEEG que indicaram genes
33 associados com a espermatogênese como ribossomo, apoptose e outros. O trabalho evidencia o
34 atlas mais abrangente de proteínas expressas no tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix*
35 *coturnix*).

36 **Keywords:** Espectrometria de massa; espermatogênese; proteína de choque térmico.

37

38 3.1 Introdução

39 A coturnicultura é considerado um seguimento da avicultura bastante promissor, além de
40 possibilitar a produção de alimento, apresenta rápido retorno econômico. O Brasil é o quinto maior
41 produtor mundial de carne de codornas (Grieser et al., 2015). A produção efetivo de codornas no
42 Brasil em 2021, somou 15,3 milhões de aves e a produção de ovos atingiu 273,7 milhões de dúzias,
43 ambos em queda, comparado ao ano de 2019 (IBGE, 2022), provavelmente devido ao surto de
44 Covid-19 causado pelo Sars-CoV-2. O estado do Ceará é responsável por uma produção de 40,65%
45 de codornas no país (Grieser et al., 2015). Sendo os machos selecionados pela indústria avícola
46 para produção de carne (Krautwald-Junghanns et al., 2018) e como reprodutores. Devido a essa
47 importância socioeconômica estudos vêm sendo desenvolvidos sobre aspectos reprodutivos em
48 aves (Wang et al., 2014; Estermann et al., 2021).

Na reprodução, as gônadas são partes fundamentais, de modo que nas aves os testículos estão localizados na cavidade abdominal, dorsalmente ao trato gastrointestinal e ventralmente aos rins, assim, a espermatogênese progride a temperatura igual ou acima de 37°C (Leska e Dusza, 2007). A espermatogênese é um processo complexo de várias etapas que envolve interações intrínsecas entre diferentes tipos de células presente no testículo. O processo inicia em células localizadas na região basal do túbulo seminífero, ocorrendo proliferação e diferenciação das espermatogônias em espermatócitos via mitose, seguido de meiose formando espermatídes, e finalizando, na região luminal do túbulo seminífero ocorre a diferenciação das espermatídes em espermatozoides (Guo et al., 2008; Griswold, 2016).

As células de Sertoli estão presentes ao redor das células germinativas e tem como função suporte estrutural, metabólico, regulação do meio interno dos túbulos seminíferos e secretam proteínas que são transportadoras de nutrientes (Griswold, 1998). As células de Leydig, que estão localizadas fora dos ductos seminíferos na parte intersticial, têm função de produção de andrógenos, como a testosterona (Zhou et al., 2019).

O proteoma é o conjunto de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento. A espectrometria de massa é uma ferramenta indispensável para a biologia molecular, celular e de sistemas (Aebersold e Mann, 2003). O desenvolvimento de abordagens proteômicas melhoram consideravelmente a compreensão e identificação de proteínas do tecido do sistema reprodutivo (Huang et al., 2002). A análise proteômica baseada em LC-MS/MS é uma ferramenta que permite a caracterização de peptídeos e proteínas, auxiliando assim, a compreensão do proteoma do tecido testicular em aves.

Protocolos baseados em espectrometria de massa geraram mapas proteômicos detalhados de tecidos testicular em humanos (Li et al., 2011; Kim et al., 2014; Wilhelm et al., 2014), macacos (Zhou et al., 2015), camundongos (Zhu et al., 2010; Stanton et al., 2016; Green et al., 2018), suínos

(Huang et al., 2005 (a); Huang et al., 2011) e bode (Wang et al., 2022). Os recentes avanços tecnológicos em proteômica melhoraram consideravelmente a compreensão como a variação de proteínas tem impacto no organismo vivo. Objetivou-se avaliar por meio de espectrometria de massa, o proteoma do tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*).

3.2 Materiais e métodos

2.1. Animais e coleta de amostras

Os procedimentos foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Ceará (CEUA/UFC/2552250718/ 2018). O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura (altitude de 15,5 m; -3°43'02"; 38°32'35"), utilizando codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*) de 21 semanas de idade, alojadas em um galpão convencional de produção, provido de gaiolas de arame galvanizado medindo (35 x 25 x 20 cm) alojando cinco codornas por gaiola, dispostas em sistema piramidal e equipadas com comedouro linear tipo calha e bebedouro tipo nipple. As aves foram selecionadas com base no peso corporal ($296,0 \pm 8,5$), distribuídas uniformemente nas gaiolas, adotando um delineamento inteiramente casualizado, composto por quatro fêmeas e um macho por unidade experimental, totalizando assim 40 animais.

A dieta experimental foi formulada para atender as exigências nutricionais propostas por Costa e Silva (2009), foram considerados os valores de composição nutricional e energética dos ingredientes segundo Rostagno et al. (2000). Durante todo o período experimental foi oferecida as rações e água à vontade, também utilizou o programa de luz de 16 horas (natural e artificial), sendo 12 horas de luz natural e 4 horas de luz artificial, o experimento teve duração de 21 dias.

Os animais foram abatidos por deslocamento cervical, procedeu-se então à dissecação e retirada dos testículos. Estes foram congelados em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizadas por aproximadamente 24 horas, sendo então maceradas e armazenadas a -20 °C.

2.2. Extração de proteínas

Quatro amostras do tecido testicular liofilizado foram ressuspensas em 700 µl de tampão de lise (8 M de ureia, 75 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,2 M ortovanadato de sódio, 0,2 M beta-glicerofosfato e inibidores de protease (Sigma, EUA), com pH 8,2), seguido de agitação em gelo por 15 minutos (min). Posteriormente as amostras foram sonicadas três vezes por 1 min (com intervalo de 2 min entre cada sonicação em gelo), centrifugadas (4°C, 14.000 rpm, 15 min), e o sobrenadante aliqotado e armazenado a -80 °C. A quantificação e concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

2.3. Digestão de proteínas

As proteínas extraídas do tecido testicular (60 µl) foram reduzidas com solução ditioneitol (DTT) com concentração final de 5 mM, mantidos durante 25 min a 56 °C em banho maria. Em seguida, alquiladas com iodoacetamida (IAA) para obter uma concentração final 14 mM (protegido da luz, em temperatura ambiente, por 30 min). Foi adicionado posteriormente DTT concentração final 5 mM (protegido da luz, em temperatura ambiente, 15 min). As amostras foram diluídas em bicarbonato de amônio, reduzindo a concentração de uréia de 8 M para 1,6 M, seguido da adição de cloreto de cálcio (CaCl₂) para concentração final de 1mM. As proteínas foram digeridas com tripsina durante 16 horas a 37 °C. Para interromper a atividade trípica foi adicionado uma concentração final de 0,4% de ácido trifluoroacético (TFA) (Viana et al., 2018; com adaptações).

2.4. Dessalinização de peptídeos

Foram montadas colunas SepPak tC18 50 mg 1cc (Waters, EUA) no Manifold Visiprep SPE (Sigma Aldrich, EUA), para dessalinização dos peptídeos. As colunas C18 foram ativadas

com 3 ml de acetonitrila (ACN) 100% (Sigma Aldrich, EUA), seguido de 1ml de ácido fórmico a 0,1% para equilibrar. Posteriormente adicionado 3 ml TFA a 0,1% para equilibrar a coluna. As amostras digeridas foram carregadas na coluna, lavadas com 3 ml de TFA a 0,1% e equilibradas com 1ml de ácido fórmico a 0,1%, seguido de eluição com 2 ml de uma solução contendo 50% de ACN e 50% de ácido fórmico a 0,1%. As amostras foram eluídas novamente com 80% ACN e 20% de ácido fórmico a 0,1%, seguido de liofilização e armazenadas a -80 °C. Antes da espectrometria de massa foi realizado a concentração peptídica (fluorímetro Qubit™; Thermo Fisher, EUA).

2.5. Espectrometria de massa *Label-free*

Peptídeos trípticos 1 µg foram analisados em sistema cromatográfico com colunas capilares (nano-UHPLC Dionex Ultimante 3000) acoplado a um espectrômetro de massa híbrido quadrupolo-orbitrap, (Orbitrap Q Exactive™ Plus, Thermo Scientific, Germany). Foram utilizados os seguintes solventes para as corridas: solvente A (0.1% ácido fórmico em água) e solvente B (acetonitrila/0.1% de ácido fórmico 80/20). O sistema cromatográfico consistiu em duas colunas. Primeiro, uma pré-coluna, Acclaim™ PepMap™ 100 C18 (300 µm × 5 mm) contendo partículas esféricas de sílica de 5 µm- diâmetro com tamanho de poro de 100 Å (Thermo Fisher, USA), onde as amostras foram injetadas a uma taxa de fluxo de 5 µL/min, com 98% de solvente A e 2% de solvente B. Em seguida, os peptídeos foram separados em uma coluna analítica PicoCHIP® (75µm × 25 cm, 15 µm tip), embalado com partículas de Reprosil-PUR C18 de 1.9 µm, tamanho de 120 Å (New Objective, USA), através de um gradiente de eluição com solvente B (2-40% durante 170 min.; 40-85% durante 15 min.; isocrático de 85% durante 5 min.), seguido de uma etapa isocrático de 2% do solvente B durante 19 min. e 30 seg. para reequilibrar a coluna. A interface entre o nanoLC e o espectrômetro de massas híbrido seguiu o controle automático do equipamento, utilizando o software Xcalibur 4.1.31.9 (Thermo Scientific, USA). A ionização do peptídeo foi

realizada em uma fonte de íons PicoCHIP nanoelectrospray (New Objective, USA), com voltagem de pulverização ajustada em 2.5 kV e temperatura capilar de transferência em 250 °C.

Os espectros de MS foram adquiridos no modo positivo, com aquisição dependente de dados (DDA). O ciclo DDA consistiu em uma varredura de pesquisa compreendendo faixa de 200-2000 m/z com resolução de 140,000 FWHM (Full Width at Half-Maximum) a m/z 400 e com um valor alvo de controle de ganho automático (AGC) de 3×10^6 íons para todas as varreduras FTMS e tempo máximo de preenchimento de 45 ms. A varredura de pesquisa foi seguida por fragmentação MS/MS por dissociação de colisão de alta energia (HCD) dos 20 íons precursores mais abundantes em cada momento, sob 30% de energia de colisão, com 17,500 FWHM em m/z 400, um valor alvo de AGC de 1×10^6 íons e um valor mínimo de 8×10^3 íons para todas as varreduras FTMS e um tempo de preenchimento máximo de 60 ms. Íons precursores previamente fragmentados foram excluídos dinamicamente por 10 s.

2.6. Pesquisa de banco de dados e identificação de proteínas

A pesquisa e a filtragem de correspondência de espectro de peptídeos foram realizadas usando o mecanismo de pesquisa Comet (version 2019.01) incorporado no PatternLab para Proteomics (version V, <http://patternlabforproteomics.org>; Carvalho et al., 2016; Santos et al., 2022). Sequências não revisadas de *Gallus gallus* (Chicken) foram obtidas do banco de dados do UniProtKB (60,570 entries; September 02th, 2022, <http://www.uniprot.org/>). A pesquisa final de banco de dados usando a ferramenta Search Database Generator do PatternLab incluiu um chamariz reverso para cada sequência alvo mais sequencias de 15 contaminantes comuns, como queratina e ubiquitina. Os parâmetros de pesquisa incluíram: candidatos a peptídeos totalmente específicos com massas entre 500 e 6000 Da, até duas clivagens perdidas, 40 ppm para massa precursora e bins de 1,0005 m/z para MS/MS. Modificações fixas e variáveis foram definidas como carbamidometilação de cisteína (C) e oxidação de metionina (M).

Os parâmetros de pesquisa pré-configurados do PatternLab foram selecionados como “High-High” (e.g., Q-Exactive / using orbitrap for MS1 and MS2); “Pesquisa e Filtrar” para o modo de operação; “Processamento de diretório recursivo” como opções de processamento. Os parâmetros avançados do mecanismo de pesquisa Comet incluíam “Trypsin” como enzima selecionada e “Totalmente específico” para especificidade da enzima, todos os outros mantidos no modo padrão. A validação de correspondências de espectro de peptídeos (PSMs) foi avaliada usando o Search Engine Processor (SEPro). Para cada resultado, XCorr, DeltaCN, DeltaMass, SpecCount Score e os valores de pontuação secundária do Comet foram usados para gerar um discriminador Bayesian e uma pontuação de corte que foi estabelecida para aceitar 1% de taxa de falsa descoberta (FDR). Foi necessário um comprimento mínimo de sequência de 6 resíduos de aminoácidos e os resultados foram filtrados para aceitar apenas PSMs com erro de massa de precursor inferior a 6 ppm. O filtro de pós-processamento resultou em um FDR global, no nível de proteína, inferior a 1% e foi independente do estado triptico, sendo necessários pelo menos 2 peptídeos/proteína para identificação.

2.7. Análise bioinformática

Os dados das proteínas identificadas foram analisados com o software para ferramenta de análise de enriquecimento funcional (FunRich version 3.1.4), usando o banco de dados UniProtKB (Pathan et al., 2015). Agrupamentos funcionais associados às proteínas do tecido testicular foram analisados por meio da plataforma DAVID (Functional Annotation Bioinformatics Analysis), de acordo com os escores de enriquecimento e os *P*-values (Huang et al., 2009), sendo também empregada para realizar as vias KEEG.

O STRING (<http://string-db.org>) versão 11.0 foi usado para análise *in-silico* com base em previsões coletadas de associações diretas (físicas) ou indiretas (funcionais) das proteínas identificadas, integrando evidências do contexto genômico, co-expressão e dados da literatura

(Viana et al., 2018). Os clusters foram manuseados manualmente para melhor visualização das interações proteína-proteína.

Os genes foram selecionados para modulação potencial por miRNAs, usando o conjunto de dados *Homo sapiens* miRBase (<http://www.mirbase.org>) (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011) e servidor miRNet 2.0 (<https://www.mirnet.ca/>) (Chang et al., 2020).

3.3 Resultados

Foram identificadas 2784 proteínas no tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*), para garantir uma identificação confiável, foram realizadas sequências peptídicas com FDR <1%. De todas as proteínas listadas, foram caracterizadas de acordo com o Uniprot Database 2174 proteínas, as demais proteínas não eram caracterizadas em *Chicken*. Os detalhes de todas as proteínas identificadas com precisão são demonstrados na tabela suplementar 1. Realizou-se uma seleção das proteínas com base na pontuação de enriquecimento e contagem de espectro, deste modo, as proteínas mais abundantes no tecido testicular foram heat shock protein, tubulin, creatine kinase, actin, ATP synthase, transitional endoplasmic reticulum ATPase, pyruvate kinase, endoplasmic reticulum chaperone and glycerol-3-phosphate dehydrogenase. Na tabela 1 encontra-se as 15 proteínas mais abundantes do tecido testicular de codornas.

Destas foram selecionadas quatro genes (HSP90AA1, TUBB4B, CKB e ACTG1) para análise na plataforma visual de rede miRNET, no qual foram identificados 389 miRNAs relacionados a estes genes, com uma rede de 509 interações. As funções dos miRNAs selecionadas foram: Via de sinalização mediada por hormônio (46 miRNAs), proliferação celular (46 miRNAs), envelhecimento (47 miRNAs), metabolismo da glicose (23 miRNAs), ciclo celular (47 miRNAs) e morte celular (56 miRNAs), e outros selecionados segundo o $Pval < 0,05$ (Figura 1). Na tabela suplementar 2 encontra-se disponível os genes selecionados de miRNAs.

Os principais processos biológicos ligados às proteínas do tecido testicular foram tradução, transporte intracelular de proteínas e dobramento proteico (Figura 2a). As funções moleculares das proteínas estavam relacionadas a ligação de ATP, ligação RNA, ligação GTP, atividade de GTPase, constituinte estrutural do ribossomo, entre outros (Figura 2b), enquanto os principais componentes celulares foram localizados no citoplasma, citosol, microtúbulo e outros (Figura 2c).

Os resultados do banco de dados foram anotados e analisados na plataforma DAVID, resultando em termos funcionalmente enriquecidos, um upload de 2784 códigos de acesso Uniprot através da plataforma DAVID equivalendo a 1.563 genes, estes foram associados a 192 clusters funcionais enriquecidos (tabela suplementar 3). Dez clusters foram selecionados: ligação de nucleotídeos, ligação de ATP, constituinte estrutural de ribossomo, tradução, domínio de reconhecimento de RNA, ligação de GTP, dobramento, ligação de proteínas e Chaperona (tabela 2).

As proteínas englobadas nos dez clusters selecionados, foram analisadas com STRING (Figura 3), resultando em interações significativas (valor P de enriquecimento PPI: $1,0 \times 10^{-16}$, número de nós 47 representando as proteínas, número esperado de interações 57, número encontrados de interações 235 moleculares).

Com base da análise DAVID foram também estabelecidas via KEEG relacionados a espermatogênese, incluindo vias de spliceossoma (47 genes), ciclo celular (21 genes), metabolismo da glutathiona (22 genes), ribossomo (71 genes), apoptose (24 genes) (tabela 3). Foram identificadas proteínas presentes nas células germinativas e somáticas, no proteoma do tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*) (tabela suplementar 1).

3.4 Discussão

Neste estudo um total de 2784 proteínas foram identificadas no tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*). O testículo é considerado o órgão que expressa o maior número de proteínas específicas do tecido (Chalmel et al., 2012; Uhlen et al., 2015), mostrando, divergência entre espécies (macaco, suínos, camundongos, bode) tanto para sequência de gene quanto para expressão de proteínas (Guillaumen et al., 2000; Huang et al., 2005 (a); Khaitovich et al., 2005; Paz et al., 2006; Zhu et al., 2006; Voolstra et al., 2007; Huang et al., 2011; Djueinovic et al., 2014; Wang et al., 2014; Zhou et al., 2015; Wang et al., 2022). Apesar do notável conhecimento disponível sobre o perfil proteico do tecido testicular dos animais citados, há informações limitadas sobre o proteoma testicular em aves. Em aves, os trabalhos proteômicos no tecido testicular estavam relacionados ao estresse térmico (Wang et al., 2014; Wang et al., 2019; Zhuang et al., 2018) e alimentação (Ferreira, 2019).

A expressão de proteínas de choque térmico (HSPs) está presente no tecido testicular de diversas espécies, o que indica que essas proteínas são cruciais para o desenvolvimento das células germinativas (Zakeri et al., 1988; Gruppi et al., 1991; Neuer et al., 2000; Ferreira, 2019), estão presentes na espermatogônia, espermatócitos, espermátides e espermátides alongadas (Huang et al., 2005 (b)), desempenhando um papel fundamental na espermatogênese e na reprodução do macho (Zhu et al., 1997; Eddy, 2015). A proteína HSP90 alfa é expressa no citoplasma de todas as células espermatogênicas no tecido testicular de frangos (Wang et al., 2014). Os testículos nas aves estão localizados dentro da cavidade abdominal, onde a espermatogênese ocorre em uma temperatura entre 37 e 41 °C (Beaupre et al., 1997; Leska e Dusza, 2007), conseqüentemente, mecanismos compensatórios permitem a espermatogênese normal (Li et al., 2011).

A tubulina é uma proteína polimórfica, sendo o principal constituinte dos microtúbulos, estando envolvida na formação dos túbulos seminíferos testiculares (Chen et al., 2018). Está,

desenvolve um papel importante na motilidade do axonema (Audebert et al., 1999), tornando-se essencial para a formação da cauda do espermatozoide no testículo (Huang et al., 2005 (b)), e envolvida assim, na espermatogênese.

No proteoma do tecido testicular, a maioria das proteínas mais abundantes estão localizadas no citoesqueleto. A actina é essencial para a espermatogênese, essas proteínas são importantes para suporte e transporte de espermatozoides em desenvolvimento através das células epiteliais (Li et al., 2017) e influenciam na barreira hematotesticular (Xiao e Yang, 2007), porém, os mecanismos moleculares permanecem desconhecido (Wang et al., 2020). A proteína actina músculo liso aórtico são marcadores para células de Sertoli e células peritubulares (Mayerhofer, 2013; Welter et al., 2020).

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase tem expressão específica no testículo, participa da regulação da glicólise, na qual, a enzima codificada catalisa uma importante etapa da produção de energia no metabolismo de carboidratos e, durante a espermatogênese, desempenhando papel importante na regulação da troca de diferentes vias de produção de energia, necessários para a motilidade espermática (Welch et al., 2000). Em resumo as proteínas citadas no presente trabalho podem desempenhar papel importante na espermatogênese de codornas.

De acordo com a análise miRNAs específicos relacionados a genes equivalentes às proteínas mais abundantes no tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*) foram relacionadas à proliferação celular, via de sinalização mediada por hormônio, ciclo celular, metabolismo da glicose e lipídios, morte celular e outras funções. Entre esses processos biológicos, os processos hormonais e metabólicos da glicose desempenham um papel importante na espermatogênese (Liang et al., 2021). Proteínas glicolíticas podem indicar um esforço das células de Sertoli para secretar quantidades de lactato para as células germinativas em desenvolvimento, na qual, pode diminuir a taxa apoptótica (O'Flaherty, 2015).

A análise de clusters revelou 192 clusters funcionais enriquecidos, no qual, os principais clusters foram ligação de nucleotídeos, ligação de ATP, constituinte estrutural de ribossomo, tradução, ligação de GTP, Chaperona, entre outros. As análises GO e clusters foram correlacionadas, sugerindo assim, envolvimento no enriquecimento de proteínas expressas nos processos celulares e na regulação da espermatogênese. Das 15 proteínas mais abundantes no tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*), mais da metade estão representadas em pelo menos um desses agrupamentos. Proteínas relacionadas a ligação do ATP, GTP e proteína desdobrada foram associadas a função molecular (P -valor $<0,005$), enquanto predominantes nos processos biológicos: tradução e Chaperona (P -valor $<0,005$), representados nos componentes celulares: ribossomos e nucleossomos (P -valor $<0,005$).

Vários genes identificados no proteoma do tecido testicular de codornas são específicos nas células germinativas, como ATP-dependente RNA helicase DDX1 e Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 (Eildermann et al., 2012; Langenstroth et al., 2014). O gene *deleted in azoospermia-like* (DAZL) codifica uma proteína de ligação do RNA, no testículo, essa proteína está localizada no núcleo das espermatogônias, e posteriormente durante a meiose no citoplasma dos espermátocitos, sendo um gene essencial na gametogênese de machos e fêmeas (Reijo et al., 2000; Pineau et al., 2019).

A rede de interações proteína-proteína constituída com maior número de genes, foram os constituintes estruturais: tradução e constituintes da proliferação de ribossomos, devido a quantidade das proteínas (ribossomo, actina e tubulina) (tabela 2), evidenciando que uma grande rede de proteínas estava funcionalmente conectada. A interação de proteínas do ribossomo exerce funções regulatórias na espermatogênese (Mageeney e Ware, 2019), incluindo componentes ribossômicos, bem como proteínas não ribossômicas e small nuclear RNA, tendo papel

fundamental na biogênese (Hassouni et al., 2019). A actina tem função na manutenção e motilidade celular (Zhang et al., 2021).

Na análise de KEGG os principais clusters foram ribossomo, apoptose, spliceossoma, ciclo celular, metabolismo da glutathione, dentre outras. Os genes com maior expressão no tecido testicular estão associados a funções de manutenção, como genes que codificam proteínas mitocondriais e do ribossomo. As proteínas do ribossomo estão envolvidas na síntese de proteínas, enzimas essenciais para o metabolismo e expressão gênica, proteínas mitocondriais necessárias para geração de energia e integridade celular (Djueinovic et al., 2014).

O spliceossoma é uma grande molécula complexa contendo cinco RNAs nucleares (pequenos e comuns), e de subunidades proteicas que removem sequências não-codificantes (Nakanishi e Shiratsuchi, 2004), que regula e medeia o processamento do mRNA precursor (Eto et al., 2010). Esses componentes estão envolvidos na formação de gametas masculinos, de modo que defeitos nos spliceossoma poderiam causar infertilidade (Huang et al., 2020). Um trabalho utilizando tecnologia iTRAQ e tecnologia LC-MS/MS para identificar proteínas expressas diferencialmente nos perfis proteômicos do tecido testicular de homens com espermatogênese prejudicada e normal, sugerem que: a via spliceossoma poderia estar envolvido na espermatogônia, estando regulada negativamente, devido a defeitos (Liang et al., 2021). Os principais defeitos do spliceossoma irão afetar a diferenciação das espermatogônias testiculares, estando relacionadas à azoospermia não obstrutiva, inibindo assim, o desenvolvimento e a maturação dos espermatozoides (Wu et al., 2016).

As proteínas presentes nas células germinativas e somáticas encontradas no trabalho foram vimentin e lamain. A proteína vimentin é comum no microtúbulo, células de Sertoli, espermatogônia e espermátide (Costigliola et al., 2017). A proteína vimentin está relacionada a manutenção da integridade do contato entre as células germinativas e células de Sertoli, relacionado

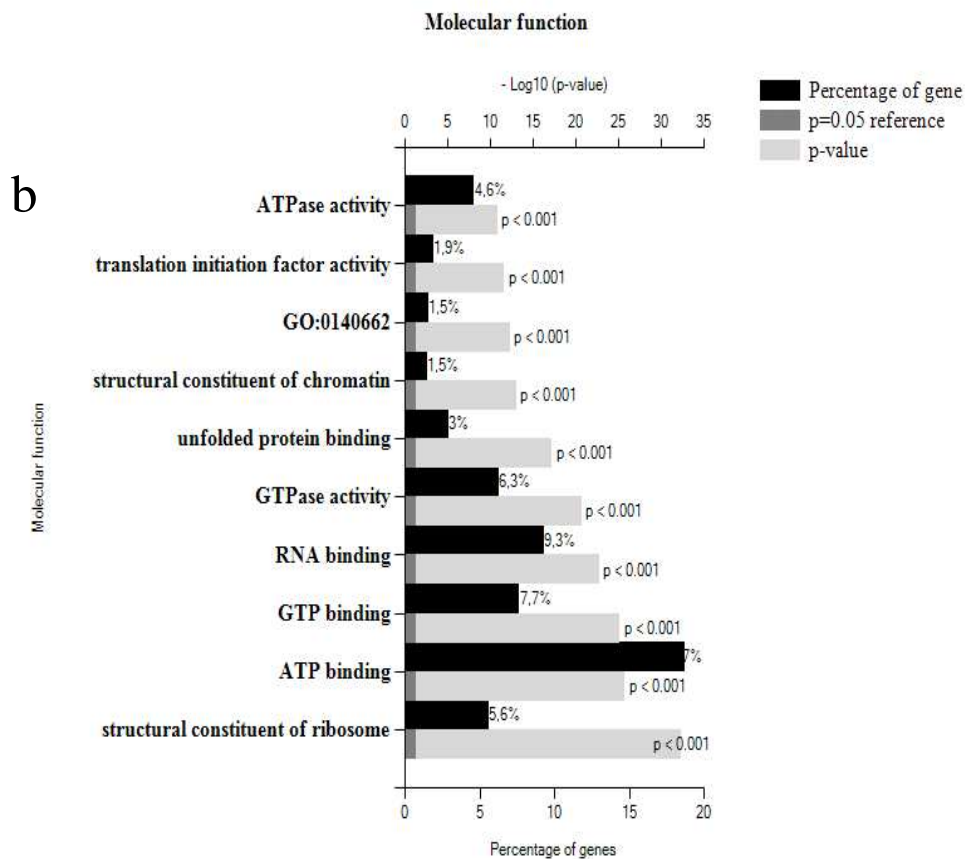
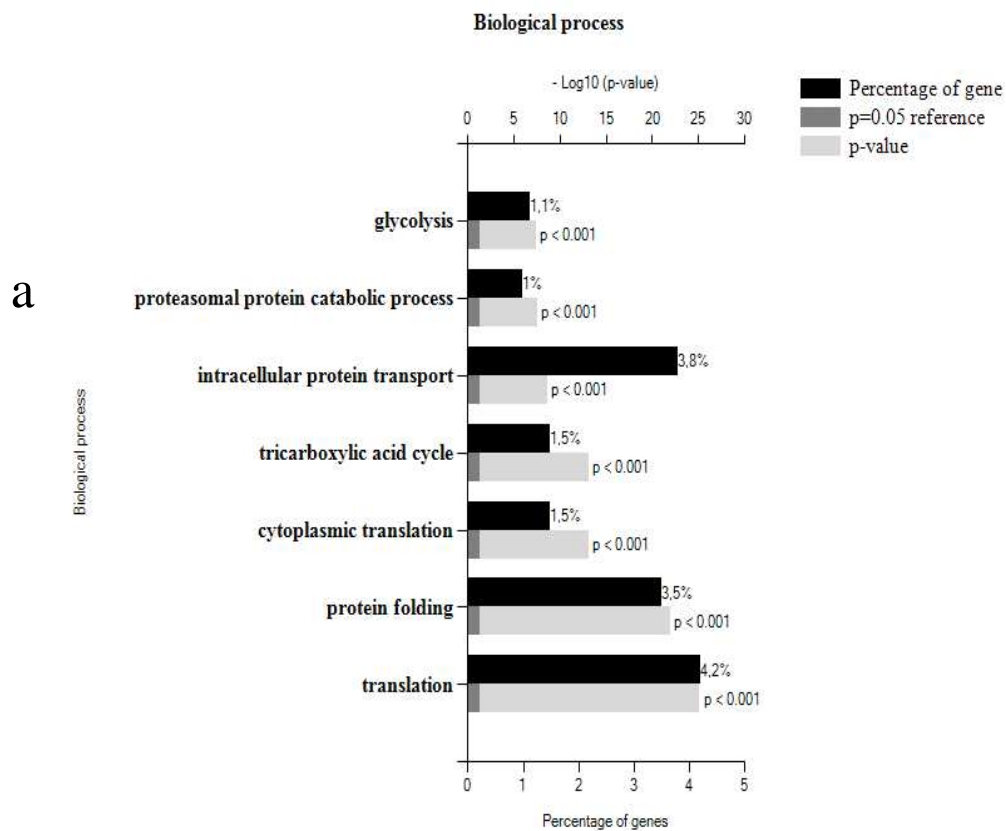
principalmente com o componente de filamento intermediário (Kossack et al., 2013; Giudice et al., 2014), e envolvida na adesão, migração e tradução. A proteína lamain está presente nas células Sertoli, Leydig, mióide peritubular, espermatogônias e células da parede capilar (Park et al., 2016; Wang et al., 2022), essa proteína tem efeitos de ligação e mediação para controlar a formação da membrana basal (Binsila et al., 2018). Estudos *in vitro* em camundongos, mostraram que o aumento da $[Ca^{2+}]$ nas células de Sertoli é mediado pela proteína lamain (Taranta et al., 2000). As proteínas expressas no testículo, que desempenham um papel importante na espermatogênese, incluem lactate dehydrogenase, actin, vimentin, lamain, tubulin, citocromo c, proteína quinase, histona e proteínas de choque térmico (Son et al., 1999). O lactate tem propriedades anti-apoptóticas no desenvolvimento de células germinativas (Rato et al., 2014; Binsila et al., 2018; Sayed et al., 2019; Wang et al., 2022).

3.5 Conclusão

O presente trabalho é o atlas mais amplo de proteínas expressas no tecido testicular de codornas, identificando 2784 proteínas, dessas 610 não eram caracterizadas em *Chicken*, estando estas envolvidas diretamente na espermatogênese. As principais funções moleculares destas proteínas estão relacionadas a ligação de ATP, ligação de GTP e constituinte estrutural do ribossomo no tecido testicular. A descrição do proteoma do tecido testicular de codornas pode contribuir para biologia da reprodução, relacionados a aspectos reprodutivos em aves.

Reconhecimentos

Apoio financeiro para a pesquisa foi fornecido pelo Conselho Nacional de Apoio ao Ensino Superior- CAPES, Brasil. Os autores agradecem o apoio do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (NPDM) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.



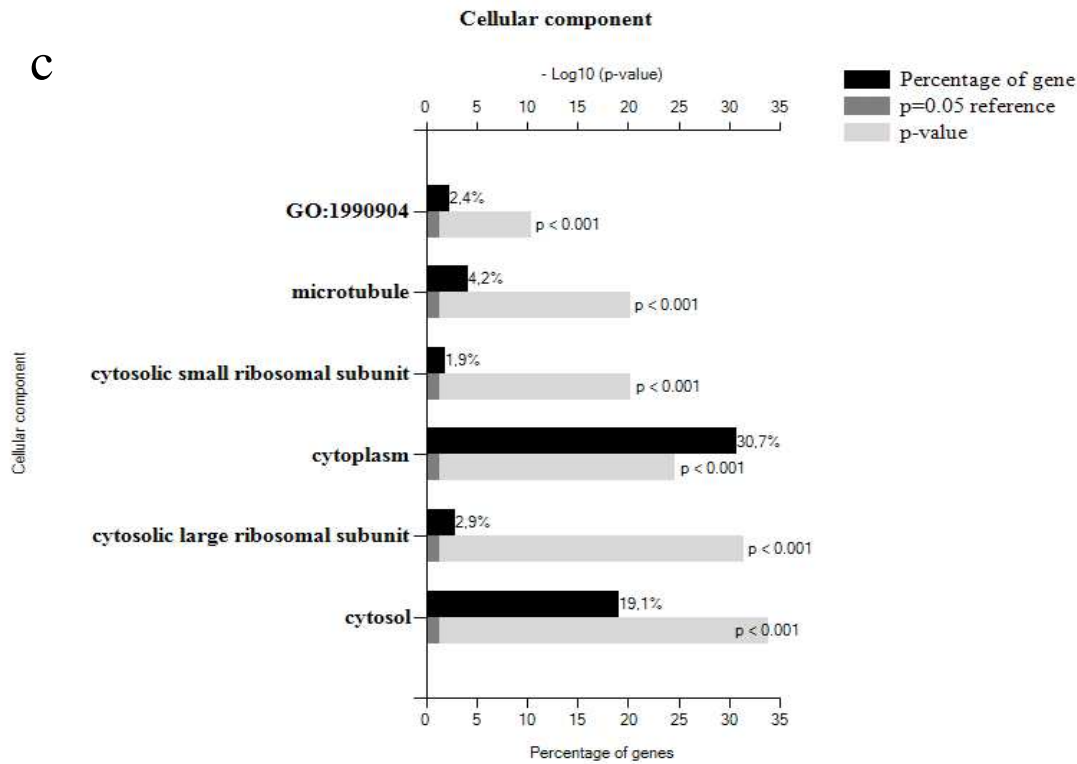


Figura 2. Diagrama de ontologia genética mostrando as proteínas de distribuição funcional no tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*). A distribuição foi feita com base em processos biológicos (Fig. 2 a), funções moleculares (Fig. 2 b) e componentes celulares (Fig. 2 c). Os dados proteicos foram analisados utilizando o software de pesquisa de anotações de proteínas FunRich (Ferramenta de análise de enriquecimento funcional, versão 3.1.4). Os termos da ontologia genética foram obtidos do banco de dados UniProtKB.

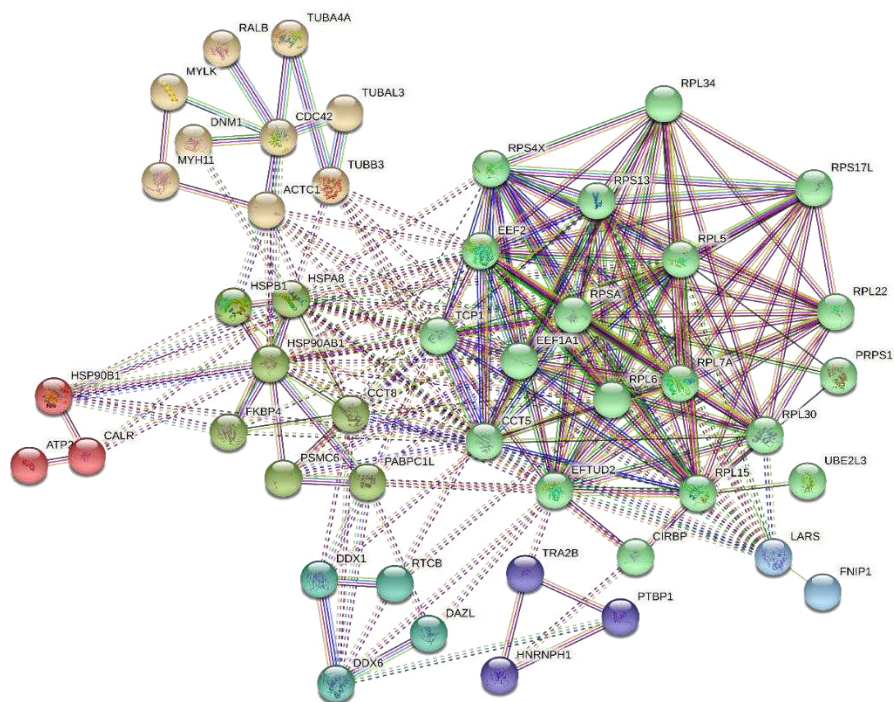


Figura 3. Análise in silico de interações e agrupamentos de proteínas identificadas no tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*), conforme determinado pela plataforma String (<https://string-db.org/>).

Tabela 1. Lista das 15 proteínas mais abundantes identificadas no tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*).

Protein accession code	Gene (UniProt)^a	Protein score	Spectrum count	Protein description
P11501	HSP90AA1	415.394	917	Heat shock protein HSP 90-alpha
F1NYB1	TUBB4B	318.823	827	Tubulin beta chain
P05122	CKB	198.483	540	Creatine Kinase B-type
Q5ZMQ2	ACTG1	284.529	532	Actin, cytoplasmic 2
F1NWX0	LOC425049	225.521	493	Tubulin alpha chain
A0A1D5PYK0	HSPA8	256.16	440	Heat shock cognate 71 KDa protein
P68034	ACTC1	245.996	390	Actin, alpha cardiac muscle 1
P68139	ACTA1	231.398	380	Actin, alpha skeletal muscle
F1P476	ACTA2	232.038	327	Actin, aortic smooth muscle
P63270	ACTG2	232.038	327	Actin, gamma-enteric smooth muscle
A0A1L1RY04	ATP5B	252.028	316	ATP synthase subunit beta
Q5ZMU9	vcp	318.76	315	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
F1NW43	PKLR	194.408	261	Pyruvate Kinase
A0A1D5PPN9	HSP90B1	232.81	258	Endoplasmin
P00356	GAPDH	181.059	246	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

^a In accordance with gene abbreviation in UniProt.

Tabela 2. Clusters selecionados associados a proteínas no tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*), avaliados pelo Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID).

Functional annotation cluster	Protein accession number	Gene	Protein description	<i>P</i> -value	Enrichment score
Nucleotide-binding	Q90WU3	DDX1	ATP-dependent RNA helicase DDX1	5.620899 ⁽⁻²⁰⁾	29.81
	P68034	ACTC1	Actin, alpha cardiac muscle 1		
	A0A1L1RYL5	PSMC6	AAA domain-containing protein		
	A0A1D5PH36	A0A1D5PH36	UBC core domain-containing protein		
	F1NNV0	ATP2A3	Calcium-transporting ATPase		
	F1NIP5	PRPS1L1	Ribose-phosphate diphosphokinase		
ATP binding	Q04619	HSP90AB1	Heat shock cognate protein HSP 90-beta	6.26506 ⁽⁻¹³⁾	29.81
	Q5ZKB9	DDX6	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6		
	A0A1D5PPN9	HSP90B1	Endoplasmin		
	P10587	MYH11	Myosin-11		
	P11799	Mylk	Myosin light chain kinase, smooth muscle		
	A0A3Q2U2D0	LARS	Leucine--tRNA ligase		
	A0A3Q2UEJ5	PTGES3	Prostaglandin E synthase 3		
Structural constituent of ribosome	P50890	RPSA	40S ribosomal protein AS	6.91191 ⁽⁻²⁰⁾	24.00
	P32429	RPL7A	60S ribosomal protein L7a		
	F1N9J4	RPL22	60S ribosomal protein L22		

	Q8UWG7	RPL6	60S ribosomal protein L6		
	Q08200	RPL10	60S ribosomal protein L10		
	P67883	RPL30	60S ribosomal protein L30		
	A0A452J886	RPL7A	60S ribosomal protein L7a		
	Q6ITC7	RPS13	40S ribosomal protein S13		
	Q90835	EEF1A	Elongation factor 1-alpha 1		
	P50890	RPSA	40S ribosomal protein AS		
	P08636	RPS17	40S ribosomal protein S17		
	P47836	RPS4	40S ribosomal protein S4		
Translation	Q6ITC7	RPS13	40S ribosomal protein S13	1.87736 ⁽⁻⁰⁸⁾	24.00
	P22451	RPL5	60S ribosomal protein L5		
	A0A1L1S0X5	RPL34	60S ribosomal protein L34		
	F1N9J4	RPL22	60S ribosomal protein L22		
	F1P368	DAZL	Deleted in azoospermia-like		
	Q6WNG8	HNRNPH2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1-like protein		
	A0A1L1S0D8	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1		
RNA recognition motif domain	E1BWJ7	PABPC1L	Polyadenylate-binding protein	9.47392 ⁽⁻⁰⁹⁾	22.13
	F1P5K0	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1		
	Q9DDU8	TRA2B	Transformer-2 beta		
	Q5ZLU8				
	A0A3Q2UCF3	RBM3	Cold-inducible RNA-binding protein		

		EIF3G	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G		
GTP binding	Q90835	EEF1A	Elongation factor 1-alpha 1		
	A0A1D5PEI5	TUBB3	Tubulin beta chain		
	A0A1D5NW27	TUBA1A	Tubulin alpha chain		
	A0A1D5P5Z0	TUBA8A	Tubulin alpha chain		
	Q5F3X4	EFTUD2	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	4.44814 ⁽⁻¹²⁾	21.46
	F1NYI3	RTCB	RNA-splicing ligase RtcB homolog		
	A0A3Q3B0L8	FKBP4	Peptidylprolyl isomerase		
	A0A3Q2U1D7	DNM1	Dynamin GTPase		
Small GTP-binding protein domain	Q5F3X4	EFTUD2	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component		
	A0A1L1RXY9	EFTUD2	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component		
	A0A3Q2TUW7	CDC42	Cell division control protein 42 homolog		
	A0A1D5PD33	CDC42	Cell division control protein 42 homolog	2.94485 ⁽⁻⁰⁸⁾	21.46
	Q90705	EEF2	Elongation factor 2		
	E1BVT0	RALB	Small monomeric GTPase		
	A0A3Q3AMW5	RALB	Small monomeric GTPase		
Protein folding	A0A1D5P5R0	HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha		
	A0A1D5PHC5	HSP90AB1	Heat shock cognate protein HSP 90-beta	3.75462 ⁽⁻⁰⁹⁾	19.10
	Q90955	PTGES3	Prostaglandin E synthase 3		
	F1NEF2	CCT8	T-complex protein 1 subunit theta		

Unfolded protein binding	Q5ZMG9	TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha	4.78325 ⁽⁻⁰⁹⁾	19.10
	A0A1D5PZJ4	CCT8	T-complex protein 1 subunit theta		
	Q5F411	CCT5	T-complex protein 1 subunit épsilon		
	A0A1D5P0U5	CALR	Calreticulin		
	A0A1D5P5R0	HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha		
	O73885	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein		
	A0A1D5PHC5	HSP90AB1	Heat shock cognate protein HSP 90-beta		
	O57476	CDC37	Hsp90 co-chaperone Cdc37		
	F1P593	HSPB1	Heat shock protein beta-1		
	Q90955	PTGES3 HSPB1	Prostaglandin E synthase 3		
	Q5ZMG9	TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha		
	F1NEF2		T-complex protein 1 subunit theta		
	Chaperone	A0A1D5P5R0	HSP90AA1		
A0A1L1RND0		HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha		
A0A1D5PUL6		HSP90AA1 HSPB1	Heat shock protein HSP 90-alpha		
Q00649		HSPA8	Heat shock protein beta-1		
O73885		HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein		
F1NWP3		HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein		
A0A1D5PFJ6		HSP90AB1	Heat shock cognate 71 kDa protein		
A0A1D5PHC5		CDC37	Heat shock cognate protein HSP 90-beta		

O57476

Hsp90 co-chaperone Cdc37

Tabela 3. Análise de vias KEEG usando servidor DAVID para genes relacionados à espermatogênese e reprodução

Pathways	Gene count	Percentage (%)	Fold enrichment	P-value	FDR	Enrichment score
Ribosome	71	4.24	35.42	9.71845 ⁽⁻¹¹⁾	1.16 ⁽⁻⁰⁷⁾	24.00
Apoptosis	24	14.34	1.15	0.337	0.73	8.79
Spliceosome	47	2.81	2.47	9869	1.68 ⁽⁰⁸⁾	6.14
Cell cycle	21	12.54	10.65	0.507	0.80	3.32
Glutathione metabolism	22	13.14	26.65	1.48688 ⁽¹¹⁾	1.26 ⁽¹²⁾	2.64

Tabela Suplementar 2. Principais funções dos microRNAs envolvidos na regulação de HSP90AA1, TUBB4B, CKB e ACTG1 com base nos maiores valores de P obtidos no banco de dados miRNet.

Hormone-mediated Signaling Pathway	Cell Proliferation	Aging	Glucose Metabolism	Cell Cycle	Cell Death
hsa-mir-16-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-let-7b-5p
hsa-mir-17-5p	hsa-let-7e-5p	hsa-let-7e-5p	hsa-let-7e-5p	hsa-mir-16-5p	hsa-let-7e-5p
hsa-mir-17-3p	hsa-mir-16-5p	hsa-mir-16-5p	hsa-mir-23a-3p	hsa-mir-17-5p	hsa-mir-16-5p
hsa-mir-23a-3p	hsa-mir-17-5p	hsa-mir-17-5p	hsa-mir-34a-5p	hsa-mir-17-3p	hsa-mir-17-5p
hsa-mir-92a-3p	hsa-mir-17-3p	hsa-mir-17-3p	hsa-mir-331-3p	hsa-mir-92a-3p	hsa-mir-17-3p
hsa-mir-101-3p	hsa-mir-92a-3p	hsa-mir-30a-5p	hsa-mir-484	hsa-mir-34a-5p	hsa-mir-23a-3p
hsa-mir-34a-5p	hsa-mir-34a-5p	hsa-mir-92a-3p	hsa-let-7d-5p	hsa-mir-182-3p	hsa-mir-25-3p
hsa-mir-221-3p	hsa-mir-221-3p	hsa-mir-148a-3p	hsa-let-7g-3p	hsa-mir-221-3p	hsa-mir-92a-3p
hsa-mir-128-3p	hsa-mir-222-3p	hsa-mir-10a-5p	hsa-mir-129-5p	hsa-mir-222-3p	hsa-mir-30c-5p
hsa-mir-7-1-3p	hsa-mir-224-5p	hsa-mir-34a-5p	hsa-mir-195-5p	hsa-mir-185-5p	hsa-mir-10b-5p
hsa-mir-7-2-3p	hsa-mir-34c-5p	hsa-mir-204-5p	hsa-mir-20a-5p	hsa-mir-34c-5p	hsa-mir-34a-5p
hsa-mir-499b-5p	hsa-mir-378a-3p	hsa-mir-221-3p	hsa-mir-34a-3p	hsa-mir-141-5p	hsa-mir-182-3p
hsa-mir-101-5p	hsa-mir-196b-5p	hsa-mir-222-3p	hsa-mir-23b-3p	hsa-mir-200c-5p	hsa-mir-183-5p
hsa-mir-133a-3p	hsa-mir-200c-5p	hsa-mir-30e-5p	hsa-let-7a-5p	hsa-mir-103a-2-5p	hsa-mir-221-3p

hsa-mir-15a-3p	hsa-let-7d-5p	hsa-mir-7-1-3p	hsa-let-7c-5p	hsa-mir-103a-3p	hsa-mir-222-3p
hsa-mir-15a-5p	hsa-let-7g-3p	hsa-mir-7-2-3p	hsa-mir-124-3p	hsa-mir-107	hsa-mir-128-3p
hsa-mir-16-1-3p	hsa-mir-127-5p	hsa-mir-141-5p	hsa-let-7g-5p	hsa-mir-141-3p	hsa-mir-7-1-3p
hsa-mir-20a-5p	hsa-mir-129-5p	hsa-mir-200c-5p	hsa-mir-125b-5p	hsa-mir-15b-5p	hsa-mir-7-2-3p
hsa-mir-21-3p	hsa-mir-130a-3p	hsa-let-7d-5p	hsa-mir-20a-3p	hsa-mir-16-1-3p	hsa-mir-1226-3p
hsa-mir-22-5p	hsa-mir-15b-5p	hsa-let-7g-3p	hsa-mir-625-5p	hsa-mir-195-5p	hsa-let-7d-5p
hsa-mir-24-3p	hsa-mir-16-1-3p	hsa-mir-141-3p	hsa-mir-1207-5p	hsa-mir-196a-5p	hsa-mir-129-5p
hsa-mir-27a-3p	hsa-mir-21-3p	hsa-mir-15a-3p	hsa-mir-124-5p	hsa-mir-20a-5p	hsa-mir-130b-3p
hsa-mir-30d-5p	hsa-mir-22-5p	hsa-mir-15a-5p	hsa-mir-129-2-3p	hsa-mir-21-3p	hsa-mir-130b-5p
hsa-mir-34a-3p	hsa-mir-24-3p	hsa-mir-16-1-3p		hsa-mir-24-3p	hsa-mir-134-5p
hsa-mir-499a-3p	hsa-mir-34a-3p	hsa-mir-181a-5p		hsa-mir-34a-3p	hsa-mir-16-1-3p
hsa-mir-23b-3p	hsa-mir-374b-5p	hsa-mir-195-5p		hsa-mir-424-5p	hsa-mir-181a-5p
hsa-let-7a-5p	hsa-let-7a-5p	hsa-mir-21-3p		hsa-let-7a-5p	hsa-mir-20a-5p
hsa-mir-18a-3p	hsa-let-7c-5p	hsa-mir-22-5p		hsa-mir-18a-3p	hsa-mir-21-3p
hsa-mir-21-5p	hsa-mir-21-5p	hsa-mir-30b-5p		hsa-mir-191-3p	hsa-mir-24-3p
hsa-mir-29a-3p	hsa-mir-29b-3p	hsa-mir-30d-5p		hsa-mir-21-5p	hsa-mir-30b-5p
hsa-mir-30d-3p	hsa-mir-29c-3p	hsa-mir-34a-3p		hsa-mir-29b-3p	hsa-mir-30d-5p
hsa-mir-7-5p	hsa-mir-503-5p	hsa-mir-194-5p		hsa-mir-503-5p	hsa-mir-34a-3p
hsa-mir-1-3p	hsa-mir-1-3p	hsa-let-7a-5p		hsa-mir-1-3p	hsa-mir-23b-3p
hsa-mir-124-3p	hsa-mir-124-3p	hsa-let-7c-5p		hsa-mir-124-3p	hsa-let-7a-5p
hsa-mir-146a-5p	hsa-mir-146a-5p	hsa-mir-18a-3p		hsa-mir-182-5p	hsa-let-7c-5p

hsa-mir-132-3p	hsa-mir-200b-3p	hsa-mir-21-5p	hsa-mir-191-5p	hsa-mir-18a-3p
hsa-mir-20a-3p	hsa-mir-429	hsa-mir-30a-3p	hsa-mir-200b-3p	hsa-mir-21-5p
hsa-mir-212-3p	hsa-let-7g-5p	hsa-mir-30d-3p	hsa-mir-210-3p	hsa-mir-29b-3p
hsa-mir-22-3p	hsa-mir-125b-5p	hsa-mir-30e-3p	hsa-mir-125b-5p	hsa-mir-29c-3p
hsa-mir-9-5p	hsa-mir-140-5p	hsa-mir-7-5p	hsa-mir-140-5p	hsa-mir-30d-3p
hsa-mir-98-5p	hsa-mir-145-5p	hsa-mir-146a-5p	hsa-mir-145-5p	hsa-mir-7-5p
hsa-mir-124-5p	hsa-mir-22-3p	hsa-let-7g-5p	hsa-mir-20a-3p	hsa-mir-1-3p
hsa-mir-212-5p	hsa-mir-9-5p	hsa-mir-145-5p	hsa-mir-9-5p	hsa-mir-146a-5p
hsa-mir-27a-5p	hsa-mir-124-5p	hsa-mir-22-3p	hsa-mir-98-5p	hsa-mir-182-5p
hsa-mir-363-3p	hsa-mir-130a-5p	hsa-mir-9-5p	hsa-mir-124-5p	hsa-let-7f-5p
hsa-mir-18a-5p	hsa-mir-203a-3p	hsa-mir-155-5p	hsa-mir-138-5p	hsa-let-7i-5p
		hsa-mir-18a-5p	hsa-mir-18a-5p	hsa-mir-125b-5p
				hsa-mir-145-5p
				hsa-mir-20a-3p
				hsa-mir-212-3p
				hsa-mir-98-5p
				hsa-mir-212-5p
				hsa-mir-885-3p
				hsa-mir-129-2-3p
				hsa-mir-203a-3p
				hsa-mir-18a-5p

REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, Ruedi; MANN, Matthias. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.
- AUDEBERT, Stéphane et al. The carboxy-terminal sequence Asp427–Glu432 of β -tubulin plays an important function in axonemal motility. **European journal of biochemistry**, v. 261, n. 1, p. 48-56, 1999.
- BEAUPRE, Christine E. et al. Determination of testis temperature rhythms and effects of constant light on testicular function in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Biology of reproduction**, v. 56, n. 6, p. 1570-1575, 1997.
- BINSILA, Krishnan B. et al. Isolation and enrichment of putative spermatogonial stem cells from ram (*Ovis aries*) testis. **Animal reproduction science**, v. 196, p. 9-18, 2018.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CARVALHO, Paulo C. et al. PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. **Nature protocols**, v. 11, n. 1, p. 102, 2016.
- CHALMEL, Frederic et al. Global human tissue profiling and protein network analysis reveals distinct levels of transcriptional germline-specificity and identifies target genes for male infertility. **Human reproduction**, v. 27, n. 11, p. 3233-3248, 2012.
- CHANG, Le et al. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. **Nucleic acids research**, v. 48, n. W1, p. W244-W251, 2020.
- CHEN JIE, Chen Jie. Dynamics of microfilaments and tubulin during spermiogenesis in the Chinese bush cricket, *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). **Acta Entomologica Sinica**, v. 61, n. 3, p. 308-321, 2018.
- COSTIGLIOLA, Nancy et al. Vimentin fibers orient traction stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 20, p. 5195-5200, 2017.
- DE OLIVEIRA GRIESER, Daiane et al. Estudo do crescimento e composição corporal de linhagens de codornas de corte e postura. **Acta Tecnológica**, v. 10, n. 2, p. 23-37, 2017.
- DJUREINOVIC, Dijana et al. The human testis-specific proteome defined by transcriptomics and antibody-based profiling. **Molecular human reproduction**, v. 20, n. 6, p. 476-488, 2014.
- EDDY, E. M. HSP70-2 heat-shock protein of mouse spermatogenic cells. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 282, n. 1-2, p. 261-271, 2015.

- EILDERMANN, K.; GROMOLL, J.; BEHR, R. Misleading and reliable markers to differentiate between primate testis-derived multipotent stromal cells and spermatogonia in culture. **Human Reproduction**, v. 27, n. 6, p. 1754-1767, 2012.
- EL HASSOUNI, Btissame et al. Targeting the ribosome biogenesis key molecule fibrillarin to avoid chemoresistance. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 33, p. 6020-6032, 2019.
- ESTERMANN, Martin Andres; MAJOR, Andrew Thomas; SMITH, Craig Allen. Genetic regulation of avian testis development. **Genes**, v. 12, n. 9, p. 1459, 2021.
- ETO, Ko et al. Phosphorylated SAP155, the spliceosomal component, is localized to chromatin in postnatal mouse testes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 393, n. 4, p. 577-581, 2010.
- FERREIRA, R. S. **Morfologia, histologia e proteômica do testículo de codornas europeias alimentadas com anacardato de cálcio**. 2019. Dissertação, (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- GIUDICE, C. et al. Immunohistochemical expression of markers of immaturity in sertoli and seminal cells in canine testicular atrophy. **Journal of comparative pathology**, v. 150, n. 2-3, p. 208-215, 2014.
- GREEN, Christopher Daniel et al. A comprehensive roadmap of murine spermatogenesis defined by single-cell RNA-seq. **Developmental cell**, v. 46, n. 5, p. 651-667. e10, 2018.
- GRISWOLD, Michael D. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. **Physiological reviews**, v. 96, n. 1, p. 1-17, 2016.
- GRISWOLD, Michael D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 1998. p. 411-416.
- GRUPPI, Carol M.; ZAKERI, Zahra F.; WOLGEMUTH, Debra J. Stage and lineage-regulated expression of two hsp90 transcripts during mouse germ cell differentiation and embryogenesis. **Molecular reproduction and development**, v. 28, n. 3, p. 209-217, 1991.
- GUILLAUME, Elisabeth et al. Proteome analysis of spermatogonia: identification of a first set of 53 proteins. **Proteome**, v. 1, p. 1-20, 2000.
- GUO, Xuejiang et al. Analysis of the human testis proteome by mass spectrometry and bioinformatics. **PROTEOMICS–Clinical Applications**, v. 2, n. 12, p. 1651-1657, 2008.
- HUANG, Da Wei; SHERMAN, Brad T.; LEMPICKI, Richard A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009.

- HUANG, Hsiu-Chin et al. Purification and characterization of porcine testis 90-kDa heat shock protein (HSP90) as a substrate for various protein kinases. **Journal of protein chemistry**, v. 21, p. 111-121, 2002.
- HUANG, San-Yuan et al. A reference map and identification of porcine testis proteins using 2-DE and MS. **Proteomics**, v. 5, n. 16, p. 4205-4212, 2005 (a).
- HUANG, San-Yuan et al. Developmental changes of heat-shock proteins in porcine testis by a proteomic analysis. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p. 1940-1955, 2005 (b).
- HUANG, San-Yuan et al. Differential expression of porcine testis proteins during postnatal development. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3-4, p. 221-233, 2011.
- HUANG, Yu-lin et al. Novel targets identified by integrated proteomic and phosphoproteomic analysis in spermatogenesis of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 15659, 2020.
- KHAI TOVICH, Philipp et al. Parallel patterns of evolution in the genomes and transcriptomes of humans and chimpanzees. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1850-1854, 2005.
- KIM, Min-Sik et al. A draft map of the human proteome. **Nature**, v. 509, n. 7502, p. 575-581, 2014.
- KOSSACK, N. et al. A combined approach facilitates the reliable detection of human spermatogonia in vitro. **Human Reproduction**, v. 28, n. 11, p. 3012-3025, 2013.
- KOZOMARA, Ana; GRIFFITHS-JONES, Sam. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl_1, p. D152-D157, 2010.
- KRAUTWALD-JUNGHANNS, Maria-Elisabeth et al. Current approaches to avoid the culling of day-old male chicks in the layer industry, with special reference to spectroscopic methods. **Poultry science**, v. 97, n. 3, p. 749-757, 2018.
- LANGENSTROTH, Daniel et al. Separation of somatic and germ cells is required to establish primate spermatogonial cultures. **Human Reproduction**, v. 29, n. 9, p. 2018-2031, 2014.
- LESKA, Anna; DUSZA, Luiza. Seasonal changes in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in birds. **Reprod Biol**, v. 7, n. 2, p. 99-126, 2007.
- LI, C. et al. Expression analysis of global gene response to chronic heat exposure in broiler chickens (*Gallus gallus*) reveals new reactive genes. **Poultry science**, v. 90, n. 5, p. 1028-1036, 2011.
- LI, Linxi et al. Sperm release at spermiation is regulated by changes in the organization of actin- and microtubule-based cytoskeletons at the apical ectoplasmic specialization—a study using the adjuvin model. **Endocrinology**, v. 158, n. 12, p. 4300-4316, 2017.

LIANG, Jiaying et al. Comparison of proteomic profiles from the testicular tissue of males with impaired and normal spermatogenesis. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 67, n. 2, p. 127-136, 2021.

MAGEENEY, Catherine M.; WARE, Vassie C. Specialized eRpL22 paralogue-specific ribosomes regulate specific mRNA translation in spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 30, n. 17, p. 2240-2253, 2019.

MAYERHOFER, Artur. Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. **Reproduction**, v. 145, n. 5, p. R107-R116, 2013.

NAKANISHI, Yoshinobu; SHIRATSUCHI, Akiko. Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 13-16, 2004.

NEUER, A. et al. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human reproduction update**, v. 6, n. 2, p. 149-159, 2000.

O'FLAHERTY, Cristian. Redox regulation of mammalian sperm capacitation. **Asian journal of andrology**, v. 17, n. 4, p. 583-590, 2015.

PARK, Min Hee et al. Effects of extracellular matrix protein-derived signaling on the maintenance of the undifferentiated state of spermatogonial stem cells from porcine neonatal testis. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 29, n. 10, p. 1398, 2016.

PATHAN, Mohashin et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. **Proteomics**, v. 15, n. 15, p. 2597-2601, 2015.

PAZ, María; MORÍN, Matías; DEL MAZO, Jesús. Proteome profile changes during mouse testis development. **Comparative biochemistry and physiology Part D: Genomics and proteomics**, v. 1, n. 4, p. 404-415, 2006.

PINEAU, Charles et al. Cell type-specific expression of testis elevated genes based on transcriptomics and antibody-based proteomics. **Journal of proteome research**, v. 18, n. 12, p. 4215-4230, 2019.

RATO, Luis et al. Pre-diabetes alters testicular PGC1- α /SIRT3 axis modulating mitochondrial bioenergetics and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1837, n. 3, p. 335-344, 2014.

REIJO, Renee A. et al. DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1490-1496, 2000.

ROSTAGNO, Horacio Santiago et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa: UFV/DZO, 2000.

- SAYED, Ramy KA et al. Retinoid-related orphan nuclear receptor alpha (ROR α)-deficient mice display morphological testicular defects. **Laboratory Investigation**, v. 99, n. 12, p. 1835-1849, 2019.
- SILVA, JHV da; COSTA, FGP2009. Tabela para codornas japonesas e europeias. **Jaboticabal, SP: Funep**, v. 110, 2009.
- SON, Weon-Young et al. Specific expression of heat shock protein HspA2 in human male germ cells. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 5, n. 12, p. 1122-1126, 1999.
- STANTON, Peter G. et al. Mapping the testicular interstitial fluid proteome from normal rats. **Proteomics**, v. 16, n. 17, p. 2391-2402, 2016.
- TARANTA, Anna et al. Immediate cell signal induced by laminin in rat Sertoli cells. **Matrix Biology**, v. 19, n. 1, p. 11-18, 2000.
- UHLÉN, Mathias et al. Tissue-based map of the human proteome. **Science**, v. 347, n. 6220, p. 1260419, 2015.
- VIANA, A. G. A. et al. Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16323, 2018.
- VOOLSTRA, Christian et al. Contrasting evolution of expression differences in the testis between species and subspecies of the house mouse. **Genome research**, v. 17, n. 1, p. 42-49, 2007.
- WANG, Hua et al. Distribution of extracellular matrix related proteins in normal and cryptorchid ziwuling black goat testes. **Animal Reproduction**, v. 19, p. e20220005, 2022.
- WANG, Jing et al. In-depth proteomic analysis of whole testis tissue from the adult rhesus macaque. **Proteomics**, v. 14, n. 11, p. 1393-1402, 2014.
- WANG, Lingling et al. Actin binding proteins, actin cytoskeleton and spermatogenesis—lesson from toxicant models. **Reproductive Toxicology**, v. 96, p. 76-89, 2020.
- WANG, Shih-Han et al. Acute heat stress changes protein expression in the testes of a broiler-type strain of Taiwan country chickens. **Animal biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 129-145, 2019.
- WANG, Shih-Han et al. Changes in protein expression in testes of L2 strain Taiwan country chickens in response to acute heat stress. **Theriogenology**, v. 82, n. 1, p. 80-94, 2014.
- WELCH, JEFFREY E. et al. Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells. **Journal of andrology**, v. 21, n. 2, p. 328-338, 2000.

- WELTER, Harald et al. The glucocorticoid receptor NR3C1 in testicular peritubular cells is developmentally regulated and linked to the smooth muscle-like cellular phenotype. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 961, 2020.
- WILHELM, Mathias et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. **Nature**, v. 509, n. 7502, p. 582-587, 2014.
- WU, Hao et al. Major spliceosome defects cause male infertility and are associated with nonobstructive azoospermia in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 15, p. 4134-4139, 2016.
- XIAO, Xiang; YANG, Wan-xi. Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, n. 7, p. 498-506, 2007.
- ZAKERI, Zahra F.; WOLGEMUTH, Debra J.; HUNT, Clayton R. Identification and sequence analysis of a new member of the mouse HSP70 gene family and characterization of its unique cellular and developmental pattern of expression in the male germ line. **Molecular and cellular biology**, 1988.
- ZHANG, Jingfei et al. Curcumin attenuates hepatic mitochondrial dysfunction through the maintenance of thiol pool, inhibition of mtDNA damage, and stimulation of the mitochondrial thioredoxin system in heat-stressed broilers. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 3, p. 867-879, 2018.
- ZHANG, Pengfei et al. Proteomic and phosphoproteomic profiles of Sertoli cells in buffalo. **Theriogenology**, v. 170, p. 1-14, 2021.
- ZHOU, Rui et al. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. **Cellular and molecular life sciences**, v. 76, p. 2681-2695, 2019.
- ZHOU, Tao et al. An update of the macaque testis proteome. **Data in brief**, v. 5, p. 95-98, 2015.
- ZHU, Dahai; DIX, David J.; EDDY, E. M. HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. **Development**, v. 124, n. 15, p. 3007-3014, 1997.
- ZHU, Hui et al. Proteomic analysis of testis biopsies in men treated with transient scrotal hyperthermia reveals the potential targets for contraceptive development. **Proteomics**, v. 10, n. 19, p. 3480-3493, 2010.
- ZHU, Ye-Fei et al. Proteomic analysis of effect of hyperthermia on spermatogenesis in adult male mice. **Journal of proteome research**, v. 5, n. 9, p. 2217-2225, 2006.

APÊNDICE A – LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1 - Gel de poliacrilamida do músculo Pectoralis Major de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*), alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico. M- marcador; T1 - ração controle; T2 - 0,25% ANC; T3 - 0,25% ANC e 0,25% AC; T4 - 0,50% ANC; T5 - 0,50% ANC e 0,25% AC; T6 - 0,50% ANC e 0,50% AC; T7 - 0,75% ANC; T8 - 0,75% ANC e 0,25% AC; T9 - 0,75% ANC e 0,50% AC; respectiva quantidade de anacardato de cálcio (ANC) e ácido cítrico (AC)..... 32
- Figura 2 - Termos de ontologia gênica de proteínas do músculo Pectoralis Major (a), testículo (b), epidídimo (c) e glândula acessória (d) de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*) submetidas a diferentes níveis de dieta com anacardato de cálcio associado ao ácido cítrico, associados ao processo biológico, classe proteica, função molecular e componente celular. Os dados e a identificação das proteínas foram analisados pelo sistema de classificação Panther (<http://geneontology.org/>) e com base no banco de dados 34
- Figura 3 - Análise in silico das interações proteicas do músculo Pectoralis Major (A), testículo (B), epidídimo (C) e glândula acessória (D) em codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*) determinadas por STRING software version 11.0. A análise inclui todas as proteínas incluídas na tabela suplementar, mas com exceção das que não tiveram interação..... 36
- Figura 4 - Gel de poliacrilamida do tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*), alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico. M- marcador; T1 - ração controle; T2 - 0,25% ANC; T3 - 0,25% ANC e 0,25% AC; T4 - 0,50% ANC; T5 - 0,50% ANC e 0,25% AC; T6 - 0,50% ANC e 0,50% AC; T7 - 0,75% ANC; T8 - 0,75% ANC e 0,25% AC; T9 - 0,75% ANC e 0,50% AC; representam a respectiva quantidade de anacardato de cálcio (ANC) e ácido cítrico (AC) fornecido nas dietas dos animais durante o período experimental. SDS-PAGE de 12,5% corado com comassie R-250..... 37

- Figura 5 - Comparação entre bandas de proteínas identificadas do tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*) alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico. As letras diferentes diferem ($P < 0,05$)..... 40
- Figura 6 - Imagens de microscopia óptica do túbulo seminífero de codornas europeias alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio (ANC) associado ou não ao ácido cítrico (AC) 40X. Tratamento controle (A) apresentaram organização celular normal no epitélio seminífero, com correta distribuição, maturação e diferenciação celular durante a produção de espermatozoides (mostrado pela seta preta); Formação de vacúolos entre células germinativas nos tratamentos 0,50% ANC e 0,50% AC (B); 0,75% ANC (C), 0,75% ANC e 0,25% AC (D) e 0,75% ACN e 0,50% AC (E) respectivamente (mostrados pela seta amarela)..... 42

CAPÍTULO II

- Figura 1 - Análise de enriquecimento de rede e conjunto de genes de miRNAs associados à regulação de HSP90AA1, TUBB4B, CKB e ACTG1 com base nos valores P mais elevados obtidos do banco de dados miRNet..... 77
- Figura 2 - Diagrama de ontologia genética mostrando as proteínas de distribuição funcional no tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*). A distribuição foi feita com base em processos biológicos (Fig. 2 a), funções moleculares (Fig. 2 b) e componentes celulares (Fig. 2 c). Os dados proteicos foram analisados utilizando o software de pesquisa de anotações de proteínas FunRich (Ferramenta de análise de enriquecimento funcional, versão 3.1.4). Os termos da ontologia genética foram obtidos do banco de dados UniProtKB..... 79
- Figura 3 - Análise in silico de interações e agrupamentos de proteínas identificadas no tecido testicular de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*), conforme determinado pela plataforma String (<https://string-db.org/>)..... 80

APÊNDICE B – LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Média e desvio padrão dos dados morfométricos do testículo e peso das codornas europeias (<i>Coturnix coturnix coturnix</i>) alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico.....	43
Tabela 2 - Composição percentual e nutricional calculada das rações experimentais.....	44
Tabela 3 - Proteínas do músculo <i>Pectoralis Major</i> de codornas (<i>Coturnix coturnix coturnix</i>) alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE unidimensional e identificadas por espectrometria de massa tandem (ESI-Q-ToF).....	45
Tabela 4 - Proteínas do tecido testicular de codornas (<i>Coturnix coturnix coturnix</i>) alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE unidimensional e identificadas por espectrometria de massa tandem (ESI-Q-ToF).....	52
Tabela 5 - Quantidade de células presente no túbulo seminífero de testículos de codornas europeias suplementadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio e ácido cítrico.....	55

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Lista das 15 proteínas mais abundantes identificadas no tecido testicular de codornas (<i>Coturnix coturnix coturnix</i>).....	81
Tabela 2 - Clusters selecionados associados a proteínas no tecido testicular de codornas (<i>Coturnix coturnix coturnix</i>), avaliados pelo Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID).....	82
Tabela 3 - . Análise de vias KEEG usando servidor DAVID para genes relacionados à espermatogênese e reprodução.....	87