

MARCADORES MOLECULARES DE FERTILIZAÇÃO EM OVINOS DESLANADOS

Giovanna Costa Marques Araújo¹

Vitória Costa Pinheiro¹

Fabiola Gomes de Vasconcelos Chaves¹

Denise Damasceno Guerreiro²

¹Discente - Centro Universitário Fametro - Unifametro

¹Discente - Centro Universitário Fametro - Unifametro

¹Discente - Centro Universitário Fametro - Unifametro

²Docente - Centro Universitário Fametro - Unifametro

(Giovanna.aluno1@unifametro.edu.br)

Área Temática: Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária

Área Temática: Bem-estar animal, medicina veterinária preventiva e saúde pública veterinária

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde

Encontro Científico: IV Encontro de Experiências Docentes

RESUMO

Introdução: Com o crescimento exponencial da população mundial, a agroindústria vem exigindo maiores números e ganhos para atendermos as necessidades do mercado, e isto influencia diretamente nos animais de produção e a forma de seleção e melhoramento genético. O uso de marcadores moleculares principalmente de DNA, vem auxiliando com maior precisão o potencial genético dos animais antes mesmo da expressão do seu fenótipo. **Objetivos e métodos:** Fazer um levantamento sobre as principais proteínas seminais relacionadas à fertilidade de ovinos deslanados, revisar procedimentos de coleta para espermograma, além de ressaltar a importância de se utilizar essa biotecnologia em prol da agroindústria. **Resultados:** Foi possível levantar dados sobre as 10 proteínas mais abundantes encontradas no espermatozoide de carneiros da raça Morada Nova. **Considerações finais:** O uso de marcadores moleculares de fertilização em ovinos deslanados mostra-se de grande importância para os avanços na ovinocultura, permitindo que o potencial genético de um animal seja determinado com mais precisão. dessa forma gerando um melhoramento genético da espécie e gerando ganhos econômicos.

Palavras-chave: Proteômica; Reprodução animal; Ovinos.

INTRODUÇÃO

A exploração de pequenos ruminantes domésticos, historicamente, é uma atividade de grande importância econômico-social, particularmente na maioria dos países que possuem regiões de climas árido e semiárido. Nestas regiões, o segmento da sociedade que tradicionalmente é envolvida no processo produtivo de pequenos ruminantes apresenta elevados níveis de complexidade e multiplicidade de objetivos (ELLIS, 1996).

No Brasil, o rebanho ovino é de aproximadamente 16.019.170 cabeças, sendo a região Nordeste com maior concentração desses animais com cerca de 9.379.380 (58,55%), (IBGE, 2008). Esses rebanhos apresentam algumas diferenças, considerando os aspectos raciais e sistemas de exploração utilizados. Na região Sul, os ovinos são destinados tradicionalmente à produção de lã, embora essa tendência esteja mudando pela maior valorização da carne. No Nordeste, o rebanho ovino é constituído principalmente por animais deslanados, destinados à produção de carne e pele (OLIVEIRA & LIMA, 1994; EMBRAPA CAPRINOS, 2008).

Dentre as raças deslanadas, Santa Inês é a mais comumente difundida no estado do Ceará, devido a sua adaptabilidade ao clima e condições de manejo, rusticidade, boa habilidade materna e resistência às verminoses (embora seja exigente nutricionalmente). Nesse sentido, a raça Santa Inês destaca-se como excelente alternativa para a produção de carne em quase todas as regiões do Brasil. Estes atributos a colocam em posição estratégica como reserva de diversidade genética factível de uso em programas de melhoramento, por meio de seleção e cruzamentos. A baixa prolificidade e limitações em algumas características de carcaça são atributos restritivos, mas que não comprometem a raça Santa Inês como opção viável para produção de carne no País. (EMBRAPA).

Nos sistemas de produção, a eficiência reprodutiva é um dos fatores essenciais para a lucratividade (MATOS et al.,1992) e, portanto, a produção de carneiros depende da seleção de reprodutores testados e com alta capacidade fertilizante. Desse modo, é importante a inclusão de características reprodutivas dentre os parâmetros utilizados em sua seleção (ISLAM & LAND, 1977). A análise dos parâmetros seminais e da integridade da cromatina espermática são utilizados para definição de critérios mínimos aceitáveis para a seleção de reprodutores, assim como as dimensões testiculares, podendo contribuir para um expressivo melhoramento

genético devido às suas correlações com a produção e qualidade seminal (YARNEY et al., 1990).

Desse modo, este trabalho objetivou fazer um levantamento sobre as principais proteínas presentes nos espermatozoides de carneiros deslanados da raça Santa Inês utilizando a espectrometria de massas associada à cromatografia líquida.

METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Núcleo de Ensino e Estudos em Forragicultura (NEEF/DZ/CCA/UFC), em Fortaleza-Ceará. Foram utilizados 3 ovinos machos não castrados da raça Santa Inês, com aproximadamente 30 kg e dois anos de idade. Todos os animais foram vermifugados e receberam suplementação de vitaminas A, D e E injetável por via subcutânea. O sêmen foi coletado utilizando vagina artificial,

Ao restante do sêmen foi adicionado inibidor de protease (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) e, em seguida, centrifugado (700 x g, 10 minutos, 4 °C), para separação do plasma seminal e células espermáticas. As células espermáticas foram então submetidas ao processo de extração e digestão de proteínas. Em seguida, as amostras foram submetidas a análise de espectrometria de massa (Orbitrap Q Exactive™ Plus -Thermo Scientific, Alemanha).

As atividades práticas desenvolvidas no presente trabalho, foram uma parceria entre as universidades UFC: colaborando com os laboratórios e animais e UECE: atividades laboratoriais e demais experimentos, e foram registradas sob o número de protocolo 10420061/2022, junto ao Comitê de Ética para o Uso de Animais Da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas um total de 118 proteínas nos espermatozoides de carneiros da raça Santa Inês. Desse total de proteínas destacamos as dez mais abundantes (TUBB4B, TUBA3C, IL4I1, ACR, ATP5F1B, ATP5F1A, LUZP2, ODF2, ALDOA e LDHA), conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Lista das 10 proteínas mais abundantes encontradas no espermatozoide de carneiros da raça Morada Nova.

Código de acesso Proteína	Gene (UniProt) ^a	Abundância	Descrição Proteína
P68371	TUBB4B	140445.99	Cadeia de tubulina beta-4B
P0DPH7	TUBA3C	93998.18	Cadeia de tubulina alfa-3C
Q96RQ9	IL4I1	51839.10	L-aminoácido oxidase
P10323	ACR	41933.06	Acrosina
P06576	ATP5F1B	41379.73	Subunidade beta da ATP sintase, mitocondrial
P25705	ATP5F1A	35206.05	Subunidade alfa da ATP sintase, mitocondrial
Q86TE4	LUZP2	33839.17	Proteína de zíper de leucina 2
Q5BJF6	ODF2	33546.45	Proteína de fibra densa externa 2
P04075	ALDOA	28925.53	Frutose-bifosfato aldolase A
P00338	LDHA	28561.20	Cadeia A da L-lactato desidrogenase

As tubulinas TUBB4B e TUBA3C encontradas no presente trabalho, são proteínas que compõem os microtúbulos. Os microtúbulos são elementos citoesqueléticos que desempenham papéis-chave nas diferentes etapas do desenvolvimento do espermatozoide (GADADHAR E HIRSCHMUGL, 2023). Como parte integrante do flagelo espermático, a máquina molecular que gera a motilidade espermática, os microtúbulos também são essenciais para a motilidade progressiva e capacitação do espermatozoide para o oócito, que é um pré-requisito para a fertilização (DVORAKOVA et al., 2005; FRANCOU, 2014). Nesse sentido, a abundância dessa proteína nos espermatozoides de ovinos se deve a sua função na maquinaria do citoesqueleto dessas células germinativas.

Outra proteína abundante encontrada foi a L-aminoácido oxidase (IL4I1), que já foi relatada anteriormente em espermatozoides de carneiro, touro e garanhão (TOSIC & WALTON 1950; SHANNON & CURSON 1972, 1982; UPRETI *ET AL.* 1998; AITKEN *ET AL.*, 2015). A IL4I1 é uma flavoenzima que catalisa a oxidação de L-aminoácidos em alfa-cetoácido, amônia e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (ZHANG *ET AL.*, 2021). Em espermatozoides equinos a enzima L-aminoácido oxidase é capaz de gerar quantidades significativas de espécies reativas de oxigênio (ROS) e criar um estado de estresse oxidativo (AITKEN *ET AL.*, 2015). Em concentrações fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (ERO) modulam as alterações morfológicas necessárias para a maturação dos espermatozoides e os processos cruciais envolvidos na capacitação, hiperativação e reações acrossômicas (ZHANG *ET AL.*, 2021). Nesse sentido, a IL4I1 pode ser considerada um marcador de espermatozoides funcionais.

A acrosina (ACR) é uma serina proteinase acrossomal do esperma que está envolvida nos estágios iniciais da fertilização como: reação acrossômica, reconhecimento e ligação do espermatozoide a zona pelúcida e penetração da zona pelúcida pelos espermatozoides (TAITZOGLOU ET AL., 2001). A acrosina exerce papel crucial na reprodução, pois sem a atividade da acrosina, a fertilização não ocorreria. Identificamos também como proteínas abundantes as subunidades alfa e beta da ATP sintase, mitocondrial (ATP5F1B e ATP5F1A, respectivamente). O ATP é essencial para muitas das funções do esperma, como a motilidade espermática, o metabolismo celular, incluindo eventos de fusão associados à fertilização, e depende da morfologia geral do esperma (RAJASINGAM ET AL., 2021).

A proteína de zíper de leucina 2 (LUZP2) é um motivo estrutural que permite formar interações proteína-proteína e se ligar a sequências de DNA envolvidas na transcrição gênica. Foi relatada em espermatozoides de bovinos (BYRNE ET AL., 2012) e humanos com criptorquidismo (LU ET AL., 2017), entretanto seu papel nos espermatozoides ainda é pouco explorado. Outra proteína abundante encontrada em nosso estudo foi a fibra densa externa 2 (ODF2), que é uma proteína citoesquelética necessária para a de flagelos (cauda) e estabilidade para transportar espermatozoides dos testículos para os óvulos (ITO ET AL., 2019).

Por fim a Frutose-bifosfato aldolase A (ALDOA) é uma enzima glicolítica envolvida na ligação da zona pelúcida (PETIT ET AL., 2013) e lactato desidrogenase (LDHA). A glicólise é uma importante via conservada que foi substancialmente modificada durante a espermatogênese dos mamíferos. Esta via metabólica central é composta por dez enzimas que convertem a glicose em piruvato, com uma produção líquida de 2 ATPs por molécula de glicose. O piruvato pode ser posteriormente metabolizado nas mitocôndrias através do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa, ou alternativamente convertido em lactato pela lactato desidrogenase (LDH) (VEMUGANTI ET AL., 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento dessas proteínas é de extrema importância para desvendar os mecanismos envolvidos na funcionalidade espermática. O mapeamento dessas proteínas, também permitirá identificar os carneiros com subfertilidade e problemas na criopreservação de sêmen.

REFERÊNCIAS

AITKEN JB, NAUMOVSKI N, CURRY B, GRUPEN CG, GIBB Z, AITKEN RJ. Characterization of an L-amino acid oxidase in equine spermatozoa. *Biol Reprod.* 2015 May;92(5):125. doi: 10.1095/biolreprod.114.126052.

BYRNE K, LEAHY T, MCCULLOCH R, COLGRAVE ML, HOLLAND MK.

Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. *Proteomics*. 2012 Dec;12(23-24):3559-79. doi: 10.1002/pmic.201200133.

F.M. PETIT, C. SERRES, F. BOURGEON, C. PINEAU, J. AUER, Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding, *Human Reproduction*, Volume 28, Issue 4, April 2013, Pages 852–865, <https://doi.org/10.1093/humrep/des45>

Ito, C., Akutsu, H., Yao, R. et al. Odf2 haploinsufficiency causes a new type of decapitated and decaudated spermatozoa, Odf2-DDS, in mice. *Sci Rep* 9, 14249 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50516-2>

GADADHAR S, HIRSCHMUGL T, JANKE C. The tubulin code in mammalian sperm development and function. *Semin Cell Dev Biol*. 2023 Mar 15;137:26-37. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.12.003. Epub 2022 Jan 20. PMID: 35067438.

LU P, WANG P, LI L, XU C, LIU JC, GUO X, HE D, HUANG H, CHENG Z. Exomic and Epigenomic Analyses in a Pair of Monozygotic Twins Discordant for Cryptorchidism. *Twin Res Hum Genet*. 2017 Aug;20(4):349-354. doi: 10.1017/thg.2017.33.

RAJASINGAM JEYENDRAN, ALEKSANDRA LAZAREVIC, LARRY FISHEL, MILICA IVANOVIC, SETH LEVRANT,

ATP AS INDICATOR OF SPERM NORMALCY AND REPRODUCTIVE FITNESS, *Fertility and Sterility*, Volume 116, Issue 3, Supplement, 2021, Page e351.

SHANNON P & CURSON B 1982 Site of aromatic l-amino-acid oxidase in dead bovine spermatozoa and determination of between bull differences in the percentage of dead spermatozoa by oxidase activity. *Journal of Reproduction and Fertility* 64 469–473.

TAITZOGLOU IA, TSANTARLIOTOU M, ZERVOS I, KOURETAS D, KOKOLIS NA. Inhibition of human and ovine acrosomal enzymes by tannic acid in vitro. *Reproduction*. 2001 Jan;121(1):131-7.

TOSIC J & WALTON A 1950 Metabolism of spermatozoa. The formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival. *Biochemical Journal* 47 199–212.

UPRETI GC, JENSEN K, MUNDAY R, DUGANZICH DM, VISHWANATH R & SMITH JF 1998 Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Animal Reproduction Science* 51 275–287.

ZHANG H, LIU H, KATAOKA S, KINUKAWA M, UCHIYAMA K, KAMBE J, WATANABE G, JIN W, NAGAOKA K. L-amino acid oxidase 1 in sperm is associated with reproductive performance in male mice and bulls. *Biol Reprod*. 2021 May 7;104(5):1154-1161. doi: 10.1093/biolre/ioab024.

VEMUGANTI SA, BELL TA, SCARLETT CO, PARKER CE, DE VILLENA FP, O'BRIEN DA. Three male germline-specific aldolase A isozymes are generated by alternative splicing and retrotransposition. *Dev Biol*. 2007 Sep 1;309(1):18-31. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.06.010. https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/19050/1/2015_dis_sdsousa.pdf

VILLELA, LUCIANA CRISTINE VASQUES. **Santa Inês**. 2021. Disponível em:
<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/ovinos-de-corte/pre-producao/caracteristicas/racas/naturalizadas/santa-ines>. Acesso em: 02 jul. 2023.