

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DO CONTROLE DE LUZ SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS E PROTEÔMICA DO
SÊMEN DE PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*)**

KELRY MAYARA DA SILVA

Botucatu - SP
Agosto - 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DO CONTROLE DE LUZ SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS E PROTEÔMICA DO
SÊMEN DE PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*)**

KELRY MAYARA DA SILVA

Tese apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para o Exame Geral de Qualificação do curso de Doutorado em Biotecnologia Animal

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Botucatu – SP
Agosto - 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Da Silva, Kelry Mayara.

Efeito do controle de luz sobre as características
espermáticas e proteômica do sêmen de perdizes (*Rhynchotus
rufescens*) / Kelry Mayara Da Silva. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Orientador: Fabiana Ferreira de Souza

Capes: 50504002

1. Perdiz (Ave). 2. Reprodução. 3. Espermatozoides. 4.
Proteômica.

Palavras-chave: Espermatozoide; Luminosidade; Proteína;
Tinamiforme.

Nome do autor (a): Kelry Mayara da Silva

Título: EFEITO DO CONTROLE DE LUZ SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS E PROTEÔMICA DO SÊMEN DE PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*)

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal - FMVZ- UNESP, Botucatu/SP

Profa. Dra. Eunice Oba

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal - FMVZ- UNESP, Botucatu/SP

Profa. Dra. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal - FMVZ- UNESP, Botucatu/SP

Prof. Dr. Felipe Rydygier de Ruediger

Membro

Departamento de Reprodução Animal – UNOESTE- Universidade do Oeste Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias, Presidente Prudente/SP

Profa. Dra. Priscilla Nascimento Guasti

Membro

Departamento de Reprodução Animal - FAEF- Faculdade de Garça, Garça/SP

Data da defesa: 20 de Agosto de 2020

“E o poder de Deus na minha fraqueza, se aperfeiçoou.”

Dedico!

A **Deus**, por ter me dado a honra e glória de ter os melhores pais, irmão, família, amigos e mestres. Obrigada Senhor, por estas vidas.
Gratidão!

AGRADECIMENTOS

“Ainda bem que Deus não me dá tudo que eu quero, porque nem tudo que eu quero, eu preciso, nem tudo que eu preciso, eu mereço. Até a porta que Deus fecha, é livramento. Ainda bem, que Deus, me conhece bem mais, do que eu mesmo, me conheço.”

O primeiro e mais importante agradecimento, é para Deus. Obrigada, Senhor. Obrigada, por tudo que me deste, por ter me feito chegar até aqui, nestas linhas. Obrigada, pelas grandes amizades proporcionadas, por todo aprendizado adquirido, pelos momentos especiais vivido e pelas lágrimas derramadas. Foram tantas adversidades enfrentadas, mas posso dizer que venci, e sou extremamente GRATA a ti, por tudo. Obrigada!

Aos meus pais Valdo Ferreira e Elaine Renata. Mãe, Pai, quantas coisas passamos para que eu pudesse chegar até aqui, e vocês sabem mais do que ninguém, por isso, só tenho as agradecer pela vida de vocês. Saibam que vocês sempre serão minha origem, meu alicerce, minhas estruturas, enfim, a base de tudo, obrigada. Obrigada por dedicarem amor incondicional a mim, amor sem fim é o que tenho por vocês.

Ao meu irmão Valter Junior, pela amizade, cumplicidade, amor, e por nunca medir esforços quando o assunto é fazer algo que me faça feliz, você é a minha vida, uma das grandes razões que me motiva a crescer cada dia mais, eu simplesmente te amo, incondicionalmente.

Aos meus avós, Regina e José Raimundo (meu Cheiro Bom), tio Beto, tia Ana, tia Hélia, por estarem sempre ao meu lado, e principalmente por orarem por mim incessantemente a todo instante, amo vocês. Vó Auxiliadora e Vô José Salviano, obrigada, por todo amor.

À minha orientadora Dra. Fabiana Ferreira de Souza, que para mim, será sempre a Fáf. Obrigada, pelos ensinamentos, confiança, incentivo, por não medir esforços em minha orientação, pelas oportunidades oferecidas, apoio em todos os momentos. É e sempre será uma grande honra e satisfação, saber que me orientou. Você me inspira como pesquisadora, obrigada por tudo.

Ao Paulo Yamada, pois foi ele quem me apresentou a Fabiana como pesquisadora. Toda insistência para que eu fizesse o doutorado em Botucatu deu certo, pois aqui estou, obrigada. Obrigada, pelos momentos compartilhados, que foram muitos e dos mais diversos. Obrigada, por ter feito parte dessa história, aqui, conheci pessoas incríveis, fiz grandes amizades e tenho vivido momentos únicos, que de certa forma devo a você. Obrigada, de todo meu coração.

Às minhas amigas irmãs, companheiras para todas as horas Dayrine Candido, Aline Compagnoni, Nanci Compagnon, Claudia Oka e Driely Candido, obrigada pela amizade, força, por estarem sempre ao meu lado nas horas boas e ruins, vocês são parte de mim, uma porção essencial que eu jamais saberei viver sem, amo vocês.

Aos grandes tesouros que ganhei, amigos: Viviane Codognoto, Fernando Evaristo, Andressa Filaz, Marcos Gomides, Thaís Cavaleiro e Laiza Camargo, se eu fosse descrever todo o amor, carinho e gratidão que tenho por vocês não caberiam em linhas e lágrimas, e sim somente, em orações. Deixo meu amor abaixo.

“Pra fazer a vida ter outro sentido, é preciso procurar, encontrar e conquistar, um grande Amigo. Para você confiar, sem tem medo de errar. Um sorriso pra fortalecer, se a tua mão enfraquecer, um amigo vem te socorrer. Os amigos são presentes,

conquistados lentamente, sentimento forte que não se entende. Faz doido o coração, sincero amor e de emoção, ter amigo é ter riqueza e ser, tesouro em nossos corações. Um amigo se conquista, e se guarda para sempre, um tesouro pra durar, eternamente. Raridade é feliz, quem à um amigo conquistar. Ter amigo é ter riqueza, tesouro em nossos corações.” Amo vocês, e os levarei guardados em meu coração onde quer que esteja. Contem sempre comigo.

Viviana Vallejo e Pablo Ocampo, obrigada por todo carinho e companheirismo de sempre. Você estarão para sempre em meu coração.

A Cristiane Paranzini. Kite, você teve um papel muito importante na minha vida em Botucatu, aprendi muito com você sobre a reprodução das perdizes e isso não vou esquecer nunca. Você fez parte de muitos dos bons momentos que vive durante o doutorado, tenha certeza disso. E saiba que todas as discussões que tivemos foi para o crescimento de ambas, porque nenhuma de nós somos fáceis. Torço muito pela sua felicidade pessoal e profissional. Obrigada.

A professora Eunice Oba, por todo carinho, cuidado e atenção que sempre teve comigo. Aprendi e vivi tantas coisas com a senhora, sou extremamente Grata a Deus, por tudo e principalmente por sua vida. Obrigada, por sempre deixar as portas dos seus laboratórios abertas pra mim, por sempre me tratar como uma “orientada”. Que a senhora tenha saúde e força em abundância, pois o resto a senhora sempre correrá atrás.

Aos irmãos da minha igreja que sempre oraram e torceram por mim, estando sempre presentes em minha vida e coração.

Aos colegas do nosso laboratório Repas (Carol Scott, Otávio de Paula, Michelle Araújo e Guta Pagnano). Obrigada por toda ajuda, aprendi muito com cada um com vocês. Obrigada, pelo convívio enriquecedor que tivemos.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Reprodução Animal, em especial ao professor José Antonio Dell’Aqua Junior pela atenção que sempre me deste em relação ao meu experimento, propondo ideias enriquecedoras. Ao professor Frederico Papa e Camila Freitas-Dell’Aqua, que muitas vezes me ajudaram a resolver problemas com poucas palavras. Obrigada.

Ao nosso grupo de pesquisa com as perdizes, os professores Josineudson Augusto e Nabor Veiga, aos colegas discentes Luiz Eduardo Correia, Édina Aguiar, Estevam Rodrigues, Eduardo Martins e Mariana Leal. Meu muito obrigada a todos vocês, obrigada, por participarem junto comigo desta oportunidade de aprendizado.

Ao Moisés, nosso Nico. Nico, obrigada por todo cuidado, atenção e zelo para com as aves e comigo. Obrigada, pelos risos no desespero, por fazer parte deste sonho, por ser meus olhos e ouvidos, nos momentos em que eu não estava com aves. Você é parte fundamental deste projeto, e principalmente do setor das perdizes. Todo obrigada é pouco.

A professora Dra. Ibiara C. L. Almeida Paz, por toda a atenção e confiança em meus estágios de docência na disciplina de avicultura, foi um prazer fazer parte das suas aulas, aprendi muito com você, e levo com inspiração seus ensinamentos e didática em sala. Obrigada, pelo prazer de conhecer e conviver com a Elisane Milbradt e Gustavo Chaves, Caio dos Ouros, por podermos trabalhar juntos novamente. Obrigada.

Aos colegas do curso de mestrado e doutorado do Departamento de Reprodução Animal, por terem feito parte desta jornada, todos caminhando em busca do mesmo objetivo, a pesquisa.

A Botupharma® pela doação do suplemento fornecido as aves, durante todo o experimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Brasil), pela bolsa concedida no início do doutorado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2017/14557-8), pela bolsa concedida.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, (LNBio), do CNPEM, Campinas, Brasil, pelo suporte na técnica de espectrometria de massas.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	i
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Perdiz (<i>Rhynchotus rufescens</i>)	2
2.2. Período reprodutivo e acasalamento	3
2.3. Fisiologia do sistema reprodutivo masculino de aves	5
2.4. Espermatogênese e características dos espermatozoides das aves	7
2.5. Sazonalidade e fotoperíodo nas aves	11
2.6. Proteoma das células espermáticas e do plasma seminal das aves	18
3. REFERÊNCIAS	21
4. HIPÓTESE	344
5. OBJETIVOS	344
CAPÍTULO 2	355
ARTIGO 1	366
RESUMO	37
1. Introdução	37
2. Materiais e métodos	39
2.1. Aspectos éticos	39
2.2. Design experimental	39
2.3. Instalações, aves e dieta	39
2.4. Colheita e avaliação do sêmen	40
2.5. Análise estatística	42
3. Resultados	42
4. Discussão	43
5. Conclusão	45
7. Referências	45
CAPÍTULO 3	49
ARTIGO 2	50
RESUMO	51
1. Introdução	52
2. Material e métodos	53
2.1. Aspectos éticos	53
2.2. Aves e manejo	54
2.3. Design experimental	54
2.4. Colheita do sêmen	54
2.5. Análise proteômica	55
2.6. Análise estatística	57
2.7. Bioinformática	58
3. Resultados	58
4. Discussão	62
4.1. Espermatozoides	63
4.2. Plasma seminal	65
Conclusão	66
5. Agradecimentos	66
6. Referências	66

RESUMO

SILVA, K.M. EFEITO DO CONTROLE DE LUZ SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS E PROTEÔMICA DO SÊMEN DE PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*). Botucatu - SP. 2020, p.89. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O estudo teve como objetivo avaliar as características seminais e o comprimento da estação reprodutiva de perdizes (*Rhynchotus rufescens*), criadas com luz natural ou artificial, a fim de melhorar a eficiência reprodutiva visando à criação comercial (estudo I). Foi também objetivo descrever a proteômica dos espermatozoides e plasma seminal de perdizes (estudo II). No estudo I, durante a estação reprodutiva (setembro 2017 a março 2018), foram selecionados 20 de 60 machos, quanto à facilidade para a colheita do sêmen e à produção espermática. Os machos selecionados foram divididos em 2 grupos, grupo controle (luz natural, n = 10) e grupo tratado (16 h de luz e 8 h de escuridão, n = 10). O sêmen foi colhido 2 vezes/semana e analisado quanto ao volume, motilidade subjetiva, vigor, coloração, grau de contaminação, concentração espermática e defeitos morfológicos. O estudo II foi conduzido similarmente ao estudo I. O sêmen foi colhido de 28 machos, divididos em 2 grupos (luz natural e luz artificial). Após as colheitas, as amostras foram agrupadas em pools de cada grupo e centrifugadas para a separação do plasma seminal (sobrenadante) e espermatozoides (pellet). As amostras foram preparadas para proteômica com digestão trípica e submetidas a espectrometria de massas (ESI-Q-TOF MS/MS). No estudo I, a obtenção e facilidade na colheita do sêmen foi maior nas aves mantidas com luz artificial (43 versus 11 amostras de sêmen dos grupos luz artificial e natural, respectivamente). Os parâmetros avaliados no sêmen, também foram superiores ($P < 0,001$) nas aves mantidas sob luz artificial. No estudo II, foram encontradas 28 proteínas no plasma seminal e 58 no extrato proteico dos espermatozoides. A *keratin* e isoformas e as *catalytic activity* e *binding* foi a proteína e funções moleculares mais frequentes, respectivamente, nas amostras e grupos. No extrato proteico dos espermatozoides, as proteínas *alpha-enolase*, *serum albumin*, *keratin, type II cytoskeletal cochlear (fragment)* e *ferritin (fragment)* foram encontradas em maior abundância nas aves mantidas com luz natural. Já as proteínas *olfactory receptor (fragment)*, *tail-anchored protein insertion receptor WRB (fragment)*, *keratin, type II cytoskeletal 73 (fragment)* e *keratin, type II cytoskeletal 75 (fragment)* foram mais abundantes nas aves com luz artificial. As proteínas identificadas no plasma seminal foram *keratin, type II cytoskeletal 75 frag.*, *keratin, type I cytoskeletal 15*, *keratin, type I cytoskeletal 17*, *keratin, type II cytoskeletal 73*, *keratin, type II cytoskeletal 75*, *keratin, type II cytoskeletal cochlear*, *tubulin beta chain (Fragment)*, *glutathione S-transferase Mu 5*. Nós concluímos que o programa de luz artificial pode prolongar a estação reprodutiva e aumentar a qualidade espermática de perdizes, sendo indicado para a produção comercial. Além disso, as principais proteínas das células espermáticas e plasma seminal de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) foram descritas pela primeira vez, as quais foram similares as encontradas em outras espécies.

Palavras-Chave: Espermatozoide; Luminosidade; Proteína; Tinamiforme.

ABSTRACT

SILVA, K.M. **EFFECT OF LIGHT CONTROL ON SPERM CHARACTERISTICS AND SEMEN PROTEOMIC OF RED-WINGED TINAMOU (*Rhynchotus rufescens*)**. Botucatu - SP. 2020, p.89. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The study aimed to evaluate the seminal characteristics and reproductive breeding length of the red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*), breed with natural and artificial light, in order to improve reproductive efficiency to commercial breeding (study I). Also, it was aim to describe the sperm and seminal plasma proteomic of tinamou (estudy II). In the suty I, during breeding season (Setember 2017 to March 2018), 20 males were select from 60 males, regarding the ease of semen collection and sperm production. The selected males were divided into 2 groups, control group (natural light, n = 10) and treated group (16 h light and 8 h darkness, n = 10). Semen was collected two time/week and analyzed for volume, subjective motility, vigor, color, contamination degree, sperm concentration and the morphological defects. The study II was similarly conducted to study I. The semen was collected from 28 males, divided in 2 groups (artificial and natural light). After the collections, the samples was grouped in pools of the each groups and centrifuged to separate seminal plasma (supernatant) and spermatozoa (pellet). The samples were prepared to proteomic with triptic digestion and submitted to mass spectrometry. In the study I, there was higher samples number and easiness to collect the sample during in the birds maintained to the artificial light (43 *versus* 11 from artificial and natural light groups, respectively). The parameters evaluated in semen were also higher ($P < 0.001$) in birds kept under artificial light. In the study II, 28 proteins were found in the seminal plasma and 58 in the protein extract of the spermatozoa. *Keratin* and isoforms and *catalytic activity* and *binding* were the most frequent proteins and molecular functions, respectively, in samples and groups. In the protein extract of sperm, the proteins *alpha-enolase*, *serum albumin*, *keratin*, *type II cytoskeletal cochleal (fragment)* and *ferritin (fragment)* were found in greater abundance in birds kept under natural light. The *olfactory receptor proteins (fragment)*, *tail-anchored protein insertion receptor WRB (fragment)*, *keratin, type II cytoskeletal 73 (fragment)* and *keratin, type II cytoskeletal 75 (fragment)* were more abundant in birds with artificial light. The main proteins identified in the seminal plasma were *keratin, type II cytoskeletal 75 frag.*, *Keratin, type I cytoskeletal 15*, *keratin, type I cytoskeletal 17*, *keratin, type II cytoskeletal 73*, *keratin, type II cytoskeletal 75*, *keratin, type II cytoskeletal cochleal*, *tubulin beta chain (Fragment)*, *glutathione S-transferase Mu 5*. In conclusion, the artificial light program can prolong the reproductive season and increase the sperm quality of red-winged tinamou, being indicated for commercial production. Moreover, the main proteins of sperm cells and seminal plasma of red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*) were described for first time and were found similar proteins to other species.

Keywords: Lightness; Protein; Spermatozoa; Tinamiform.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

No Brasil, a criação de aves para produção de alimento cresceu nas últimas três décadas, e o país ocupa o 1º e 2º lugar em exportação e produção mundial, respectivamente (ABPA, 2019). Essa evolução da avicultura tem ocorrido em vista das mudanças nos índices zootécnicos, tanto para postura quanto para corte, que tiveram como base o melhoramento genético, a nutrição e a sanidade. Apesar dos avanços na produção de aves, consumidores têm exigido a produção de outras fontes de proteína animal, especialmente de animais de caça. Em algumas regiões do mundo, a carne de caça é considerada uma iguaria de alto valor para o consumo humano (MORO, 1996). Neste sentido, a utilização de aves silvestres para fins comerciais tornou-se uma alternativa para obtenção de carne e ovos, além de proporcionar fonte de material genético e incentivar a conservação das espécies (MORO et al., 2006).

A perdiz (*Rhynchotus rufescens*) é considerada uma das opções para produção de proteína com elevado potencial para exploração zootécnica, já que tem características importantes que o mercado valoriza, como um peito grande (MORO et al., 2006) e também é bem aceita pelos consumidores (COSTA, 2005). Considerando o progresso e o desenvolvimento do setor, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) na portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998, Art. 1º aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves, estando o gênero *Perdix*, na qual a perdiz aparece dentre as aves liberadas e consideradas aves domésticas de criação.

Contudo, para o desenvolvimento da criação comercial desta espécie é necessário conhecer a fisiologia da reprodução da perdiz e fatores que podem influenciar a criação comercial. Um dos fatores envolvidos na criação das aves domésticas é o fornecimento de luz diária artificial para a adequada produção (ARAÚJO et al., 2011). A perdiz é uma espécie influenciada pela sazonalidade e a quantidade de luz pode ter efeito direto sobre a sua reprodução (CAVALCANTE, 2006) e o fornecimento de luz artificial já foi descrito, contudo não contribuiu para a uniformidade da produção de ovos (BRUNELI, 2006).

Em vista disso e da ausência de estudos que comprovem a hipótese da influência da quantidade de luz sobre a reprodução das perdizes, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da quantidade de luz diária sobre o início da estação reprodutiva e sobre as características espermáticas da espécie, incluindo uma abordagem proteômica das células espermáticas e do plasma seminal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Perdiz (*Rhynchotus rufescens*)

A perdiz (*Rhynchotus rufescens*) é popularmente conhecida no Brasil como Perdigão (sul) e/ou Inhambupé (norte). A espécie pertence à família Tinamidae, reino Animalia, filo Chordata, classe das Aves, ordem Tinamiformes, gênero *Rhynchotus* e espécie *Rhynchotus rufescens*, consideradas não-passeriformes. Habitam desde a região norte da Bolívia ao leste do Brasil, do sul ao leste do Paraguai e nordeste da Argentina e Uruguai e não é considerada uma ave ameaçada ou em risco de extinção (IBC, 2016).

A espécie é tida como maior tinamídeo campestre do Brasil, medindo entre 38 e 42 centímetros de comprimento. O macho pesa entre 700 e 900 g, sendo menor em comprimento e peso em relação às fêmeas, que pesam entre 815 e 1.040 g. Devido sua aparência galinácea e terrícola, é uma ave apreciada por seu valor cinegético. As aves são de cor castanho-claro, salpicado de preto e branco (Figura 1), apresentando um forte mimetismo, o que lhe dá condições de proteção contra predadores (CARNIO; MORO; GIANNONI, 1999). Possui bico forte, o qual é utilizado para escavar raízes. Emite um piado alto, plangente, repetidos com intervalos de 16 a 20 segundos quando estão vivaz ou na estação reprodutiva, apresentando maior atividade e movimentação nas horas quentes do dia. São aves com comportamento arredio, que na presença de possíveis predadores se camuflam ou fingem de mortas (SICK, 1997).

As perdizes não possuem voo aprimorado, em vista da musculatura pouco desenvolvida e baixa irrigação arterial das asas, a qual impossibilita esforços prolongados. Habitam regiões campestres, cerrados, campos sujos e ambientes úmidos, alimentando-se de sementes, raízes, frutos e invertebrados (SICK, 1997).

As vantagens da criação e produção das perdizes indicam que o rendimento de carcaça e as características físico-químicas da carne são semelhantes às do frango, contudo sua carne tem um pH mais elevado, com maior concentração de proteínas, menor quantidade de calorias e colesterol (QUEIROZ et al., 2013). O rendimento de carcaça e as estas características a torna viável para a produção de carnes especiais (MORO et al., 2006).



Figura 1. Perdiz (*Rhynchotus rufescens*). A. Bico forte e longo (seta). B. Penas de cor castanho claro, salpicado de preto e branco (seta). (Acervo pessoal)

2.2. Período reprodutivo e acasalamento

O período reprodutivo das perdizes ocorre entre agosto a março, período marcado pela vocalização intensa dos machos, sendo um piado característico e que demarca o início da estação reprodutiva (MENEGHETI, 1981).

As aves nascem com peso médio de $38,6 \pm 4,22$ g, tendo as fêmeas mais vantagens no ganho de peso. Ainda, há uma correlação ($r = 0,61$, $P < 0,01$) entre o peso do ovo e o peso ao nascimento (CARNIO; MORO; GIANNONI, 1999) o que pode ser uma característica zootécnica para seleção de aves mais pesadas. Além disso, a maturidade sexual tem relação direta com o peso da ave, quanto mais rápido a ave atinge o peso de um adulto, mais rápido desenvolverá a maturidade sexual, com média de 302 dias (MORO; JOJI; MALHEIROS, 2002).

Os tanamídeos possuem capacidade de mudar seu sistema de acasalamento de acordo com a idade, no qual um macho quando juvenil pode ser classificado como monogâmico e, posteriormente, se torna poligâmico (SICK, 1997) e poliândrico quando adulto (DEL HOYO; ELLIOT; SARGATAL, 1992). Assim, esses três sistemas de acasalamento (monogâmico, poligâmico e poliândrico) devem ser considerados para

esta espécie (DEL HOYO; ELLIOT; SARGATAL, 1992), apesar de predominar o sistema poliândrico (MENEGETTI, 1988).

No sistema poliândrico as fêmeas acasalam com dois ou mais machos e os abandona a seguir. *In situ*, a partir do acasalamento, os machos assumem todas as responsabilidades maternas, cuidando dos ovos e filhotes (Figura 2; DEL HOYO; ELLIOT; SARGATAL, 1992). *Ex situ*, as perdizes mantem o sistema de acasalamento poliândrico, porém, logo após a ovipostura das fêmeas, os ovos são retirados e incubados artificialmente durante 21 dias (CORREIA, 2017).

Umas das características positivas da poliândria *in situ* é que, quando as fêmeas se isentam dos cuidados com a prole, o tempo entre duas posturas sucessivas é reduzido, fazendo com que a fêmea recupere rapidamente a energia gasta durante o período reprodutivo (MENEGETTI; MARQUES, 1981). Ademais, a elevada fecundidade está diretamente relacionada com a vida terrícola da espécie, gerando maior eficiência reprodutiva, sendo comprovado pelo grande volume de aves em áreas virgens (SICK, 1997).



Figura 2. Perdiz macho demonstrando os cuidados parentais. (Acervo pessoal).

As características comportamentais são importantes para selecionar fêmeas e machos para o sistema de criação, já que dominância e submissão estão relacionadas com os períodos de movimentação e descanso das aves e também com a manutenção da viabilidade dos ovos (STEIN et al., 2005; CROMBERG et al., 2007). Mesmo com hábitos solitários fora do período reprodutivo, é possível encontrar tinamídeos que formam casais apenas por bem-estar, não sendo evidenciada corte. Quando em fase

reprodutiva, começa o estabelecimento de limites territoriais durante os acasalamentos, corte nupcial e cópula (MENEGETTI, 1984).

Geralmente, as perdizes fazem duas ou três oviposturas consecutivas e o casal cessam os acasalamentos entrando na fase de choco, contudo não é evidente a separação entre as atividades reprodutivas e do choco nesta espécie. O choco corresponde ao comportamento de incubação dos ovos, que tem duração entre 19 a 21 dias. *In situ*, após esse período ocorre a eclosão dos ovos, e os perdigotos (filhotes) abandonam o ninho na guarda do pai (SICK, 1988).

2.3. Fisiologia do sistema reprodutivo masculino das aves

Nas aves, os testículos estão localizados na região dorsal-medial do abdômen, ventral aos rins e às glândulas adrenais. Os epidídimos estão localizados imediatamente dorsal aos testículos, porém voltados para a região medial, possuem vesículas na porção terminal, local de armazenamento de espermatozoides (KRAWCZYK; JAWORSKA-ADAMU, 2019). Diferente dos mamíferos, os epidídimos são pequenos e não são divididos em regiões, apresentam um apêndice que se estende até a borda ventral da glândula adrenal com muitos ductos aberrantes (com fundo de “saco cego”, Figura 3) (OROSZ, 2012). Os ductos deferentes emergem do epidídimo e formam um emaranhado de ductos na região caudal, denominado de *glomus* seminal, cujo ducto desemboca no urodeo. As aves não possuem glândulas sexuais acessórias (KRAWCZYK; JAWORSKA-ADAMU, 2019) e por isso o plasma seminal é formado pelos fluídos produzidos pelos testículos, epidídimos e ductos deferentes (BLESBOIS, 2012; BAKST; DYMO, 2013; SASANAMI et al., 2015). Além disso, o fluído linfático (FUJIHARA, 1992) de origem dos corpos vasculares paracloacais podem contribuir para o volume do sêmen (WISHART, 2009). Estes órgãos acessórios são responsáveis pelo tecido linfático tumescente que acompanha a excitação sexual. A ejaculação ocorre quando os músculos lisos presentes na parede de cada *glomus* seminal se contraem, acompanhando a eversão do falo (FUJIHARA, 1992; KING; MCLELLAND, 1981).

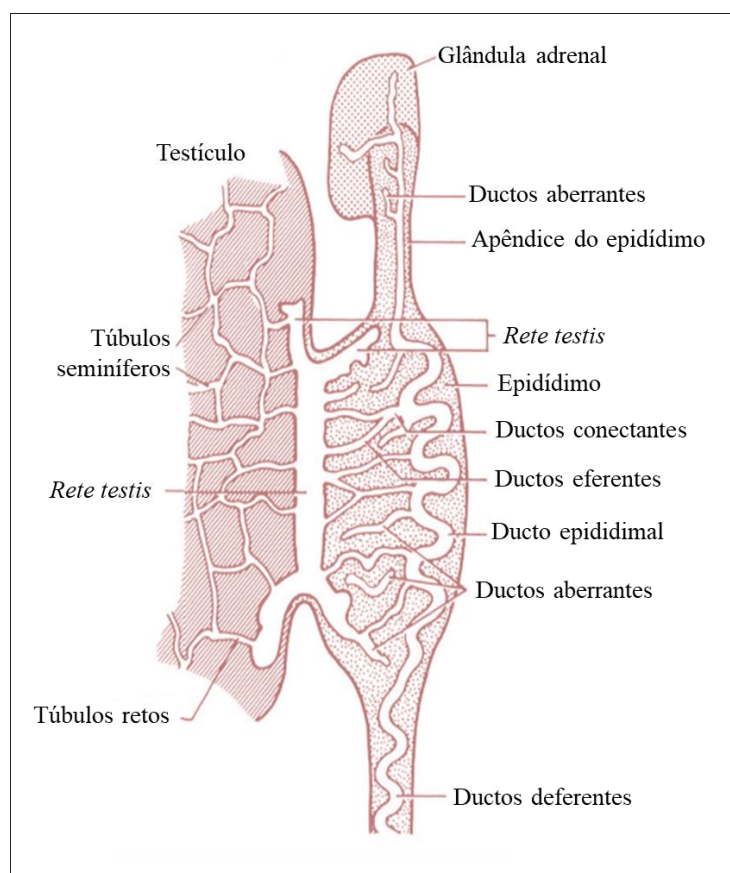


Figura 3. Estrutura do epidídimo das aves (Adaptado de King e McClelland, 1984).

Falo, é o nome dado ao órgão copulador da perdiz, cuja característica, observada durante a cópula, é ser espiralado quando evertido (SICK, 1997). Com localização no proctodeo, é dividido em duas porções, a primeira cilíndrica eversível e a segunda fixa. A ereção acontece por ingurgitamento linfático, podendo o falo atingir de 3 a 4 cm de comprimento por 8 mm de diâmetro (Figura 4; BARALDI-ARTONI et al., 2001). No momento da ereção, sua base ocupa quase toda a abertura cloacal (ARTONI, 2001).

Apesar do falo ser um órgão de tamanho considerável, o dimorfismo sexual das aves não é aparente (Figura 5; MORO, 1991), haja vista, que a exposição do falo acontece somente durante a cópula. Em aves mantidas em cativeiro, são utilizadas várias técnicas na determinação do sexo como, análises fecais, sanguíneas e endoscopia (SICK, 1997). A reversão da cloaca, como auxílio do espéculo ou não, também é utilizada, observando-se a presença ou não do falo, possibilitando a identificação do sexo aos 7 dias de idade (MORO, 1991).



Figura 4. Aparelho copulatório (seta: falo) da perdiz (Acervo pessoal).

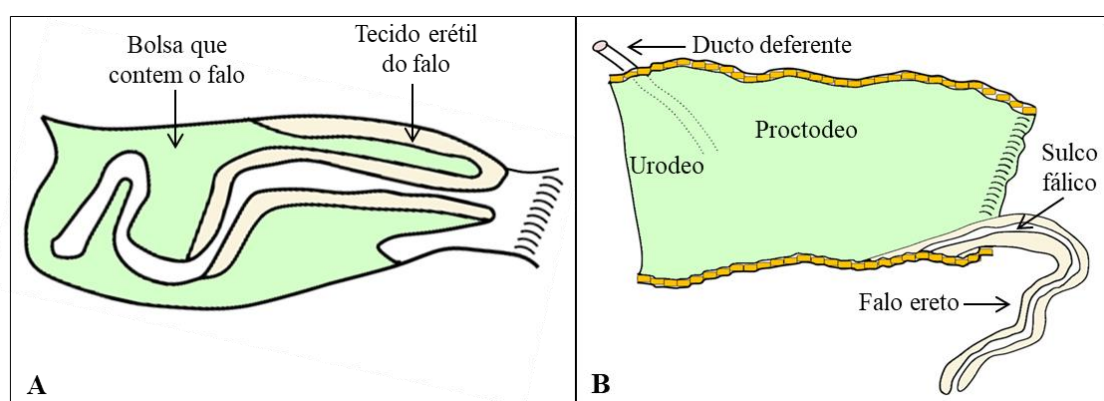


Figura 5. Corte longitudinal da região do falo retraído (A) e ereto (B) de uma ave.

2.4. Espermatogênese e características dos espermatozoides das aves

As aves têm pouca reserva espermática extra-gonadal e os espermatozoides são ejaculados logo após a produção nos testículos. O *glomus seminal* é um local extra-gonadal de armazenamento de espermatozoides, o qual é composto por um enovelamento do ducto deferente (ASANO; TAJIMA, 2017).

A espermatogênese nas aves apresenta particularidades. Este processo é 4 vezes mais rápido nas aves, e produz 4 vezes o número de espermatozoides/g testículo, o que está associado com trânsito mais rápido e meia-vida mais curta dos espermatozoides nos

ductos extragonadais. Similar a algumas espécies de mamíferos, a onda da espermatogênese segue um caminho em espiral ao longo e ao redor de um túbulo seminífero com estádios consecutivos do ciclo. Contudo, nas aves são observadas menos divisões mitóticas durante a proliferação de espermatogônias e a reposição das células-tronco nos túbulos seminíferos é considerada mais simples quando comparada com os mamíferos, contudo também há uma reserva de espermatogônias não-proliferativas como nos mamíferos. Toda esta adaptação é relacionada com a pressão da seleção, a competição entre os machos para fertilizar uma fêmea. Além disso, também está associada com o padrão ovulatório e sistemas de acasalamento (revisado por JONES; LIN, 1993).

Outro fator relevante a ser considerado é que a espermatogênese ocorre e é mais ativa nos períodos do dia com temperaturas mais baixas, como a noite, mesmo os testículos estando intracavitários (SAMOUR, 2002). Mais recentemente, estudo demonstrou que as aves possuem uma adaptação molecular para manter a espermatogênese. Padhi; Ghaly; Ma (2016) estudaram HSPA2, membro da família das HSP70. As HSPs são chaperonas envolvidas na resposta contra o choque térmico. Quando há insulto térmico, as chaperonas promovem o *folding* e *refolding* das proteínas, mantendo a integridade das macromoléculas e evitando a proteólise (MOSSER; MORIMOTO, 2004). A HSPA2 localiza-se na superfície da célula espermática e está envolvida na ligação entre os gametas em humanos (REDGROVE et al., 2012; NIXON et al., 2015). Há expressão diferenciada da HSPA2 nas células germinativas dos mamíferos e aves. Nos mamíferos há *down-regulation* da proteína (WANG et al., 2013; WANG et al., 2015) e nas aves *up-regulation* (KON; ENDOH, 2001; WIDLAK et al., 2007) em resposta ao estresse térmico. Ainda segundo Padhi et al. (2016) estas alterações evolutivas adaptativas estão relacionadas com alguns resíduos de aminoácidos no C-terminal da HSPA2 das aves, que induzem a diversificação funcional.

Apesar das adaptações, como nos mamíferos, a espermatogênese nas aves é composta pelas fases de proliferação mitótica de espermatogônias, divisão meiótica de espermatócitos primários em espermatídes redondas e diferenciação morfológica de espermatídes em espermatozoides (ASANO; TIJAMA, 2017). O início da espermatogênese ocorre após a proliferação da espermatogônia, que desencadeiam duas fases meióticas diferentes a serem divididas em espermatídes redondas com conjunto haplóide de cromossomos. Os espermatócitos são classificados em primário e

secundário. O espermátócito primário é uma célula pré-meiótica caracterizada por uma estrutura nuclear visível (ASANO; TIJAMA, 2017), e os secundários são produzidos pela primeira divisão meiótica e têm meia-vida relativamente curta em comparação aos primários (0,15 dias *versus* 3,86 dias) porque outra divisão meiótica ocorre imediatamente para produzir espermátides redondas (LIN; JONES; BLACKSHAW, 1990), o que é similar aos mamíferos (ASANO; TIJAMA, 2017).

Em seguida, espermátides haplóides e redondas sofrem transformações morfológicas para se tornarem espermatozoides, processo denominado de espermiogênese (ASANO; TIJAMA, 2017). As espermátides são classificadas em quatro fases de acordo com as modificações nucleares, (1) espermátides com núcleos redondos, (2) com núcleos irregulares, (3) com núcleos longos contendo grânulos de cromatina grosseiros e (4) com núcleos longos homogeneamente densos (GUNAWARDANA; SCOTT, 1977). A transformação ocorre quando as espermátides redondas se movem em direção ao compartimento adluminal dos túbulos seminíferos. O epitélio seminífero é estruturado por arranjos celulares estratificados, contendo espermátides em justaposição em várias etapas da espermiogênese (ASANO; TIJAMA, 2017).

Durante a fase de amadurecimento, as espermátides passam para a superfície luminal dos túbulos seminíferos, conduzidas por prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (ASANO; TIJAMA, 2017). Os espermatozoides liberados após a espermição, não apresentam gotículas citoplasmáticas na maioria das aves, exceto na ema (DU PLESSIS; SOLEY, 2014) e pato doméstico (SIMÕES; ORSI; ARTONI, 2012), e não ocorre maturação no epidídimo e nem sofrem capacitação (ETCHES, 1994). Entretanto, os espermatozoides sofrem reação do acrossomo logo após o contato com a membrana interna perivitelina do gameta feminino (LEMOINE et al., 2008).

A reação do acrossomo é similar à que acontece nos mamíferos, e envolve a ligação de oligossacarídeos com resíduos terminais de N-acetil-glucosamina na membrana perivitelina, os quais são indutores da reação do acrossomo (HORROCKS et al., 2000). A ZP1 (SASANAMI et al., 2007) e a ZPD (OKUMURA et al., 2004), proteínas constituintes da zona pelúcida são também considerada um indutor da reação do acrossomo nas aves. Durante a fertilização, os espermatozoides penetram na membrana perivitelina interna, uma camada fibrosa composta de glicoproteínas, principalmente ZP1 e ZP3, porém também apresentam, em menor quantidade, ZP2, ZP4 e ZPD (KINOSHITA et al., 2010; RODLER, 2011; RODLER; SINOWATZ, 2012;

ICHIKAWA et al., 2016). Estas proteínas são receptoras para ligação entre o gameta masculino e feminino (HORROCKS et al., 2000; (WISHART; HORROCKS, 2000; BAUSEK et al., 2004) e induzem a reação do acrossomo, a qual não é precedida pela capacitação nas aves (WISHART; HORROCKS, 2000; SASANAMI et al., 2011).

A produção espermática acompanha a estação reprodutiva nas fêmeas com início do processo de setembro a dezembro no hemisfério sul, correspondente a primavera (BARALDI-ARTONI et al., 2007). Os espermatozoides das perdizes são do tipo saurospídeo, semelhante aos dos répteis. As células são filiformes, de superfície lisa e alongadas, com núcleo cilíndrico, longo e reto, coberto, anteriormente, por um acrossomo cônico e cilíndrico (Figura 6; (VIEIRA; COLLI; BAO, 2004; GRIBBINS, 2011).

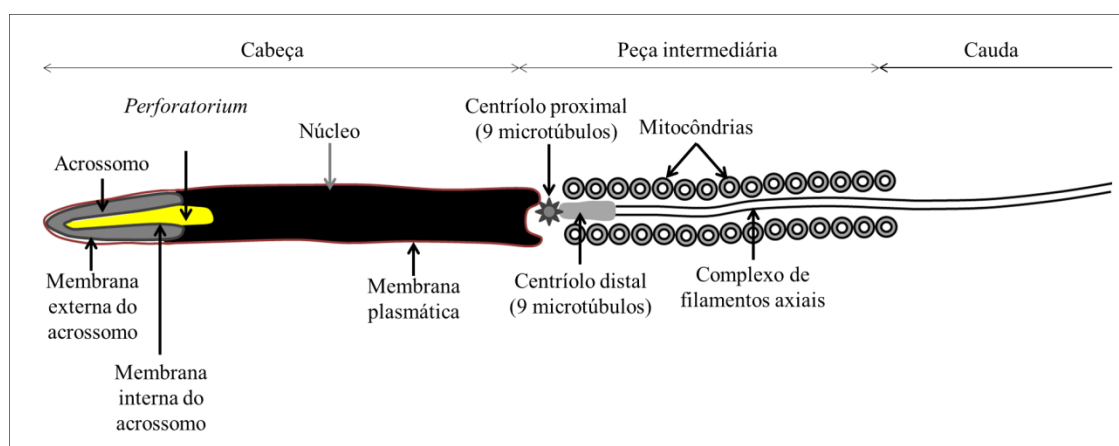


Figura 6. Composição da célula espermática de aves.

Com características diferenciadas, os espermatozoides das aves são células extremamente simplificadas (ASANO; TIJAMA, 2017) e são divididos em três compartimentos subcelulares, acrossoma, núcleo e flagelo. O acrossoma é uma vesícula secretora, posicionada próxima à membrana plasmática na porção proximal da cabeça do espermatozoide (AIRE, 2014). O flagelo é dividido em peça central, peça principal e final, sendo todas responsáveis em impulsionar o espermatozoide para o local da fertilização no oviduto (ASANO; TIJAMA, 2017).

Interessantemente os espermatozoides das aves são depositados na cloaca, independente da ovulação (BAKST; DYMOND, 2013), e migram em direção a vagina e útero. Na junção útero-vaginal, as células permanecem armazenadas em criptas formadas no epitélio da junção, denominados de túbulos primários de estocagem

espermática (BAKST; DYMOND, 2013; SASANAMI et al., 2013). Nos túbulos de armazenamento, os espermatozoides se acumulam e formam “ninhos” seminais (BIRKHEAD; MØLLER, 1992; BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA, 2001), locais que possuem condições para manter as células por longos períodos, como 2 a 3 semanas em galos domésticos (BIRKHEAD; MOLLER, 1992; BAKST; DYMOND, 2013; SASANAMI et al., 2013). Próximo da ovulação os espermatozoides adquirem motilidade e migram para o infundíbulo e permanecem novamente estocados em dobras do epitélio da mucosa, denominadas de túbulos secundários de estocagem espermática (WISHART; HORROCKS, 2000). Não há diferença no número de túbulos de armazenamento primário entre as fêmeas da mesma espécie, relacionados com a fertilidade, mas há diferenças entre as espécies, já que nos galos domésticos há em média 4.893 e nos perus 30.566 (BAKST et al., 2010).

O ejaculado das perdizes possui média de motilidade $70,65 \pm 1,93\%$, vigor $3,22 \pm 0,17$ e de viabilidade $67,17 \pm 6,32\%$ (ETCHES, 1994). A porcentagem de defeitos morfológicos das células espermáticas, durante o período reprodutivo, podem chegar a 65%, dentre estes, 80% são defeitos de cauda, 14% de peça intermediária e 6% de cabeça. Já na estação não reprodutiva, podem ser observados 70% de defeitos, 6% de cauda, 7% de peça intermediária e 87% de defeitos da cabeça (PARANZINI et al., 2018). Cavalcante (2006) verificou volume ($23,6 \pm 1,3 \mu\text{L}$), motilidade ($73,1 \pm 1,4\%$), vigor ($3,1 \pm 0,1$), pH ($8,0 \pm 0$) e concentração espermática ($5,3 \pm 0,7 \times 10^9$ espermatozoides/mL).

2.5. Sazonalidade e fotoperíodo nas aves

Algumas espécies animais possuem os testículos localizados na cavidade abdominal, incluindo as aves. Além disso, as aves são consideradas, dentre todos os vertebrados, as que possuem as maiores temperaturas corporais (HERIN; BOOTH; JOHNSON, 1960). Nos galos domésticos a temperatura testicular e corporal é em torno de 40 a 41° C (BEAUPRE et al., 1997). Na perdiz a variação de temperatura corporal é similar (média de 40,7° C, MARDER; BERNSTEIN, 1983), as aves domésticas, e a espécie se encontra neste grupo, cujos testículos são intracavitários (PARANZINI et al., 2017).

Em vista da localização intracavitária dos testículos nas aves, pesquisas focaram a determinação dos mecanismos de termorregulação testicular. Nas décadas passadas estudos sugeriram que os sacos aéreos eram responsáveis pela redução da temperatura

testicular (COWLES; NORDSTROM, 1946; ROMER; PARSONS, 1977; KARDONG, 1995) e que estes órgãos estavam recobertos por uma fina membrana proveniente dos sacos aéreos torácicos posteriores (PARKER; MCKENZIE; KEMPSTER, 1942). Porém, outro estudo indicou que a retirada cirúrgica dos sacos aéreos e insulação testicular não demonstraram diferenças significativas quando comparados ao controle (com sacos aéreos). Ademais, não foi observada diferenças na temperatura testicular, retal e dos sacos aéreos aferida nas aves do grupo controle, sem insulação (HERIN et al., 1960). Estes achados foram confirmados posteriormente por Menuam; Richards, (1975) que não encontraram diferenças significativas na temperatura corporal e dos sacos aéreos. Também foi levantada a hipótese que a produção espermática nas aves ocorria durante a noite, com temperatura ambiental inferior (RILEY, 1940; MACARTNEY, 1942), mas mesmo que a temperatura do ambiente possa variar, a temperatura corporal se mantém estável em aves mantidas com luz constante ou períodos de luz e escuridão controlados, mantendo o ciclo do epitélio seminífero de 28 dias (BEAUPRE et al., 1997).

As aves são consideradas fotoperíodo positivo e, em vista disso, o crescimento testicular e a produção hormonal nos testículos são estimulados pela intensidade de luz ao longo do dia, sendo que em períodos do ano de dias longos as aves possuem grandes testículos e em dias curtos é observada atrofia e inatividade testicular (Figura 7; WINGFIELD; FARNER, 1993).

Nas aves selvagens incluindo as perdizes, o período reprodutivo inicia-se na primavera, com aumento gradual do tamanho testicular e níveis hormonais, e permanecem elevados até o verão, com posterior diminuição gradativa (AKINS; BURNS, 2001). No período de descanso sexual ou em imaturos, as gônadas dos machos podem ser tão pequenas não podendo ser localizadas (SICK, 1997). E quando fora do período reprodutivo ocorre a degeneração, com quiescência da espermatogênese, alterando sua morfologia (Figura 8; BOTINO et al., 2003). Os ductos deferentes também sofrem alteração nesta fase, reduzindo em até 112% do seu volume quando comparados com a fase reprodutiva (MAHECHA et al., 2003).

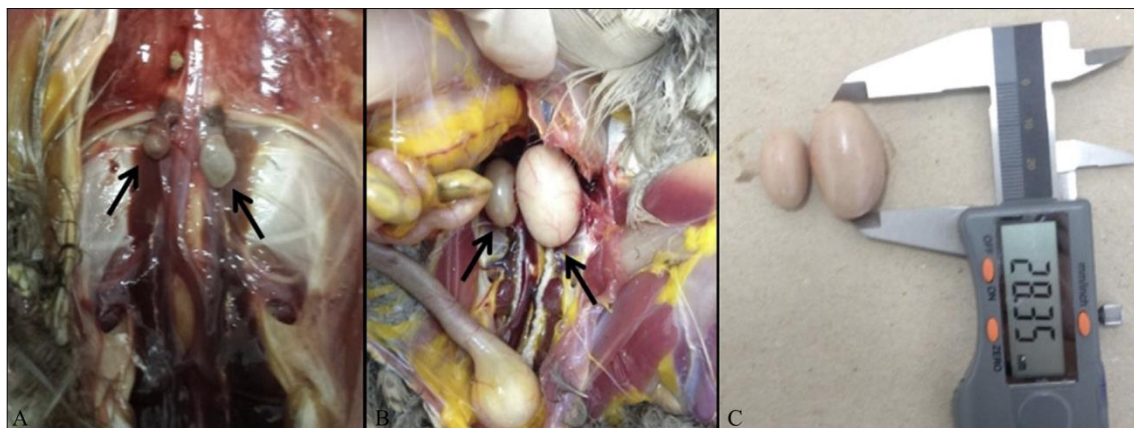


Figura 7. Variação do tamanho testicular de perdiz. A. Tamanho dos testículos (seta) fora da estação reprodutiva. B e C. Tamanho dos testículos na estação reprodutiva. (Fonte: PARANZINI et al., 2018).

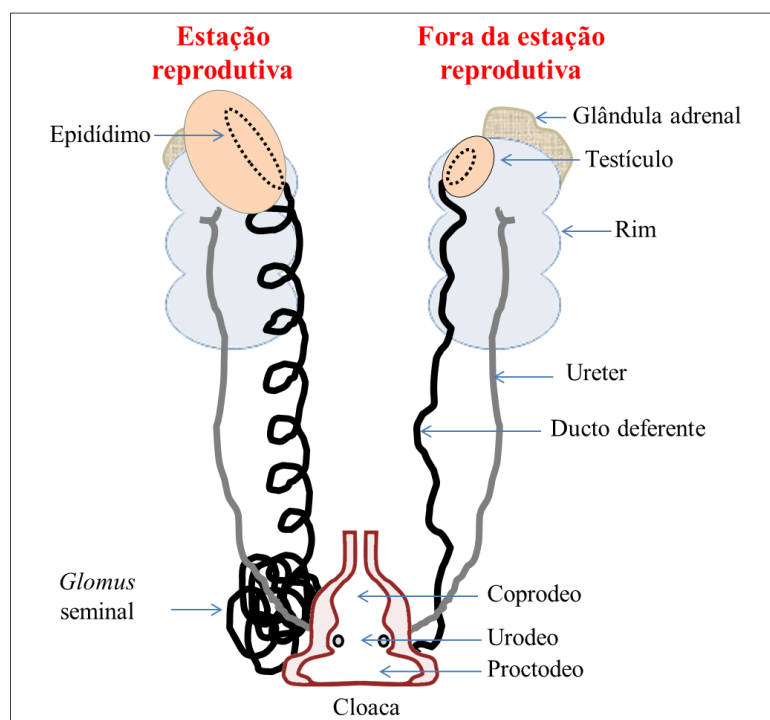


Figura 8. Características morfológica do aparelho reprodutiva do macho de perdiz de acordo com o fotoperíodo.

Além das variações no peso testicular, também ocorrem alterações na composição do tecido testicular. Estudo em periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) demonstrou que na estação não-reprodutiva há redução e fechamento do lúmen dos túbulos seminíferos. O epitélio germinativo apresentou poucas espermatogônias e foram observados escassos espermátócitos primários (~10%) em

divisão ativa. O tecido intersticial foi reduzido e pouco perceptível, com os núcleos das células de Leydig pálidos e com restrita vascularização. Já no início da estação reprodutiva, além do aumento do peso testicular, foram observados muitos túbulos seminíferos com lúmen aparente, interstício espesso, epitélio germinativo contendo muitas espermatogônias e espermatócitos primários em divisão ativa. Durante a estação reprodutiva, concomitante a maior produção de sêmen e maior peso testicular, o lúmen dos túbulos seminíferos estava totalmente aberto e o interstício comprimido pela expansão dos túbulos seminíferos. O epitélio germinativo apresentou ativa divisão celular e espermatozoides foram observados no lúmen dos túbulos seminíferos (SAMOUR, 2002).

A estação reprodutiva é marcada não somente pelas alterações nos testículos, mas também pelo desenvolvimento de características sexuais secundárias e maior agressividade nos machos de diferentes espécies (ASSENMACHER; JALLEGEAS, 1980; STOKKAN; SHARP, 1980; BLUHM et al., 1984).

Além da expressão de agressividade no comportamento, também são detectados sinais ambientais, como luz, temperatura, disponibilidade de água e comida, predadores etc. para iniciar a reprodução (Figura 9). A atividade reprodutiva também depende de interações sociais como som, visão, contato. Similarmente aos mamíferos, neurônios hipotalâmicos estimulam a liberação de neurohormônios, como o GnRH, que é liberado na eminência mediana. O GnRH estimula a secreção de hormônios da pituitária, as gonadotrofinas FSH e LH. Por sua vez, as gonadotrofinas estimulam a esteroidogênese e gametogênese. Os esteroides sexuais estimulam as características sexuais secundárias. O GnRH1, um neuropeptídeo hipotalâmico estimula a síntese e liberação de gonadotrofinas via seus receptores (GNRH-R), os quais são expressos nas células gonadotróficas na pituitária. O GnIH, um peptídeo *Rfamide* hipotalâmico (TSUTSUI et al., 2000), pode inibir a síntese e liberação de gonadotrofinas, atuando diretamente na pituitária ou inibindo a atividade do GnRH1 via seus receptores GnRH-R (UBUKA; BENTLEY; TSUTSUI, 2013). O estresse é um fator que pode aumentar a secreção do GnIH, inibindo a reprodução nas aves (CALISI; RIZZO; BENTLEY, 2008).

Para o início do ciclo reprodutivo deve ocorrer a percepção da luz por fotorreceptores presentes na retina, que encaminham os estímulos ao hipotálamo a receptores extra-retinianos, que convertem a energia dos fótons em impulsos neurais (DAWSON et al., 2001; AKINS; BURNS, 2001). Porém, em algumas espécies, na ausência dos olhos, os efeitos do fotoperíodo ainda são mantidos indicando que a

importância dos olhos/retina para a percepção da luz é variável entre as espécies (BENOIT; ASSENMACHER, 1966; MENAKER et al., 1970). Nas aves em que os olhos são essenciais para o início da estação reprodutiva, este órgão, além dos fotoreceptores, funcionam como “relógios” circadianos e produzem o ritmo circadiano da melatonina na glândula pineal (BINKLEY; REILLY; HRYSHCHYSHYN, 1980; HAMM; MENAKERT, 1980), que apresenta células fotosensoras (COLLIN; OKSCHE, 1981). A informação neural do fotoperíodo é mediada por uma proteína (Opsin 5) que encaminha a resposta neuroendócrina (NAKANE et al., 2010).

Os fotoreceptores nas aves são muito sensíveis e respondem mesmo a pequena quantidade de luz (AKINS; BURNS, 2001). No hipotálamo das aves, há muitos neurônios especializados para a síntese e secreção de peptídeos, incluindo os hormonais, hormônios estes que vão para corrente sanguínea e atuam em órgãos distantes ou para o sistema porta-hipofisário.

Assim como nos mamíferos, nas aves a produção do GnRH é estimulada quando o comprimento de luz do dia aumenta (AKINS; BURNS, 2001).

A melatonina, hormônio envolvido na regulação da reprodução em muitas espécies, é produzida pela glândula pineal, e é sintetizada a partir da serotonina por ação de duas enzimas, a N-acetiltransferase e hidroxindol-O-metil transferase, sua concentração é elevada durante a noite (UBUKA; BENTLEY; TSUTSUI, 2013). A melatonina estimula a secreção do GnIH nas aves, estabelecendo o ritmo diário da secreção de gonadotrofinas (UBUKA et al., 2013). Além disso, há uma relação entre a melatonina e a secreção do hormônio estimulante da tireoide (TSH) para estimular ou inibir a secreção de gonadotrofinas. A melatonina inibe a secreção de TSH o que impede a liberação de tiroxinas, e consequentemente, de GnRH1 (KAMEDA; MIURA; MARUYAMA, 2002; NAKAO et al., 2008), pelo menos no início da resposta ao fotoperíodo (UBUKA; BENTLEY; TSUTSUI, 2013).

Assim, os neurônios GnRH2 estimulam a atividade reprodutiva e, da mesma forma, o GnIH modula seus efeitos. Em aves domésticas, o GnRH1 é o principal neurohormônio que controla a secreção de gonadotrofinas (SHARP et al., 1990). Estes neurohormônios são também regulados por sinais internos (retroalimentação) como as secreções de testosterona, estradiol e progesterona. Além disso, a triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4) produzida no hipotálamo pela ação da iodotironina tipo 2 (DIO2), estimula a liberação de GnRH1 (DAWSON et al., 1985; UBUKA; BENTLEY; TSUTSUI, 2013).

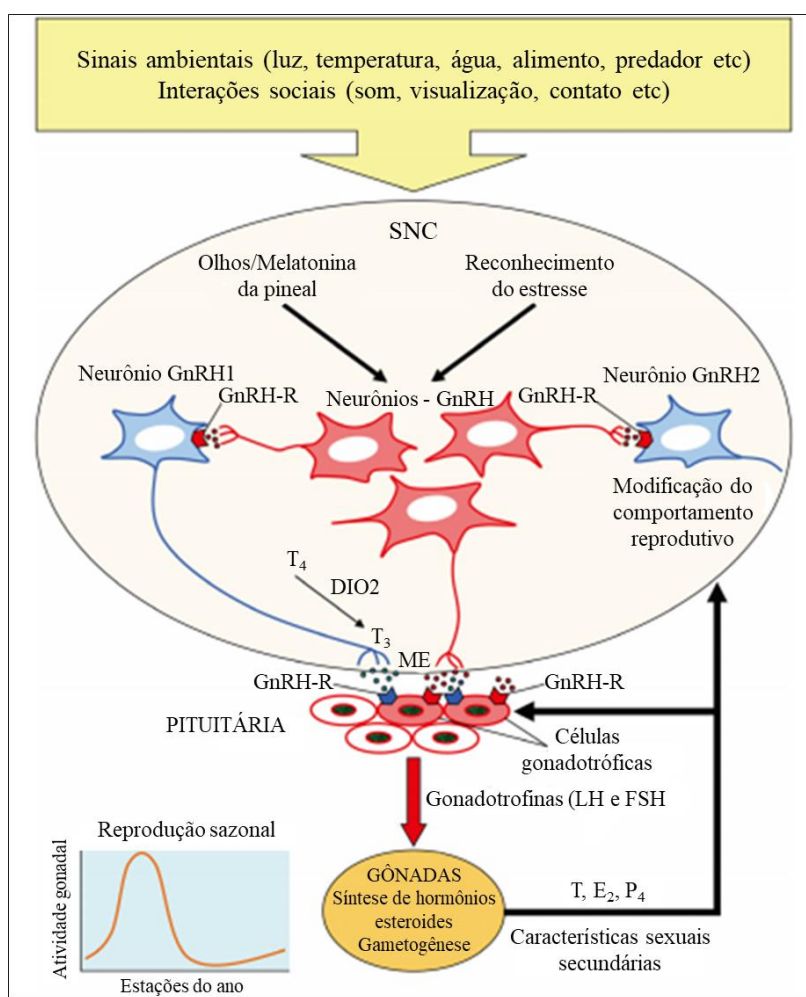


Figura 9. Modelo do controle hormonal da sazonalidade nas aves. Sistema nervoso central (SNC); Eminência mediana (ME); triiodotironina (T₃); tiroxina (T₄); iodotironina deiodinase tipo 2 (DIO2); hormônio luteinizante (LH); hormônio folículo estimulante (FSH); testosterona (T); estradiol (E₂); progesterona (P₄).

A localização do núcleo supraóptico do hipotálamo na ave não é precisa, mas acredita-se que o núcleo hipotalâmico medial, também conhecido como núcleo supraóptico medial, e núcleo retino-hipotalâmico lateral são, possivelmente, os homólogos do núcleo supraóptico do hipotálamo de mamíferos (SHIMIZU et al., 1994).

O ritmo circadiano é controlado por diferentes genes, denominados *clock* e *ritmic genes*. Genes homólogos aos de humanos que controlam o ritmo circadiano, foram clonados em codornas japonesas (qClock, qPer2 e qPer3). O qPer2 e qPer3 apresentaram oscilações circadianas nos olhos e na glândula pineal, embora o RNAm do qClock tenha sido expresso durante o dia. O RNAm de qPer2 foi induzido pela luz

artificial, enquanto o qClock ou qPer3 não se alteraram durante a indução (YOSHIMURA et al., 2000).

Em codornas que são aves de fotoperíodo positivo, quando transferidas de ambiente com curto para longo período de luminosidade apresentam níveis reduzidos de gonadotrofinas na primeira semana. Porém, o crescimento testicular e esteroidogênese atingem o máximo em 5 semanas (FOLLETT; ROBINSON, 1980). Contrariamente, níveis basais de esteroides são observados quando as aves são transferidas para ambientes com longo para curto período de luminosidade (GIBSON; FOLLETT; GLEDHILL, 1975). No estorninho comum (*Sturnus vulgaris*), um passeriforme nativo da Eurásia e introduzido na América do Norte, África do Sul, Austrália e Nova Zelândia, a redução gonadal, sob condições naturais ou experimentais, é concomitante a um pico de prolactina e também com a troca (“muda”) das penas (DAWSON, 2006).

Aves que vivem em locais de médias e altas latitudes, as alterações da quantidade de luz no dia, durante o ano, influencia sua reprodução (FOLLETT, 1984; (UBUKA; BENTLEY; TSUTSUI, 2013). Apesar disso, as perdizes demonstram características reprodutivas sazonais no hemisfério sul, onde não há demarcada variação na quantidade de luz diária durante as estações do ano.

Durante a exposição a fotoperíodos longos ocorre a fotorrefratariedade, momento em que a síntese de GnRH cessa, apesar da quantidade de luz (WINGFIELD; FARNER, 1993). Por este motivo as aves são consideradas fotorrefratárias por terem assimetria da estação reprodutiva e fotoperíodo (CRAMP; PERRINS, 1994), o que esta relacionado com a disponibilidade de alimento para manutenção da prole, muitas vezes altriciais, e para as mudas de penas (DAWSON; SHARP, 2007). Nessa fase de fotorrefratariedade a secreção de GnRH ainda pode ser alta, porque o fotoperíodo é longo, mas desde que a síntese cessou, nenhum GnRH é secretado e as gônadas regredem, provocando uma reversão para uma condição prépuberal. A síntese de GnRH é retomada durante o aumento crescente de luz no outono, no entanto, como a quantidade de luz ainda é baixa, há pouca secreção de GnRH e pouca maturação gonadal, o que só irá ocorrer durante a primavera seguinte (DAWSON et al., 2001).

Além da luz, a temperatura é outro fator importante para indução da reprodução em aves sazonais. Aves fotoperíodo positivo como as perdizes, quando submetidas em temperaturas baixas, reduzem a secreção de LH (WADA; HATANAKA, 1990; TSUYOSHI; WADA, 1992). Durante o processo evolutivo, os animais desenvolveram elevada temperatura corporal, contudo as células germinativas testiculares não

acompanharam este processo, e se tornaram sensíveis às elevadas temperaturas. Desta maneira, o organismo se adaptou com a aquisição de mecanismos termoregulatórios para manter os testículos com temperaturas mais baixas, como o escroto, assim como em algumas espécies, a espermatogênese intermitente, a qual ocorre durante os períodos do dia em que a temperatura é menor (HERIN; BOOTH; JOHNSON, 1960). Em vista disso, a temperatura testicular é vários graus abaixo da temperatura corporal, na maioria dos mamíferos (KASTELIC; COOK; COULTER, 1996) e temperaturas similares a corporal podem promover alteração na produção espermática a azoospermia (VOGLER et al., 1991).

Em Chapim-real (*Parus major*) um estudo identificou que a temperatura também é um fator influenciador da reprodução nas aves e temperaturas mais elevadas podem adiantar o período reprodutivo (VISSER; HOLLEMAN; CARO, 2009).

Apesar do fotoperíodo ser um dos principais fatores que contribuem para o aumento testicular, outras características podem influenciar o período reprodutivo das aves como a carga parasitária, a densidade da colônia, tamanho corporal e idade (BROWN; BROWN, 2003). *In situ*, a disponibilidade de alimentos também é um fator a ser considerado (UBUKA; BENTLEY; TSUTSUI, 2013). Embora nenhum destes fatores tenha sido descrito nas perdizes, podem ser considerados na seleção de reprodutores e no manejo da criação comercial.

2.6. Proteoma das células espermáticas e do plasma seminal das aves

As aves não apresentam glândulas sexuais acessórias, então as proteínas contidas no ejaculado são de origem espermática, fluído testicular ou do sistema de ductos (ETCHES, 1996). Além disso, o fluído linfático (FUJIHARA, 1992) de origem dos corpos vasculares paracloacais podem contribuir para o volume do sêmen (WISHART, 2009). Em aves e mamíferos o sêmen é um fluido complexo que inclui espermatozoides e plasma seminal (SLOWINSKA et al., 2011) e as diferenças podem afetar diretamente a capacidade de fertilização espermática. Desta forma, buscar entender a biologia do sêmen das aves e as consequências na fertilidade tem sido uma ferramenta de valor e estudos moleculares tem tentado buscar estas respostas (BLESBOIS, 2012).

O sêmen é composto por componentes orgânicos e inorgânicos, derivados das secreções dos órgãos reprodutores masculinos (MANN; LUTWAK-MANN, 1982; BLESBOIS; HERMIER, 1990). O plasma seminal de aves apresentam todos os componentes fundamentais para sobrevivência do espermatozoide como açúcares,

glicose, frutose, enzimas e eletrólitos, sendo todos essenciais para nutrição e metabolismo espermático (BUCKETT; LEWIS-JONES, 2002).

O líquido seminal das aves contém concentração de proteína 10 vezes menor que os mamíferos (2,0 - 2,4 g/dL) (HARRIS; SWEENEY, 1971; THURSTON et al., 1982) e as proteínas são as principais macromoléculas envolvidas na fertilização e na ligação entre os gametas. Raros estudos foram conduzidos a respeito da proteômica do sêmen de aves. Em galos utilizando a eletroforese bidimensional associada ao MALDI-TOF e 17 spots principais foram identificados. As proteínas *serum albumin*, *ovotransferrin*, *alpha-enolase*, *fatty acid binding protein*, *thioredoxin*, *trypsin inhibitor CITI-1* e *gallinacin-9* foram as proteínas mais intensas no gel e estão envolvidas na manutenção do meio para a sobrevivência das células espermáticas ou protegem os espermatozoides do estresse oxidativo ou contra microorganismos. A *ovotransferrin*, *gallinacin-9* e *trypsin inhibitor CITI-1* foram consideradas específicas para as aves (MARZONI et al., 2013). *Ovotransferrin* e *gallinacin-9* tem funções antimicrobianas e são encontradas no trato reprodutivo de machos e fêmeas (MICHAELIDIS; AVDI, 2010). Já a *alpha-enolase*, *creatin kinase B-type*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *phosphoglycerate mutase 1*, *triosephosphate isomerase* são proteínas envolvidas no metabolismo de energia, responsáveis pela motilidade espermática (FROMAN et al., 2011).

No galo banquiva (*Gallus gallus*), uma espécie selvagem, que deu origem ao galo doméstico, foram encontradas 1.141 proteínas no fluído seminal. Similarmente ao estudo em galos domésticos (MARZONI et al., 2013), as proteínas foram envolvidas com a imunidade, fatores antimicrobianos e, adicionalmente, com a fertilização. Ademais, a comparação do proteoma do fluído seminal de galos jovens e idosos, identificou proteínas relacionadas com a idade e a velocidade espermática. Galos idosos com velocidade espermática elevada apresentaram proteoma diferenciado. A comparação com galos domésticos ainda revelou diferenças qualitativas e quantitativas no proteoma seminal, o que foi relacionado com a domesticação. As proteínas elencadas em galos jovens e com alta velocidade espermática foram *serum albumin precursor*, *transferrin precursor*, *fatty acid-binding protein brain*, *pendrin isoform X2* e *gallinacin-10 preproprotein* (BORZIAK et al., 2016).

Semelhantemente, um estudo em *Thai native* galos (*Leung hang khao*) encontrou diferenças nas proteínas do plasma seminal de aves de diferentes idades. Contudo, a técnica utilizada foi eletroforese unidimensional e as proteínas não foram identificadas.

Apesar disso, encontraram proteínas com massas moleculares entre 90 e 140 kDa associadas com a viabilidade espermática e com a idade (INYAWILERT et al., 2019).

Outro estudo em galo banquiva (*Gallus gallus*) determinou influência de a acasalamentos sucessivos com alteração da composição proteica do fluido seminal nos acasalamentos e em machos dominantes ou subdominantes, com variação entre 1091 a 1305 proteínas entre os acasalamentos. Houve uma depleção de 43% das proteínas e aumento na abundância de 19% em acasalamentos sequenciais (ALVAREZ-FERNANDEZ et al., 2019).

Cheng et al. (2015) estudaram a abundância de proteínas nos espermatozoides de galos domésticos antes e após a congelação do sêmen por eletroforese bidimensional. Dentre 55 spots, 19 diminuíram após o tratamento, sendo as principais a *fructose-bisphosphatealdolase C*, *triosephosphate isomerase*, *aconitate hydratase*, *tubulin* e *outer dense-fiberprotein*, as quais foram associadas com o metabolismo de energia e estrutura do flagelo. A ontologia gênica das principais proteínas relacionadas com a função molecular foram aquelas envolvidas com o metabolismo celular, metabolismo de carboidratos, atividade oxi-redução e ligação de proteínas. Também em galos domésticos, porém usando abordagem *shotgun*, um estudo identificou 1.165 proteínas nos espermatozoides e plasma seminal. Aves com maior fertilidade apresentaram em maior abundância enzimas envolvidas no metabolismo de energia, cadeia respiratória e atividade de oxi-redução nos espermatozoides. Já no plasma seminal, machos com maior fertilidade apresentaram muitas proteínas em maior abundância, dentre as quais, *angiotensin-converting enzyme precursor*, *gallinacins*, *glutathione S-transferase* e *highly conserved regulatory 14-3-3 proteins* foram observadas (LABAS et al., 2015).

Diferenças nas proteínas do fluído seminal entre espécies similares como pardais domésticos (*Passer domesticus*) e pardais espanhóis (*Passer hispaniolensis*) foram determinadas, com diversificação das proteínas envolvidas na imunidade e maturação espermática (ROWE et al., 2019).

Além de marcador de fertilidade, a proteômica do plasma seminal tem identificado proteínas associadas com doenças relacionadas com a fertilidade. Em perus (*Meleagris gallopavo*) estudo foi conduzido para identificar proteínas relacionadas com a síndrome do sêmen amarelo, nas qual a cor branca do sêmen é alterada, com concomitante redução da qualidade espermática, fertilidade e eclodibilidade. Neste estudo a eletroforese bidimensional identificou 49 spots com abundância diferencial, 30 com regulação positiva e 19 negativa, encontradas no plasma seminal de aves com a

síndrome. Dentre estas a *transthyretin*, *serum albumin-like*, *hemopexin-like*, *immunoglobulin light chain V-J-C region* e *pantetheinase-like* encontraram-se aumentadas no plasma seminal das aves com a síndrome. Já *ovotransferrin*, *hepatocyte growth factor activator*, *cysteine-rich secretory protein 3-like* e *ferritin heavy chain-like* estavam diminuídas. Estas proteínas foram consideradas marcadoras da qualidade espermática e fertilidade (STOWIŃSKA et al., 2015).

3. REFERÊNCIAS¹

AIRE, T. A. Spermiogenesis in birds. **Spermatogenesis**, Austin, v. 4, n. 3, p. e959392, 2014.

AKINS, C. K.; BURNS, M. Visual control of sexual behavior. In: COOK, R. G. (ed.). **Avian visual cognition**. Medford: Tufts University, 2001. *E-book*.

ALVAREZ-FERNANDEZ, A. *et al.* Female novelty and male status dynamically modulate ejaculate expenditure and seminal fluid proteome over successive matings in red junglefowl. **Scientific Reports**, London, v. 9, p. 5852, 2019.

ARAÚJO, W. A. G. *et al.* Programa de luz na avicultura de postura. **Revista CFMV**, Brasília, v. 17, n. 52, p. 58-65, 2011.

ARTONI, S. M. B. **Características morfológicas do sistema genital masculino de perdiz *Rhynchotus rufescens***. 2001. 107 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

ASANO, A.; TAJIMA, A. **Avian reproduction**. Singapore: Springer, 2017. v. 1001, 214 p.

ASSENMACHER, I.; JALLEGEAS, M. Circadian and circannual hormonal rhythms. In: EPPLE, A.; STETSON, M. H. (ed.). **Avian endocrinology**. New York: Academic Press, 1980. v. 3, p. 183-286.

BAKST, M. R. *et al.* Comparisons of sperm storage tubule distribution and number in 4 strains of mature broiler breeders and in turkey hens before and after the onset of photostimulation¹. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, n. 5, p. 986-992, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018. 12 p

BAKST, M. R.; DYMOND, J. S. Artificial insemination in poultry. In: LEMMA, A. **Success in artificial insemination: quality of semen and diagnostics employed**. London: InTech, 2013. *E-book*.

BARALDI-ARTONI, S. M. *et al.* Anatomia macroscópica da porção fixa e eversível do falo de perdiz *Rhynchotus rufescens*. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO. **Anais [...]**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2001. p. 228.

BARALDI-ARTONI, S. M. *et al.* Morphometric study of *Rhynchotus rufescens* testis throughout the year. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 363-367, 2007.

BAUSEK, N. *et al.* Interaction of sperm with purified native chicken ZP1 and ZPC proteins. **Biology of Reproduction**, New York, v. 71, n. 2, p. 684-690, 2004.

BEAUPRE, C. 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**, New York, v. 56, n. 6, p. 1570-1575, 1997.

BENOIT, J.; ASSENMACHER, I. Recherches sur la photosensibilité des récepteurs nerveux superficiels et profonds dans la gonadostimulation par les radiations visibles chez le Canard Pekin Impubère. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, p. 2750-2752, 1966.

BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA, Z. **Embriologia**. Warszawa: PWRiL, 2001.

BINKLEY, S.; REILLY, K. B.; HRYSHCHYSHYN, M. N-Acetyltransferase in the chick retina. **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, v. 139, p. 103-108, 1980.

BIRKHEAD, T. R.; MØLLER, A. P. Numbers and size of sperm storage tubules and the duration of sperm storage in birds: a comparative study. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 45, n. 4, p. 363-372, 1992.

BLESBOIS, E. Biological features of the avian male gamete and their application to biotechnology of conservation. **Journal of Poultry Science**, Tokyo, v. 49, n. 3, p. 141-149, 2012.

BLESBOIS, E.; HERMIER, D. Effects of high-density lipoproteins on storage at 4°C of fowl spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 90, n. 2, p. 473-482, 1990.

BLUHM, C. K. *et al.* Effects of male courtship and gonadal steroids on pair formation, egg-laying, and serum LH in Canvasback ducks (*Aythya valisineria*). **Journal of Zoology**, London, v. 204, n. 2, p. 185-200, 1984.

BORZIAK, K. *et al.* The seminal fluid proteome of the polyandrous Red junglefowl offers insights into the molecular basis of fertility, reproductive ageing and domestication. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 35864, 2016.

BOTINO, F. *et al.* Estudo morfométrico dos testículos de perdiz no decorrer do ano. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2003, Ribeirão Preto. **Anais [...]**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2003. p. 203.

BROWN, C. R.; BROWN, M. B. Testis size increases with colony size in cliff swallows. **Behavioral Ecology**, New York, v. 14, n. 4, p. 569-575, 2003.

BRUNELI, F. A. T. **Concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, progesterona, prolactina e corticosterona em perdizes (*Rhynchotus rufescens*), criadas em cativeiro**. 2006. 86 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BUCKETT, W. M.; LEWIS-JONES, D. I. Fructose concentrations in seminal plasma from men with nonobstructive azoospermia. **Archives of Andrology**, New York, v. 48, n. 1, p. 23-27, 2002.

CALISI, R. M.; RIZZO, N. O.; BENTLEY, G. E. Seasonal differences in hypothalamic EGR-1 and GnIH expression following capture-handling stress in house sparrows (*Passer domesticus*). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 157, n. 3, p. 283-287, 2008.

CARNIO, A.; MORO, M. E. G.; GIANNONI, M. L. Estudos para a criação e reprodução em cativeiro da ave silvestre, *Rhynchotus rufescens* (Tinamiformes), com potencial para exploração zootécnica. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 15, n. 2, p. 140-143, 1999.

CAVALCANTE, A. K. S. **Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro: comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados**. 2006. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

COLLIN, J. P.; OKSCHE, A. Structural and functional relationships in the nonmammalian pineal gland. *In*: REITER, R. J. (ed.). **The pineal gland**. Boca Raton: CRC press, 1981. v. 1: Anatomy and biochemistry, p. 27-67.

CORREIA, L. E. C. S. **Avaliação da endogamia, características reprodutivas e de crescimento em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro**. 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.

COSTA, A. J. D. A perdigão, a passagem do poder e a profissionalização nas empresas familiares. *In*: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE HISTÓRIA DE EMPRESAS, 7., 2005, Rio de Janeiro. **Anais [...]**. Rio de Janeiro: Conservatória, 2005. Disponível em: <http://www.empresas.ufpr.br/perdigao.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2020.

COWLES, R. B.; NORDSTROM, A. A Possible avian analogue of the scrotum. **Science**, Washington, v. 104, n. 2712, p. 586-587, 1946.

CRAMP, S.; PERRINS, C. M. **Handbook of the birds of Europe, the Middle East, and North Africa**. Oxford: Oxford University Press, 1994.

CROMBERG, V. U. *et al.* Reproductive and behavioral aspects of red-winged tinamous (*Rhynchotus rufescens*) in groups with different sex ratios. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 161-166, 2007.

DAWSON, A. *et al.* Hypothalamic gonadotrophin-releasing hormone and pituitary and plasma FSH and prolactin during photostimulation and photorefractoriness in intact and thyroidectomized starlings (*Sturnus vulgaris*). **Journal of Endocrinology**, London, v. 105, n. 1, p. 71-77, 1985.

DAWSON, A. *et al.* Photoperiodic control of seasonality in birds. **Journal of Biological Rhythms**, Thousand Oaks, v. 16, n. 4, p. 365-380, 2001.

DAWSON, A. Control of molt in birds: association with prolactin and gonadal regression in starlings. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 147, n. 3, p. 314-322, 2006.

DAWSON, A.; SHARP, P. J. Photorefractoriness in birds — photoperiodic and non-photoperiodic control. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 153, n. 1-3, p. 378-384, 2007.

DEL HOYO, J.; ELLIOT, A. S.; SARGATAL, J. **Handbook of the birds of the world: ostrich to ducks**. Barcelona: Lynx Edicions, 1992. v. 1, 696 p.

DU PLESSIS, L.; SOLEY, J. T. A re-evaluation of sperm ultrastructure in the emu, *Dromaius novaehollandiae*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 81, n. 8, p. 1073-1084, 2014.

EBIRD. **Tinamiformes - Tinamidae**: perdiz *Rhynchotus rufescens*. Ithaca: The Cornell Lab Merlin, 2020. Disponível em: <http://ibc.lynxeds.com/species/red-winged-tinamou-Rhynchotus-rufescens>. Acesso em: 28 abr. 2020.

ETCHES, R. J. **Estímulo luminoso na reprodução**. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCULA (ed.). **Fisiologia da reprodução de aves**. Campinas: FACTA, 1994.

ETCHES, R. J. The male. In: ETCHES, R. J. (ed.). **Reproduction in poultry**. Oxford: CAB International, 1996. p. 208-233.

FOLLETT, B. K. Birds. In: LAMMING, G. E. (ed.). **Marshall's physiology of reproduction**. 4. ed. New York: Churchill-Livingstone, 1984. v. 1, p. 283-350.

FOLLETT, B. K.; ROBINSON, J. E. Photoperiod and gonadotropin secretion in birds. In: REITER, R. J.; FOLLETT, B. K. **Progress in reproductive biology**: seasonal reproduction in higher vertebrates. Basel: Karger, 1989. p. 39-61.

FROMAN, D. P. *et al.* Physiology and endocrinology symposium: a proteome-based model for sperm mobility phenotype. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 5, p. 1330-1337, 2011.

FUJIIHARA, N. Accessory reproductive fluids and organs in male domestic birds. **World's Poultry Science Journal**, London, v. 48, n. 1, p. 39-56, 1992.

GIBSON, W. R.; FOLLETT, B. K.; GLEDHILL, B. Plasma levels of luteinizing hormone in gonadectomized japanese quail exposed to short or to long daylengths. **Journal of Endocrinology**, London, v. 64, n. 1, p. 87-101, 1975.

GRIBBINS, K. M. Reptilian spermatogenesis: a histological and ultrastructural perspective. **Spermatogenesis**, Austin, v. 1, n. 3, p. 250-269, 2011.

GUNAWARDANA, V. K.; SCOTT, M. G. A. D. Ultrastructural studies on the differentiation of spermatids in the domestic fowl. **Journal of Anatomy**, London, v. 124, pt. 3, p. 741-755, 1977.

HAMM, H. E.; MENAKER, M. Retinal rhythms in chicks: circadian variation in melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 77, n. 8, p. 4998-5002, 1980.

HARRIS, G. C.; SWEENEY, M. J. Changes in the protein concentration of chicken seminal plasma after rapid freeze-thaw. **Cryobiology**, New York, v. 7, n. 4, p. 209-215, 1971.

HERIN, R. A.; BOOTH, N. H.; JOHNSON, R. M. Thermoregulatory effects of abdominal air sacs on spermatogenesis in domestic fowl. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 198, n. 6, p. 1343-1345, 1960.

HORROCKS, A. J. *et al.* Induction of acrosomal exocytosis in chicken spermatozoa by inner perivitelline-derived N-linked glycans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 278, n. 1, p. 84-89, 2000.

ICHIKAWA, Y. *et al.* Sperm-egg interaction during fertilization in birds. **Journal of Poultry Science**, Tokyo, v. 53, n. 3, p. 173-180, 2016.

INYAWILERT, W. *et al.* Age-related difference changes semen quality and seminal plasma protein patterns of Thai native rooster. **International Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 15, n. 2, p. 287-296, 2019.

JONES, R. C.; LIN, M. Spermatogenesis in birds. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, Oxford, v. 15, p. 233-264, 1993.

KAMEDA, Y.; MIURA, M.; MARUYAMA, S. Effect of pinealectomy on the photoperiod-dependent changes of the specific secretory cells and α -subunit mRNA level in the chicken pars tuberalis. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 308, n. 1, p. 121-130, 2002.

KARDONG, K. V. **Vertebrate comparative anatomy function and evolution**. Dubuque: Brown Publishers, 1995.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 108, n. 1, p. 81-85, 1996.

KING, A. S.; MCLELLAND, J. (ed.). **Form and function in birds**. London: Academic Press, 1981.

KINOSHITA, M. *et al.* Zona pellucida protein ZP2 is expressed in the oocyte of Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Reproduction**, Cambridge, v. 139, n. 2, p. 359-371, 2010.

KON, Y.; ENDOH, D. Heat-shock resistance in experimental cryptorchid testis of mice. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 58, n. 2, p. 216-222, 2001.

KRAWCZYK, A.; JAWORSKA-ADAMU, J. Oocyte-sperm interactions in the fertilization of birds. **Medycyna Weterynaryjna**, Warszawa, v. 75, n. 5, p. 276-279, 2019.

LABAS, V. *et al.* Qualitative and quantitative peptidomic and proteomic approaches to phenotyping chicken semen. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 112, p. 313-335, 2015.

LEMOINE, M. *et al.* A reappraisal of the factors involved in in vitro initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. **Reproduction**, Cambridge, v. 136, n. 4, p. 391-399, 2008.

LIN, M.; JONES, R. C.; BLACKSHAW, A. W. The cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and estimation of its duration. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 88, n. 2, p. 481-490, 1990.

MACARTNEY, E. L. Diurnal rhythm of mitotic activity in the seminiferous tubules of the domestic fowl. **Poultry Science**, Champaign, v. 21, n. 2, p. 130-135, 1942.

MAHECHA, G. A. B. *et al.* **Variação sazonal dos ductulos eferentes da perdiz *Rhynchotus rufescens***. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2003, Ribeirão Preto. **Anais [...]**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2003.

MANN, T.; MANN, C. L.; DIXON, R. L. Passage of chemicals into human and animal semen: mechanisms and significance. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 11, n. 1, p. 1-14, 1982.

MARDER, J.; BERNSTEIN, R. Heat balance of the partridge *Alectoris chukar* exposed to moderate, high and extreme thermal stress. **Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology**, Oxford, v. 74, n. 1, p. 149-154, 1983.

MARZONI, M. *et al.* A proteomic approach to identify seminal plasma proteins in roosters (*Gallus gallus domesticus*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 216-223, 2013.

MENAKER, M. *et al.* Extraretinal light perception in the sparrow, III: the eyes do not participate in photoperiodic photoreception. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 67, n. 1, p. 320-325, 1970.

MENEGHETI, J. O. Observações preliminares sobre o acasalamento e recrutamento em *Nothura maculosa* (TEMMINCK, 1815) (Aves, Tinamidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia. Série zoologia**, Porto Alegre, v. 59, p. 65-75, 1981.

MENEGHETI, J. O.; MARQUES, M. I. B. Reprodução e mortalidade da perdiz. **Natureza em Revista**, Porto Alegre, v. 8, p. 26-31, 1981.

MENEGHETTI, J. Acasalamento em *Nothura maculosa* (Temminck, 1815) (Aves, Tinamidae) duração, período, magnitude e sua variação. **Iheringia. Série zoologia**, Porto Alegre, v. 64, p. 3-14, 1984.

MENEGHETTI, J. Razão de sexo e considerações sobre o sistema de acasalamento em *Nothura maculosa* (Temminck, 1815) (Aves, Tinamidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 427-440, 1988.

MENUAM, B.; RICHARDS, S. A. Observations on the sites of respiratory evaporation in the fowl during thermal panting. **Respiration Physiology**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 39-52, 1975.

MICHAILIDIS, G.; AVDI, M. Transcriptional profiling of gallinacins antimicrobial peptides in the chicken reproductive tract and embryos. **Journal of Biological Research**, Thessaloniki, v. 14, p. 211-218, 2010.

MORO, E. M. G. *et al.* Rendimento de carcaça e composição química da carne da perdiz nativa (*Rhynchotus rufescens*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 258-262, 2006.

MORO, E. M. G.; JOJI, A.; MALHEIROS, E. B. Avaliação dos níveis de proteína da dieta sobre a idade à maturidade sexual e produção de ovos de perdiz (*Rhynchotus rufescens* Temminck). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 997-1000, 2002.

MORO, M. E. G. **Citogenética e alguns aspectos produtivos da *Rhynchotus rufescens* - Perdiz (Aves: Tinamidae)**. 1991. 97 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1991.

MORO, M. E. G. **Desempenho e características de carcaça de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas com diferentes programas de alimentação na fase de crescimento**. 1996. 75 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

MOSSER, D. D.; MORIMOTO, R. I. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. **Oncogene**, Hampshire, v. 23, n. 16, p. 2907-2918, 2004.

NAKANE, Y. *et al.* A mammalian neural tissue opsin (Opsin 5) is a deep brain photoreceptor in birds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 34, p. 15264-15268, 2010.

NAKAO, N. *et al.* Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. **Nature**, London, v. 452, p. 317-322, 2008.

NIXON, B. *et al.* The role of the molecular chaperone heat shock protein A2 (HSPA2) in regulating human sperm-egg recognition. **Asian Journal of Andrology**, Beijing, v. 17, n. 4, p. 568-573, 2015.

OKUMURA, H. *et al.* A newly identified zona pellucida glycoprotein, ZPD, and dimeric ZP1 of chicken egg envelope are involved in sperm activation on sperm-egg interaction. **Biochemical Journal**, London, v. 384, pt. 1, p. 191-199, 2004.

OROSZ, S. E. Anatomy of the avian reproductive system. *In*: NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE: Small Animal, 2012, Orlando, FL. **Proceedings** [...]. Gainesville: NAVC, 2012.

PADHI, A.; GHALY, M. M.; MA, L. Testis-enriched heat shock protein A2 (HSPA2): Adaptive advantages of the birds with internal testes over the mammals with testicular descent. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 18770, 2016.

PARANZINI, C. S. *et al.* Feasibility of semen collection in red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*) by manual stimulation and sazonality implications. **Theriogenology**, Stoneham, v. 107, p. 36-40, 2018.

PARKER, J. E.; MCKENZIE, F. F.; KEMPSTER, H. L. **Fertility in the male domestic fowl**. Columbia: University of Missouri, 1942. 347 p.

QUEIROZ, F. A. *et al.* Meat and carcass traits of the red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*). **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 113-118, 2013.

REDGROVE, K. A. *et al.* The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition. **PloS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 11, p. e50851, 2012.

RILEY, G. M. Diurnal variations in spermatogenic activity in the domestic fowl. **Poultry Science**, Champaign, v. 19, p. 360, 1940.

RODLER, D. Histochemical detection of glycoconjugates in the inner perivitelline layer of Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 40, n. 6, p. 441-449, 2011.

RODLER, D.; SASANAMI, T.; SINOWATZ, F. Assembly of the inner perivitelline layer, a homolog of the mammalian zona pellucida: an immunohistochemical and ultrastructural study. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 195, n. 4, p. 330-339, 2012.

ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. **The vertebrate body**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1977. 624 p.

ROWE, M. *et al.* Molecular diversification of the seminal fluid proteome in a recently diverged passerine species pair. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 37, n. 2, p. 488-506, 2019.

SAMOUR, J. H. The reproductive biology of the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*): semen preservation techniques and artificial insemination procedures. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, Boca Raton, v. 16, n. 1, p. 39-49, 2002.

SASANAMI, T. *et al.* Induction of sperm acrosome reaction by perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Reproduction**, Cambridge, v. 133, n. 1, p. 41-49, 2007.

SASANAMI, T. *et al.* Sperm acrosin is responsible for the sperm binding to the egg envelope during fertilization in Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Reproduction**, Cambridge, v. 142, n. 2, p. 267-276, 2011.

SASANAMI, T. *et al.* Sperm storage in the female reproductive tract in birds. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 59, n. 4, p. 334-338, 2013.

SASANAMI, T. *et al.* A unique mechanism of successful fertilization in a domestic bird. **Scientific Reports**, London, v. 5, p. 7700, 2015.

SHARP, P. J. *et al.* Physiological roles of chicken LHRH-I and -II in the control of gonadotropin release in the domestic chicken. **Journal of Endocrinology**, London, v. 124, n. 2, p. 291-299, 1990.

SHIMIZU, T. *et al.* Cholera toxin mapping of retinal projections in pigeons (*Columba livia*), with emphasis on retinohypothalamic connections. **Visual Neuroscience**, Cambridge, v. 11, n. 3, p. 441-446, 1994.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**: uma introdução. 3. ed. Brasília: Universidade de Brasília, 1985. 2 v.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 862 p.

SIMÕES, K.; ORSI, A. M.; ARTONI, S. M. B. Ultrastructure of the spermatozoa of the domestic duck (*Anas platyrhynchos* sp.). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 41, n. 3, p. 202-208, 2012.

SLOWINSKA, M. *et al.* Proteomic analysis of white and yellow seminal plasma in turkeys (*Meleagris gallopavo*). **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, n. 6, p. 2785-2795, 2015.

STEIN, M. S. *et al.* Reproductive and behavioral aspects of partridges (*Rhynchotus rufescens*) using different mating strategies. In: EUROPEAN POULTRY CONFERENCE, 12., 2006, Verona. **Proceeding** [...]. Verona: WPSA, 2005. p. 1-6.

STOKKAN, K. A.; SHARP, P. J. Seasonal changes in the concentrations of plasma luteinizing hormone and testosterone in willow ptarmigan (*Lagopus lagopus lagopus*) with observations on the effects of permanent short days. **General and Comparative**

Endocrinology, New York, v. 40, n. 1, p. 109-115, 1980.

THURSTON, R. J. *et al.* Elevated seminal plasma protein : a characteristic of Yellow turkey semen. **Poultry Science**, Champaign, v. 61, n. 9, p. 1905-1911, 1982.

TSUTSUI, K. *et al.* A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 275, n. 2, p. 661-667, 2000.

TSUYOSHI, H.; WADA, M. Termination of LH secretion in Japanese quail due to high- and low-temperature cycles and short daily photoperiods. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 85, n. 3, p. 424-429, 1992.

UBUKA, T.; BENTLEY, G. E.; TSUTSUI, K. Neuroendocrine regulation of gonadotropin secretion in seasonally breeding birds. **Frontiers in Neuroscience**, Lausanne, v. 7, p. 38, 2013.

VIEIRA, G. H. C.; COLLI, G. R.; BÁO, S. N. The ultrastructure of the spermatozoon of the lizard *Iguana iguana* (Reptilia, Squamata, Iguanidae) and the variability of sperm morphology among iguanian lizards. **Journal of Anatomy**, London, v. 204, n. 6, p. 451-464, 2004.

VISSER, M. E.; HOLLEMAN, L. J. M.; CARO, S. P. Temperature has a causal effect on avian timing of reproduction. **Proceedings. Biological Sciences**, London, v. 276, n. 1665, p. 2323-2331, 2009.

VOGLER, C. J. *et al.* Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 11, p. 3827-3835, 1991.

WADA, M. *et al.* Temperature modulation of photoperiodically induced LH secretion and its termination in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 80, n. 3, p. 465-472, 1990.

WANG, S. *et al.* Differential gene expressions in testes of L2 strain Taiwan country chicken in response to acute heat stress. **Theriogenology**, Stoneham, v. 79, n. 2, p. 374-382, 2013.

WANG, S. *et al.* Acute heat stress induces differential gene expressions in the testes of a broiler-type strain of Taiwan country chickens. **PloS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. e0125816, 2015.

WIDLAK, W. *et al.* Heat shock transcription factor 1 down-regulates spermatocyte-specific 70kDa heat shock protein expression prior to the induction of apoptosis in mouse testes. **Genes Cells**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 487-499, 2007.

WINGFIELD, J. C.; FARNER, D. S. Endocrinology of reproduction in wild species. *In*: FARNER, D. S.; KING, J. R.; PARKES, K. C. (ed.). **Avian biology**. 9. ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 163-327.

WISHART, G. Semen quality and semen storage. *In*: HOCKING, P. (ed.). **Biology of breeding poultry**. Wallingfor: CABI Publishing, 2009. p. 151-178.

WISHART, G. J.; HORROCKS, A. J. Fertilization in birds. *In*: TARIN, J. J.; CANO, A. (ed.). **Fertilization in protozoa and metazoan animals**. Berlin: Springer, 2000. p. 193-222.

YOSHIMURA, T. *et al.* Molecular analysis of avian circadian clock genes. **Brain Research. Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 78, n. 1-2, p. 207-215, 2000.

4. HIPÓTESE

A adição de luz artificial durante o período reprodutivo (setembro a março) das perdizes (*Rhynchotus rufescens*), pode ou não influenciar o tempo da produção espermática e "características" das proteínas no sêmen.

5. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos provocados pelo controle da luz diária sobre as características seminais, comprimento da estação reprodutiva, proteoma das células e plasma espermático de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*), submetidos ou não a indução da reprodução por controle de luz, a fim de melhorar a eficiência reprodutiva visando à criação comercial.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1²

Efeitos do controle da luz sobre as características espermáticas de perdizes (*Rhynchotus rufescens*)

Light control effects on semen characteristics of the red-winged tinamou (Rhynchotus rufescens)

Kelry M. Silva^a, Marcos G. Carvalho^a, Cristiane S. Paranzini^{a,b}, Fernando E. Silva^a, Édina F. Aguiar^c, Luiz E. C. S. Correia^{d,e}, Josineudson AII V. Silva^e, Nabor Veiga^f, José A. Dell'Aqua-Junior^a, Fabiana F. Souza^{a,*}

^aDepartment of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, FMVZ, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, Brazil

^bEnvol Biomedical, Immokalee, Florida, USA

^cDepartment of Agronomia, Unifenas, Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, Brazil

^dDepartment of Animal Science, FCAV, São Paulo State University, UNESP, Jaboticabal, Brazil

^eDepartment of Animal Breeding and Nutrition, FMVZ, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, Brazil

^fDepartment of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, FMVZ, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, Brazil

*Corresponding author

Fabiana F Souza, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, Universidade Estadual Paulista, UNESP

Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n

Bairro: Unesp Campus de Botucatu, 18618-681 - Botucatu, SP, Brasil

Telephone number: +55(14)3880-2237

Email: fabiana.f.souza@unesp.br

² Artigo redigido de acordo com as normas da revista Theriogenology, com exceção da numeração de páginas. As normas da revista podem ser observadas no link <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do controle da luz diária sobre as características seminais e sobre o comprimento da estação reprodutiva de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*). O programa de luz artificial foi iniciado no mês de julho e continuado durante a estação reprodutiva (setembro 2017 a março 2018). Para o estudo foram selecionados 20 de 60 machos, quanto à facilidade da colheita do sêmen. Os machos selecionados foram divididos em 2 grupos, sendo grupo controle (luz natural, n = 10) e grupo tratado (16 h de luz e 8 h de escuridão, n = 10). O sêmen foi colhido 2 vezes/semana, e analisado quanto ao volume, motilidade e vigor subjetivos, coloração, grau de contaminação, concentração e morfometria espermática. A obtenção e facilidade na colheita do sêmen foram maiores nas aves submetidas ao programa de luz, 43 versus 11 amostras de sêmen colhidas das aves submetidas à luz artificial e natural, respectivamente. As aves submetidas ao programa de luz apresentaram produção espermática entre setembro a março, enquanto no grupo controle de setembro a dezembro. As características do sêmen também foram superiores ($P < 0,001$) nas aves mantidas sob luz artificial. Concluímos que o programa de luz artificial pode prolongar a estação reprodutiva e aumentar a qualidade espermática de perdizes, sendo indicado para a produção comercial.

Palavras-chave: Fotoperíodo; Luminosidade; Sêmen; Tinamiforme.

1. Introdução

A perdiz (*Rhynchotus rufescens*) pertence à ordem dos Tinamiformes, família Tinamidae, gênero *Rhynchotus*. É o maior tinamídeo campestre da fauna brasileira, com aproximadamente 37,5 cm de altura, sendo as fêmeas geralmente maiores que os machos [1]. A espécie é considerada potencial fonte de proteína para produção comercial, devido algumas particularidades apresentadas na composição de sua carcaça. O peito da ave, musculatura considerada corte nobre, compõe 40,7% da carcaça, agregando valor à produção [2]. Apesar disso, a perdiz não é uma espécie muito estudada e conhecer suas características reprodutivas pode contribuir para a obtenção de maiores índices de produção, permitindo a aplicação de biotécnicas da reprodução resultando em um melhor aproveitamento de aves geneticamente superiores [3].

Dentre os fatores que afetam diretamente a fertilidade dos machos destacam-se a temperatura ambiente e o fotoperíodo. Caracterizada como uma ave de reprodução

sazonal (fotoperíodo positivo), com ciclo de postura entre os meses de agosto a março [4–5], ficando o período de setembro a janeiro, considerados os de maior produção de ovos [6]. Aves com reprodução sazonal detectam sinais ambientais, como luz, temperatura que são importantes para indução da reprodução. Nas aves selvagens incluindo as perdizes, o período reprodutivo inicia-se na primavera, com aumento gradual do tamanho testicular e níveis hormonais, e permanecem elevados até o verão, com posterior diminuição gradativa [7].

Nas aves sazonais, o ciclo reprodutivo anual apresenta dois estádios, um de fotossensibilidade, no qual a resposta ao fotoperíodo ocorre, e de fotorrefratariedade, em que não há resposta imediata a maior quantidade de luz. Durante a estação reprodutiva, influenciada pela luminosidade, as aves apresentam, inicialmente, desenvolvimento testicular gradual, com reduzidas concentrações de testosterona na primeira semana. Porém, o crescimento testicular e esteroidogênese atingem o máximo em 5 semanas [8–10]. Ao final da estação reprodutiva, que pode não coincidir com o fotoperíodo, há redução das concentrações de LH [9,10], apesar da luminosidade elevada. Este período é denominado de fotorrefratário [11–13] e é concomitante com um pico de prolactina e redução gonadal [14].

Os compartimentos testiculares também se alteram de acordo com sazonalidade. Nas perdizes ocorrem alterações morfológicas dos testículos e há maior diâmetro dos túbulos seminíferos, da espessura do epitélio germinativo e quantidade de células de meiose na primavera, quando comparado com as outras estações do ano. A espessura da túnica albugínea é maior durante inverno e menor no verão. Estes resultados indicaram que a fase ativa de produção espermática ocorre na primavera, com completa espermatogênese neste período contendo todos os tipos células das linhagens germinativas. Já o verão é marcado pela fase de regressão, com involução do epitélio seminífero. No inverno há um período de preparação para a próxima fase reprodutiva, com recuperação do epitélio seminífero [15].

A produção comercial de perdizes necessita de manejo apropriado e, o uso de luz artificial, já é bem estabelecido nas aves domésticas, com contribuição para o aumento da produtividade [16]. Como há escassas informações se a luz artificial pode contribuir com a alteração da estação reprodutiva, tornando as perdizes mais produtivas e por maior período de tempo, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do controle da luz diária sobre as características seminais de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*),

submetidos ou não ao controle de luz diária e identificar a influência da luz artificial no comprimento da estação reprodutiva.

2. Material e métodos

2.1. Aspectos éticos

O estudo foi registrado no Sistema Brasileiro de Autorização e Informação da Biodiversidade (SISBIO nº 50.367), realizado de acordo com as diretrizes éticas recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) institucional (nº 159/2017).

2.2. Design experimental

O experimento foi realizado em dois períodos. Na primeira estação reprodutiva (setembro 2016 a março 2017), 20 machos foram selecionados entre 60, de acordo com a facilidade de colheita do sêmen e qualidade espermática. Na segunda estação reprodutiva (setembro 2017 a março 2018), os machos selecionados foram separados aleatoriamente em dois grupos ($n = 10/\text{grupo}$) em grupo controle, mantidos em luz natural e grupo tratado, mantidos em programa de luz artificial (16 horas de luz e 8 horas de escuridão) de acordo com Bruneli et al. [17].

O sistema de iluminação artificial foi introduzido do modo gradativo, iniciando-se 8 semanas (10 julho de 2017) antes do início do período reprodutivo (setembro 2017 a março 2018). Semanalmente foi feito o acréscimo de 30 minutos de luz artificial/diária, até completar 16 horas (Fig. 1).

2.3. Instalações, aves e dieta

Para o estudo foram selecionados 20 machos, com idade média de 6 anos, mantidos em galpões experimentais, em gaiolas coletivas (7 m^2), sob cama de feno de gramínea, luminosidade natural e artificial, galpão do tipo convencional telado lateralmente, com densidade de 3 aves/m^2 . Externamente á tela lateral, foi mantida uma cortina plástica, controlada manualmente, usada para o controle da temperatura interna nos boxes.

Os machos foram mantidos em boxes isolados das fêmeas, porém com contato visual, olfatório e auditivo.

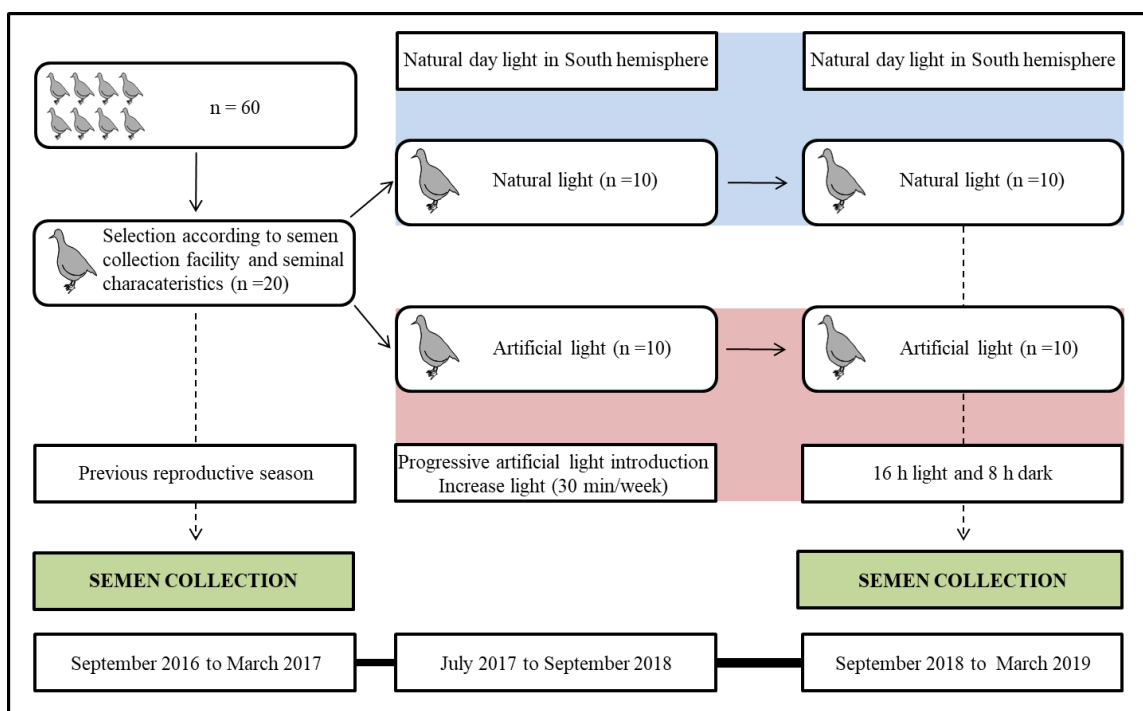


Fig. 1. Design experimental.

No início do terceiro mês da estação reprodutiva (novembro a março), foi feita a suplementação de um composto vitamínico, mineral e aminoácido (produto desenvolvido exclusivamente para o estudo, Botupharma®, Botucatu, SP, Brasil) acrescido à ração, na dose de 1 mL por kg/ração (Tabela 1).

O arraçoamento foi composto de ração farelada, isonutritiva, formulada a base de milho e farelo de soja conforme as recomendações de Moro [18]. O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*, utilizando-se bebedouros pendulares e comedouros tubulares.

2.4. Colheita e avaliação do sêmen

As aves foram condicionadas à colheita do sêmen, 2 vezes/semana, 1 mês antes do período reprodutivo. O corte das penas da região pericloacal foi realizado para facilitar a colheita e evitar a contaminação do sêmen, a cada 20 dias.

A colheita do sêmen foi efetuada após contenção do macho e massagem da cloaca e dorso (região sobre os testículos) [3,19]. Os ejaculados foram colhidos na porção distal do falo, diretamente com um tubo plástico pré-aquecido. As amostras foram mantidas em banho-seco a 37° C.

Tabela 1.

Composição do suplemento vitamínico, mineral e aminoácido de acordo com níveis de garantia por kg/ração.

Composição*	Quantidade	Unidade de Medida
Ácido Fólico	1.200	mg/kg
Arginina	20	g/kg
Beta Caroteno	200	mg/kg
Carnitina	300	g/kg
Cobre	60	mg/kg
Cromo	150	mg/kg
Glicina	1.000	mg/kg
L-Glutamina	1.300	mg/kg
Ômega 3	100	g/kg
Ômega 6	50	g/kg
Selênio	60	mg/kg
Taurina	1.300	mg/kg
Vitamina B12	200	mcg/kg
Vitamina B6	600	mg/kg
Vitamina E	20.000	UI/kg
Zinco	1.200	mg/kg

*Quantidades mínimas

Imediatamente após cada colheita foi realizado o exame visual da amostra para identificação do grau de contaminação, o qual foi classificado em 5 categorias [20]. O grau 1 foi considerado sem contaminação aparente de fezes e urina e grau 5 com contaminação acentuada de fezes e urina. Quando o grau de contaminação foi superior a 4, a amostra foi descartada.

O volume foi mensurado com pipetador automático e as amostras foram diluídas em solução salina 0,9% (1: 10) para facilitar as avaliações, já que o sêmen contém muitas células em pouco volume.

A motilidade (0 a 100%) e vigor (escore de 0 a 5) espermáticos foram mensurados pelo depósito de uma alíquota de sêmen diluído (5 µL) entre lâmina e lamínula, observada em microscópio de contraste de fase. A concentração espermática

foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer, após diluição das amostras em formol-salina (1: 50).

Para a morfometria espermática, foram confeccionados esfregaços das células, as lâminas foram coradas com panótico rápido e fotografadas em microscópio óptico, em um aumento de 1.000X. As imagens das células espermáticas foram analisadas no ImageJ, um software de domínio público (U.S. National Institutes of Health, www.rsbl.info.nih.gov/ij/). O comprimento, largura, área e perímetro da cabeça dos espermatozoides foram as medidas analisadas.

2.5. Análise estatística

As variáveis foram analisadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e posteriormente pelo teste de Mann-Whitney. O software Sigma-Plot (2011) foi utilizado para a comparação entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney e o nível de significância considerado foi de 5%. Os resultados foram representados pela média $\pm$ erro padrão.

3. Resultados

O sucesso na colheita do sêmen foi obtido em 43 amostras das aves mantidas sob luz artificial, contrapondo 11 sob luz natural. Todos os parâmetros seminais analisados foram superiores no sêmen obtido das aves mantidas sob luz artificial (Tabela 2).

As células espermáticas foram mensuradas apresentando comprimento da cabeça $14,0 \pm 0,9 \mu\text{m}$; largura da cabeça $10,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$; e comprimento da cauda $58,1 \pm 7,0 \mu\text{m}$ (Fig. 2).

Tabela 2.

Parâmetros seminais de perdizes mantidas sob luz natural e artificial.

Parâmetro	Luz artificial	Luz natural	Valor de P*
Volume (μL)	$41,44 \pm 4,11$	$10,50 \pm 3,29$	<0,001
Motilidade (%)	$38,52 \pm 4,38$	$9,84 \pm 3,49$	<0,001
Vigor (escore 0 a5)	$1,80 \pm 0,19$	$2,02 \pm 1,74$	<0,001
Coloração (escore 1 a 5)	$1,42 \pm 0,12$	$0,44 \pm 0,15$	<0,001
Concentração ($\times 10^6$)	$1.351,50 \pm 94,34$	$284,50 \pm 85,39$	<0,001

*Mann-Whitney

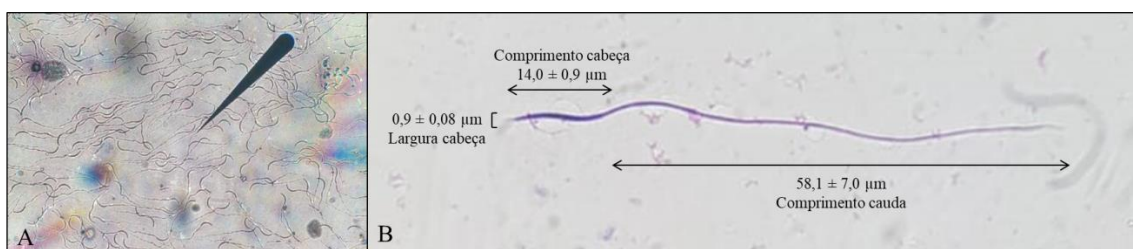


Fig. 2. Célula espermática de perdiz. A. Fotomicrografia durante a avaliação da motilidade e vigor espermáticos (aumento de 1.000X). B. Morfometria da célula espermática.

4. Discussão

Neste estudo, foram analisados os efeitos do fornecimento de luz artificial sobre as características espermáticas de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) constatando seu efeito positivo no aumento do comprimento da fase reprodutiva. A eficiência do tratamento com luz artificial, pôde ser demonstrado pelo número de amostras obtidas quando comparado ao controle. Além disso, a luminosidade afetou o período reprodutivo, levando ao prolongamento da fase de pico (setembro a dezembro), fazendo com que os machos ejaculassem de forma contínua por um período maior, se estendo durante toda estação reprodutiva, compreendida de setembro a março [21], e consequentemente apresentando maior volume de sêmen, motilidade, vigor e concentração espermática, quando comparados ao sistema de luz natural.

A ejaculação dos machos de perdiz de vida livre inicia-se, de forma regular, em setembro, permanecendo até meados de dezembro, quando começam a diminuir a produção espermática de forma gradativa, entrando numa aparente fase de regressão [7]. Mesmo havendo alta disponibilidade de luz natural, os machos desta espécie, cessam a produção de sêmen, inferindo que o aumento de luz disponível não é aproveitado, permanecendo poucas aves com capacidade de ejaculação, evidenciando refratariedade à luz [22]. Em contrapartida, quando o fornecimento de luz artificial foi estabelecido neste estudo, constatou-se que a diminuição ou regressão na produção espermática não ocorreu, tendo uma continuidade na produção que se manteve até o findar de março. O aumento do fotoperíodo gera uma fotoestimulação, resultando em aumento da secreção de GnRH1, maturação gonadal, e consequentemente a reprodução [10]. Desta forma, o prolongamento da produção espermática em aves que receberam iluminação artificial, pode ter acontecido devido ao desencadeamento de fotoestimulação contínua, não havendo diminuição na secreção do GnRH1 durante a estação. As aves apresentam

capacidade fisiológica de desconectar o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal após a reprodução [23], ao contrário dos mamíferos, que não apresentam tal característica [13]. Esse fato não envolve apenas uma mudança no padrão de secreção de GnRH1, mas uma diminuição em sua síntese, fazendo com que seu conteúdo hipotalâmico diminua. Sendo causado não pelo retorno de fotoperíodos curtos, mas sim, por fotoperíodos longos, atuando como fotorrefrator [12].

Os machos de ambos os tratamentos tinham contato visual e auditivo com as fêmeas, como forma de estímulo sexual. Manter esse tipo de interação aguça o surgimento da característica marcante dos machos dessa espécie, que é tido como aumento da vocalização, em torno de 1 a 2 meses antes da estação reprodutiva [5]. Foi evidenciado que os machos que receberam tratamento de luz artificial permaneceram com vocalização até o final da estação, nos servindo de parâmetro de libido ativo, sendo que a interação estimula a liberação de neurohormônios como o GnRH [13]. Este comportamento, geralmente, é evidenciado apenas durante a primavera, e está associado com a agressividade, inquietação, perseguição às fêmeas e tentativas de cópula [23].

A temperatura é outro fator relacionado com a interação social e observamos que em dias mais quentes havia maior interação entre os animais, e consequentemente, a libido, produção espermática e qualidade das amostras foram maiores, em ambos os tratamentos. Porém, os animais tratados com iluminação artificial apresentaram maior qualidade das características espermáticas, como volume, motilidade e concentração do ejaculado. Embora esses fatores não tenham sido descritos para perdizes, no Chapim-real (*Parus major*), temperaturas mais elevadas, afetam o momento da postura, podendo adiantar o período reprodutivo [24]. Em contraposto, quando a temperatura diminui acontece uma redução da concentração de LH, o que afeta a reprodução [10], pois este hormônio está diretamente ligado ao estímulo da esteroidogênese e gametogênese [13].

Neste período os machos que receberam iluminação artificial se mantiveram ejaculando de forma regular, apresentando libido no período. Ao contrário, os animais mantidos em sistema de luz natural, que foi marcado pelo baixo número de amostras, os machos não apresentavam resposta positiva a massagem em dorso e cloaca, pouco sinal de excitação, sem exposição aparente do falo durante a colheita e ausência de ejaculação. Este fato por estar relacionado as baixas concentrações de LH, devido a menor intensidade de iluminação, embora não tenhamos quantificado esse hormônio, é sabido que a produção de testosterona está diretamente relacionada com o LH, pois o

LH é responsável pela produção e estímulo na secreção de testosterona, estando a testosterona ligada a maior libido e consequentemente, a ejaculação [25].

As características de volume, motilidade, coloração e concentração foram maiores nos animais que receberam luz artificial, o que já foi demonstrado em perdiz (*Rhynchotus rufescens*) [3] durante uma estação reprodutiva completa, na qual foram encontrados valores mais elevados de motilidade e vigor, e menor contaminação, porém os valores de volume e concentração espermática resultante do nosso estudo foram superiores.

Devido a escassez de informações na literatura a morfometria das células espermáticas da perdiz (*Rhynchotus rufescens*) foi determinada em nosso estudo, as quais apresentaram características semelhantes ao periquito-australiano (*Melopsittacus undulatus*) [25].

Baseado nos nossos resultados foi evidente que o tratamento com luz artificial, durante o período reprodutivo da perdiz prolonga e uniformiza a produção espermática entre setembro a março, denominado como fase reprodutiva. Demonstrando também, elevação nas características dos parâmetros seminais e pelo número maior de amostras obtidas, quando comparados ao controle. Esse manejo pode ser introduzido na produção comercial da espécie.

5. Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo nº145578, 2017) pela concessão da bolsa de estudos e ao suporte oferecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, no início deste projeto.

6. Referências

- [1] SICK H. Composição da Avifauna Brasileira. Ornitol. Bras. uma introdução, 1985, p. 133–46.
- [2] Moro MEG, Ariki J, Alves P, Barbosa H, Souza A De, Maria V, et al. Rendimento de carcaça e composição química da carne da perdiz nativa (*Rhynchotus rufescens*). Ciência Rural 2006;36:258–62. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000100040>.
- [3] Cavalcante AKS. Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro: Comparação entre os índices reprodutivos de

- animais acasalados e inseminados. 2006. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- [4] Moro MEG. Citogenética e alguns aspectos produtivos da *Rhynchotus rufescens* - Perdiz (Aves: Tinamidae). 1991. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 1991.
 - [5] Peixoto JEI, Tischer MCI. Avaliação do desempenho reprodutivo de perdiz (*Rhynchotus rufescens*) em Zoológicos brasileiros durante o período 1991/2001. In: Anais da Sociedade Paulista de Zoológicos, 2005.
 - [6] Bruneli FAT, Tholon P, Isaac FL, Damasceno PR, Tonhati H, Queiroz SA. Caracterização da reprodução de perdizes. *ARS Vet* 2005;21:272–80. <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2005v21n2p272-280>
 - [7] Akins CK, Burns M. Visual Control of Sexual Behavior. in: Cook RG, editors. *Avian Visual Cognition*. On-line; 2001. Disponível: www.pigeon.psy.tufts.edu/avc/akins/.
 - [8] Follett BK, Robinson JE. Photoperiod and gonadotropin secretion in birds. In: Reiter RJ, Follett BK, editors. *Reproduction in Higher Vertebrates*, Switzerland: Basel:Karger; 1980, p. 38–61.
 - [9] Tsuyoshi H, Wada M. Termination of LH Secretion in Japanese Quail Due to High- and Low-Temperature Cycles and Short Daily Photoperiods Changes in Plasma. *Gen Comp Endocrinol* 1992;429:424–9. doi:10.1016/0016-6480(92)90087-z.
 - [10] Wada M, Hatanaka F, Tsuyoshi H, Sonoda Y. Temperature Modulation of Photoperiodically Induced LH Secretion and Its Termination in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen Comp Endocrinol* 1990;80:465–72. doi: 10.1016/0016-6480(90)90195-r.
 - [11] Wingfield JC, Farner DS. Control of seasonal reproduction in temperate-zone birds,” in: Reiter RJ, Follett B, editors. *Progress in Reproductive Biology*, New York: Karger; 1990, p. 62–101.
 - [12] Dawson A, King VM, Bentley GE, Ball GF. Photoperiodic Control of Seasonality in Birds. *J Biol Rhythms* 2001;16:365–80. <https://doi.org/10.1177/074873001129002079>.
 - [13] Ubuka T, Bentley GE, Tsutsui K. Neuroendocrine regulation of gonadotropin secretion in seasonally breeding birds. *Front Neurosci* 2013;7:1–17.

- <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00038>.
- [14] Dawson A. Control of molt in birds : Association with prolactin and gonadal regression in starlings. *Gen Comp Endocrinol* 2006;147:314–22. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.02.001>.
 - [15] Baraldi-Artoni SM, Bottino F, Oliveira D, Sobue Franzo V, Amoroso L, Orsi AM, et al. Morphometric study of *Rhynchotus rufescens* testis throughout the year. *Braz J Biol* 2007;67:363–7. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842007000200024>
 - [16] Araújo WAG, Albino LFT, Tavernari FC, Godoy MJS. Programa de luz na avicultura de postura. *Rev CFMV- Bras* Ano XVII, No 52 2011:58–65.
 - [17] Bruneli FAT. Concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, progesterona, prolactina e corticosterona em perdizes (*Rhynchotus rufescens*), criadas em cativeiro. 2006. 86 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006.
 - [18] Moro MEG. Desempenho e características de carcaça de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas com diferentes programas de alimentação na fase de crescimento. 1996. 75 p. Tese (Doutorado em Zootecnia, Área de concentração em Produção Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 1996.
 - [19] Góes PAA, Cavalcante AKS, Tavian AF, Felipe L, Santos EC, Nichi M, et al. Análise espermática de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2011;48:370–7. doi: 10.11606/S1413-95962011000500003.
 - [20] Dogliero A, Rota A, Lo R, Degerfeld MM Von, Quaranta G. Semen evaluation in four autochthonous wild raptor species using computer-aided sperm analyzer. *Theriogenology* 2016;85:1113–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.023>.
 - [21] Menegheti J. Observações preliminares sobre o acasalamento e recrutamento em *Nothura maculosa* (TEMMINCK, 1815) (Aves, Tinamidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia Série Zool* 1981;59:65–75.
 - [22] WInfield JC, Farner DS. Endocrinology of reproduction in wild species. In: Farner, D. S.; King, J. R.; Parkes KC, editor. *Avian Biol.* IX, San Diego, CA: Academic Press; 1993, p. 163–327.
 - [23] Calisi R, Rizzo N, Bentley G. Seasonal differences in hypothalamic EGR-1 and GnIH expression following capture-handling stress in house sparrows (*Passer*

- domesticus). Gen Comp Endocrinol 2008;157:283–7.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.05.010>
- [24] Visser ME, Holleman LJM, Caro SP. Temperature has a causal effect on avian timing of reproduction 2009:2323–31. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0213>.
- [25] HAFEZ E. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. Reprodução Animal, 1995, p. 59–94.

CAPÍTULO 3

ARTIGO 2³

Abordagem proteômica das células espermáticas e plasma seminal de perdizes
(*Rynchotus rufescens*)

*Proteomic approach of spermatozoa and seminal plasma of the winged tinamou
(Rynchotus rufescens)*

Kelry M. Silva^a, Marcos G. Carvalho^a, Laiza C. Sartori^a, Viviane M. Codognoto^a,
Andressa F. Vieira^a, Thaís M. S. Cavaleiro^a, Luiz E. C. S. Correia^{b,c}, Josineudson A. II
V. Silva^c, Nabor Veiga^d, Fabiana F. Souza^{a,*}

^aDepartment of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, FMVZ, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, Brazil

^bDepartment of Animal Science, FCAV, São Paulo State University, UNESP, Jaboticabal, Brazil

^cDepartment of Animal Breeding and Nutrition, FMVZ, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, Brazil

^dDepartment of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, FMVZ, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, Brazil

*Corresponding author:

Fabiana F Souza, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, Universidade Estadual Paulista, UNESP

Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n

Bairro: Unesp Campus de Botucatu, 18618-681 - Botucatu, SP, Brasil

Telephone number: +55(14)3880-2237

Email: fabiana.f.souza@unesp.br

³ Artigo redigido de acordo com as normas da revista Theriogenology, com exceção da numeração das páginas. O hiperlink das referências. <https://www.journals.elsevier.com/theriogenology>

RESUMO

Este estudo teve como objetivo descrever o perfil proteico das células espermáticas e plasma seminal de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) e avaliar os efeitos do programa de luz artificial sobre a composição proteica dos espermatozoides. Foram utilizados 28 machos, selecionados para colheita de sêmen, divididos em 2 grupos, controle (luz natural) e tratado (luz artificial, 16 horas de luz e 8 horas de escuridão). O sêmen foi colhido 2 vezes/semana, por massagem cloacal e dorso. Após cada dia de colheita, as amostras foram agrupadas para formar um pool de cada grupo e centrifugadas para a separação do plasma seminal (sobrenadante) e espermatozoides (pellet). O plasma seminal foi recentrifugado (10.000g, 30 minutos, 4° C) e os espermatozoides foram lavados (3 vezes, 600g, 30 minutos) com PBS pH 7,0, o pellet foi acrescido de um tampão de extração e sonificados. Após a sonicação, o extrato de proteínas foi separado por centrifugação (10.000g, 30 minutos, 4° C). A concentração de proteínas totais foi mensurada no plasma seminal e extrato de proteínas espermáticas pelo método de Bradford, e as amostras foram preparadas para a espectrometria de massas (ESI-Q-TOF MS/MS) com digestão trípica. Foram encontradas 28 e 58 proteínas no plasma seminal e extrato proteico dos espermatozoides. A *keratin* e isoformas e as *catalytic activity* e *binding* foi a proteína e funções moleculares mais frequentes, respectivamente, nas amostras e grupos. No extrato proteico dos espermatozoides, as proteínas *alpha-enolase*, *serum albumin*, *keratin, type II cytoskeletal cochleal (fragment)* e *ferritin (fragment)* foram encontradas em maior abundância nas aves mantidas com luz natural. Já as proteínas *olfactory receptor (fragment)*, *tail-anchored protein insertion receptor WRB (fragment)*, *keratin, type II cytoskeletal 73 (fragment)* e *keratin, type II cytoskeletal 75 (fragment)* foram mais abundantes nas aves com luz artificial. Já as proteínas encontrados em abundância no plasma seminal foram *keratin, type II cytoskeletal 75 frag.*, *keratin, type I cytoskeletal 15*, *keratin, type I cytoskeletal 17*, *keratin, type II cytoskeletal 73*, *keratin, type II cytoskeletal 75*, *keratin, type II cytoskeletal cochleal*, *tubulin beta chain (Fragment)*, *glutathione S-transferase Mu 5*. Assim, concluímos que as perdizes apresentam perfil de proteínas do plasma seminal e espermatozoides similares e específicas das aves domésticas, podendo ser identificadas e descritas as principais proteínas das células espermáticas e plasma seminal de perdizes (*Rhynchotus rufescens*), mantidas ou não em sistema de iluminação artificial.

Palavras-chave: Fotoperíodo; Proteoma; Sêmen; Tinamiforme

1. Introdução

A qualidade do sêmen está relacionada com características espermáticas, fatores externos e composição molecular das células e fluídos. As principais moléculas envolvidas na fertilidade são as proteínas, especialmente aquelas oriundas dos fluídos produzidos pelas glândulas sexuais acessórias, mas também dos fluídos testiculares, dos epidídimos e das células espermáticas. Porém, as aves não apresentam glândulas sexuais acessórias, então proteínas contidas no ejaculado são apenas de origem espermática, fluído testicular ou do sistema de ductos [1]. Além disso, o fluído linfático [2] de origem dos corpos vasculares paracloacais podem contribuir para o volume do sêmen [3]. Vista as diferenças, resultados de estudos de proteômica conduzidos em mamíferos, não podem ser aplicados às aves.

Embora a proteômica dos fluídos e células sejam importantes para entender os processos relacionados com a fertilidade, raros estudos foram conduzidos no sêmen das aves. As principais proteínas identificadas no fluído seminal de galos foram *serum albumin*, *ovotransferrin*, *alpha-enolase*, *fatty acid binding protein*, *thioredoxin*, *trypsin inhibitor CITI-1* e *gallinacin-9* também foram descritas e estão associadas com a manutenção do meio para a sobrevivência das células espermáticas ou protegem os espermatozoides do estresse oxidativo ou contra microorganismos. A *ovotransferrin*, *gallinacin-9* e *trypsin inhibitor CITI-1* foram consideradas específicas para as aves [4] e têm funções antimicrobianas [5]. Já a *alpha-enolase* está envolvida no metabolismo de energia e é responsável pela motilidade espermática [6].

Ainda em galos domésticos, usando abordagem *shotgun*, um estudo identificou 1.165 proteínas nos espermatozoides e plasma seminal. Aves com maior fertilidade apresentaram maior abundância de enzimas envolvidas no metabolismo de energia, cadeia respiratória e atividade de oxirredução nos espermatozoides. Já no plasma seminal, machos com maior fertilidade apresentaram várias proteínas em maior abundância, dentre as quais, *angiotensin-converting enzyme precursor*, *gallinacin*, *glutathione S-transferase* e *highly conserved regulatory 14-3-3 proteins* [7].

Similarmente, em galo banquiva (*Gallus gallus*), uma espécie selvagem, que deu origem ao galo doméstico, foram encontradas 1.141 proteínas no fluído seminal, contudo houve efeito da idade e velocidade espermática na composição proteica do fluído seminal. As proteínas encontradas em galos jovens e com alta velocidade espermática foram *serum albumin precursor*, *transthyretin precursor*, *fatty acid-binding*

protein brain, pendrin isoform X2 e gallinacin-10 preproprotein [8]. A idade também foi um fator estudado em *Thai native* galos (*Leung hang khao*). Contudo, a técnica utilizada foi eletroforese unidimensional e as proteínas não foram identificadas. Apesar disso, encontraram proteínas com massas moleculares entre 90 e 140 kDa associadas com a viabilidade espermática e com a idade [9].

Diferenças nas proteínas do fluído seminal entre espécies similares como pardais domésticos (*Passer domesticus*) e pardais espanhóis (*Passer hispaniolensis*) também foram determinadas, com diversificação das proteínas envolvidas na imunidade e maturação espermática [10].

A proteômica do plasma seminal tem identificado proteínas associadas com doenças relacionadas com a fertilidade. Em perus (*Meleagris gallopavo*) estudo foi conduzido para identificar proteínas relacionadas com a síndrome do sêmen amarelo, nos quais a cor branca do sêmen é alterada, com concomitante redução da qualidade espermática, fertilidade e eclodibilidade. Neste estudo a eletroforese bidimensional diferencial identificou 49 *spots* com abundância diferencial, 30 com regulação positiva e 19 negativa, no plasma seminal de aves com a síndrome. Dentre estas a *transthyretin*, *serum albumin-like*, *hemopexin-like*, *immunoglobulin light chain V-J-C region* e *pantetheinase-like* encontraram-se aumentadas no plasma seminal. Já *ovotransferrin*, *hepatocyte growth factor activator*, *cysteine-rich secretory protein 3-like* e *ferritin heavy chain-like* estavam diminuídas. Estas proteínas foram consideradas marcadoras da qualidade espermática e fertilidade [11].

Estudar as proteínas espermáticas é uma ferramenta que pode detectar potenciais marcadores de fertilidade no sêmen [4], tanto para distúrbios reprodutivos dos machos, como infertilidade, doenças que alteram a fertilidade, ou características desejáveis, tais como criotolerância espermática [12–14]. As proteínas do plasma seminal e células espermáticas em perdiz (*Rhynchotus rufescens*) ainda não foram descritas. Desta maneira, este estudo objetivou descrever a proteômica do plasma seminal e dos espermatozoides de perdizes (*Rhynchotus rufescens*), e verificar a quantidade de luz (natural ou artificial) pode influenciar a abundância das proteínas espermáticas.

2. Material e métodos

2.1. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais Institucional, protocolo 159/2017, sendo realizado de acordo com as recomendações do Conselho

Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e autorizado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), número 50367.

2.2. Aves e manejo

O estudo foi conduzido durante a estação reprodutiva, de setembro 2017 a março 2018. Foram utilizados 28 machos, jovens (média: 6 anos), alojados em galpão experimental, contendo boxes coletivos de 7 m², sob cama de feno de gramínea, com densidade de 3 aves/m². O galpão apresenta telas laterais e cortinas plásticas externas para o controle da temperatura.

A dieta foi composta por ração farelada, isonutritiva, formulada a base de milho e farelo de soja [15], com fornecimento de água, ambos *ad libitum*.

2.3. Design experimental

Para o estudo, as aves foram divididas em dois grupos. O grupo controle, mantido com luminosidade natural (n = 14) e o tratado, com luz artificial (16 horas luz e 8 horas escuridão, n = 14).

As aves foram condicionadas a colheita do sêmen por um período de 4 semanas dias. O sêmen foi colhido dos machos dos 2 grupos. As células foram separadas do plasma seminal e as amostras (espermatozoides e plasma seminal) foram preparadas para proteômica por abordagem *shotgun*. Apenas os espermatozoides foram usados para comparação dos grupos (luz natural e luz artificial), em vista do escasso volume seminal no grupo luz natural, nas amostras de plasma seminal dos machos tratados com luz, as proteínas foram descritas (Fig. 1).

2.4. Colheita do sêmen

A colheita de sêmen foi efetuada após a contenção do macho e massagem da cloaca e dorso (região sobre os testículos) [16,17]. Os ejaculados foram colhidos diretamente do falo com um tubo plástico pré-aquecido.

Imediatamente após cada colheita, foi realizado o exame visual da amostra, graduando-se a coloração de 1 a 5 [18], sendo grau 1 (sem contaminação aparente de fezes e urina) e grau 5 (contaminação acentuada de fezes e urina). Quando o grau de contaminação foi ≥ 4 , as amostras foram descartadas para reduzir qualquer interferência nos resultados.

2.5. Análise proteômica

A proteômica foi utilizada para descrever o perfil de proteínas das células espermáticas e plasma seminal da espécie, e verificar se há variação entre as proteínas espermáticas de aves mantidas em sistema de luz natural e artificial.

Após a colheita do sêmen, as amostras foram preparadas para proteômica. O sêmen foi centrifugado a 800g, durante 10 minutos, o plasma seminal recolhido e recentrifugado a 10.000g, a 4° C, durante 30 minutos. A concentração de proteínas totais do plasma seminal foi mensurada pelo método de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, CO., USA) e as amostras armazenadas a -80° C até a espectrometria de massas.

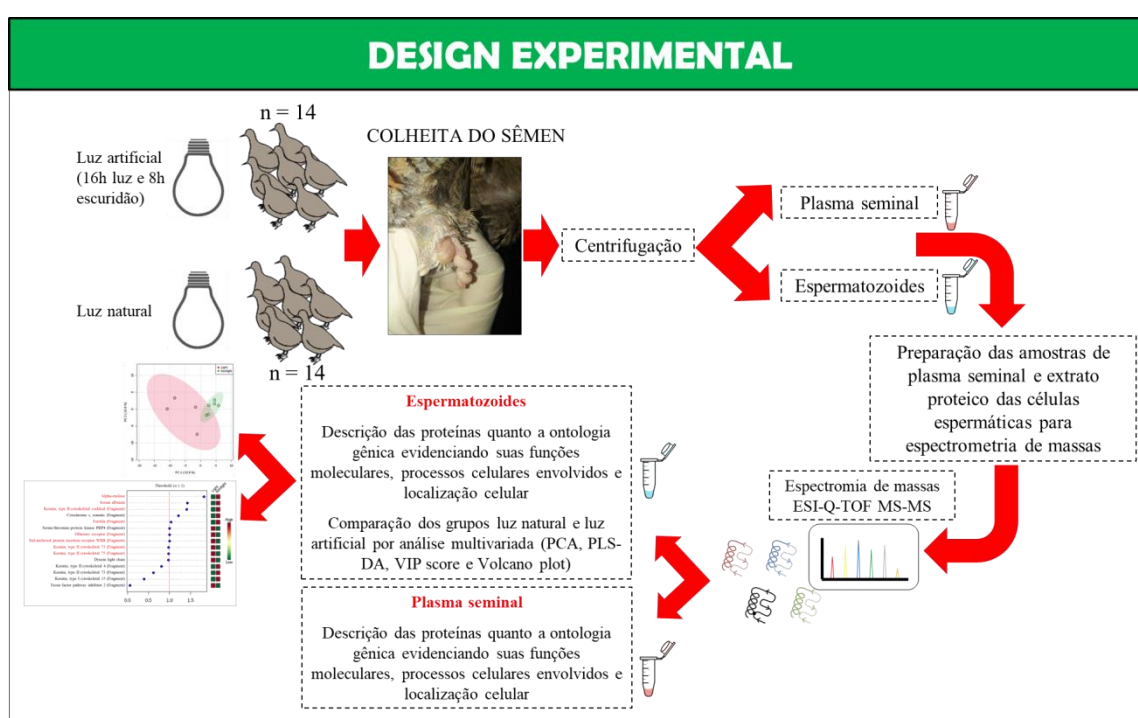


Fig. 1. Design experimental.

Os espermatozoides (pellet inicial) foram lavados 3 vezes em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,0 contendo inibidor de proteases (0,8 mmol EDTA, 1,0 µg/mL aprotinina, 1,0 µg/mL leupeptina e 35,0 µg/mL PMSF [phenylmethylsulfonil fluoride] em 50 mmol TRIS-HCl pH 7,2), por centrifugação, durante 10 minutos, a 800 g. O pellet final foi diluído em tampão RIPA modificado [19], contendo inibidores de proteases (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 50 mM TRIS-HCl pH 7,5, 0,8 mmol EDTA, 1,0 µg/mL aprotinina, 1,0 µg/mL leupeptina e 35,0 µg/mL PMSF [phenylmethylsulfonil fluoride] em 50 mmol TRIS-HCl pH 7,2). As células foram sonicadas (Sonifier Sound Enclosure Ultrasonics, Shanghai, China) em

banho de gelo [20] com uma probe of 3,0 mm, amplitude de 20%, por 30 segundos cada série, em um total de 10 séries e intervalos de 1 minuto entre as séries. A seguir as amostras foram centrifugadas a 10.000g, durante 30 minutos, a 4° C. A concentração de proteínas totais foi determinada (Pierce 660, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Foi necessária a precipitação de proteínas com acetona, já que as amostras continham baixa concentração proteica. Para isso, a amostra foi diluída (1: 5, amostra: acetona) com acetona, a mistura homogeneizada e mantida em repouso por 1 hora a -20° C, com agitação a cada 10 minutos. O sobrenadante foi retirado por centrifugação (5.000 g por 20 minutos) e a etapa repetida no pellet. Ao final a amostra foi centrifugada novamente e o sobrenadante descartado. O tubo permaneceu aberto por 15 minutos para evaporação dos resíduos do solvente. O pellet foi eluído em 40 µL de 50 mM TRIS-HCl pH 7,2, a concentração de proteína total foi novamente determinada e a amostra foi conservada a -80° C até a espectrometria de massas.

As amostras (50 µg de plasma seminal e extrato proteico dos espermatozoides) foram submetidas a eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) em sistema contínuo com gel de separação 12%. Quando as amostras atingiram o gel de separação a corrida foi interrompida e o gel corado com coomassie coloidal [21–23]. A seguir, as bandas foram recortadas para a digestão das proteínas de acordo com Shevchenko [24], com modificações. As bandas foram descoradas em 50% metanol e 2,5% ácido acético, e desidratadas em 100% acetonitrila. As pontes dissulfeto foram reduzidas com DTT (Bio-Rad®, Lagoa Santa, Brasil) e o DTT foi alquilado com iodoacetamida (Bio-Rad® Santo Amaro, Brasil). A tripsina (20 ng/µL, 1: 50 tripsina/substrato) foi usada para a digestão peptídica, realizada *overnight*. A extração do peptídeos foi conduzida com 5% ácido fórmico e os peptídeos foram concentrados (SPD1010 Integrated SpeedVac™ Systems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

As amostras foram diluídas em 0,1% ácido fórmico (0,7 µg proteína/µL), homogeneizadas e centrifugadas a 1.100 g por 5 minutos. Então, 4,5 µL do sobrenadante foram usados para separação em uma coluna C18 (100 µm x 100 mm, RP-nano UPLC column, Waters® nanoACQUITY UPLC®, Waters Corporation, Milford, MA, USA) acoplada a um espectrômetro de massas Q-ToF (Micromass® Q-ToF PREMIER® Mass Spectrometer, Waters Corporation, Milford, MA, USA) com fonte *nanoelectrospray* em um fluxo de 0,600 µL/minuto. Gradiente de acetonitrila (2-90%) em 0,1% ácido fórmico foi mantido por 60 minutos. A voltagem do *nanoelectrospray* foi de 3,5 kV, um cone de voltagem de 30 V e em uma temperatura de 100 µC. O

instrumento foi operado em *top three*, no qual um espectro de massas (MS) foi é adquirido, seguido por MS/MS dos 3 picos mais intensos. Após a fragmentação MS/MS, o íon foi mantido na lista de exclusão por 60s e para a análise da clivagem de peptídeos endógenos um tempo exclusão atual foi usado.

Os parâmetros de procura incluíram tripsina como protease e 1 clivagem máxima permitida; como modificação fixa a carbamidometilação da cisteína; e modificação variável a oxidação da metionina; tolerância de 0,1 Da para íons precursores (MS) e fragmentos (MS/MS), e massa molecular monoisotópica.

Os espectros foram adquiridos usando MassLynx™ v.4.1 software (Waters Corporation, Milford, MA, USA) e os dados brutos foram convertidos para o formato .mgf (mascot generic format), sem adição de *scans*, e procurados na base de dados UniprotSProt 10116 (<http://www.uniprot.org/>) taxonomy *Rhynchotus rufescens*, usando a ferramenta Mascot version 2.3.02 and Mascot Distiller MDRO version 2.4.0.0 (Matrix Science Inc, Boston, MA, USA). Os resultados foram submetidos ao Protein Pilot Software 4.0 program (AB Sciex, Framingham, USA) para fazer a análise dos dados, validar os peptídeos MS/MS e identificar as proteínas. Após a identificação, os dados foram inseridos no UniprotKB (www.uniprot.org.br) e Phanter (www.pantherdb.org) [25], para obter a ontologia gênica usando as categorias função molecular, processo biológico e componente celular. A quantidade relativa de cada proteína na mistura foi determinada pelo *exponentially modified protein abundance index* (emPAI) [26,27], obtido pelo software Mascot Distiller.

2.6. Análise estatística

Os resultados obtidos para as células espermáticas foram comparados entre os grupos mantidos com luz natural ou artificial. Para o plasma seminal, os resultados foram descritivos e não houveram comparações entre os grupos, já que o sêmen da espécie estudada tem um volume pequeno e com concentração espermática elevada [17].

Os resultados das células espermáticas foram normalizados. Para a normalização, os grupos no qual a amostra continha mais de 50% de expressão de uma proteína foi mantida; caso contrário, foram zeradas quando, apenas em um grupo, ou excluídas quando isso ocorreu nos dois grupos [28]. As variáveis foram winsorizadas [29], dividindo-se o emPAI de cada proteína pela somatória dos emPAIs da mesma proteína de todos os animais. Estes dados foram submetidos à análise multivariada,

usando-se cluster não-hierárquico no software *online* Metaboanalyst 3.0 [30]. A análise de componente principal (PCA) foi utilizada para descrever a formação dos grupos em uma matrix de escore. Também foi utilizada a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), o qual indicou a relevância de cada proteína na divisão dos grupos. O PSL-DA foi usado para calcular o escore de projeção das variáveis (*VIP score*). As proteínas com maior relevância foram consideradas, quando *VIP score* foi $\alpha \geq 1$ [31]. Os resultados do *VIP score* foram comparados aos *Volcano plot*, também gerado pelo mesmo software, e apenas as proteínas com resultados significativos nas duas análises foram discutidos.

2.7. Bioinformática

Para indicar a diferença no número de proteínas dos espermatozoides de acordo com os grupos luz natural e artificial foi usado o diagrama de Venn, construído online (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Foram construídos gráficos com as funções moleculares, processos biológicos e componente celular para as proteínas encontradas no plasma seminal e espermatozoides, usando o Phanter (www.pantherdb.org) [32]. Também foram elaborados interatomas com as proteínas encontradas no plasma seminal e células espermáticas pelo software (<https://string-db.org>) [33].

3. Resultados

Foram encontradas 28 proteínas no plasma seminal, 58 no extrato proteico dos espermatozoides com várias isoformas, sendo 10 comuns aos 2 tipos de amostras (Fig. 2). A *keratin* e isoformas foram as principais proteínas encontradas no plasma seminal e nos espermatozoides, observadas na maioria dos animais. Além disso, nos espermatozoides as proteínas *BHLH domain-containing protein*, *serum albumin*, *alpha-enolase*, *ferritin (fragment)*, *tissue factor pathway inhibitor 2 (fragment)* e *CCR4-NOT transcription complex subunit 1* foram frequentes nas amostras (Suplemento Tabela 1).

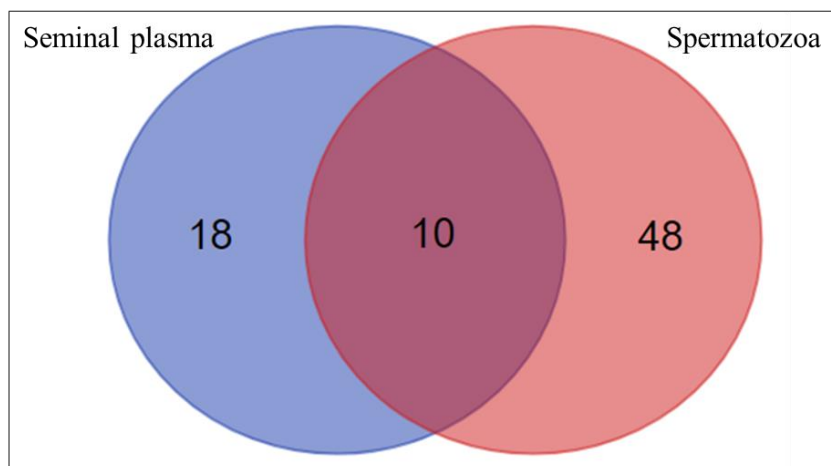


Fig. 2. Diagrama de Venn das proteínas encontradas no plasma seminal e espermatozoides de perdizes (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

As principais funções moleculares (*catalytic activity* e *binding*) foram similares nas amostras de plasma seminal e espermatozoides. Os principais processos biológicos nos quais as proteínas estão envolvidas também foram similares, sendo *cellular process* e *biological regulation*. Ademais, os principais componentes celulares foram similares nos dois tipos de amostras observados, *cell* e *cell part* (Fig. 3).

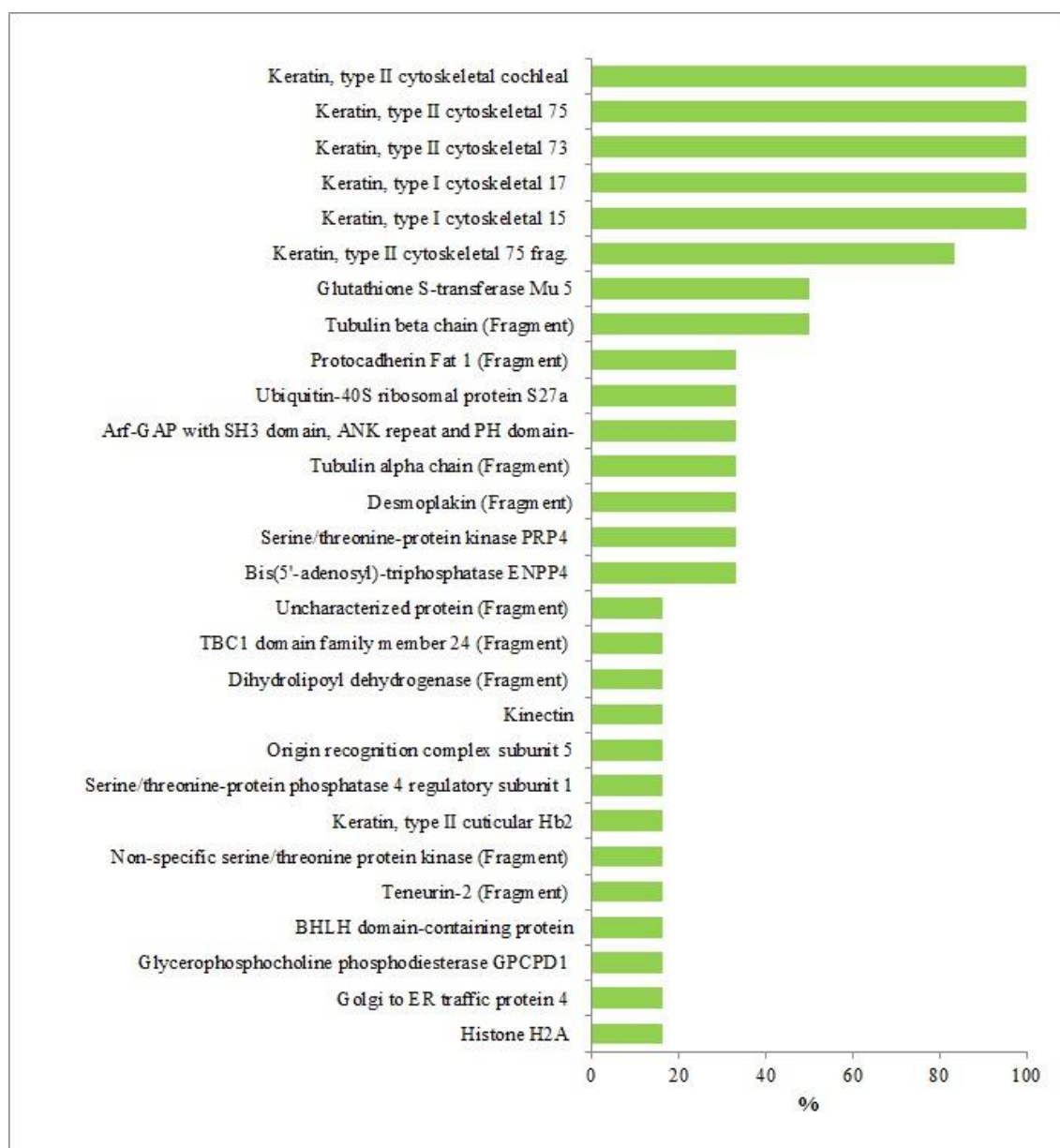


Fig. 3. Frequência (%) das proteínas encontradas no plasma seminal de perdizes.

Baseada nas análises de *Volcano plot* (Tabela 1) e na PLS-DA, representada pelo *VIP score* (Fig. 4), as proteínas *alpha-enolase*, *serum albumin*, *keratin, type II cytoskeletal cochleal (fragment)* e *ferritin (fragment)* foram encontradas em maior abundância no grupo de aves mantidas com luz natural. Já as proteínas *olfactory receptor (fragment)*, *tail-anchored protein insertion receptor WRB (fragment)*, *keratin, type II cytoskeletal 73 (fragment)* e *keratin, type II cytoskeletal 75 (fragment)* foram mais abundantes nas amostras colhidas das aves mantidas com luz artificial.

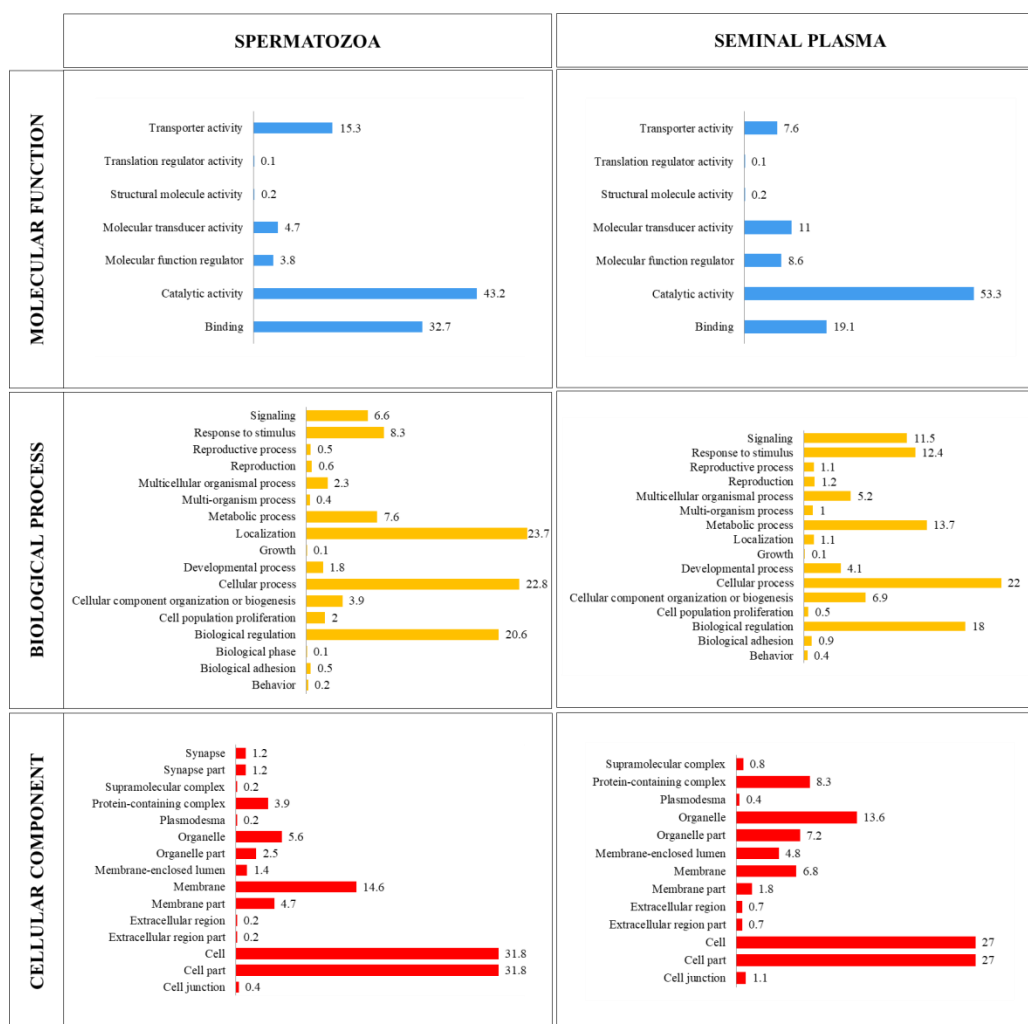


Fig. 3. Ontologia gênica das proteínas identificadas nas células espermáticas e plasma seminal de perdizes.

Tabela 1.

Resultados da análise *Volcano plot* para as comparações das proteínas espermáticas entre os grupos com luz natural ou artificial.

Protein	Fold change (FC)	Valor de P
Alpha-enolase	0.064	< 0.01
Keratin, type II cytoskeletal cochleal (Fragment)	0.076	0.02
Serum albumin	0.067	0.03
Ferritin (Fragment)	0.343	0.03
Keratin, type II cytoskeletal 4 (Fragment)	0.343	0.04
Keratin, type II cytoskeletal 73 (Fragment)	9.190	0.04
Keratin, type II cytoskeletal 75 (Fragment)	9.190	0.04
Olfactory receptor (Fragment)	10.499	0.05
Tail-anchored protein insertion receptor WRB (Fragment)	10.499	0.05

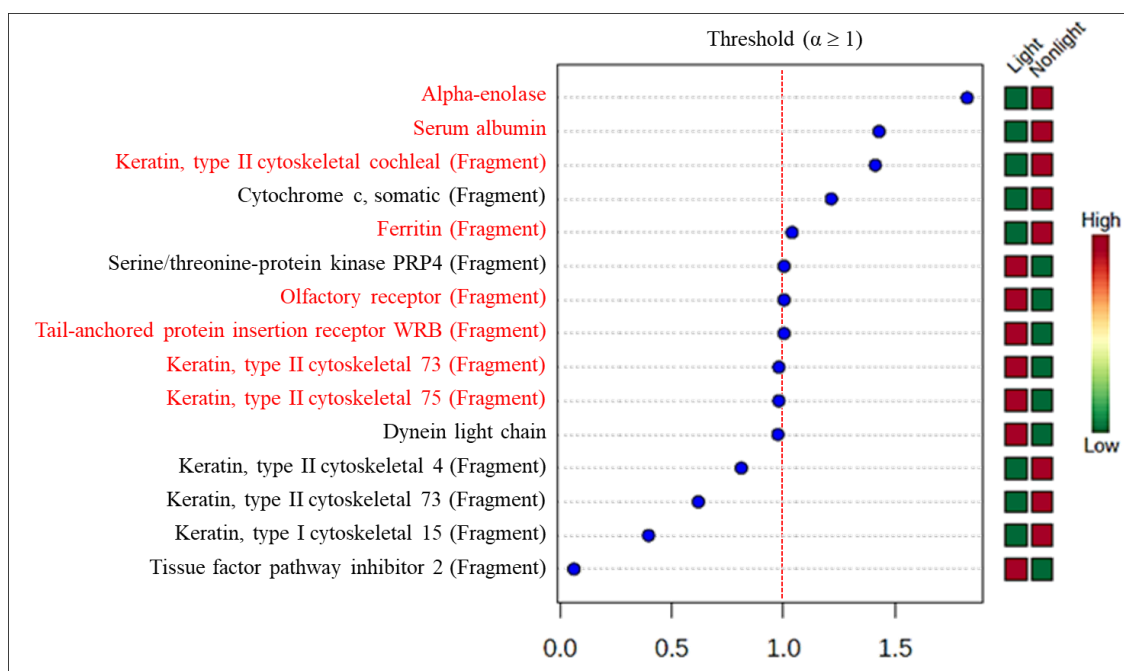


Fig. 4. Resultados da PLS-DA representado pelo VIP score das proteínas encontradas nos espermatozoides dos grupos estudados ($Q^2 = 0,52$ no PC1). Proteínas em vermelho foram também significativas na análise de *Volcano plot*.

4. Discussão

No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que descreveu as proteínas das células espermáticas e plasma seminal de perdizes (*Rhynchotus rufescens*). Neste estudo foram identificados um total de 87 proteínas entre o plasma seminal e extrato proteico dos espermatozoides com várias isoformas da *keratin* nos dois tipos de amostra. Foi determinado menor número de proteínas, porém, similares às outras aves, incluindo *ovotransferrin* e *gallinacin-10*, as quais são consideradas exclusivas das aves. Embora o plasma seminal tenha um papel fundamental na fisiologia espermática, atuando no estabelecimento da fertilidade, existem poucos estudos que descrevem a quantidade de proteínas e sua função no sêmen das aves [6,34–37]. A caracterização proteômica do plasma seminal foi recentemente realizada em duas espécies de frango [4,7,38] e peru [11], identificando as proteínas *ovotransferrin*, *gallinacin-9*, *chicken trypsin inhibitor CITI-1*, *CRISP*, *ferritin*, *albumin*, *transthyretin*, *hemopexin*, *immunoglobulin* e *pantetheinase* no plasma seminal destas espécies, podendo atuar como promotoras da eficiência reprodutiva dos machos.

Foi evidenciado que as proteínas com maior prevalência, tanto em plasma seminal como em células espermáticas foram as pertencentes a família das *keratin*, *type*

II cytoskeletal cochleal (fragment) e suas isoformas. No plasma seminal a variedade de proteínas foi descrita pela frequência e desta forma serão discutidas as principais. No caso do extrato proteico da membrana serão discutidos os resultados da análise multivariada, a qual foi usada para comparar os grupos mantidos com luz artificial e natural.

4.1. Espermatozoides

As proteínas das células espermáticas encontradas com maior abundância no grupo de aves mantidas com luz natural foram: *alpha-enolase*, *serum albumin*, *keratin*, *type II cytoskeletal cochleal (fragment)* e *ferritin (fragment)*. Já as aves mantidas em sistema de iluminação artificial, apresentaram maior abundância das seguintes proteínas *olfactory receptor (fragment)*, *tail-anchored protein insertion receptor WRB (fragment)*, *keratin, type II cytoskeletal 73 (fragment)* e *keratin, type II cytoskeletal 75 (fragment)*.

O VIP score determinou 15 proteínas importantes nos grupos estudados, sendo confirmadas diferenças significativas na análise de Volcano plot de 8 proteínas, que serão discutidas de acordo com suas funções.

A proteína *alpha-enolase*, é uma metaloenzima que atua na via glicolítica, tendo como função catalisar a conversão do ácido 2-fosfoglicérico em ácido fosfoenolpirúvico. Caracterizada como uma enzima glicolítica multifuncional, podendo estar presente no espermatozoide de humanos, camundongos e outros animais [39]. Abundante no citoplasma, superfície celular e núcleos [40]. Nos espermatozoides são encontradas com maior frequência em espermatozoides maduros, e em corpos citoplasmáticos residuais separados de espermátides alongados, podendo ser ausente em espermátócitos primários e espermátides redondos [41]. Sua principal função está relacionada com a motilidade espermática e metabolismo de energia [6]. Em bovinos, foi encontrada correlação positiva entre a *alpha-enolase* e a taxa de concepção relativa estimada [42] e já foi correlacionada com a fertilidade [43], motilidade [41] e quantidade de espermatozoides normais [44]. Nas aves estudadas foi encontrada em maior abundância naquelas mantidas com luz natural, o que poderia ser um mecanismo compensatório.

A *serum albumin*, é considerada uma das principais proteínas presente no plasma seminal de frango, podendo ser encontrada em quantidades mais elevadas na superfície dos espermatozoides de machos inférteis [7]. Ainda não foi demonstrado uma associação significativa entre albumina e motilidade espermática [45], contudo a adição

de *bovine serum albumin* no meio diluente para refrigeração do sêmen de perus aumentou a motilidade espermática e outros parâmetros da cinética espermática [46]. Estudos apontam que a albumina pode alterar a composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide pela troca lipídica ou hidrólise [47], e que a presença de albumina no testículo de humanos e no plasma seminal pode estar relacionada com sua capacidade de transportar andrógenos [48]. Em nosso estudo esta proteína esteve em maior abundância nos animais mantidos sem a presença de luz, sendo que este grupo apresentou características menores em características espermática, fato este que pode estar correlacionado a sua alta concentração nesses animais.

Os espermatozoides são altamente suscetíveis à peroxidação lipídica [49,50], processo pelo qual acontece a decomposição de ácidos graxos poliinsaturados localizados principalmente nos fosfolipídios da membrana espermática. A *ferritin* atua na homeostase e catalisação do ferro (transporte de íons ferro) [51–53]. O excesso de ferro leva a peroxidação lipídica o que causa dano a função testicular e espermatogênese [54,55]. O plasma seminal, por sua vez, contém proteínas que realizam a proteção dos espermatozoides contra a peroxidação promovida pelas altas concentrações de ferro [56–59]. A *ferritin* é encontrada nas células de Leydig, onde fornece uma camada de proteção às células germinativas [60]. A *ferritin* foi encontrada em maior abundância no grupo de aves submetidas a luz natural, o que pode predizer que estes animais estavam mais expostos a peroxidação lipídica.

Os animais que receberam iluminação artificial, expressaram outros tipos de proteínas, como a *olfactory receptor*. Os espermatozoides também expressam receptores olfatórios que podem estar envolvidos na quimiotaxia, que está envolvida na migração do espermatozoide até a tuba uterina, local da fertilização [61–63]. A quimiotaxia espermatozoide-ovócito, é um mecanismo já demonstrado em humanos e animais [64]. Assim, sugerimos que a adição de luz artificial estimula a produção da *olfactory receptor* e pode ter como consequência a maior fecundidade nas fêmeas, devido a capacidade de direcionamento do espermatozoide até o ovócito.

No grupo dos animais mantidos sobre luz artificial foi encontrada em maior abundância a *tail-anchored protein insertion receptor WRB*, que é uma proteína que realiza a inserção de outras proteínas na membrana do retículo endoplasmático do espermatozoide. Aproximadamente 5% de todas as proteínas da membrana dos seres eucariotos podem ser sinalizadas como alvos no retículo endoplasmático e esta função é atribuída *carboxy-terminal transmembrane*, que após a conclusão da síntese proteica

emerge do túnel de saída do ribossomo não sendo reconhecida pela partícula de reconhecimento de sinal [65]. Essa proteína tem como função principal facilitar processos celulares mediados por proteínas ancoradas na cauda espermática, incluindo fusão de vesículas, inserção de proteínas de membrana e apoptose [66]. A capacidade de inserção de novas proteínas a célula nos leva a crer que a *tail-anchored protein insertion receptor WRB* pode ser benéfica a célula, uma vez que a mesma pode inserir proteínas com capacidade de proteção a célula, sendo esta proteína identificada nas aves tratadas com iluminação artificial.

As proteínas estruturais localizadas no citoesqueleto foram *keratin, type II cytoskeletal cochleal (fragment)*, *keratin, type II cytoskeletal 73 (fragment)* e *keratin, type II cytoskeletal 75 (fragment)*. A *cytoskeletal type II* é uma proteína com característica de neutra a básica com 56-70 kDa. É sabido, que a *keratin, type II cytoskeletal 5 (fragment)* está presente no flagelo do espermatozoide [67,68], fazendo parte da composição das fibras densas [69], tendo função de manter a estrutura celular [67,68]. É importante entender a crescente lista de funções regulatórias das queratinas não podem ser separadas do aspecto estrutural do seu citoesqueleto [70].

4.2. Plasma seminal

Na avaliação do plasma seminal, os resultados foram apenas descritivos, devido pequeno volume e concentração espermática elevada, não sendo possível avaliar o efeito do tratamento da luz artificial. Das 28 proteínas identificadas, consideramos as de maior abundância para serem exploradas neste estudo, aquelas que foram encontradas em pelo menos 50% das aves, sendo estas *keratin, type II cytoskeletal 75 frag.*, *keratin, type I cytoskeletal 15*, *keratin, type I cytoskeletal 17*, *keratin, type II cytoskeletal 73*, *keratin, type II cytoskeletal 75*, *keratin, type II cytoskeletal cochleal*, *Tubulin beta chain (Fragment)*, *Glutathione S-transferase Mu 5*. Como as *keratin* já foram descritas anteriormente, descreveremos as demais.

A *tubulin beta chain (Fragment)* é uma proteína responsável por produzir energia a célula, além de atuar especificamente na regulação da espermatogênese, ainda garante os movimentos por meio de adaptação do citoesqueleto [71]. Com várias modificações pós-traducionais, como a acetilação, que está ligado a motilidade espermática [72]. Assim, a *tubulin* desempenha um papel fundamental na funcionalidade da cauda do espermatozoide [73]. E quando ocorre a inibição da β -

tubulin, a frequência do batimento flagelar diminui, interrompendo a interação da cabeça da *tubulin-dynein* [74].

Ainda não se tem estudos que relatam a verdadeira função da *glutathione S-transferase Mu 5*, porém, [75] mostraram evidência de que a *glutathione S-transferase* esta presente na membrana plasmática da cauda do espermatozoide epididimário, por meio de interações não covalentes periféricas. Recentemente, foi evidenciado que a *glutathione S-transferase Mu 3* pode atuar na capacitação espermática, reação acrossomal e fertilização [76].

Este estudo identificou e descreveu as principais proteínas das células espermáticas e plasma seminal de perdizes (*Rhynchotus rufescens*), identificando a função como possível marcador de fertilidade, e evidenciando que as proteínas encontradas em animais mantidos em sistema de iluminação artificial apresentam potencial de preservação das células quando comparado a luz natural. Ademais, a perdiz (*Rhynchotus rufescens*) apresenta perfil de proteínas do plasma seminal e espermatozoides similares as aves domésticas.

5. Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [Processo nº145578, 2017] pela concessão da bolsa de estudos e ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, (LNBio), do CNPEM, Campinas, Brasil, pelo suporte na técnica de espectrometria de massas.

6. Referências

- [1] Etches RJ. T The male. In: Etches RJ, editors. Reproduction in Poultry, Oxford: CAB International; 1996, p. 208–233.
- [2] Fujihara N. Accessory reproductive fluids and organs in male domestic birds. Worlds Poult Sci J 1992;48:39–56. <https://doi.org/10.1079/wps19920005>.
- [3] WISHART GJ. Semen quality and semen storage. Biol. Breed. Poult., 2009, p. 151–178.
- [4] Marzoni M, Castillo A, Sagona S, Citti L, Rocchiccioli S, Romboli I, et al. A proteomic approach to identify seminal plasma proteins in roosters (*Gallus gallus domesticus*). Anim Reprod Sci 2013;140:216–23. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.06.009>.

- [5] Michailidis G, Avdi M. Transcriptional profiling of gallinacins antimicrobial peptides in the chicken reproductive tract and embryos. *J Biol Res* 2010;14:211–8.
- [6] Froman DP, Feltmann AJ, Pendarvis K, Cooksey AM, Burgess SC, Rhoads DD. Physiology and endocrinology symposium: A proteome-based model for sperm mobility phenotype. *J Anim Sci* 2011;89:1330–7. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3367>.
- [7] Labas V, Grasseau I, Cahier K, Gargaros A, Harichaux G, Teixeira-Gomes AP, et al. Qualitative and quantitative peptidomic and proteomic approaches to phenotyping chicken semen. *J Proteomics* 2015;112:313–35. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.024>.
- [8] Borziak K, Álvarez-Fernández A, Karr TL, Pizzari T, Dorus S. The Seminal fluid proteome of the polyandrous Red junglefowl offers insights into the molecular basis of fertility, reproductive ageing and domestication. *Sci Rep* 2016;6:1–15. <https://doi.org/10.1038/srep35864>.
- [9] Inyawilert W, Chanthi S, Liao YJ, Phinyo M, Tang PC, Nfor ON, et al. Age-related difference changes semen quality and seminal plasma protein patterns of Thai native rooster. *Int J Agric Technol* 2019;15:287–96.
- [10] Rowe M, Whittington E, Borziak K, Ravinet M, Eroukhmanoff F, Sætre GP, et al. Molecular Diversification of the Seminal Fluid Proteome in a Recently Diverged Passerine Species Pair. *Mol Biol Evol* 2020;37:488–506. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz235>.
- [11] Stowińska M, Koztowski K, Jankowski J, Ciereszko A. Proteomic analysis of white and yellow seminal plasma in turkeys (*Meleagris gallopavo*). *J Anim Sci* 2015;93:2785–2795. <https://doi.org/doi:10.2527/jas2015-8912>.
- [12] Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A proteomic approach. *J Androl* 2006;27:201–11. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05089>.
- [13] Drabovich AP, Jarvi K, Diamandis EP. Verification of male infertility biomarkers in seminal plasma by multiplex selected reaction monitoring assay. *Mol Cell Proteomics* 2011;10:1–14. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.004127>.
- [14] Vilagran I, Yeste M, Sancho S, Castillo J, Oliva R, Bonet S. Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates

- and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology* 2015;3:345–56. <https://doi.org/10.1111/andr.12009>.
- [15] Moro MEG. Desempenho e características de carcaça de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas com diferentes programas de alimentação na fase de crescimento. 1996. 75 p. Tese (Doutorado em Zootecnia, Área de concentração em Produção Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 1996.
- [16] Cavalcante AKS. Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro: Comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados. 2006. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- [17] Góes PAA, Cavalcante AKS, Tavian AF, Felipe L, Santos EC, Nichi M, et al. Análise espermática de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2011;48:370–7. doi: 10.11606/S1413-95962011000500003.
- [18] Dogliero A, Rota A, Lo R, Degerfeld MM Von, Quaranta G. Semen evaluation in four autochthonous wild raptor species using computer-aided sperm analyzer. *Theriogenology* 2016;85:1113–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.023>.
- [19] Peach M, Marsh N, Macphee DJ. Chapter 4 Protein Solubilization : Attend to the Choice of Lysis Buffer. *Methods Mol Biol* 2012;869:37–47. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4>.
- [20] Souza FF, Chirinéa VH, Martins MIM, Lopes MD. Osteopontin in seminal plasma and sperm membrane of dogs. *Reprod Domest Anim* 2009;44:283–6. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01447.x>.
- [21] Neuhoff V, Stamm R, Eibl H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 1985;6:427–48. <https://doi.org/10.1002/elps.1150060905>.
- [22] Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988;9:255–62. <https://doi.org/10.1002/elps.1150090603>.

- [23] Luo S, Wehr NB, Levine RL. Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green. *Anal Biochem* 2006;350:233–8. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.10.048>.
- [24] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850–8. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>.
- [25] Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, et al. PANTHER version 11: Expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res* 2017;45:D183–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1138>.
- [26] Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:1265–72. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200>.
- [27] Shinoda K, Tomita M, Ishihama Y. emPAI Calc-for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bioinformatics* 2009;26:576–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp700>.
- [28] Royston P. Multiple imputation of missing values. *The Stata Journal* 2005;5:527–36. doi:10.1177/1536867x0400400301.
- [29] Ghosh D, Vogt A. Outliers: An Evaluation of Methodologies. *Jt Stat Metings* 2012;3455–60.
- [30] Xia J, Wishart DS. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinforma* 2016;14:1–14. <https://doi.org/10.1002/cpbi.11>.
- [31] Checa A, Bedia C, Jaumot J. Lipidomic data analysis: Tutorial, practical guidelines and applications. *Anal Chim Acta* 2015;885:1–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.068>.
- [32] Mi H, Muruganujan A, Ebert D, Huang X, Thomas D. PANTHER version 14 : more genomes , a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res* 2019;47:419–26. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1038>.
- [33] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al.

- STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D607–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>.
- [34] Douard V, Hermier D, Labbe C, Magistrini M, Blesbois B. Role of seminal plasma in damage to turkey spermatozoa during in vitro storage. *Theriogenology* 2005;63:126–37. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.020>.
- [35] Harris Jr, GC, Sweeney MJ. Changes in the protein concentration of chicken seminal plasma after rapid freeze–thaw. *Cryobiology* 1971;7:209–215. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(70\)90023-4](https://doi.org/10.1016/0011-2240(70)90023-4).
- [36] Lake PE, Hatton M. Free amino acids in the vas deferens, semen, transparent fluid and blood plasma of the domestic rooster, *Gallus domesticus*. *J Reprod Fert* 1968;15:139–143. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0150139>.
- [37] Lessley B, Brown K. Purification and Properties of a Proteinase from Chicken Seminal Plasm. *Biol Reprod* 1978;19:223–34. <https://doi.org/10.1095/biolreprod19.1.223>.
- [38] Atikuzzaman M, Sanz L, Pla D, Alvarez- M, Rub M, Wright D, et al. Selection for higher fertility reflects in the seminal fluid proteome of modern domestic chicken. *Genomics and Proteomics* 2017;1–50. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2016.10.006>.
- [39] Ji H, Wang J, Guo J, Li Y, Lian S, Guo W, et al. Progress in the biological function of alpha-enolase. *Anim Nutr* 2016;2:12–7. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.02.005>.
- [40] Pancholi V, Fischetti V. α -Enolase, uma nova proteína forte de ligação à plasmina (ogêni) da superfície dosestreptococos patogênicos. *J Biol Chem* 1998;273:14503 – 14515.
- [41] Gitlits VM, Hock B, Lakoski K, SENTRY JW. The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules. *Eur J Cell Biol* 2000;79:104–11. Doi: 10.1078/S0171-9335(04)70012-6.
- [42] Soggiu A, Piras C, Ahmed H, Canio M De, Gaviraghi A, Galli A, et al. Unravelling the bull fertility proteome. *Mol Biosyst* 2013;9:1188–95. <https://doi.org/10.1039/c3mb25494a>.
- [43] Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions.

- Theriogenology 2010;74:956–67.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.025>.
- [44] Force A, Viallard J, Grizard G, Boucher D. Enolase Isoforms Activities in Spermatozoa From Men With Normospermia and Abnormospermia. *J Androl* 2002;23:202–10. DOI:10.1002/j.1939-4640.2002.tb02616.x.
 - [45] Lindholmer C, Carlstrom A, Eliasson R. Occurrence and Origin of Proteins'in Human Seminal Plasma with Special Reference to Albumin. *Andrologia* 1974;6:181–96. DOI:10.1111/j.1439-0272.1974.tb01619.x.
 - [46] Bakst MR, Cecil HC. Effect of bovine serum albumin on motility and fecundity of turkey spermatozoa before and after storage. *J Reprod Fert* 1992;94:287–93. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0940287>.
 - [47] Go K, Wolf D. Albumin-Mediated Changes in Sperm Sterol Content During Capacitation ' tract which. *Biol Reprod* 1985;32:145–53. <https://doi.org/10.1095/biolreprod32.1.145>.
 - [48] Orlando C, Casano R, Barni T, Serio M, Balboni GC. Immunologically reactive albumin-like protein in human testis and seminal plasma. *J Reprod Fert* 1988;83:687–92. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0830687>.
 - [49] Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979;31:531–7. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)43999-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)43999-3).
 - [50] Mann T, Jones R, Sherins R. Oxygen damage, lipid peroxidation and motility of spermatozoa. *Testic. Dev. Struct. Funct.*, 1980, p. 497–501.
 - [51] Pleban P, De-Shen M. Trace elements in human seminal plasma and spermatozoa. *Clin Chim Acta*, 1983;133:43–50. DOI: 10.1016/0009-8981(83)90019-0.
 - [52] Stankovic H, Dusanka M-D. Zinc and copper in human semen. *Clin Chim Acta* 1976;70:123–6. doi: 10.1016/0009-8981(76)90013-9.
 - [53] Skandhan K, Mazumdar B. Semen copper in normal and infertile subjects. *Specialia* 1979;35:877–878. <https://doi.org/10.1007/BF01955124>.
 - [54] Merker H-J, Vormann J, Gunther T. Iron-induced injury of rat testis. *Andrologia* 1996;28:267–73. Doi: 10.1111/j.1439-0272.1996.tb02795.x.
 - [55] Lucesoli F, Caligiuri M, Roberti MF, Perazzo JC, Fraga CG. Dose-dependent increase of oxidative damage in the testes of rats subjected to acute iron overload.

- Arch Biochem Biophys 1999;372:37–43. Doi: 10.1006/abbi.1999.1476
- [56] Jones R, Mann T. Lipid peroxides in spermatozoa; formation, role of plasmalogen, and physiological significance. R Soc 1976;193:317–33. Doi: 10.1098/rspb.1976.0050.
- [57] Dawra R, Sharma O, Makkar H. Lipid peroxidation in bovine semen. Int J Fertil 1983;28:231–4.
- [58] Dawra R, Sharma O, Makkar H. Evidence for a novel antioxidant in bovine seminal plasma. Biochem Int 1984;8:655–9.
- [59] Kwenang A, Kroos MJ, Koster JF, Eyk HGV. Iron, ferritin and copper in seminal plasma. Hum Reprod 1987;2:387–8. Doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136555.
- [60] Wise T, Lunstra DD, Rohrer GA, Ford JJ. Relationships of testicular iron and ferritin concentrations with testicular weight and sperm production in boars. J Anim Sci 2003;81:503–11. Doi: 10.2527/2003.812503x.
- [61] Milardi D, Colussi C, Giuseppe G, Vincenzoni F, Pierconti F, Mancini F, et al. Olfactory receptors in semen and in the male tract: from proteome to proteins. front endocrinol (Lausanne) 2018;8:1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00379>.
- [62] Zuccarello D, Ferlin A, Garolla A, Menegazzo M, Perilli L, Ambrosini G, et al. How the human spermatozoa sense the oocyte: a new role of SDF1-CXCR4 signalling. Int J Androl 2011;34:e554–e565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01158.x>.
- [63] Guerrero A, Wood D, Nishigaki T, Carneiro J, Darszon A. Tuning sperm chemotaxis. Biochem Soc Trans 2010;38:1270–4. <https://doi.org/10.1042/BST0381270>.
- [64] Spehr M, Schwane K, Riffell JA, Zimmer RK, Hatt H. Odorant receptors and olfactory-like signaling mechanisms in mammalian sperm. Mol Cell Endocrinol 2006;250:128–36. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.035>.
- [65] Stefanovic S, Hegde RS. Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. Cell 2007;128:1147–59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.036>.
- [66] Denic V, Dötsch V, Sinning I. Endoplasmic reticulum targeting and insertion. cold Spring Harb Perspect Biol 2013;5:1–11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013334>.

- [67] Calvin H. Selective incorporation of selenium-75 into a polypeptide of the rat sperm tail. J Exp Zool 1978;204:445–452. <https://doi.org/10.1002/jez.1402040315>.
- [68] Hinsch E, Boehm JG, Groeger S, Hinsch K-D. Identification of cytokeratins in bovine sperm outer dense fibre fractions. Reprod Dom Anim 2003;38:155–60.
- [69] Lindemann C, Kanous K. Regulation of mammalian sperm motility. Arch Androl 1989;23:1–22. Doi: 10.3109/01485018908986783.
- [70] Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE. Structural and regulatory functions of keratins. ScienceDirect 2007;313:2021 – 2032. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.005>.
- [71] Sperry A. The dynamic cytoskeleton of the developing male germ cell. Biol Cell 2012;104:297–305. <https://doi.org/10.1111/boc.201100102>.
- [72] Bhagwat S, Sc M, Dalvi V, Sc M, Chandrasekhar D, Sc M, et al. Acetylated α -tubulin is reduced in individuals with poor sperm motility. Fertil Steril 2014;101:95-104.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.016>.
- [73] Mohri H. Amino-acid Composition of “Tubulin” constituting Microtubules of Sperm Flagella. Nature 1968;217:1053–4. <https://doi.org/10.1038/2171053a0>.
- [74] Audebert Â, White D, Cosson J, Huitorel P, Edde B, Gagnon C. The carboxy-terminal sequence Asp427±Glu432 of α -tubulin plays an important function in axonemal motility. Eur J Biochem 1999;261:48–56.
- [75] Hemachand T, Chandrima S. Functional role of sperm surface glutathione S -transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. FEBS Lett 2003;538:14–8. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00103-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00103-0).
- [76] Kumar R, Singh VK, Atreja SK. Theriogenology Glutathione-S-transferase : Role in buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm capacitation and cryopreservation. Theriogenology 2014;81:587–98. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.11.012>.

SUPLEMENTO

Suplemento Tabela 1.

Proteínas encontradas no plasma seminal e espermatozoides e plasma seminal de perdizes.

Proteína	Gene	Espermatozoide	Plasma seminal
Actin, alpha skeletal muscle (Fragment)	N309_08916	X	--
Actin-related protein 2 (Fragment)	N309_15374	X	--
Adenylate cyclase type 10 (Fragment)	N309_03525	X	--
Alpha-2-macroglobulin (Fragment)	N309_00964	X	--
Alpha-enolase	N309_11411	X	--
Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	N309_15033	--	X
BHLH domain-containing protein	N309_00379	X	X
Bis (5'-adenosyl)-triphosphatase ENPP4	N309_04227	--	X
Canalicular multispecific organic anion transporter 2	N309_10781	X	--
CAP-Gly domain-containing linker protein 1	N309_05961	X	--
CCR4-NOT transcription complex subunit 1	N309_05766	X	--
CD59 glycoprotein	N309_03519	X	--
Cytochrome c, somatic (Fragment)	N309_09085	X	--
Desmin	N309_05878	X	--
Desmoplakin (Fragment)	N309_10145	--	X
Dihydrolipoyl dehydrogenase (Fragment)	N309_06010	--	X
Dynein light chain	N309_13414	X	--
E3 ubiquitin-protein ligase Hakai	N309_06008	X	--
EH domain-containing protein 4 (Fragment)	N309_02715	X	--
Exportin-1	N309_07414	X	--
FERM domain-containing protein 4B	N309_00687	X	--
Ferritin (Fragment)	N309_07659	X	--
Gallinacin-10	N309_08243	X	--
Gamma-enolase (Fragment)	N309_14082	X	--
Glutathione S-transferase Mu 5	N309_11672	--	X
Glycerophosphocholine phosphodiesterase GPCPD1	N309_13881	--	X
Golgi to ER traffic protein 4	N309_08966	--	X
Histone H2A	N309_01409	--	X
Ig heavy chain V-III region VH26	N309_07857	X	--
Keratin, type I cytoskeletal 15	N309_06055	X	X
Keratin, type I cytoskeletal 17	N309_08649	X	X
Keratin, type II cuticular Hb2	N309_04728	--	X

Keratin, type II cytoskeletal 4 (Fragment)	N309_04676	X	--
Keratin, type II cytoskeletal 73	N309_04723	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 75	N309_04726	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 75 frag.	N309_04726	X	X
Keratin, type II cytoskeletal cochleal	N309_04729	X	X
Kinectin	N309_06236	--	X
L-lactate dehydrogenase (Fragment)	N309_13801	X	--
Macrophage mannose receptor 1 (Fragment)	N309_03050	X	--
MutS protein 4	N309_13735	X	--
Nesprin-1	N309_13349	--	X
Non-specific serine/threonine protein kinase	N309_10726	X	X
Non-specific serine/threonine protein kinase (Fragment)	N309_10726	X	--
Non-specific serine/threonine protein kinase (Fragment)	N309_11074	X	--
Nucleoside diphosphate kinase (Fragment)	N309_04373	X	--
Olfactory receptor	N309_13875	X	--
Opioid-binding protein/cell adhesion molecule	N309_12446	X	--
Origin recognition complex subunit 5	N309_11178	--	X
Ovotransferrin (Fragment)	N309_04481	X	--
Pleckstrin homology domain-containing family F member 1	N309_05665	X	--
Polyubiquitin-C (Fragment)	N309_13490	X	--
Protein FAM98A	N309_02365	X	--
Protein LAP2 (Fragment)	N309_15515	X	--
Protocadherin Fat 1 (Fragment)	N309_05808	--	X
Putative E3 ubiquitin-protein ligase HERC1	N309_04298	X	--
Pyruvate kinase (Fragment)	N309_00638	X	--
Selenium-binding protein 1	N309_02350	X	--
Serine/threonine-protein kinase PRP4	N309_07214	X	X
Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 1	N309_11365	--	X
Serum albumin	N309_13689	X	--
Structural maintenance of chromosomes protein 6	N309_04416	X	--
Superoxide dismutase [Cu-Zn] (Fragment)	N309_13193	X	--
Syntabulin	N309_05099	X	--
TBC1 domain family member 24 (Fragment)	N309_11369	--	X
Teneurin-2 (Fragment)	N309_12499	--	X
Tissue factor pathway inhibitor 2 (Fragment)	N309_07851	X	--

Trafficking kinesin-binding protein 2	N309_05370	X	--
Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6	N309_14084	X	--
Triosephosphate isomerase (Fragment)	N309_05815	X	--
Tropomyosin alpha-1 chain	N309_02554	X	--
Tubulin alpha chain (Fragment)	N309_01351	--	X
Tubulin beta chain (Fragment)	N309_10738	--	X
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	N309_07585	X	X
Vascular endothelial growth factor A	N309_11054	X	--
V-type proton ATPase subunit a	N309_08249	X	--
Zinc finger protein 488	N309_08916	X	--

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos foi verificar a eficiência do tratamento com luz artificial durante o período reprodutivo do macho de perdiz (*Rynchotus rufescens*). O efeito da adição da luz conseguiu promover um prolongamento no período do reprodutivo dos machos, e consequente mantendo a produção espermática até o final da estação, correspondente a setembro a março.

Ademais, no estudo da proteômico foram identificadas 28 proteínas no plasma seminal e 58 no extrato proteico dos espermatozoides e suas isoformas. Podendo identificar diferentes tipos de proteínas nas aves mantidas com iluminação artificial e luz natural.

Desta forma, ambos os estudos foram promissores para a criação de perdiz (*Rynchotus rufescens*), por se tratarem de estudos inovadores e até mesmo inéditos, como o de proteômica. Servindo também, como banco de referência na literatura e produção e criação comercial da espécie.