

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/08/2021.

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 Fã. 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 Cavalero 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.

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 domesticas.

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 Meetings* 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/https://doi.org/10.1016/0011-2240\(70\)90023-4](https://doi.org/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/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 dos estreptococos 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 HG. 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>.

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.