

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

**PROTEOMA DO PLASMA SEMINAL, FLUIDO EPIDIDIMÁRIO E DOS
ESPERMATOZOIDES COLHIDOS DO EJACULADO E DA CAUDA DO
EPIDÍDIMO DE TOUROS**

DANIEL SAMITH SALGADO CÁRDENAS

Botucatu - SP

Abril/2017

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

**PROTEOMA DO PLASMA SEMINAL, FLUIDO EPIDIDIMÁRIO E DOS
ESPERMATOZOIDES COLHIDOS DO EJACULADO E DA CAUDA DO
EPIDÍDIMO DE TOUROS**

DANIEL SAMITH SALGADO CÁRDENAS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
a Defesa de Mestrado do Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Ferreira
de Souza

Botucatu – SP
Abril/2017

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

Cárdenas, Daniel Samith Salgado.

Proteoma do plasma seminal, fluido epididimário e dos espermatozoides colhidos do ejaculado e da cauda do epidídimo de touros / Daniel Samith Salgado Cárdenas. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Fabiana Ferreira de Souza

Capes: 50504002

1. Touro. 2. Sêmen. 3. Espermatozoides. 4. Epidídimo. 5. Proteômica. 6. Reação acrossômica.

Palavras-chave: Capacitação; Célula-espermática; Epidídimo; Proteômica; Reação-acrossomo.

Nome do autor: Daniel Samith Salgado Cárdenas

PROTEOMA DO PLASMA SEMINAL, FLUIDO EPIDIDIMÁRIO E DOS
ESPERMATOZOIDES COLHIDOS DO EJACULADO E DA CAUDA DO
EPIDÍDIMO DE TOUROS

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e orientadora

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

Profa. Dra. Lucilene Delazari Dos Santos

Membro

Departamento Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos
(CEVAP) - UNESP - Botucatu /SP

Dra. Priscilla Nascimento Guasti

Membro

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

Data da Defesa: 24 de Abril de 2017.

Dedico

*A os meus pais, pela oportunidade da vida, pelo incentivo ao estudo, pelo
amor, carinho e respeito.*

Minha filha que vem em caminho, que é o mais precioso que deus me deu.

Minha irmã pelo apoio incondicional.

*À mim, por realmente acreditar que os sonhos são possíveis de cumprir e de
fazer-se realidade.*

AGRADECIMENTOS

Chegou o momento de escrever e relatar em poucas palavras e escrever em algumas folhas, tantos sentimentos, vivencia aprendidas e experiências de estes anos, desde que se iniciou á ilusão e o sonho de cursar meus estudos de mestrado. Tenho em minha mente tantas coisas que lembrar gratos momentos vividos e também de momentos difíceis como meu trabalho de laboratório.

Foram muitas as pessoas que contribuíram para que eu conseguira este objetivo, por isso eu quero expresar meus agradecimentos.

A Deus por me permitir fazer uma realidade este sonho e pela perseverância que me deu para poder alcançar esta meta, que desde que era uma criança sonhava em fazer um Mestrado, que me tem permitido crescer pessoal e profissionalmente.

A meus pais. Por seu apoio incondicional durante toda minha vida, por seus sábios conselhos, seus ensinamentos, sua formação em valores e por estar sempre ali para que este sonho não falhasse ante as dificuldades, por permitirme ter tido a experiência de viver neste lindo país, e por ter conhecido a tantas maravilhosas pessoas ao longo de minha estadía, amigos que levo no meu coração com infinito carinho.

A minha irmã. Por sua companhia, apoio e por estar me incentivando cada etapa, cada momento de felicidade ou dificuldade, por estos momentos compartilhados na distância de este sonho vivido em Brasil.

Aos familiares, minha namorada Marcela Betin e amigos, que não participaram diretamente deste trabalho, mas que sempre me apoiaram incondicionalmente desde á distancia, para eu ter forças para não desistir e continuar com meus sonhos.

A professora Eunice Oba pela oportunidade que me deu de fazer o mestrado, meus mais sinceros e profundos agradecimentos.

A professora Fabiana Ferreira de Souza. Agradeço pela incansável dedicação e valiosa contribuição na minha formação, por dar-me a oportunidade de iniciar meus estudos de Mestrado, por seus ensinamentos, seu constante apoio científico e confiança no desenvolvimento do meu trabalho de dissertação, é para mim um orgulho de ter como orientadora a uma excelente pessoa, mãe e grande investigadora.

Ao professor Angelo Gardim de Cesar por facilitarme os animais para a colheita do material necessário para a realização do meu projeto, por que pessoas como ele fizeram a diferença para que meu sonho de ser Mestre seja uma realidade de vida.

A Dra Bertha Irina Gastelbondo Pastrana, por contribuir a que este projeto hoje seja uma realidade e por esse apoio a não desistir.

Ao grupo de Pesquisa da Reprodução Animal, pelo apoio durante a realização desse trabalho. Aos incríveis colegas Viviana, Carol, Laiza, que fizeram tudo ser mais fácil e animado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA _r	Ácido ribonucleico ribossomal
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MiRNA	Micro ácido ribonucleico
PGs	Prostaglandinas
pH	Potencial hidrogeniônico, escala logarítmica que mede o grau de acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma determinada solução
AMP _c	Adenosina monofosfato cíclico
EROS	Espécie reativa de oxigênio
TP	Proteínas de transição nuclear
HBP	Proteínas de ligação a heparina
OPN	Osteopontina
BSP	Proteína do plasma seminal bovino, Proteínas de ligação espermática
aSFP	Proteína ácida do fluido seminal
pI	Ponto isoelétrico
PLA-2	Fosfolipase A2
SPLN	Plasma seminal
GAG	Glicosaminoglicanos
HDL	Lipoproteína de alta densidade
ELSPBP1	Proteína ligadora do espermatozoide epididimal
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
BLVRA	Biliverdina reductase A
ADAM	Disintegrina A and metaloprotease
MDC	Disintegrina metaloprotease rica em cisteína
RA	Reação acrossomal
PDGS	Prostaglandina D-sintetase tipo Lipocalina
SPP1	Fosfoproteína secretória 1

SUMARIO

CAPÍTULO 1.....	
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Características morfológicas e fisiológicas das células espermáticas	2
2.2. Síntese proteica na célula espermática.....	4
2.3. O epidídimo	6
2.3.1. Transporte dos espermatozoides no epidídimo.....	6
2.3.2. Maturação espermática no epidídimo	7
2.3.3. Armazenamento de espermatozoides no epidídimo.....	8
2.3.4. Proteção dos espermatozoides no epidídimo.....	9
2.3.5. Fluido epididimário.....	10
2.4. Glândulas sexuais acessórias.....	10
2.5. Formação e componentes do ejaculado	11
2.6. Proteômica espermática e dos fluidos do trato reprodutor masculino	11
2.6.1. Proteínas espermáticas	12
2.6.2. Proteínas flagelares	14
2.6.3. Proteínas do fluido epididimário	15
2.6.4. Proteínas do plasma seminal.....	18
REFERÊNCIAS.....	23
HIPÓTESE.....	37
OBJETIVO GERAL	37
OBJETIVOS ESPECIFICOS	37
 CAPÍTULO 2.....	
ARTIGO	36
RESUMO	37
ABSTRACT	38
1. Introdução	39
2. Material e métodos.....	40
2.1. Reagentes	40
2.2. Aspectos éticos.....	40
2.3. Animais.....	40
2.4. Colheita dos espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo	40
2.5. Análise seminal.....	41

2.6. Preparação das amostras para análise de proteínas	41
2.8. Precipitação de proteínas em acetona.....	42
2.9. Digestão trípica dos peptídeos e espectrometria de massas	42
Análise estatística.....	44
3. Resultados	45
4. Discussão.....	53
Referências.....	62

RESUMO

SALGADO, D. S. PROTEOMA DO PLASMA SEMINAL, FLUIDO EPIDIDIMÁRIO E DOS ESPERMATOZOIDES COLHIDOS DO EJACULADO E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE TOUROS. Botucatu – SP. 2017, p. 102. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

As proteínas dos fluido e células do sistema reprodutor são constantes objetos de estudo, a fim de elucidar eventos fisiológicos e buscar biomarcadores das funções reprodutivas, facilitando a escolha de reprodutores. Em vista disso, este estudo objetivou caracterizar as proteínas dos espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo, do plasma seminal e do fluido epididimário de touros. Foram utilizados 10 touros adultos da raça Brangus. O sêmen foi colhido por eletroejaculação e, posteriormente os machos foram orquiectomizados para a colheita dos espermatozoides e fluido do epidídimo. As células do ejaculado e da cauda do epidídimo foram analisadas subjetivamente após a colheita, e o plasma seminal e fluido do epidídimo foram separados por centrifugação. Então, as amostras foram preparadas para a espectrometria de massas (ESI-QToF MS/MS), com um pool de cada grupo. A concentração de proteínas totais não diferiu entre os grupos. Foram encontradas 67 e 66 proteínas nos espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo, e 20 e 16 no plasma seminal e líquido epididimário, respectivamente. Além disso, 52 proteínas foram comuns entre os espermatozoides obtidos do ejaculado e epidídimo, e 9 entre o plasma seminal e fluido epididimário. Atividade catalítica foi a principal função molecular nas células espermáticas; já no plasma seminal foi de ligação e no fluido epididimário, atividade catalítica. As proteínas que se destacaram foram: 14-3-3 protein zeta/delta, A-kinase anchor protein, Calmodulin, Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial, Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2, Fibronectin type III domain-containing protein 8, Glucose-6-phosphate isomerase, L-amino-acid oxidase, Phosphoglycerate mutase 2, Ropporin-1, Seminal ribonuclease, T-complex protein 1 subunit epsilon, Clusterin, Epididymal secretory protein E1, Serum albumin. Com base nos resultados, conclui-se que há uma importante contribuição das proteínas do plasma seminal para a célula espermática, fornecendo macromoléculas essenciais para a capacitação espermática, reação do acrossomo, ligação espermatozoide-oócito e fertilização; já o fluido epididimário apresenta como principal função manter a integridade e imobilidade dos espermatozoides.

Palavras-chaves: Célula-espermática; Capacitação; Epidídimo; Proteômica; Reação-acrossomo

ABSTRACT

SALGADO, D. S. PROTEOMICS OF SEMINAL PLASMA, EPIDIDYMAL FLUID, SPERMATOZOA COLLECTED OF EJACULATED AND CAUDA OF EPIDIDYMIS. Botucatu – SP. 2017, p. 102. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Proteins of fluid and cells from reproductive system are constant objects of study, in order to elucidate physiological events and to search biomarkers of the reproductive functions, facilitating the breeding selection. Thus, this study aimed to characterize the proteins of the ejaculate and epididymis spermatozoa, the seminal plasma and the epididymal fluid of bulls. Ten adult Brangus bulls were used. The semen was collected by electroejaculation and then, the males were orchietomized for collection of spermatozoa and fluid from the epididymis. The ejaculate and epididymis cells were subjectively analyzed after collection, and the seminal plasma and epididymis fluid were separated by centrifugation. The samples were prepared for mass spectrometry (ESI-QTOF MS/MS), with a pool of each group. Total protein concentration did not differ between groups. We found 67 and 66 proteins in the ejaculate and epididymis spermatozoa, and 20 and 16 in the seminal plasma and epididymal fluid, respectively. Moreover, 52 proteins were common in the spermatozoa obtained from ejaculate and epididymis, and 9 in the seminal plasma and epididymal fluid. Catalytic activity was the main molecular function in sperm cells and epididymal fluid; in the seminal plasma was binding. The main proteins found were: 14-3-3 protein zeta/delta, A-kinase anchor protein, Calmodulin, Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial, Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2, Fibronectin type III domain-containing protein 8, Glucose-6-phosphate isomerase, L-amino-acid oxidase, Phosphoglycerate mutase 2, Ropporin-1, Seminal ribonuclease, T-complex protein 1 subunit epsilon, Clusterin, Epididymal secretory protein E1, Serum albumin. Based on the results, we concluded that there is an important contribution of seminal plasma proteins to the sperm cell, providing macromolecules essential for sperm capacitation, acrosome reaction, spermatozoa-oocyte binding and fertilization; whereas the epididymal fluid has main function maintained the integrity and nonmotile sperm cells.

Keywords: Acrosome-reaction; Capacitation; Epididymus; Proteomic; Sperm-cell;

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Em vista da necessidade de identificar touros de alta fertilidade, seja para utilização em centrais de comercialização do sêmen, assim como para aplicação em propriedades rurais, ferramentas moleculares têm sido estudadas. Estas ferramentas visam substituir o teste de progênie, um método utilizado para avaliar a capacidade reprodutiva de um macho, o qual é oneroso e demanda tempo para ser conduzido (LARSSON, 2000). Além disso, defeitos subcelulares nas células espermáticas, como as alterações nos componentes da sua superfície, só podem ser estudados utilizando métodos de avaliação molecular (LARSSON, 2000; SARSAIFI et al., 2015).

Tanto a célula espermática como o oócito possuem proteínas indispensáveis para a fertilização (ALBERTS et al., 2002). Assim, as transformações ou modificações sofridas na célula espermática, para a fertilização, incluem várias fases, tais como maturação pós-testicular no epidídimo, capacitação, reação do acrossomo e ligação entre os gametas. Em cada uma dessas fases estão envolvidas proteínas específicas, que exercerão funções na célula espermática durante a fecundação (YANAGIMACHI, 1993).

A adição de proteínas às membranas durante a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo e na ejaculação influencia sua capacidade fertilizante (ROBAIRE et al., 2006; MOURA et al., 2007; MOURA et al., 2010). Desta maneira, a análise das proteínas associadas ao espermatozoide durante a espermatogênese ou seu trânsito pelo trato reprodutor masculino, pode ser considerada uma ferramenta multiparamétrica, que além de apresentar uma visão global, também pode identificar marcadores proteicos específicos (BISSONETTE et al., 2009). Em vista disso, os espermatozoides ejaculados diferem dos espermatozoides do epidídimo em muitos fatores, incluindo os tipos de proteínas que estão ligadas à membrana plasmática e as suas características (GOOVAERTS et al., 2006). Apesar disto, as proteínas espermáticas ligadas no epidídimo e sua associação com a fertilidade têm sido pouco estudadas.

Estabelecer a composição das proteínas espermáticas e entender sua relação com a fertilidade, pode ser um ponto de partida para alcançar resultados mais favoráveis nos sistemas de produção bovina (BELLIN et al., 1994), já que a subfertilidade tem que ser avaliada tendo como base transcritos e proteínas

codificadas e adicionadas aos espermatozoides, embora a maioria destas informações sejam consideradas resultado da formação da célula durante a espermatogênese, mas que pode refletir o potencial de fertilidade do ejaculado (BISSONETTE et al., 2009).

Desta maneira, o objetivo deste estudo foi descrever as proteínas do plasma seminal, fluido epididimário e das células espermáticas colhidas do ejaculado e da cauda do epidídimo de touros, a fim de identificar a relação das células com os fluidos do trato reprodutor durante sua armazenagem e na ejaculação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Características morfológicas e fisiológicas das células espermáticas

O espermatozoide é uma célula altamente especializada constituída pelo núcleo, mitocôndrias e estruturas membranosas, cuja única função é fertilizar o oócito. Consiste em uma célula com a metade do número de cromossomos em um núcleo condensado e citoplasma restrito, contendo algumas organelas celulares (SUTOVSKY; MANANDHAR, 2006). O espermatozoide é composto de cabeça e cauda, e é totalmente recoberto pela membrana plasmática (FLESCH; GADELA, 2000). A estrutura do espermatozoide pode se observar na Figura 1.

A cabeça é formada pelo acrossomo que recobre os dois terços anteriores do núcleo, a lâmina pós-acrossomal que recobre o restante do núcleo, e o núcleo fica recoberto por uma membrana dupla. O DNA nuclear é enovelado e altamente condensado, em vista de proteínas denominadas protaminas que substituem às histonas de outros tipos celulares (BREWER et al., 2002; DADOUNE, 2003). Pequenos vacúolos nucleares podem ser observados na cromatina condensada, e o *perforatorium* é uma estrutura observada entre o acrossomo e a porção anterior do núcleo do espermatozoide. O citoesqueleto participa no suporte da membrana plasmática e da membrana acrossomal. O principal elemento do citoesqueleto da cabeça do espermatozoide é a teca perinuclear, que é uma cápsula rígida que recobre o núcleo do espermatozoide e tem como função a união das membranas espermáticas e a preservação de sua integridade. A teca perinuclear está subdividida em duas regiões: subacrossomal (ancora as

vesículas derivadas do complexo de Golgi) e a pós-acrossomal. A região pós-acrossomal participa na ativação do oócito durante a fertilização e é o lugar de união entre os gametas e a região sub-acrossomal que esta conformada por as membranas do acrossomo. (SUTOVSKY; MANANDHAR, 2006).

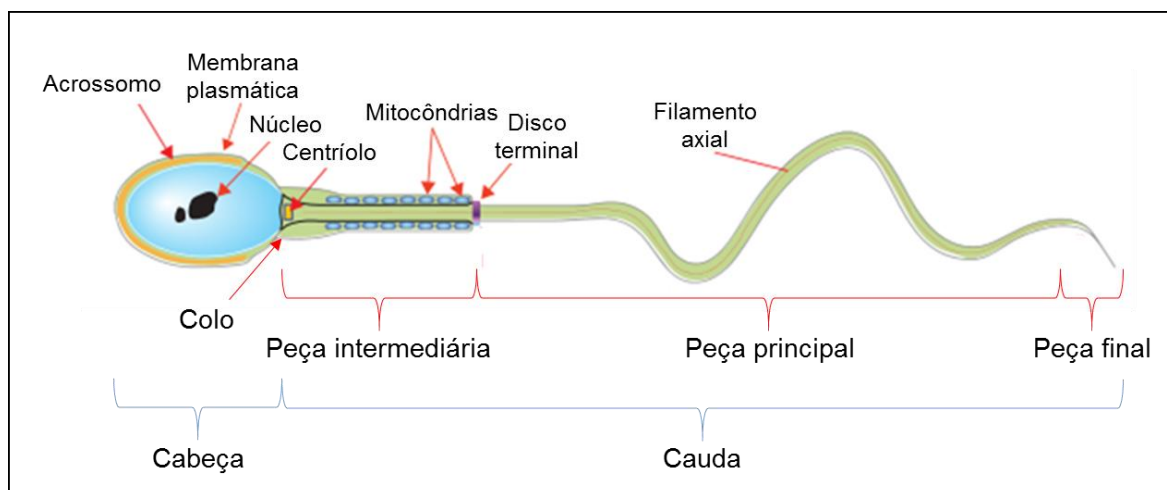


Figura 1: Estrutura do espermatozoide. Modificado de <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=699220>

O acrossomo é uma única e grande vesícula secretora que rodeia o núcleo, e se encontra na região apical da cabeça espermática (EDDY E O'BRIEN, 1994; YANAGIMACHI, 1994). Esta vesícula contém diferentes enzimas, principalmente hialuronidase e acrosina, as quais desenvolvem papéis importantes na fertilização (FLÖRKE et al., 1983). O acrossomo é envolvido por duas membranas, a externa, que está situada subjacente a membrana plasmática, e a que se encontra sobre o núcleo que é denominada membrana acrossomal interna (CARDULLO AND FLORMAN, 1993). Durante a fertilização há a exocitose desta vesícula (reação do acrossomo), processo no qual ocorrem múltiplas fusões entre estas membranas, com consequente exposição da membrana acrossomal interna e liberação do conteúdo acrossomal enzimático. Além do conteúdo acrossomal, as membranas possuem receptores envolvidos na união do espermatozoide e oócito, e fatores ativadores do oócito localizados na bainha pós-acrossomal, que são elementos proteicos sinalizadores (CARDULLO; FLORMAN, 1993; SUTOVSKY; MANANDHAR, 2006). Esta alteração morfológica do acrossomo deve ocorrer antes da penetração do espermatozoide a zona pelúcida (CARDULLO;

FLORMAN, 1993).

A cauda é a região encarregada pelo movimento espermático. É dividida em colo, peça intermediária, a qual é conformada por um conjunto helicoidal de mitocôndrias firmemente empacotadas sobre ao redor do citoesqueleto flagelar, a peça principal, que compreende a maior parte da cauda, e peça final (EDDY et al., 2003). Cada região cauda tem funções específicas no momento do reconhecimento do oócito e na fecundação (SUTOVSKY; MANANDHAR, 2006).

Durante a formação da cauda ocorre a aglomeração de aproximadamente 100 mitocôndrias na peça intermediária, e estas estruturas serão responsáveis pelo funcionamento aeróbico da célula espermática (GADELA; LUNA, 2014). A integridade e funcionalidade mitocondrial do espermatozoide indicam o estado de energia da célula e a consequente motilidade, a qual tem sido relacionada com a fertilidade (GÜRLER et al., 2016). A motilidade é importante para o transporte a partir do local da ejaculação até as tubas uterinas, onde ocorre a fertilização (GÜRLER et al., 2016).

A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide e é o componente mais externo da célula. Possui uma estrutura fina, flexível e sua composição e organização facilita a regulação da permeabilidade seletiva aos solutos polares, afinidade aos fatores de adesão, sinalização celular e fusão celular (FLESCH; GADELLA, 2000). Neste sentido, uma alteração da permeabilidade seletiva da membrana espermática reduz a motilidade, em vista da diminuição da produção de energia. Além disso, modificações na composição lipídica da membrana, o que ademais pode influir no comportamento dinâmico da membrana (HE et al., 2001).

2.2. Síntese proteica na célula espermática

Os espermatozoides, resultantes do processo de espermatogênese, se originam a partir de espermatogônias indiferenciadas, situadas nos túbulos seminíferos. Após divisões mitóticas e meióticas, as espermatogônias dão origem aos espermatócitos primários e secundários (espermatocitogênese). A partir dos espermatócitos secundários, num processo de diferenciação celular são formadas as espermátides iniciais e finais, e posteriormente os espermatozoides (espermio gênese), os quais são células haploides (HESS, 1999). Durante o processo de diferenciação, as espermátides sofrem mudanças na morfologia

celular e organização das organelas celulares, sendo as principais alterações a perda de organelas, o alongamento da célula, com formação de flagelo na porção distal do núcleo, e na zona apical, a formação do acrossomo (SUTOKSKY; MANANDHAR, 2006). Nestes processos ocorre transcrição pós-meiotica e tradução de RNAm (BOERKE et al., 2007), porém, ao final da formação da espermatíde, a expressão gênica é cessada e inicia-se uma fase de condensação do DNA, até um estado máximo, na qual as proteínas nucleares histonas são trocadas por protaminas (DACHEUX et al., 2005; COOPER; YEUNG, 2006).

A ausência de síntese de proteínas, ao final da maturação das espermatídes, tem como consequência, a diminuição progressiva do conteúdo de transcritos na célula. Assim, a transcrição do DNA é inativada (silenciamento gênico), antes e durante a condensação do DNA (WARD, 1993; SHAMAN; WARD, 2006). Durante o final da diferenciação das espermatídes, o DNA é uma estrutura supercondensada, a qual contém estruturas toroidais (enoveladas) do DNA (BOERKE et al., 2007). Essas estruturas estão ligadas entre si por uniões determinadas *regiões sensíveis as DNases ligadas aos toroides*. Nessas regiões o DNA ainda se encontra ligado as histonas, evidenciando que todo o DNA não está protaminado (98% do DNA é protaminado na maioria das espécies, incluindo a espécie bovina) (GATEWOOD et al., 1990; BENCH et al., 1996; SOTOLONGO et al., 2003). Apesar disso, os espermatozoides podem carregar diferentes tipos de RNAs, incluindo mRNA (mensageiro), asRNA (*antisense*) e miRNA (micro) (LALANCETTE et al., 2008). Embora o papel dos RNAs presentes no espermatozoide tem sido discutido (LALANCETTE et al., 2008), estes transcritos podem estar envolvidos em funções estruturais, empacotamento do genoma paterno e/ou funções essenciais para o desenvolvimento embrionário inicial (LALANCETTE et al., 2008). Adicionalmente, as moléculas de RNA presentes nos espermatozoides, incluindo o RNAm, podem ser consideradas remanescentes da espermatogênese. Acredita-se que os RNAs espermáticos se mantêm estáveis até o momento da expressão do genoma embrionário, tendo como potencial função o início do desenvolvimento do embrião (GUR et al., 2006; BOERKE et al., 2007).

2.3. O epidídimo

Apesar da liberação dos espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos marcar o final da espermatogênese, a célula ainda não está pronta para fecundação. Após a espermatogênese e é necessária a passagem pelo epidídimo, local onde as células espermáticas sofrem transformações, a fim de potencializar suas funções (JONES et al., 2007).

Com este propósito, o epitélio do epidídimo tem funções complexas, o que o diferencia de outros tecidos no organismo (CABALLERO et al., 2010), cujas principais funções são transporte, maturação, armazenamento e proteção da população espermática (ROBAIRE, 2006). O epidídimo é dividido em 3 principais porções, cabeça (seguimento mais proximal ao testículo), corpo e cauda. Cada porção do epidídimo é especializada em promover alterações na célula espermática, contribuindo para sua maturação (DACHEUX et al., 2005).

2.3.1. Transporte dos espermatozoides no epidídimo

Uma vez liberados no lúmen dos túbulos seminíferos, os espermatozoides são transportados pela *rete testis* até os ductos eferentes e, posteriormente, iniciam seu trânsito pelo epidídimo (ROBAIRE, 2006). O tempo mínimo requerido para o trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo bovino é aproximadamente 8 ou 9 dias, mas pode variar entre os touros, tendo em promedio de 4 até 15 dias de duração (AMANN et al., 1974).

Os espermatozoides entram no epidídimo, propulsados pelo fluido testicular e, possivelmente, ao ritmo das células ciliadas dos ductos eferentes. Inicialmente, os espermatozoides são imóveis ou demonstram somente uma leve contração da cauda (ROBAIRE, 2006), contudo adquirem motilidade ao longo do epidídimo. Além disso, o epitélio epididimário está recoberto por estereocílios imóveis, os quais fazem absorção massiva dos fluidos provenientes dos ductos eferentes, no segmento inicial do epidídimo, reduzindo drasticamente o fluxo do fluido testicular. Outra força capaz de impulsionar os espermatozoides em direção ao epidídimo é o fluxo oposto ao gradiente da pressão hidrostática crescente, conseguindo evitar o refluxo em direção ao testículo (JOHNSON; HOWARD, 1976).

Apesar de todos estes mecanismos de fluxo contínuo no epidídimo, as

contrações da musculatura lisa que margeia os tubos epididimários, são as principais responsáveis pela condução dos espermatozoides pelo lúmen do epidídimo (ROBAIRE, 2006). Essa contratilidade pode ser atribuída às prostaglandinas (COSENTINO, 1986), já que seus níveis endógenos regulam contratilidade basal do epidídimo proximal. Além disso, peptídeos neurohipofisários, como a ocitocina e a vasopressina, mediadas por receptores presentes no epidídimo, também auxiliam na contratilidade epididimária (COSENTINO; COCKETT 1986).

2.3.2. Maturação espermática no epidídimo

Entre as mudanças que se produzem nos espermatozoides estão o aumento da motilidade e o aumento do potencial de fertilidade (GATTI et al., 2004). O processo de maturação dos espermatozoides depende de uma sequência de modificações espermáticas, resultantes da interação da superfície do espermatozoide com diferentes componentes do fluido epididimário, mas, também dependem dos processos inerentes aos próprios espermatozoides (DACHEUX et al., 2005).

O trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo induz mudanças celulares e nos fluidos que os rodeiam (COSENTINO; COCKETT, 1986; GATTI et al., 2004). Durante a passagem pela cabeça e corpo do epidídimo, as células espermáticas sofrem um processo de maturação, a qual é consequência da atividade de proteínas específicas presentes no lúmen do túbulo epididimário (DACHEUX et al., 2005).

A maior parte dos componentes do líquido epididimário é produto das secreções do tecido epitelial do epidídimo (GATTI et al., 2004). Estas secreções são representadas por mais de 100 tipos diferentes de proteínas, contudo há regiões mais ativas. A cabeça e o corpo podem sintetizar aproximadamente 80% das proteínas presentes no fluido epididimário, demonstrando que as atividades do órgão se encontram regionalizadas (GATTI et al., 2004).

A síntese de proteínas e secreções do epidídimo no lúmen é regulada por andrógenos testiculares, que varia9m em concentração de um segmento para outro no epidídimo (DACHEUX et al., 2005). Isto resulta, numa mistura complexa de proteínas interagindo com o espermatozoide no lúmen do epidídimo

(DACHEUX et al., 2005).

O fluido do epidídimo contém um fator de inibição da motilidade que pode servir para conservar as reservas de energia das células espermáticas, e o espermatozoide modifica algumas vias metabólicas, adquirindo características de motilidade nas regiões mais distais do epididimo (COSENTINO; COCKETT, 1986).

Além da secreção e interação com proteínas, a maturação espermática no epidídimo é dependente do transporte de sódio e potássio, dos andrógenos, e da temperatura escrotal (SUTOTSKY; LOVERCAMP, 2010). As mudanças na estrutura dos espermatozoides se devem aos fosfolipídios e colesterol da membrana espermática, que são utilizados como substratos, durante a maturação (DACHEUX et al., 2005). Assim, o espermatozoide sofre mudanças significativas na sua morfologia, durante o trânsito epididimário (DACHEUX et al., 2005). Porém, a morfologia espermática não é a principal alteração nestas células, durante a passagem pelo epidídimo (ROBAIRE, 2006). Nota-se a migração da gota citoplasmática (GATTI et al., 2004; SUTOTSKY; LOVERCAMP, 2010), um remanescente citoplásmico da espermátide separado durante a espermição (SUTOTSKY; LOVERCAMP, 2010). Nos espermatozoides testiculares, a gota citoplasmática encontrasse na região anterior da peça intermediária (GATTI et al., 2004). Durante o trânsito pelo epidídimo, a gota migra para região anular mais distal e durante a ejaculação se desprende da célula espermática por completo (GATTI et al., 2004; SUTOTSKY; LOVERCAMP, 2010).

Durante a maturação no epidídimo também ocorre a compactação final da cromatina (associação do DNA às protaminas) (GOLAN et al., 1996). No núcleo do espermatozoide, ocorre uma alteração na quantidade de proteínas nucleares, produzindo a compactação. Desta maneira, a cromatina estabiliza-se no núcleo do espermatozoide, em vista da formação progressiva de pontes de dissulfeto entre as proteínas nucleares entrelaçadas (GADELLA; LUNA, 2014).

Durante este processo, as células adquirem ainda proteínas de superfície, que estão envolvidas na fertilização (ROBAIRE, 2006).

2.3.3. Armazenamento de espermatozoides no epidídimo

Entre as mais importantes funções do epidídimo, a que está diretamente

envolvida na reprodução masculina, é o armazenamento de espermatozoides produzidos pelos testículos (DACHEUX et al., 2016) na cauda do epidídimo (CONSENTINO, 1986; ROBAIRE, 2006).

Quando os espermatozoides entram na cabeça do epidídimo, ocorre a reabsorção do líquido testicular, obtendo assim, alta concentração espermática na cauda do epidídimo, desde milhões a bilhões de espermatozoides/mL que permanecem armazenados até a ejaculação ou eliminação na urina (DACHEUX et al., 2016).

A concentração luminal de íons, pequenas moléculas orgânicas, proteínas, e glicoproteínas presentes entre a cauda e o restante do epidídimo, são condições especiais que auxiliam no armazenamento dos espermatozoides na cauda num estado quiescente. Esta manutenção se refere a um metabolismo com baixa atividade, próprio do estado quiescente, o qual previne a ativação prematura dos espermatozoides (HINTON; PALLADINO, 1995).

2.3.4. Proteção dos espermatozoides no epidídimo

Para controlar os estádios pós-gonadais finais da diferenciação espermática, a morfologia e composição do fluido luminal do epidídimo são fatores chaves envolvidos na proteção da sobrevivência e maturação dos espermatozoides (DACHEUX et al., 2016).

A barreira hemato-epidídimária tem a função de impedir, seletivamente, a passagem de proteínas séricas, propiciando um microambiente luminal especializado para a maturação espermática. Além disso, há uma sequência de mecanismos de defesa no epidídimo, para auxiliar na proteção dos espermatozoides ao sistema imune, aos xenobióticos e as espécies reativas de oxigênio (ROS) (HINTON et al., 1995).

Os mecanismos de defesa incluem ainda a restrição de alguns tipos de compostos que podem penetrar o lúmen do epidídimo, a síntese e secreção de proteínas específicas, tais como as defensinas e moléculas similares as defensinas, além da rápida eliminação dos possíveis agentes nocivos e pela síntese e secreção de enzimas antioxidantes, e conjugação, síntese e secreção de compostos antioxidantes tais como a glutathione peroxidase e a taurina (COSENTINO; COCKETT, 1986). Ademais, em vista dos espermatozoides

encontrarem-se num ambiente hiperosmótico, o epidídimo deve garantir que as células estejam protegidas de possíveis modificações abruptas na osmolaridade, o que pode influenciar o volume celular (ROBAIRE, 2006).

É fundamental que os espermatozoides sejam protegidos dos efeitos deletérios das ROS, na medida em que avançam ao longo do ducto epididimário. Os efeitos da peroxidação lipídica das membranas têm sido associados com alterações na peça intermediária, diminuição da motilidade, em vista de defeitos no axonema, e a redução dos níveis intracelulares de ATP, assim como a consequente alteração da capacidade de fertilização (GADELLA; LUNA, 2014).

Os espermatozoides estão principalmente protegidos das ROS pela enzima superóxido dismutase, a qual protege as células da peroxidação de lipídios (GADELLA; LUNA, 2014; COSENTINO; COCKETT, 1986). As principais enzimas antioxidantes presentes no epidídimo incluem a superóxido dismutase, γ -glutamil transpeptidase, glutathione peroxidase, glutathione transferase, e a indolamina dioxigenase. Cada uma das enzimas e moléculas antioxidantes se encontra em diferentes quantidades ao longo do epidídimo (COSENTINO; COCKETT, 1986).

2.3.5. Fluido epididimário

Como quase todos os componentes do fluido da *rete testis* são reabsorvidos, a maior parte dos componentes presentes do fluido epididimário é resultado da secreção ativa das células epiteliais ao longo do ducto epididimário (DACHEUX, 2016). O microambiente luminal do epidídimo resulta das contribuições dos íons, solutos orgânicos e proteínas (WALES et al., 1966; DACHEUX, 2016). Então, o fluido do epidídimo proporciona ao gameta masculino, um ambiente análogo ao proporcionado pelo plasma sanguíneo aos tecidos celulares (COOPER, 1998). Devido à presença das barreiras hemato-testicular e a hemato-epididimária, a maioria das proteínas do sangue não são encontradas no fluido do epidídimo, a exceção da albumina e transferrina (ROBAIRE, 2006).

2.4. Glândulas sexuais acessórias

No touro, as glândulas sexuais acessórias são próstata, vesícula seminal, ampola e glândulas bulbouretrais (FAYRER-HOSKEN, 1997). Estas glândulas secretam um fluido que consiste de mistura complexa de íons inorgânicos,

açúcares, sais orgânicos, lipídios, enzimas, prostaglandina, proteínas e diversos outros fatores. Este fluido se mistura às células espermáticas durante a ejaculação e potencializada sua capacidade fertilizante (MOURA et al., 2007; DRUART, 2013; SYLLA, 2015).

2.5. Formação e componentes do ejaculado

O ejaculado é formado por espermatozoides, originários da cauda do epidídimo, e plasma seminal, que é composto por secreções epidimárias e das glândulas sexuais acessórias (FAYRER-HOSKEN, 1997). O plasma seminal é meio de suporte e transportador das células espermáticas até o trato genital da fêmea. No touro, o ejaculado tem em média 4 mL, embora pode haver uma variação entre 1 a 15 mL, de acordo com a idade, raça e a genética do animal (FAYRER-HOSKEN, 1997).

2.6. Proteômica espermática e dos fluidos do trato reprodutor masculino

A proteômica é o grupo de tecnologias que nasceu da finalidade de pesquisar a estrutura e função do conjunto de proteínas que formam determinado proteoma. Estudos proteômicos são realizados por comparações qualitativas e quantitativas das proteínas identificadas nos tecidos ou nos fluidos (BARBOSA et al., 2012; CARBONARO, 2004). As comparações entre as proteínas permitem identificar ou estabelecer os mecanismos celulares, como alterações de genes, seus transcritos e os produtos proteicos envolvidos nos diferentes processos biológicos de determinado organismo (BARBOSA et al., 2012; CARBONARO, 2004).

Estudos das proteínas do plasma seminal de bovinos iniciaram-se na década de 50 (LARSON; SALISBURY, 1954; BERTOK; PASZTOR, 1957) e atualmente vários estudos têm sido desenvolvido, tanto das células espermáticas, assim como de outros fluidos do trato reprodutor masculino, com o principal propósito de conhecer a fisiologia espermática e investigar a influências do perfil proteico sobre a fertilidade (JOBIM et al., 2004; MOURA et al., 2010; DRUART et al., 2013; ASLAM et al., 2014; REGO et al., 2014; BOE-HANSEN et al., 2014; SARSAIFI et al., 2015; DACHEUX et al., 2016; WESTFALEWICZ et al., 2017).

2.6.1. *Proteínas espermáticas*

Proteínas nucleares do espermatozoide tem ganhado destaque em muitos estudos (MAIER et al., 1990; SIMÕES et al., 2009; Ganguly et al., 2013; FORTES et al., 2014). A célula espermática é especializada e seu conteúdo nuclear contém tipos diferenciados de proteínas. Durante sua formação, as histonas, proteínas presentes nas células somáticas, são substituídas pelas protaminas, e estão presentes até a espermátide inicial (BALHORN, 2007).

As protaminas são consideradas pequenas proteínas de cadeia curta de aminoácidos (entre 50 a 110 aminoácidos). Nesta cadeia são encontrados, especialmente aminoácidos básicos, como a arginina, que compõe mais de 70% na cadeia, e a cisteína (BALHORN, 2007). A arginina e a cisteína, por serem aminoácidos básicos, confere-lhe a propriedade de ser fortemente básica e de carga positiva (CARREL et al., 2007). Os altos níveis de arginina e cisteína promovem a união entre os filamentos de DNA e a formação de pontes dissulfetos, indispensáveis para o adequado empacotamento da cromatina espermática (CARREL et al., 2007). As protaminas podem se encontrar de duas formas nas diferentes espécies. A protamina tipo 1 (PRM1) está presente em todos os mamíferos, e a protamina tipo 2 (PRM2) presente apenas nas células espermáticas de mamíferos placentários (OLIVA, 2006; DOGAN et al., 2015). No bovino, embora o gene da PRM2 seja transcrito e traduzido em níveis baixos nas espermátides, o seu produto é ausente no espermatozoide (COELING et al., 1972; MAIER et al., 1990), já a variante PRM1 está presente nesta espécie (CORZET et al., 2002).

As funções das protaminas são proteção e reorganização do DNA constituindo uma estrutura altamente condensada, o que desencadeia outras funções como a condensação do genoma paterno, geração do núcleo hidrodinâmico para o transporte do material genético e a proteção da mensagem genética paterna (OLIVA, 2006; RIOS, 2010).

A diminuição no conteúdo das protaminas está relacionada à condensação incompleta da cromatina espermática e a uma inadequada integridade do DNA. A cromatina está susceptível a agentes endógenos e exógenos como radicais livres ou fatores mutagênicos, o que levaria a danos no material genético e infertilidade. Esta susceptibilidade é maior durante a maturação espermática que vai ocorrer no

percurso pelo epidídimo (SMITH et al., 2006; DOGAN et al., 2015).

Apesar desta diferença entre as proteínas nucleares e sua importância como agente protetor do material genético espermático, a funcionalidade dos espermatozoides está associada principalmente as proteínas que aderidas à célula ao longo do seu trânsito pelo epidídimo e após a ejaculação, as quais são consideradas as mais importantes para conferir-lhes capacidade fertilizante (GADELLA; LUNA, 2014). Porém, é imprescindível a presença e a expressão de várias proteínas específicas para cada uma das fases da espermatogênese.

A IZUMO, uma proteína transmembrana tipo I, que faz parte da família IgSF (superfamília das imunoglobulinas) (YOUNG et al., 2015), amplamente estudada em humanos, mas já descrita em muitas espécies, está localizada abaixo da membrana até a ejaculação (INOUE et al., 2008). Durante o trânsito pelo epidídimo, a IZUMO é modificada, sofrendo uma fragmentação da forma não-glicosilada, por ação de proteases acrossomais, como a acrosina (BABA et al., 1994). IZUMO foi descrita inicialmente na cabeça de espermatozoides de ratos, FUKUDA et al. (2016) descreveram pela primeira vez sua função em espermatozoides de touros durante a maturação, reação do acrossomo e criopreservação (INOUE et al., 2005; FUKUDA et al., 2016). A proteína foi relacionada a fertilidade bovina por ser considerada uma proteína essencial na interação e fusão do espermatozoide ao oócito (INOUE et al., 2005; INOUE et al., 2008; FUKUDA et al., 2016).

As tetkinas (TEKTs) formam um grupo de proteínas filamentosas constitutiva, localizadas na lâmina nuclear, nos cílios e nos flagelos (ROY et al., 2009; OIKI et al., 2014). Nos mamíferos, têm sido identificadas 5 TEKTs (TEKT1, 2, 3, 4 e 5) nos espermatozoides associada com o axonema flagelar. Nos espermatozoides imaturos, contidos nos testículos, estudos ultraestruturais e bioquímicos, demonstraram que a proteína TEKT3, está também associada com a superfície das mitocôndrias e fibras densas exteriores da peça intermediária (OIKI et al., 2014; TAKIGUCHI et al., 2011). Além disso, a TEKT3 também está presente na região equatorial da membrana acrossomal da cabeça de espermatozoides de ratos (TAKIGUCHI et al., 2011). Ainda em ratos, a ausência de TEKT3 foi associada com a redução da motilidade espermática e maior porcentagem de defeitos estruturais na cauda dos espermatozoides (ROY et al.,

2009). Em bovinos, foi um polipeptídeo de sequência similar à TEKT3 foi identificado em espermatozoides do epidídimo, o qual se encontrava na região acrossomal interna, e foi associado à função de regulação das hidrolases que são liberadas durante a reação do acrossomo (NAGDAS et al., 2015).

2.6.2. Proteínas flagelares

O flagelo da célula espermática possui quatro regiões distintas, a peça de conexão (colo), adjacente à cabeça; a peça intermediária, que forma um conjunto helicoidal de mitocôndrias empacotadas ao redor do citoesqueleto; a peça principal; e peça final (EDDY et al., 2003). Recentemente, têm sido identificadas proteínas que tem o papel de regular a função do flagelo e dos componentes das suas regiões. Estas proteínas contribuem na regulação da motilidade espermática, e dentre as mais estudadas no bovino encontra-se o complexo *rhopilin-ropporin*, proteínas 3 e 4 de ancoragem a quinase A (AKAP3 e AKAP4) (EDDY et al., 2003).

As proteínas AKAPs (AKAP3 e AKAP4) são consideradas as proteínas estruturais mais abundantes da bainha fibrosa, além de participar da montagem do flagelo, participam da aquisição inicial da motilidade (EDDY et al., 2003). A AKAP3 é sintetizada nas espermátides redondas, se incorporando na bainha fibrosa e tem como função a organização desta estrutura (BROWN et al., 2003). AKAP 4 é sintetizada posteriormente no desenvolvimento das espermátides, e tem a função de finalizar a montagem da bainha fibrosa (BROWN et al., 2003).

O complexo *rhopilin-ropporin* é formado por estas duas proteínas constitutivas da bainha fibrosa dos espermatozoides de mamíferos, que podem estar localizadas tanto na peça principal como na peça final do flagelo espermático. *rhopilin* é uma proteína caracterizada por três domínios denominados domínios de união *Rho*, localizados no aminoácido 70 do seu N-terminal. A *rhopilin* atua como um adaptador de proteínas, promovendo a união entre o domínio *Rho* e as proteínas de interação com a *rhopilin*, tais como a *ropporin* (FUJITA et al., 2000). A *ropporin* é uma proteína reguladora de AMPc kinase dependente (CHEN et al., 2011). No touro a *ropporin 1* já foi relacionada a motilidade espermática (YOON et al., 2016).

2.6.3. *Proteínas do fluido epididimário*

Várias proteínas de origem epididimária, as quais são inseridas ao espermatozoide durante o seu trânsito pelo epidídimo, já foram identificadas (COOPER, 1998). Estas proteínas podem atuar como proteínas integrais da membrana, e outras são ancoradas a superfície da membrana espermática via GPI (COOPER, 1998; PHELPS et al., 1988).

Estas proteínas são transportadas para as células espermáticas de diferentes maneiras e, atualmente dois mecanismos foram estabelecidos, por partículas tipo vesículas ou exossomos, denominados de epididimossomos e também como proteínas em fase solúvel (COOPER, 1998; THÉRY et al., 2002).

A descoberta de vesículas extracelulares nos fluidos biológicos que transportam os espermatozoides permitiu demonstrar que a presença de complexos com alta massa molecular no fluido epididimário, os epididimossomos, é uma característica especial do trato reprodutor masculino (YANAGIMACHI et al., 1985; FRENETTE et al., 2002; SULLIVAN, 2015). Uma característica dos epididimossomos e das vesículas provenientes, sintetizadas na próstata (prostassomos) está relacionada com a capacidade para transferir novas proteínas aos espermatozoides (FRENETTE et al., 2002). Estas estruturas estão presentes no fluido epididimário e prostático (prostassomos) e se encontram relacionadas com a maturação espermática pós-testicular e a aquisição da capacidade fecundante (Figura 2; SAEZ, 2003; GATTI, 2004). Nos epididimossomos já foram encontradas proteínas hidrofóbicas (FRENETTE et al., 2002; SAEZ et al., 2003; GATTI et al., 2004), o que lhes confere as características de carrear proteínas que não seriam transportadas de outra maneira. Os epididimossomos são secretados por vias apócrinas envolvidas na maturação do espermatozoide, e a população de epididimossomos presentes em determinado segmento do epidídimo pode ser heterogênea (FORNÉS et al., 1995., SULLIVAN, 2015).

Apesar desta importante via de transporte de proteínas, poucas moléculas foram associadas aos epididimossomos. Dentre as identificadas nos bovinos, destaca-se a P25b, uma proteína de ancoragem ao Glicosilfosfatidilinositol GPI, cuja transferência dos epidídimoossomos ao espermatozoide tem sido considerada indispensável para a fertilidade bovina, por estar presente em touros de alta

fertilidade. Desta maneira, esta macromolécula é considerada como um marcador de fertilidade em bovinos (PARENT et al., 1999; FRENETE et al, 2002). A função da P25b está relacionada com o reconhecimento e união dos gametas (BERUBE; SULLIVAN, 1994).

Outra proteína associada aos epididimossomos é a ELSPBP1, já identificada no epidídimo bovino. A ELSPBP1 apresenta é similar a BSP, e tem afinidade por uma enzima denominada BLVRA (*biliverdin reductase A*). O complexo formado; o complexo formado ELSPBP1/BLVRA se liga aos espermatozoides mortos no epidídimo, e a BLVRA tem atividade contra as ROS geradas por estas células, além de proteger os espermatozoides sobreviventes do estresse oxidativo (SULLIVAN, 2015).

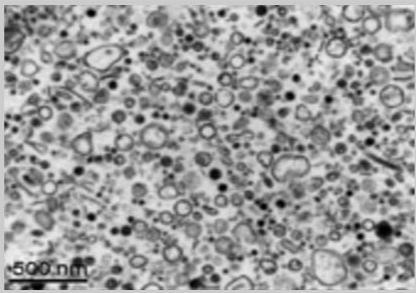
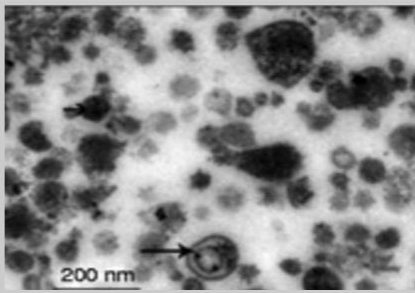
	EPIDIDIMOSSOMOS	PROSTASSOMOS
Características		
Tamanho:	25 a 30 nm	30 a 500 nm
Origem celular:	Células epiteliais principais	Células acinais da próstata
Liberação extracelular:	Secreção apócrina	Exocitose das vesículas de armazenamento
Função:	Maturação espermática, transferência de proteínas à superfície espermática	Motilidade espermática, imunossupressora, fator antioxidante e capacitação espermática

Figura 2. Características das vesículas extracelulares de transporte proteico do epidídimo (epididimossomos) e da próstata (prostassomos). Adaptado de <http://www.reproduction-online.org>

A proteína MIF (Macrophage migration inhibitory fator), identificada como uma citocina secretada pelo epididimo, é transferida pelos epidídimoossomos para as fibras densas da cauda espermática (EICKHOFF et al., 2001), que contém na sua sequência três cisteínas como *tiols* livres. Estes grupos *tiols* quelam o zinco

associado às fibras densas flagelares externas, ajudando na formação de pontes dissulfeto entre as proteínas estruturais do flagelo (EICKHOFF et al., 2004), contribuindo para a modulação da motilidade espermática no trânsito pelo epididimo (EICKHOFF et al., 2004; FRENETTE et al., 2005).

Outra proteína associada aos epididimossomos em bovinos é a ubiquitina uma proteína envolvida no reconhecimento e eliminação de espermatozoides defeituosos do fluido epididimal (SUTOVSKY et al., 2001).

Além dos epididimossomos, várias proteínas são solúveis no fluido epididimário. Dentre esta fertilina (PH30), uma proteína da família ADAM (*disintegrin* e *metalloprotease*), também conhecida como MDC (desintegrinas-metalloproteases ricas em cisteína). Este tipo proteico possui um domínio desintegrina e um domínio metaloprotease. São proteínas implicadas na união espermatozoide-oócito e na fusão de membranas durante a fertilização (WATERS; WHITE, 1997).

A clusterina é uma glicoproteína ácida heterodimérica, com uma massa molecular de 80 a 85 kDa, também conhecida como glicoproteína-2 sulfatada ou SGP-2. É uma proteína de origem testicular (*rete testis*) e epididimária (fluido epididimário) que possui dois sítios de união à heparina em humanos (TUNG, 1985; PANKHURST et al., 1998; IBRAHIM et al., 1999). No touro está presente no tecido hepático, cérebro e testículos (PALMER DJ; CHRISTIE DL, 1992). Esta proteína se liga aos espermatozoides anormais de touros, induzindo sua aglutinação, o que explica sua correlação negativa com índices de fecundação e motilidade espermática (O'BRIAN, 1994). A avaliação da concentração de clusterina no ejaculado pode indicar disfunção da espermatogênese e seus efeitos sobre a fertilidade (IBRAHIM et al., 2000). Além disso, a clusterina também foi relacionada com a adesão celular e a maturação espermática (BLASCHUK et al., 1983; SYLVESTER et al., 1991). Além, a presença da clusterina pode expressar uma resposta ao choque térmico e ao estresse oxidativo; tem sido estudado que esta proteína protege ao espermatozoide contra o estresse oxidativo, atuando como chaperona nos processos tóxicos que envolvem a precipitação das proteínas da membrana espermática, assim atua controlando a desnaturação e estabilização dessas proteínas (MOURA et al., 2006; REYES-MORENO et al., 2002)

A proteína prostaglandina-D sintetase tipo lipocalina (PDGS ou SP26) é a principal proteína secretada pelas células epiteliais do epidídimo e pode ser identificada no plasma seminal, na cauda do epidídimo e nas células de Sertoli. Possui massa molecular de 26 kDa e esta localizada na região apical do acrossomo espermático (GERENA et al., 1998; GERENA et al., 2000). Pela sua localização nas células de Sertoli, seu papel na espermatogênese e no armazenamento dos espermatozoides no epidídimo, foi relacionada com a maturação espermática, mas sua função na fertilidade bovina é ainda contraditório (MORTARINO et al., 1998; GERENA et al., 2000; MOURA et al., 2006; JOBIM et al., 2009).

2.6.4. Proteínas do plasma seminal

Na última década, diferentes pesquisas, usando distintas metodologias proteômicas tiveram como foco comprovar a hipótese que o plasma seminal da espécie bovina contém proteínas associadas com a fertilidade de touros (LAFLEUR et al., 2010, DRUART et al., 2013; FOLHADELLA et al., 2013, ASLAM et al., 2014, REGO et al., 2014, BOE-HANSEN et al., 2015, SARSAIFI et al., 2015, PATEL et al., 2016, RODRIGUEZ-VILLAMIL et al., 2016).

Neste sentido, as proteínas presentes no plasma seminal podem influenciar nas funções dos espermatozoides, de modo que a capacitação espermática, a reação do acrossomo, bem como a motilidade, a integridade do DNA e a interação com o oócito, são dependentes da ação de proteínas específicas que desencadeiam processos celulares produzindo determinadas funções nas células espermáticas (MOURA et al., 2007; MANJUNATH, 2009; SYLLA, 2015).

Nos bovinos, o plasma seminal contém maior quantidade, proteínas que fazem parte de duas famílias, as espermadesinas e o grupo com domínios fibronectina tipo II, as BSP, as quais incluem BSP1, BSP3 e BSP5 (MANJUNATH et al., 2009, RODRIGUEZ-VILLAMIL et al., 2016).

As proteínas BSPs e as espermadesinas não são as únicas proteínas que atuam na capacitação espermática e tem implicação na fertilidade bovina. Outras proteínas do plasma seminal, produzidas pelas glândulas sexuais secundárias, como PLA-2 (fosfolipase A2), SPLN (plasma seminal), OPN (osteopontina), Clusterina e a Prosaposina tem sido avaliadas e encontradas em touros de alta

fertilidade (TEDESCHI et al., 2000; KELLY et al., 2006; SOUZA et al., 2008).

As BSPs podem ser encontradas no plasma seminal de quase todos os mamíferos (MANJUNATH et al., 2009). Estas proteínas perfazem, aproximadamente, 40 a 57% do total das proteínas do plasma seminal bovino. A BSP1 representa a maior percentagem das BSPs (25 a 47%), seguida pela BSP3 com 0,4 a 0,9%. A BSP5 está em menor concentração com 0,5 a 1% da fração proteica total das BSP (NAUC; MANJUNATH, 2000).

As proteínas da família BSPs são proteínas de natureza ácida, tem massa molecular relativamente baixa, entre 12 a 30 kDa e podem estar ou não glicosiladas (MANJUNATH et al., 2007). As BSP tem uma estrutura secundária comum, composta por um domínio N-terminal variável, seguido de dois fibronectinas tipo II dispostas a cada lado (cada uma de 40 aminoácidos) de um ligador *linker* composto por sete aminoácidos e um domínio C-terminal curto que pode ser variável.

A família das proteínas BSPs possui importante capacidade de interação com vários ligantes, incluindo diferentes tipos de colágeno, fibrinogênio, heparina, apolipoproteína A1, lipoproteínas de alta densidade (HDL) e espermatozoide bovino (MANJUNATH; SAIRAM 1987; MANJUNATH et al., 1989; CHANDONNET, et al., 1990; GASSET et al., 1997). A capacidade de ligação é conferida pela presença dos domínios tipo fibroectina II (MANJUNATH et al., 2009). As BSPs são essenciais para a capacitação espermática bovina, especialmente a BSP1 (LAFLEUR, 2010), processo que ocorre no trato genital feminino, e envolve a adesão de moléculas originárias dos fluidos da fêmea (THERIEN, 2013).

A capacitação e reação do acrossomo são processos necessários para a fertilização. A capacitação espermática é constituída por múltiplas etapas, que promove várias mudanças bioquímicas e estruturais na membrana espermática (THERIEN, 1998). Uma destas alterações inclui as BSPs, que se ligam a membrana espermática na ejaculação. Inicialmente, a ligação das BSPs aos fosfolipídios de membrana podem prevenir a movimentação dos fosfolipídios e estabilizar a membrana e o espermatozoide pode transitar pelo trato reprodutor feminino, sem que ocorra a capacitação precoce. Porém no trato reprodutor da fêmea, as BSPs se ligam a diferentes proteínas, incluindo as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e aos glicosaminoglicanos que iniciarão a mobilização do

colesterol e fosfolipídeos (fosfatidilcolina) da membrana e sua desestabilização, dando início à reorganização estrutural, que será o passo inicial da capacitação espermática e reação do acrossomo (CHANDONNET; ROBERTS, 1990; MANJUNATH et al., 2007; MANJUNATH; HERIEN, 2002; THERIEN, 2013).

Os fosfolipídeos da membrana espermática são os sítios de ligação das BSPs, principalmente a fosfatidilcolina, fosfatidilcolina plasmalogen e a esfingomielina (DESNOYERS; MANJUNATH 1992; MANJUNATH; SOUBEYRAND, 1994).

Das BSPs, a BSP1 é a principal proteína do plasma seminal de touros que tem a capacidade de se ligar à heparina (CALVETE et al., 1999) e à moléculas semelhantes, como os GAGs e as HDLs (CHANDONNET; ROBERTS, 1990; THERIEN et al., 2005).

As espermadesinas, uma família de polipeptídeos de 12 a 16 kDa com alta similaridade nas sequências (TOPFFER-PETERSEN et al., 1998; MOURA et al., 2007), também estão presentes no plasma seminal dos bovinos (TEDESCHI, 2000). Os principais integrantes desta família são a aSFP (proteína ácida do fluido seminal) e a espermadesina Z13, que se ligam ao espermatozoide durante a ejaculação (TOPFFER-PETERSEN et al., 1998; MOURA et al., 2007).

A aSFP é uma espermadesina isolada e purificada do plasma seminal de touros, formada por uma cadeia de 110 a 130 resíduos de aminoácidos, não-glicosilada e com massa molecular de 13 a 14 kDa (MOURA et al., 2007). Não tem afinidade pela heparina, mas se mantém ligada à membrana espermática até capacitação espermática, antes do espermatozoide da união do espermatozoide com o oócito, ou seja, não se une a zona pelúcida (DOSTÁLOVÀ et al., 1994; TEDESCHI, 2000). Desta maneira, não é considerada uma proteína essencial na união espermatozoide-oócito (TEDESCHI, 2000). A aSFP inibe o estresse oxidativo (MOURA ET AL., 2007; MOURA et al., 2010) e possui atividade antioxidante *in vitro*, sobre o dano oxidativo da membrana espermática (peroxidação lipídica) (SCHONECK, 1996). Além disso, é considerada um fator decapacitante, até o momento da fertilização (DOSTOLOVÀ et al., 1994). A expressão do gene que codifica aSFP nos bovinos foi identificado na vesícula seminal, na ampola e no epidídimo, indicando seus possíveis locais de produção (WEMPE et al., 1992).

A Z13, outra espermedesina, tem sido identificada como a segunda proteína mais abundante do plasma seminal de touros, considerando a BSP1 como a primeira (MOURA et al., 2007). É uma glicoproteína que pode apresentar-se como um dímero de 26 kDa, em condições nativas, e pode ser um monômero de 13 kDa na presença de agentes redutores (TEDESCHI et al., 2000). Possui duas subunidades de 13 kDa conectadas por duas pontes dissulfeto (TEDESCHI et al., 2000). Não é uma proteína glicosilada e possui 50% de similaridade na sua sequência de aminoácidos com a aSFP, e já foi correlacionada com a motilidade espermática (TEDESCHI et al., 2000; MOURA et al., 2007).

A osteopontina (OPN) ou fosfoproteína secretada 1 (SPP1), é constituída por 278 resíduos de aminoácidos, e possui uma massa molecular de 25-55 kDa (KILLIAN et al., 1993; MOURA 2005). É outra proteína ácida multifuncional encontrada no plasma seminal de bovinos (LIAW et al., 1995; MAZZALI et al., 2002; WAI AND KUO, 2004; DENHARDT, 2001; SOUZA et al., 2008). É produzida e secretada pela ampola e vesícula seminal (CANCEL et al., 1999; RODRÍGUEZ et al., 2000). A OPN pode ser sintetizada também pelas células de Sertoli e células germinativas dos túbulos seminíferos, mas estudos de expressão gênica demonstraram sua presença somente nos túbulos seminíferos que contém espermátides alongadas (SIITERI et al., 1995; SOUZA et al., 2008). Esta proteína se liga na cauda e na cabeça do espermatozoide durante a ejaculação (FRANZEN; HEINEGARD, 1985; LIAW et al., 1995; MAZZALI et al., 2002; WAI AND KUO, 2004; DENHARDT, 2001; SOUZA et al., 2008).

A OPN possui uma sequência rica em ácido aspártico, ácido glutâmico e serina (SORENSEN; PETERSEN, 1994), cujas funções foram relacionadas ao remodelamento das membranas, as alterações do citoesqueleto, a modulação imunológica, a prevenção do apoptose (DENHARDT, 2001; WAI; KUO, 2004; ERIKSON et al., 2007; HASHIMOTO et al., 2007; MOURA et al., 2011) e a adesão e migração celular, demonstrando potencialmente sua participação nas interações espermatozoide-oócito (GONÇALVES et al., 2007). A sequência rica em ácido aspártico, ácido glutâmico e serina conferem-lhe a esta proteína a capacidade de se ligar com receptores da família das integrinas, por isso é classificada no grupo de proteínas SIBLINGS (*small integrin-binding ligand, N linked glycoprotein*). O complexo espermatozoide-integrina-OPN tem o potencial

de unir-se a outras OPN com uma maior afinidade (MOURA, 2005).

A prosaposina é uma proteína de 65-70 kDa que pode ser produzida pelas células de sertoli na forma de lisossomos celulares ou pelas células epiteliais de diferentes ductos nos animais, assim pode estar presente no plasma seminal (AMANN et al., 1999;MORALES et al., 2000). Esta proteína tem sido estudada pela sua participação na interação dos gametas (MAGARGEE et al., 2000). Atualmente existe um peptídeo sintético com a sequência proteica da prosaposina que tem a capacidade, ao igual que a molécula nativa, ao estar presente na superfície espermática de aumentar a probabilidade de se ligar o espermatozoide ao oócito; permitindo assim, além da aderência, a penetração do espermatozoide e a consequente fusão das membranas, desta forma o peptídeo ajuda ao se dar início ao desenvolvimento embrionário (HAMMERSTEDT; CRAMER, 1997).

REFERÊNCIAS*

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.

AMANN, R.; KAVANAUGH, J.; GRIEL L.; VOGLMAYR, J. Sperm production of Holstein bulls determined from testicular spermatid reserves, after cannulation of rete testis or vas deferens, and by daily ejaculation. *J Dairy Sci*. v. 57, n. 1, p. 93-9. 1974.

AMANN, R.P., HAMMERSTEDT, R.H., SHABANOWITZ, R.B. Exposure of human, boar, or bull sperm to a synthetic peptide increases binding to an egg-membrane substrate. *J Androl*. v. 20, n. 1, p. 34-41, 1999.

ASLAM, M. M.; KUMARESAN, A.; SHARMA, V. K.; TAJMUL, M.; CHHILLAR, S.; CHAKRAVARTY, A. K.; YADAV, S. Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. *Theriogenology*, v. 82, n. 9, p. 1254-1262, 2014.

BABA, T., AZUMA, S., KASHIWABARA, S. I., TOYODA, Y. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem*, v. 269, n. 50, p. 31845-31849, 1994.

BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*, v. 8, n. 9, p. 1, 2007.

BARBOSA, E. B., VIDOTTO, A., POLACHINI, G. M., HENRIQUE, T., DE MARQUI, A. B. T., TAJARA, E. H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev Assoc Med Bras*, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.

BELLIN, M. E., HAWKINS, H. E., AX, R. L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J Anim Sci*, v. 72, n. 9, p. 2441-2448, 1994.

BENCH, G.S., FRIZ, A.M., CORZETT, M.H., MORSE, D.H., BALHORN, R. DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry*, v. 23, p. 263–271, 1996.

BERTOK, L.; PASZTOR, L. Paper-electrophoretic studies of seminal plasma proteins. *Acta Vet Hung*, v. 7, p. 439-444, 1957.

BERUBE, B.; SULLIVAN, R. Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein. *Biol Reprod*, v. 51, p. 1255-1263, 1994.

BISSONETTE, N., LÉVESQUE-SERGERIE, J. P., THIBAUT, C., BOISSONNEAULT, G. Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm

* Referências organizadas segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), NBR 6023, 2002.

motility: a potential tool to evaluate semen quality. *Reproduction*, v. 138, n. 1, p. 65-80. 2009.

BLASCHUK, O., BURDZY, K., FRITZ, I.B. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem*, v. 258, n. 12, p. 7714-7720, 1983.

BOE-HANSEN, G. B., REGO, J. P. A., CRISP, J. M., MOURA, A. A., NOUWENS, A. S., LI, Y., MCGOWAN, M. R. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. *Anim Reprod Sci*, v. 162, p. 20-30. 2015.

BOERKE, A., DIELEMANM S. J., GADELLA, B. M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, v. 68, n. 1, p. 147-155. 2007.

BREWER, L., CORZETT, M. AND BALHORN R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J Biol Chem*. v. 277. p. 38895–38900. 2002.

BROWN, P.R., MIKI, K., HARPER, D.B., EDDY, E.M. A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. *Biol Reprod*, v. 68, n. 6, p. 2241-2248, 2003.

CABALLERO, J. FRENETTE, G. SULLIVAN, R. Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Vet Med Int*, v. 2011, p. 1-13. 2010.

CALVETE, J.J., CAMPANERO-RHODES, M.A., RAIDIA, M., SANZ, L. Characterisation of the conformational and quaternary structure-dependent heparin-binding region of bovine seminal plasma protein PDC-109. *FEBS lett*, v. 444, n. 2-3, p. 260-264, 1999.

CANCEL, A. M., CHAPMAN, D. A., KILLIAN, G. J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol Reprod*, v. 60, n. 2, p. 454-460, 1999.

CARBONARO, M. Proteomics: Present and future in food quality evaluation. *Trends Food Sci Technol*, v. 15, n. 3, p. 209-216, 2004.

CARDULLO, R.A., FLORMAN, H.M. Strategies and methods for evaluating acrosome reaction. *Methods Enzymol*. v. 225, p. 136-153, 1993.

CARRELL, D. T., EMERY, B. R., Hammoud, S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update*, v. 13, n. 3, p. 313-327, 2007.

CHANDONNET, L., ROBERTS, K. D., CHAPDELAINE, A., MANJUNATH, P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev*, v. 26, n. 4, p. 313-318, 1990.

CHEN, J., WANG, Y., WEI, B., LAI, Y., YAN, Q., GUI, Y., CAI, Z. Functional

expression of ropporin in human testis and ejaculated spermatozoa. *J Androl*, v. 32, n. 1, p. 26-32, 2011.

COELINGH, J.P., MONFOORT, C.H., ROZIEN, T.H., LEUVEN, J.A., SCHIPHOF, R., STEYN-PARVÉ, E.P., BRAUNITZER, G., SCHRANK, B., RUHFUS, A. The complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull spermatozoa. *Biochim Biophys Acta*, v. 285, n. 1, p.1-14, 1972.

COOPER, T. G. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v. 53. p. 119-136. 1998.

COOPER, T.G., YEUNG, C-H. Sperm maturation in the human epididymis. In: De Jonge C, Barratt C, editors. *The sperm cell production, maturation fertilization regeneration*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p. 72–107. 2006.

COSENTINO, M. J. COCKETT, A. T. K. Review article: structure and function of the epididymis. *Urol Res*, v. 14, n. 5, p. 229-240, 1986.

CORZETT, M., MAZRIMAS, J., BALHORN, R. Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev*. v. 61, n. 4, p. 519-527, 2002.

DACHEUX, J. L., CASTELLA, S., GATTI, J. L., DACHEUX, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, v. 63 n. 2, p. 319-341, 2005.

DACHEUX, J.L., DACHEUX, F., DRUART, X. Epididymal protein markers and fertility. *Anim Reprod Sci*, v. 169, p. 76-87, 2016.

DADOUNE, J.P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech*, v. 61, p. 56–75. 2003.

DENHARDT, D. T., NODA, M., O'REGAN, A. W., PAVLIN, D., BERMAN, J. S. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest*, v. 107, n. 9, p. 1055-1061, 2001.

DESNOYERS, L., MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *Journal Biol Chem*. v. 15, n. 267, p. 10149-10155, 1992.

DOGAN, S., VARGOVIC, P., OLIVEIRA, R., BELSER, L. E., KAYA, A., MOURA, A., MEMILI, E. Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls. *Biol Reprod*, v. 92, n. 4, p. 1-9, 2015.

DOSTÀLOVÀ, Z., CALVETE, J. J., SANZ, L., HETTEL, C., RIEDEL, D., SCHÖNECK, C., TÖPFER-PETERSEN, E. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biol Chem Hoppe Seyler*, v. 375, n.7, p. 457-462, 1994.

DRUART, X., RICKARD, J.P., MACTIER, S., KOHNKE, P.L., KERSHAW-YOUNG, C.M., BATHGATE, R., GIBB, Z., CROSSETT, B., TSIKIS, G., LABAS, V., HARICHAUX, G., GRUPEN, C.G., DE GRAAF, S.P. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J Proteomics*, v. 8, p. 91:13-22. 2013.

EDDY, E.M., O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J. D. Neill, eds. (New York: Raven Press), p. 29–78. 1994.

EDDY, E. M., TOSHIMORI, K., & O'BRIEN, D. A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech*, v. 61, n. 1, p. 103-115, 2003.

ERIKSON, D. W., WAY, A. L., CHAPMAN, D. A., KILLIAN, G. J. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. *Biol Reprod*, v. 133, n. 5, p. 909-917, 2007.

EICKHOFF, R., WILHELM, B., RENNEBERG, H., WENNEMUTH, G., BACHER, M., LINDER, D., BUCALA, R., SEITZ, J., MEINHARDT, A. Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol Med*, v. 7, n. 1, p. 27-35, 2001.

EICKHOFF, R., BALDAUF, C., KOYRO, H.W., WENNEMUTH, G., SUGA, Y., SEITZ, J., HENKEL, R., MEINHARDT, A. Influence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) on the zinc content and redox state of protein-bound sulphhydryl groups in rat sperm: indications for a new role of MIF in sperm maturation. *Mol Hum Reprod*. v. 10, n. 8, p. 605-11, 2004.

FAYRER-HOSKEN, R. Anatomy and physiology of the bull's reproductive system. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. v. 13, n. 2. p. 195-202, 1997.

FLESCH, FM, GADELLA, BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*. v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

FLÖRKE, S., PHI-VAN, L., MÜLLER-ESTERL, W., SCHEUBER, H.P., ENGEL, W. Acrosin in the spermiogenesis of mammals. *Differentiation*, v. 24, n. 3, p. 250-256, 1983.

FOLHADELLA, I. M., CASTRO, T. S., SALVADOR, D. F., SÁ, W. F. D., FERREIRA, A. D. M., RAMOS, A. D. A., SANTORO, M. M. Identificação de proteínas do plasma seminal de touros da raça Gir. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 37, p.64-71, 2013.

FORNÉS. M.W., BARBIERI, A., CAVICCHIA, J.C. Morphological and enzymatic study of membrane-bound vesicles from the lumen of the rat epididymis. *Andrologia*, v. 27, n. 1, p. 1-5, 1995.

FRANZÉN, A., HEINEGÅRD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J. Dec*, v. 15, n. 232 (3), p. 715-724, 1985.

FRENETTE, G., LESSARD, C., SULLIVAN, R. Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol Reprod*, v. 67, n. 1, p. 308-313, 2002.

FRENETTE, G., LÉGARÉ, C., SAEZ, F., SULLIVAN. Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Mol Hum Reprod*, v. 11, n. 8, p. 575-582, 2005.

FUJITA, A., NAKAMURA, K. I., KATO, T., WATANABE, N., ISHIZAKI, T., KIMURA, K., NARUMIYA, S. Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *J Cell Sci*, v. 113, n. 1, p. 103-112, 2000.

FUKUDA, M., SAKASE, M., FUKUSHIMA, M., HARAYAMA, H. Changes of IZUMO1 in bull spermatozoa during the maturation, acrosome reaction, and cryopreservation. *Theriogenology*, v. 86, n. 9, p. 2179-2188, 2016.

GADELLA, B. M., & LUNA, C. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*, v. 81, n. 1, p. 74-84, 2014.

GANGULY, I., GAUR, G. K., KUMAR, S., MANDAL, D. K., KUMAR, M., SINGH, U., SHARMA, A. (Differential expression of protamine 1 and 2 genes in mature spermatozoa of normal and motility impaired semen producing crossbred Frieswal (HF× Sahiwal) bulls. *Res Vet Sci*, v. 94, n. 2, p. 256-262, 2013.

GASSET, M., SAIZ, J. L., LAYNEZ, J., SANZ, L., GENTZEL, M., TÖPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J. J. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *Eur J Biochem*, v. 250, n. 3, p. 735-744, 1997.

GATEWOOD JM., COOK GR., BALHORN R., SCHMIDCW., BRADBURY EM. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *Journal Biol Chem*, v. 265, p. 20662–20666, 1990.

GATTI, J. L., CASTELLA, S., DACHEUX, F., ECROYD, H., METAYER, S., THIMON, V., DACHEUX, J. L. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci*, v. 82, p. 321-339, 2004.

GERENA, R. L., IRIKURA, D., EGUCHI, N., URADE, Y., KILLIAN, G. J. Immunocytochemical localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the bull testis and epididymis and on ejaculated sperm. *Biol Reprod*, v. 62 n. 3, p. 547-

556, 2000.

GERENA, R. L., IRIKURA, D., URADE, Y., EGUCHI, N., CHAPMAN, D. A., KILLIAN, G. J. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol Reprod*, v. 58, n. 3, p. 826-833, 1998.

GOOVAERTS, I. G. F., HOFLACK, G. G., VAN SOOM, A., DEWULF, J., NICH, M., DE KRUIF, A., & BOLS, P. E. J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology*, v. 66, n. 2, p. 323-330, 2006.

GOLAN, R., COOPER, TG., OSCHRY, Y., OBERPENNING, F., SCHULZE, H., SHOCHAT, L. Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Hum Reprod*, v. 11. p. 1457–1462, 1996.

GONCALVES, R. F., WOLINETZ, C. D., KILLIAN, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (α V and α 5) and osteopontin on bovine sperm–egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology*, v. 67, n. 3, p. 468-474, 2007.

GUR, Y., BREITBART, H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes & Development*, v. 20, n. 4, p. 411-416, 2006.

GÜRLER, H., MALAMA, E., HEPPELMANN, M., CALISICI, O., LEIDING, C., KASTELIC, J.P., BOLLWEIN, H. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, v. 15, n. 86, p. 562-571. 2016.

HAMMERSTEDT, R.H., CRAMER, P.G. Barbatto GE A method and use of polypeptide in sperm-egg binding to enhance or decrease fertility. International Patent Publication Number WO/97/25620. Geneva: World Intellectual Property Organization, p.1-42. 1997.

HASHIMOTO, M., SUN, D., RITTLING, S. R., DENHARDT, D. T., YOUNG, W. Osteopontin-deficient mice exhibit less inflammation, greater tissue damage, and impaired locomotor recovery from spinal cord injury compared with wild-type controls. *J Neurosci*, v. 27, n. 13, p. 3603-3611, 2007.

HE, L., BAILEY, JL., BUHR, M.M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biol Reprod*, v. 64, n. 1. p. 69-79, 2001.

HESS, R.A. Spermatogenesis overview. In: Knobil E, Neild JD, editors. *Encyclopedia of reproduction*, vol. 4. San Diego, CA: Academic Press; p. 539–545, 1999.

HINTON, B.T., PALLADINO, M.A., RUDOLPH, D., LABUS, J.C. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 7: p. 731–745, 1995.

HINTON, B.T., PALLADINO, M.A. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc Res Tech.* v. 30, p. 67–8, 1995.

IBRAHIM, N. M., GILBERT, G. R., LOSETH, K. J., CRABO, B. G. Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. *J Androl*, v. 21, n. 6, p. 887-894, 2000.

IBRAHIM, N. M., TROEDSSON, M. H., FOSTER, D. N., LOSETH, K. J., FARRIS, J. A., BLASCHUK, O., CRABO, B. G. Reproductive Tract Secretions and Bull Spermatozoa Contain Different Clusterin Isoforms That Cluster Cells and Inhibit Complement-induced Cytolysis. *J Androl*, v. 20, n. 2, p. 230-240, 1999.

INOUE, N., IKAWA, M., ISOTANI, A., OKABE, M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, v. 434, n. 7030, p. 234-238, 2005.

INOUE, N., IKAWA, M., OKABE, M. Putative sperm fusion protein IZUMO and the role of N-glycosylation. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 377, n. 3, p. 910-914, 2008.

JOBIM, M. I. M., OBERST, E. R., SALBEGO, C. G., SOUZA, D. O., WALD, V. B., TRAMONTINA, F., MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v. 61, n. 2, p. 255-266, 2004.

JOHNSON, A. L., HOWARDS, S. S. Intratubular hydrostatic pressure in testis and epididymis before and after long-term vasectomy in the guinea pig. *Biol Reprod*, v. 14, n. 4, p. 371-376, 1976.

JONES, R. C., DACHEUX, J. L., NIXON, B., ECROYD, H.W. Role of the epididymis in sperm competition. *Asian J Androl*. v. 9, n. 4, p. 493-499, 2007.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod*, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

LAFLEUR, M., COURTEMANCHE, L., KARLSSON, G., EDWARDS, K., SCHWARTZ, J. L., MANJUNATH, P. Bovine binder-of-sperm protein BSP1 promotes protrusion and nanotube formation from liposomes. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 399, n. 3, p. 406-411, 2010.

LALANCETTE, C., MILLER, D., LI, Y., KRAWETZ, S. A. Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem*, v. 104, n. 5, p. 1570-1579, 2008.

LARSON, B.L., SALISBURY, G.W. The proteins of bovine seminal plasma. 1.

Preliminary and electrophoretic studies. *Journal Biol Chem*, v. 206, p.741-749, 1954.

LARSSON, B., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?. *Anim Reprod Sci*, v. 60, p. 327-336, 2000.

LIAW, L., LINDNER, V., SCHWARTZ, S. M., CHAMBERS, A. F., GIACHELLI, C. M. Osteopontin and $\beta 3$ integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate arg-gly-asg-dependent endothelial migration in vitro. *Circulation Res*. v. 77, p. 665–672, 1995.

MAGARGEE, SF, CRAMER, PG, HAMMERSTEDT, RH. Increased in vitro binding and fertilizing ability of mouse sperm exposed to a synthetic peptide. *Mol Reprod Dev*. v. 57, n. 4, p. 406-411, 2000.

MAIER, W. M., NUSSBAUM , G., DOMENJOU, D. L., KLEMM, U., ENGEL ,W. The lack of protamine 2 (P2) in boar and bull spermatozoa is due to mutations within the P2 gene. *Nucleic Acids Res*. v. 11, n. 18, p. 1249-54. 1990.

MANJUNATH, P., LEFEBVRE, J., JOIS, P. S., FAN, J., WRIGHT, M. W. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol Reprod*, v. 80, n. 3, p. 394-397, 2009.

MANJUNATH, P., MARCEL, Y. L., UMA, J., SEIDAH, N. G., CHRETIEN, M., CHAPDELAINE, A. Apolipoprotein AI binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem*, v. 264, n. 28, p. 16853-16857, 1989.

MANJUNATH, P., SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J*, v. 241, n. 3, p. 685-692, 1987.

MANJUNATH, P., SOUBEYRAND, S., CHANDONNET, L., ROBERTS, K. D. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. *Biochem J*, v. 303, n. 1, p. 121-128, 1994.

MANJUNATH, P., THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol*, v. 53, n. 1, p. 109-119, 2002.

MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Reprod Domest Anim*, v. 65, p. 217-228, 2007.

MAZZALI, M., KIPARI, T., OPHASCHAROENSUK, V., WESSON, J.A., JOHNSON, R., HUGHES, J. Osteopontin: a molecule for all seasons. *Q J Med*, v. 95, p. 3–13, 2002.

MORALES, C. R., ZHAO, Q., LEFRANCOIS, S., HAM, D. Role of prosaposin in the male reproductive system: effect of prosaposin inactivation on the testis,

epididymis, prostate, and seminal vesicles. *Arch Androl*, v. 44, n. 3, p.173-186, 2000.

MORTARINO, M., TEDESCHI, G., NEGRI, A., CECILIANI, F., GOTTARDI, L., MAFFEO, G., RONCHI, S. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. *Electrophoresis*, v. 19, n. 5, p. 797-801, 1998.

MOURA, A. A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. *Anim Reprod*, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2005.

MOURA, A. A., ANDRADE, C. R., SOUZA, C. E. A., RÊGO, J. P. A., MARTINS, J. A. M., OLIVEIRA, R. V. MENEZES, E. B. S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. *Rev bras reprod anim*, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 139-144, 2011.

MOURA, A. A., CHAPMAN, D. A., KOC, H., KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci*, v. 98, n. 3, p. 169-188, 2007.

MOURA, A. A., KOC, H., CHAPMAN, D. A., KILLIAN, G. J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl*, v. 27, n. 2, p. 201-211, 2006.

MOURA, A. A., SOUZA, C. E., STANLEY, B. A., CHAPMAN, D. A., KILLIAN, G. J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *J Proteomics*, v. 73, n. 10, p. 2006-2020, 2010.

NAGDAS, S. K., SMITH, L., MCNAMARA, A., HERNANDEZ-ENCARNACION, L., MEDINA-ORTIZ, I. Identification and characterization of a bovine sperm acrosomal matrix protein and its mechanism of interaction with acrosomal hydrolases. *Mol Cell Biochem*, v. 41, n. 1-2, p. 11-23, 2015.

NAUC, V., MANJUNATH, P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol Reprod*, v. 63, n. 4, p. 1058-66, 2000.

O'BRYAN, MK., MURPHY, BF., LIU, DY., CLARKE, G. N., BAKER, H. W. The use of anticlusterin monoclonal antibodies for the combined assessment of human sperm morphology and acrosome integrity. *Hum Reprod*. v. 9, n. 9, p. 1490-1496, 1994.

OIKI, S., HIYAMA, E., GOTOH, T., IIDA, H. Localization of Tektin 1 at both acrosome and flagella of mouse and bull spermatozoa. *Zoolog Sci*, v. 31, n. 2, p. 101-107, 2014.

OLIVA, R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*, v. 12, n. 4, p. 417-435, 2006.

PANKHURST, G. J., BENNETT, C. A., EASTERBROOK-SMITH, S. B. Characterization of the heparin-binding properties of human clusterin. *Biochemistry*, v. 37, n. 14, p. 4823-4830, 1998.

PALMER D.J, CHRISTIE D.L. Identification of molecular aggregates containing glycoproteins III, J, K (carboxypeptidase H), and H (Kex2-related proteases) in soluble and membrane fractions of adrenal medullary chromaffin granules. *J Biol Chem*. v. 267, p. 19806–19812, 1992.

PARENT, S., LEFIEVRE, L., BRINDLE, Y., SULLIVAN, R. Bull Subfertility Is Associated With Low Levels of a Sperm Membrane Antigen. *Mol Reprod Dev*, v. 52, p. 57–65, 1999.

PATEL, M. K., CHEEMA, R. S., BANSAL, A. K., GANDOTRA, V. K. A 31-kDa Seminal Plasma Heparin Binding Protein reduces cold shock stress during Cryo-preservation of Cross-bred Cattle Bull Semen. *Theriogenology*. 2016.

PHELPS, B.M., PRIMAKOFF, P., KOPPEL, D.E., LOW, M.G., MYLES, D.G. Restricted lateral diffusion of PH-20, a PI-anchored sperm membrane protein. *Science*. v. 24, n. 240, p. 4860:1780-2, 1988.

REGO, J. P. A., CRISP, J. M., MOURA, A. A., NOUWENS, A. S., LI, Y., VENUS, B., MCGOWAN, M. R. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Anim Reprod Sci*, v. 148, n. 1, p. 1-17, 2014.

REYES-MORENO, C., BOILARD, M., SULLIVAN, R., SIRARD, M.A. Characterization of secretory proteins from cultured cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* V. 63, p. 500–509, 2002.

RIOS, E. A., RUIZ, A. C., GARCIA, D. A., RUBIO, P. J. P. Z., TOBÓN, A. R., GARCIA, A. R. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *ContactoS*, v. 78, p. 5-11, 2010.

ROBAIRE, B., HINTON, B. T., ORGEBIN-CRIST, M. C. The epididymis. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, v. 1, p. 1071-148. 2006.

RODRÍGUEZ, C. M., DAY, J. R., KILLIAN, G. J. Osteopontin gene expression in the Holstein bull reproductive tract. *J Androl*, v. 21 n. 3, p. 414-420, 2000.

RODRÍGUEZ-VILLAMIL, P., HOYOS-MARULANDA, V., MARTINS, J. A. M., OLIVEIRA, A. N., AGUIAR, L. H., MORENO, F. B., BERTOLINI, M. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. *Theriogenology*, v. 85, n. 3, p. 540-554, 2016.

ROY, A., LIN, Y. N., AGNO, J. E., DEMAYO, F. J., MATZUK, M. M. Tektin 3 is required for progressive sperm motility in mice. *Mol Reprod Dev*, v. 76, n. 5, p. 453-459, 2009.

SAEZ, F., FRENETTE, G., SULLIVAN, R. Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. *J Androl*, v. 24, n. 2, p. 149-154, 2003.

SARSAIFI, K., HARON, A. W., VEJAYAN, J., YUSOFF, R., HANI, H., OMAR, M. A., OTHMAN, A. M. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and their relationship with semen quality. *Theriogenology*, v. 84, n. 6, p. 956-968, 2015.

SHAMAN, J. A., WARD, W. S. Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. In: De Jonge C, Barratt C, editors. *The sperm cell production, maturation fertilization regeneration*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; p. 31–48, 2006.

SIMÕES, R., FEITOSA, W.B., MENDES, C.M., MARQUES, M.G., NICACIO, A.C., DE BARROS, F.R., VISINTIN, J.A., ASSUMPÇÃO, M.E. use of chromomycin a3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. *Biotech histochem*. v. 84, n. 3, p. 79-83, 2009.

SIITERI, J. E., ENSRUD, K. M., MOORE, A., HAMILTON, D. W. identification of osteopontin (opn) mrna and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. *Mol Reprod Dev*, v. 40, n. 1, p. 16-28, 1995.

SORENSEN, E. S., PETERSEN, T. E. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 198, n. 1, p. 200-205, 1994.

SOTOLONGO, B., LINO, E., WARD, W. S. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod*, v. 69, p. 2029–2035. 2003.

SOUZA, C. E. A., MOURA, A. A., MONACO, E., KILLIAN, G. J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim Reprod Sci*, v. 105, n. 1, p. 72-89. 2008.

SULLIVAN, R. Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian J Androl*, v. 17, 5, p. 726. 2015.

SULLIVAN, R., SAEZ, F., GIROUARD, J., FRENETTE, G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis*, v. 35, n. 1, p. 1-10. 2005.

SULLIVAN, R., SAEZ, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*. v. 14, n. 146, p. 21-35. 2013.

SUTOVSKY, P., MANANDHAR, G. Mammalian spermatogenesis and sperm

structure: anatomical and compartmental analysis. In: De Jonge C, Barratt C, editors. The sperm cell production, maturation fertilization regeneration. Cambridge, UK: Cambridge University Press, p. 1–30. 2006.

SUTOVSKY, P., LOVERCAMP, K. Molecular markers of sperm quality. Soc Reprod Fertil Suppl, v. 67, p. 247–256. 2010.

SUTOVSKY, P., MORENO, R., RAMALHO-SANTOS, J., DOMINKO, T., THOMPSON, W. E., SCHATTEN, G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. J Cell Sci, v. 114, n. 9, p. 1665-1675. 2001.

SYLLA, L., PALOMBI, C., STRADAIOLI, G., VAGNILUCA, A., & MONACI, M. Effect of semen collection by transrectal massage of accessory sexual glands or artificial vagina on the outcome of breeding soundness examinations of Italian yearling beef bulls. Theriogenology, v. 83, n. 5, p. 779-785. 2015.

SYLVESTER, S.R., MORALES, C., OKO, R., GRISWOLD, M.D. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. Biol Reprod. v. 45, n. 1, p. 195-207. 1991.

SMITH, R., KAUNE, H., PARODI, D., MADARIAGA, M., RIOS, R., MORALES, I., CASTRO, A. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. Hum Reprod. v. 21, n. 4, p. 986-993. 2006.

SCHONECK, C. J., BRAUN, R. Einspanier Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. Theriogenology, v. 45, p. 633–642. 1996.

TAKIGUCHI, H., MURAYAMA, E., KANEKO, T., KURIO, H., TOSHIMORI, K., IIDA, H. Characterization and subcellular localization of Tektin 3 in rat spermatozoa. Mol Reprod Dev, v. 78, n. 8, p. 611-620. 2011.

TEDESCHI, G., OUNGRE, E., MORTARINO, M., NEGRI, A., MAFFEO, G., RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. Eur J Biochem, v. 267, n. 20, p. 6175-6179. 2000.

THERIEN, I., BERGERON, A., BOUSQUET, D., MANJUNATH, P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. Mol Reprod Dev, v. 71, n. 1, p. 97-106. 2005.

THERIEN, I., MOREAU, R., MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. Biol Reprod, v. 59, n. 4, p. 768-776. 1998.

THERIEN, A., MANJUNATH, P., LAFLEUR, M. Chemical and physical requirements for lipid extraction by bovine binder of sperm BSP1. Biochim Biophys Acta, v. 1828, n. 2, p. 543-551. 2013.

THÉRY, C., ZITVOGEL, L., AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* v. 2, n. 8, p. 569-579. 2002.

TOPFER-PETERSEN, E., ROMERO, A., VARELA, P. F., EKHLASI-HUNDRIESER, M., DOSTALOVA, Z., SANZ, L., CALVETE, J. J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, v. 30, n. 4-5, 217-224. 1998.

TUNG, P. S., FRITZ, I. B. Immunolocalization of clusterin in the ram testis, rete testis, and excurrent ducts. *Biol Reprod*, v. 33, n. 1, p. 177-186. 1985.

WAI, P. Y., KUO, P. C. The role of osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res*, v. 121, n. 2, p. 228-241. 2004.

WALES, R. G., WALLACE, J. C., WHITE, I. G. Composition of bull epididymal and testicular fluid. *J Reprod Fertil.* v. 12, n. 1, p. 139-44. 1966.

WARD WS. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod*, v. 48, p. 1193–201. 1993.

WATERS, S. I., WHITE, J. M. Biochemical and molecular characterization of bovine fertilin alpha and beta (ADAM 1 and ADAM 2): a candidate sperm-egg binding/fusion complex. *Biol Reprod*, v. 56, n. 5, p.1245-1254. 1997.

WEMPE, F., EINSPANIER, R., SCHEIT, K. H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 183, n. 1, p. 232-237. 1992.

WESTFALEWICZ, B., DIETRICH, M.A., MOSTEK, A., PARTYKA, A., BIELAS, W., NIŻAŃSKI, W., CIERESZKO., A. Analysis of bull (*Bos taurus*) seminal vesicle fluid proteome in relation to seminal plasma proteome. *J Dairy Sci.* v. 100, n. 3, p. 2282-2298. 2017.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, p. 189–317. 1993.

YANAGIMACHI, R., KAMIGUCHI, Y., MIKAMO, K., SUZUKI, F., YANAGIMACHI, H. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *Am J Anat.* V. 172, n. 4, p. 317-30. 1985.

YOON, S. J., RAHMAN, M. S., KWON, W. S., PARK, Y. J., PANG, M. G. addition of cryoprotectant significantly alters the epididymal sperm proteome. *PLoS One*, v. 11, n. 3, 2016.

YOUNG, S. A., AITKEN, J., BAKER, M. A. Phosphorylation of Izumo1 and Its Role in Male Infertility. *Asian J Androl.* v. 17, 5, p. 708-10. 2015.

ZALATA, A. A., CHRISTOPHE, A. B., DEPUYDT, C. E., SCHOONJANS, F.,

COMHAIRE, F. H. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Mol Hum Reprod*, v. 4, n. 2, p. 111-8. 1998.

HIPÓTESE

As proteínas relacionadas á fertilidade em bovinos se ligaram em quantidade semelhante nos espermatozoides da cauda do epidídimo e do ejaculado

OBJETIVO GERAL

Investigar e sequenciar as proteínas da membrana de espermatozoides colhidos do ejaculado e da cauda do epidídimo, do plasma seminal e do fluido epididimário

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar as proteínas dos espermatozoides colhidos do ejaculado e da cauda do epidídimo, do plasma seminal e do fluido epididimário
- Identificar as proteínas do plasma seminal aderidas aos espermatozoides colhidos do ejaculado e da cauda do epidídimo
- Estudar as funções e processos celulares das proteínas da membrana de espermatozoides colhidos do ejaculado e da cauda do epidídimo, do plasma seminal e do fluido epididimário

CAPÍTULO 2

ARTIGO

Proteômica do plasma seminal, fluido epididimário, espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo de touros Brangus

Proteomic of seminal plasma, epididymal fluid, spermatozoa of the ejaculate and epididymis from Brangus bulls

Artigo redigido segundo as normas da Ciência Animal Brasileira, ISSN 1809-6891, ranqueada como B3 pelo QUALIS – CAPES de 2015

RESUMO

As proteínas dos fluido e células do sistema reprodutor são constantes objetos de estudo, a fim de elucidar eventos fisiológicos e buscar biomarcadores das funções reprodutivas, facilitando a escolha de reprodutores. Em vista disso, este estudo objetivou caracterizar as proteínas dos espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo, do plasma seminal e do fluido epididimário de touros. Foram utilizados 10 touros adultos da raça Brangus. O sêmen foi colhido por eletroejaculação e, posteriormente os machos foram orquiectomizados para a colheita dos espermatozoides e fluido do epidídimo. As células do ejaculado e da cauda do epidídimo foram analisadas subjetivamente após a colheita, e o plasma seminal e fluido do epidídimo foram separados por centrifugação. Então, as amostras foram preparadas para a espectrometria de massas (ESI-QTOF MS/MS), com um pool de cada grupo. A concentração de proteínas totais não diferiu entre os grupos. Foram encontradas 67 e 66 proteínas nos espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo, e 20 e 16 no plasma seminal e líquido epididimário, respectivamente. Além disso, 52 proteínas foram comuns entre os espermatozoides obtidos do ejaculado e da cauda do epidídimo, e 9 entre o plasma seminal e fluido epididimário. Atividade catalítica foi a principal função molecular nas células espermáticas; já no plasma seminal foi de ligação e no fluido epididimário, atividade catalítica. As proteínas que se destacaram foram: 14-3-3 protein zeta/delta, A-kinase anchor protein, Calmodulin, Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial, Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2, Fibronectin type III domain-containing protein 8, Glucose-6-phosphate isomerase, L-amino-acid oxidase, Phosphoglycerate mutase 2, Ropporin-1, Seminal ribonuclease, T-complex protein 1 subunit epsilon, Clusterin, Epididymal secretory protein E1, Serum albumin. Com base nos resultados, conclui-se que há uma importante contribuição das proteínas do plasma seminal para a célula espermática, fornecendo macromoléculas essenciais para a capacitação espermática, reação do acrossomo, ligação espermatozoide-oócito e fertilização; já o fluido epididimário apresenta como principal função manter a integridade e imobilidade dos espermatozoides.

Palavras-chave: Célula-espermática; Capacitação; Epidídimo; Fertilização; Proteína; Reação-acrossomo.

ABSTRACT

Proteins of fluid and cells from reproductive system are constant objects of study, in order to elucidate physiological events and to search biomarkers of the reproductive functions, facilitating the breeding selection. Thus, this study aimed to characterize the proteins of the ejaculate and epididymis spermatozoa, the seminal plasma and the epididymal fluid of bulls. Ten adult Brangus bulls were used. The semen was collected by electroejaculation and then, the males were orchietomized for collection of spermatozoa and fluid from the epididymis. The ejaculate and epididymis cells were subjectively analyzed after collection, and the seminal plasma and epididymis fluid were separated by centrifugation. The samples were prepared for mass spectrometry (ESI-QTOF MS/MS), with a pool of each group. Total protein concentration did not differ between groups. We found 67 and 66 proteins in the ejaculate and epididymis spermatozoa, and 20 and 16 in the seminal plasma and epididymal fluid, respectively. Moreover, 52 proteins were common in the spermatozoa obtained from ejaculate and epididymis, and 9 in the seminal plasma and epididymal fluid. Catalytic activity was the main molecular function in sperm cells and epididymal fluid; in the seminal plasma was binding. The main proteins found were: 14-3-3 protein zeta/delta, A-kinase anchor protein, Calmodulin, Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial, Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2, Fibronectin type III domain-containing protein 8, Glucose-6-phosphate isomerase, L-amino-acid oxidase, Phosphoglycerate mutase 2, Ropporin-1, Seminal ribonuclease, T-complex protein 1 subunit epsilon, Clusterin, Epididymal secretory protein E1, Serum albumin. Based on the results, we concluded that there is an important contribution of seminal plasma proteins to the sperm cell, providing macromolecules essential for sperm capacitation, acrosome reaction, spermatozoa-oocyte binding and fertilization; whereas the epididymal fluid has main function maintained the integrity and nonmotile sperm cells.

Keywords: Acrosome-reaction; Capacitation; Epididymus; Fertilization; Protein; Sperm-cell

1. Introdução

No estudo da fertilidade bovina é relevante reconhecer o papel do espermatozoide, até se tornar uma célula competente capaz de contribuir para a fecundação e formação de um novo organismo, o embrião (1). Para isso, o espermatozoide é conduzido por um processo de transformação, iniciado no testículo, durante a espermatogênese, e que se completa no trato reprodutor feminino (2). Durante este processo, as células espermáticas necessitam de determinadas proteínas, indispensáveis para promover a fertilização (3).

As modificações sofridas pela célula espermática incluem várias fases, como maturação pós-testicular no epidídimo, capacitação e reação do acrossomo, e em cada fase estão envolvidas proteínas específicas, que exercerão sua função para contribuindo para a fecundação (2,4). Desta maneira, as proteínas aderidas à superfície espermática, as quais estão presentes no fluido durante este percurso no epidídimo, tem funções relacionadas ao processo de maturação e a motilidade e podem regular a fertilidade de um macho (4).

Após estas modificações, os espermatozoides durante a ejaculação, os espermatozoides entrem em contato com as secreções das glândulas sexuais acessórias e adquirem novas proteínas. Desta forma, o plasma seminal, a porção fluída do ejaculado, será formada por uma mistura complexa de secreções originadas do testículo, epidídimo e glândulas acessórias, a qual também contém fatores que podem influenciar nas funções e nos processos reprodutivos, que estão relacionados à fertilidade (5,6).

Nos últimos anos, estes fatores, que são principalmente proteínas, têm sido identificados e caracterizados, a fim de identificar marcadores de capacidade reprodutiva de touros (7). Várias famílias de proteínas presentes do plasma seminal já foram correlacionadas com a fertilidade de touros (8), oriundos das glândulas sexuais acessórias e do fluido epididimário (9,10).

A identificação de proteínas é uma ferramenta que auxilia na busca de informações sobre os mecanismos moleculares relacionados à fertilidade ou infertilidade masculina (11). Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar e comparar as proteínas do plasma seminal, fluido epididimário, espermatozoides colhidos do ejaculado e da cauda do epidídimo de touros, a fim de investigar a origem e o envolvimento destas macromoléculas na fisiologia espermática.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza e adquiridos das empresas GE Healthcare (Uppsala, Suécia), Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), Merck S.A. (São Paulo, Brasil) ou Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda. (São Paulo, Brasil), quando não, foram citados.

2.2. Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os preceitos éticos recomendados pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) e após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, Protocolo nº 65/2015 – CEUA, 12 de junho de 2015.

2.3. Animais

Foram utilizados 10 touros da raça Brangus clinicamente sadios, entre 24 e 36 meses de idade, com um peso médio de 400 kg. No momento da avaliação, os animais foram classificados de acordo com escore de condição corporal e todos os animais foram submetidos ao exame andrológico, previamente ao experimento.

2.4. Colheita dos espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo

Após limpeza da região prepucial, os ejaculados foram colhidos por eletroejaculação. Posteriormente, efetuou-se a orquiectomia convencional, após anestesia regional (cordão espermático) e local (linha de incisão) com lidocaína. Após a castração, os complexos testículos/epidídimos foram separados. O ducto deferente foi ligado com fio de náilon e o epidídimo foi desconectado do testículo, lavado com solução fisiológica a temperatura ambiente e mantido em placa de petri a 37°C, sobre uma mesa aquecedora. As células foram colhidas por fluxo retrógrado segundo metodologia descrita por Garde et al. (12) e Bruemmer et al. (13). O epidídimo foi seccionado na altura da cauda e um cateter venoso, sem o guia, foi utilizado para canular o ducto deferente. Pelo cateter, foi realizada lavagem, com 10 mL de solução fisiológica para cada epidídimo.

2.5. *Análise seminal*

Tanto as células do ejaculado, assim como os espermatozoides da cauda do epidídimo foram avaliados quanto ao volume e, subjetivamente, as características como turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática.

O volume foi determinado por leitura direta no tubo de colheita graduado em mL.

O turbilhonamento ou motilidade em massa foi observada em microscópio óptico num aumento de 40X. O turbilhão foi classificado utilizando-se um escore de 0 a 5

A motilidade e o vigor foram avaliados sob microscópio óptico num aumento de 100X, expressando-se a porcentagem de espermatozoides móveis (0 a 100%) para a motilidade e um escore de 0 a 5 para a vigor. A partir destes dois parâmetros foi calculado o índice de motilidade progressiva pela fórmula $IMP = [motilidade + (vigor \times 20)]/2$ (14).

A concentração espermática foi determinada em câmara de Neubauer.

Para morfologia espermática foi avaliada nas amostras diluídas em formol-salina em microscópio de contraste diferencial de fase, pela porcentagem de espermatozoides com alterações morfológicas (defeitos maiores e menores) sendo contadas 200 células de cada amostra.

2.6. *Preparação das amostras para análise de proteínas*

2.6.1. *Plasma seminal e fluido epididimário*

Após a colheita e avaliação do ejaculado e da cauda do epidídimo, as amostras foram centrifugadas à 800g, durante 10 minutos para separação do plasma seminal e fluido epididimário. O *pellet* (espermatozoides) foi mantido para solubilização das proteínas espermáticas. O plasma seminal e fluido epididimário foram submetidos a uma segunda centrifugação a 10.000g, durante 30 minutos, a 4° C e o sobrenadante foi armazenado a -20° C.

2.6.2. *Solubilização das proteínas espermáticas*

Os espermatozoides obtidos após a primeira centrifugação do ejaculado ou das amostras colhidas da cauda do epidídimo foram lavados em tampão contendo inibidores de proteases (50 mM TRIS-HCL pH 7,2, 0,8 mM EDTA, 1 µg/mL de aprotinina, 1 µg/mL de leupeptina, 35 µg/mL *phenylmethylsulfonyl fluoride* - PMSF), por 3 vezes, a 800g, durante 10 minutos. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e um tampão contendo 50mM ureia foi utilizado para solubilização das proteínas espermáticas. A seguir,

as amostras foram sonicadas (Sonifier Sound Enclosures Ultrasonics, Shanghai, China) segundo Baker et al. (15) modificado por Souza (16) com uma probe de 3,0 mm, amplitude de 20%, por 30 segundo em banho de gelo, sendo repetidas 10 vezes, com intervalos de 1 minuto entre as séries. Após a sonicação, as amostras foram homogenizadas durante 3 minutos e centrifugadas a 15.000g, a 4° C, durante 30 minutos (16) e o sobrenadante foi armazenado a -20° C.

2.7. Determinação da concentração de proteína total

A concentração de proteína total das amostras de plasma seminal, fluido do epidídimo, espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo foi determinada por método colorimétrico e espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific™ Wilmington, Delaware USA). Utilizou-se o método de *Pierce™ 660nm Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific™, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), na proporção de 1: 15 (amostra: reagente) para quantificar as proteínas solubilizadas dos espermatozoides e o método de Bradford (B6916, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), na proporção 1: 30 (amostra: reagente) para as amostras de plasma seminal e fluido epididimário.

2.8. Precipitação de proteínas em acetona

A partir da concentração de proteína total, uma alíquota contendo de 50 µg de proteína foi separada e a precipitação proteica com acetona foi realizada para redução do volume. Para precipitação, a amostra foi diluída na proporção de 1: 4 em acetona. A mistura foi homogeneizada e mantida em repouso por 2 horas a -20° C, agitando-se a cada 10 minutos. A seguir, foram centrifugadas a 5.000g, durante 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e novamente foi adicionada acetona no mesmo volume inicial. A mistura foi homogeneizada e novamente centrifugada a 5.000g, durante 20 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi mantido no tubo aberto, em uma capela, durante 10 minutos, para evaporação dos resíduos de acetona. Então, o *pellet* foi eluído com 100 µL de 50 mM TRIS-HCl pH 7,2. A homogeneização foi realizada e a amostra foi conservada a -20° C até a digestão triptica.

2.9. Digestão triptica dos peptídeos em solução e espectrometria de massas

As amostras foram digeridas segundo Villén e Gigy (17) com modificações. A alíquota contendo 50 µg de proteína no volume de 100 µL adicionou-se o mesmo volume

(1: 2) de uma solução aquosa de ureia 8 M. A seguir, foram acrescentados 5 mM na solução final de ditioneitol (DTT) diluído em solução aquosa de bicarbonato de amônio 50 mM, para a redução ou clivagem das pontes dissulfetos formadas entre os resíduos de cisteína. A mistura foi mantida durante 25 minutos a 56° C em banho seco. Após a incubação, para a alquilação dos tiois livres foi adicionada iodoacetamida (IAA) em solução aquosa de bicarbonato de amônio 50 mM, na concentração de 14 mM na solução final e novamente a amostra foi incubada, durante 30 minutos à temperatura ambiente protegida da luz. Para o *quench* da IAA livre (retirada do excesso de IAA) foi adicionado novamente DTT 5 mM na solução final, preparado em solução aquosa de bicarbonato de amônio 50 mM e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente protegido da luz.

A amostra foi diluída na proporção de 1: 5 em 50 mM de bicarbonato de amônio para reduzir a concentração da ureia para 1,6 M, e a seguir foi adicionada uma solução aquosa de 1 mM na solução final de cloreto de cálcio (CaCl₂).

A seguir, adicionou-se uma solução contendo tripsina (Sequence Grade Modified Tripsin V5111, Promega Biotecnologia do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) a 20 ng/μL em solução aquosa de bicarbonato de amônio 50 mM na proporção de 1: 50 de enzima/substrato. A mistura foi incubada por aproximadamente 16 horas, a 37° C, em banho seco. Após este período, a ação da enzima foi interrompida pela adição de ácido trifluoacético (TFA) na concentração final de 0,4 %. O pH foi aferido visando mantê-lo abaixo de 2,0. As amostras foram centrifugadas 2.500g, por 10 minutos em temperatura ambiente e o pellet descartado.

O sobrenadante foi transferido para colunas de dessalinização (Sep-Pak C18, Waters Corporation, Milford, MA, USA), após estabilização da coluna de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram concentradas (SPD1010 Integrated SpeedVac™ System, Waltham, MA, USA) para 1 μL e armazenadas a -20° C até a realização da espectrometria de massas.

Para espectrometria de massas, as amostras foram descongeladas, diluídas em ácido fórmico 0,1 % na proporção de 0,7 μg de proteína/μL, homogeneizadas em agitador de tubos e centrifugadas a 1.100g por 5 minutos. A seguir, 20 μL do sobrenadante foram depositados em tubos específicos para análise no espectrômetro de massas (*Clear glass 12 x 32 mm screw neck total recovery vial* com tampa, Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Para análise de proteínas por espectrometria de massas, uma alíquota de 4,5 μL,

resultante da digestão dos peptídeos foi separada por uma coluna C18 (100 µm x 100 mm) RP-nano UPLC (Waters® nanoACQUITY UPLC®, Waters Corporation, Milford, MA, USA) acoplada ao espectrômetro de massas Q-Tof (Micromass® Q-Tof PREMIER™ Mass Spectrometer, Waters Corporation, Milford, MA, USA) com fonte de *nanoelectrospray*, com uma taxa de fluxo de 0,600 µL/minuto. Gradiente de 2-90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico Foi mantido, durante 45 minutos. A voltagem do *nanoelectrospray* foi mantida em 3,5 kV, uma voltagem cone de 30 V e temperatura da fonte de 100 µC. O instrumento foi operado em modo *top three*, no qual um espectro de massa (MS) é adquirido seguido por MS/MS dos três picos mais intensos detectados. Após a fragmentação MS/MS, o ion foi mantido na lista de exclusão por 60 segundos e para a análise de peptídeos de clivagem endógena, um tempo de exclusão real foi usado.

Os espectros foram adquiridos usando o *software* MassLynx™ v.4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) e os arquivos de dados brutos foram convertidos para um formato de lista de picos (.mgf, *mascot generic format*) sem somar os *scans* e buscados contra o banco de dados UniprotSProt_012015 (<http://www.uniprot.org/>) taxonomia *Bos taurus*, usando a ferramenta Mascot version 2.3.02 e Mascot Distiller MDRO version 2.4.0.0 (Matrix Science Inc, Boston, MA, USA). A quantificação relativa de cada proteína na mistura foi determinada pelo *exponentially modified protein sbundance index* (emPAI), obtido pelo software Mascot Distiller (18).

Os parâmetros de procura incluíram tripsina como protease, com permissão de no máximo de 1 clivagem perdida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Tolerância de 0,1 Da para ambos precursor (MS) e fragmento (MS/MS) de íons, e massa molecular monoisotópica.

As análises de espectrometria de massas foram efetuadas no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP, Brasil.

Após identificação proteica a anotação da ontologia gênica das proteínas resultantes foi obtida no UniprotKB (www.uniprot.org.br) usando as categorias função molecular, processo biológico e componente celular. As figuras referentes à ontologia gênica foram montadas no *Panther version 10* (<http://www.pantherdb.org>, 19).

Análise estatística

Todas as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e

analisadas pelo teste *Mann-Whitney Rank Sum Test* (parâmetros seminais) quando a distribuição não foi normal e pelo *t test* (proteínas totais) quando a distribuição foi normal. As variáveis com distribuição normal foram representadas pela média e erro padrão, e as restantes pela mediana, valores mínimos e máximos. Os resultados da análise estatística foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

Os resultados referentes à comparação do emPAI s escores das proteínas identificadas na espectrometria de massas entre as amostras provenientes do ejaculado e da cauda do epidídimo foram representadas pelo raio (*fold change*) entre o maior e menor escore, e foram considerados como mais ou menos abundantes quando este raio foi $> 1,5$.

3. Resultados

Parâmetros seminais

Os touros escolhidos para este estudo apresentaram uma circunferência escrotal de $34,3 \pm 4,5$ cm. Como representado na Tabela 1, apenas a porcentagem de espermatozoides móveis foi maior nas amostras de espermatozoides colhidas do epidídimo. Todos os parâmetros seminais analisados são detalhados na Tabela 1.

Características do proteoma associado as células obtidas do ejaculado e da cauda do epidídimo

A concentração de proteínas totais do extrato proteico obtido dos espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo não diferiram (média $\pm$ erro padrão: $8,25 \pm 0,90$ mg/mL e $7,7 \pm 0,53$ mg/mL, respectivamente, $P = 0,500$). Foram encontrados 87 e 84 espectros, que resultaram em 67 e 66 proteínas nos espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo, respectivamente. Dentro das proteínas mais abundantes identificadas nas células espermáticas do ejaculado, estão: a BSP1, *spermadhesin-1*, *protein S100-A8*, *seminal ribonuclease*, *tubulin beta-4b chain*, BSP3, *calmodulin*, *sperm acrosome membrane-associated protein 3*, *cytochrome c oxidase subunit 5a mitochondrial* e a *ATP synthase subunit beta, mitochondrial*. Outras proteínas de grande importância biológica foram também identificadas no ejaculado, embora em menor quantidade, como são: *tubulin alpha-8 chain*, *ropporin-1*, *calmodulin*, BSP5, *metalloproteinase inhibitor 2*, *sperm surface protein-Sp17*, *acrosin-binding protein*, *tubulin beta-6 chain*, *outer dense fiber protein 2*, *sperm acrosome membrane-associated protein 3*, *sperm acrosome membrane-*

associated protein 1, acrosin, osteopontin, 10 kda heat shock protein mitochondrial, clusterin, caltrin, zona pellucida-binding protein 1, epididymal secretory protein e1, annexin a1, prosaposin, spermadhesin Z13.

Em quanto, as mais abundantes associadas às células colhidas do epididimo, se identificaram, *hemoglobin subunit alpha, hemoglobin subunit beta, calmodulin, tubulin beta-4b chain, phosphoglycerate mutase 2, tubulin alpha-3 chain, 14-3-3 protein zeta/delta, a-kinase anchor protein 4, sperm surface protein sp17 e a ropporin-1*. Além, numa menor quantidade, mas não por isso menos relevante, foi achada a presença das seguintes proteínas indispensáveis na fisiologia espermática; *sperm acrosomal protein fsa-acr.1, disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2, t-complex protein 1 subunit epsilon, sperm acrosome membrane-associated protein 1, acrosin-binding protein, sperm acrosome membrane-associated protein 3, acrosin, zona pellucida-binding protein 1, peroxiredoxin-5, mitochondrial, heat shock protein hsp 90-alpha, epididymal sperm-binding protein 1, protein S100-A9, seminal ribonuclease, superoxide dismutase [cu-zn], caltrin, e a izumo sperm-egg fusion protein 4.*

No resumo da ontologia gênica elaborado no *panther* resultaram como principais funções moleculares no extrato de proteínas obtidas das células espermáticas do ejaculado, a atividade catalítica (50,0%), ligação (33,3%) e a atividade de molécula estrutural (10%). Os processos biológicos mais associados com estas proteínas foram o processo metabólico (30,3%), o processo celular (22,7%) e a resposta ao estímulo (9,1%). Em quanto o componente celular, os mais comuns relacionados às proteínas do ejaculado foram parte celular (38,5%), organela (26,9%) e o complexo macromolecular (15,4%). Nas categorias de proteínas celulares, estas foram classificadas como molécula de sinalização (15,6%), oxidoreductase (15,6%), hidrolase (12,5%) e como modulador enzimático (12,5%).

Já no extrato de proteínas obtidas das células espermáticas da cauda do epidídimo as principais funções resultaram serem as mesmas mais com percentagem diferente, assim atividade catalítica (62,5%), ligação (16,7%) e a atividade de molécula estrutural (8,3%). Nos processos metabólicos, os mais associados foram processo metabólico (32,1%), processo celular (18,9%) e a organização de componentes celulares (9,4%). O componente celular, maiormente relacionado nestas proteínas, foi à parte celular (44,4%), seguido de a organela (27,8%) e a membrana (11,1%). Na classificação de proteínas ao nível celular, a principal classe foi a hidrolase/oxidoreductase (16,1%) respectivamente, modulador enzimático (9,7%) e a proteína de transferência/carregadora (9,7%). A representação

gráfica da ontologia genica das proteínas associadas às células espermáticas do ejaculado e da cauda do epidídimo são detalhadas nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Características do Proteoma do plasma seminal e do liquido epididimário

Em quanto à quantificação de proteínas totais do extrato proteico obtido do plasma seminal e do fluido do epidídimo, a concentração proteica apresentou diferencas significantes (média $\pm$ erro padrão: 10,4 $\pm$ 1,19 mg/mL e 1,1 $\pm$ 0,14 mg/mL, respectivamente, $P = 0,500$). Seguidamente, pela espectrometria de massas (ESI-QToF) foram identificados 27 e 21 espectros, que derivaram em 20 e 16 proteínas no plasma seminal e no liquido epididimário, respectivamente. Assim, as proteínas mais abundantes no plasma seminal foram a *BSP1*, *spermadhesin-1*, *spermadhesin z13*, *seminal ribonuclease*, *acrosin inhibitor 1*, *BSP3*, *trypsin*, *BSP5*, *metalloproteinase inhibitor 2* e a *C-C motif chemokine 2*. Alem disso, neste fluido foram identificadas várias proteínas de grande valor biológico, embora com menor relevancia, como a *caltrin*, *serotransferrin*, *osteopontin*, *epididymal secretory protein e1* e a *clusterin*.

Para o liquido epididimário, as, maiormente identificadas foram a *hemoglobin subunit beta*, *hemoglobin subunit alpha*, *epididymal secretory protein e1*, *serum albumin*, *spermadhesin-1*, *clusterin*, *trypsin*, *carboxylesterase 5a*, a *serotransferrin* e a *ribonuclease pancreatic*.

Baseado na análise da ontologia génica, as únicas funções moleculares que resultaram associadas com o proteoma do plasma seminal foram, no primeiro lugar ligação (62,5%) e a atividade catalítica (37,5%). Neste sentido, os processos biológicos mais relacionados foram o processo celular, regulação biológica e o processo metabólico, todos com percentagem de 14,8 respectivamente. Em quanto, o componente celular, o, maiormente associado foi a região extracelular (66,7%) e a membrana (33,3%). No tipo ou classe de proteínas celulares, as do plasma seminal foram classificadas principalmente como molécula de sinalização (44,4%), modulador enzimático (22,2%) e na hidrolase (11,1%). Para o proteoma do liquido epididimário, atividade catalítica (50%), ligação (16,7%) e a atividade de molécula estrutural (16,7%), foram as funções moleculares mais relacionadas. Dos processos biológicos o processo metabólico (41,2%), o processo celular (29,4%) e o de organização de componente celular ou biogênese (11,8%) foram os mais relacionados às proteínas do fluido epididimário. Nos componentes celulares, maiormente associado foi o de parte celular (44,4%), o macromolecular (33,3%) e o de organela (22,2%). Já na

classificação das proteínas identificadas no fluido, várias categorias apresentaram a mesma percentagem de proteínas inclusas; assim as classes principais foram: proteínas do citoesqueleto (15,4%), oxidoreductase (15,4%), ligação aos ácidos nucleicos (15,4%) e a hidrolase (15,4%). A representação gráfica da ontologia genica do plasma seminal e do fluido epididimario é detalhadas nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Comparação entre os proteomas associados às células espermáticas ejaculadas e de origem epididimário e os proteomas do plasma seminal e do fluido epididimário.

A comparação das proteínas identificadas nas células espermáticas do ejaculado e da cauda do epidídimo, mostrou que 52 proteínas resultaram comuns nestes proteoma. E os proteomas dos fluidos compartilharam 9 proteínas do total de identificadas. Esta comparação entre as proteínas associadas às células e as de ambos fluidos é apresentada em forma de diagrama de Venn na Figura 5. Nas proteínas identificadas para as células e para os fluidos resultaram muitas que foram exclusivas de cada grupo de estudo; estas proteínas que somente pertenciam a um grupo foram detalhadas nas tabelas 2,3,4 e 5. Das proteínas compartilhadas entre as células do ejaculado e da cauda do epidídimo, foi muito relevante a Ribonuclease seminal, a qual foi identificada nas células, resultou, maiormente expressa no ejaculado; desta forma a fosfoglicerato kinase, a proteína 1 do Complexo T subunidade épsilon, a peroxiredoxina-5 tipo mitocondrial, proteína da fibra densa tipo 2, 14-3-3 protein zeta/delta, Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein e a calmodulina foram das principais proteínas expressas em ambas células espermáticas que apresentaram uma maior expressão nas células espermáticas da cauda do epidídimo. Além disso, a Caltrina foi identificada nos dois grupos de células e embora não sendo muito relevante a diferença, esta proteína mostrou maior expressão no ejaculado.

Em quanto as proteínas compartilhadas entre o plasma seminal e o fluido epididimário, pode ser observar que a Spermadhesin-1, embora estas presentes em ambos fluidos teve uma maior expressão no plasma seminal. Além, a clusterina, a albumina sérica, a proteína secretora epididimal E1 e a tripsina, embora esteja presentes em ambos fluidos apresentaram maior expressão no liquido epididimário. A comparação entre as proteínas presentes e o raio apresentado ao fazer a comparação dos emPAI, é mostrada nas tabelas 2 e 3.

Tabela 1. Resultados dos parâmetros obtidos na análise de células espermáticas colhidas da cauda do epidídimo e ejaculado de 10 touros da raça Brangus.

Parâmetro	Ejaculado			Epidídimo			Valor P**
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Volume (mL)	10,0	2,0	15,0	7,5	5,0	13,5	--
Motilidade (%)	80,0	60,0	90,0	90,0	60,0	90,0	0,028
Vigor (0-5)	5,0	3,0	5,0	5,0	3,0	5,0	0,195
Nº células (x10 ⁹)	3,6	0,4	8,0	4,4	0,6	10,7	0,501
Células normais	186,5	182,0	192,0	164,0	137,0	177,0	0,0011
Celulas anormais	13,50	8,0	18,00	36,00	23,00	63,00	0,0011

**P ≤ 0,05 foi considerado significativo; (--) ausência de dados.

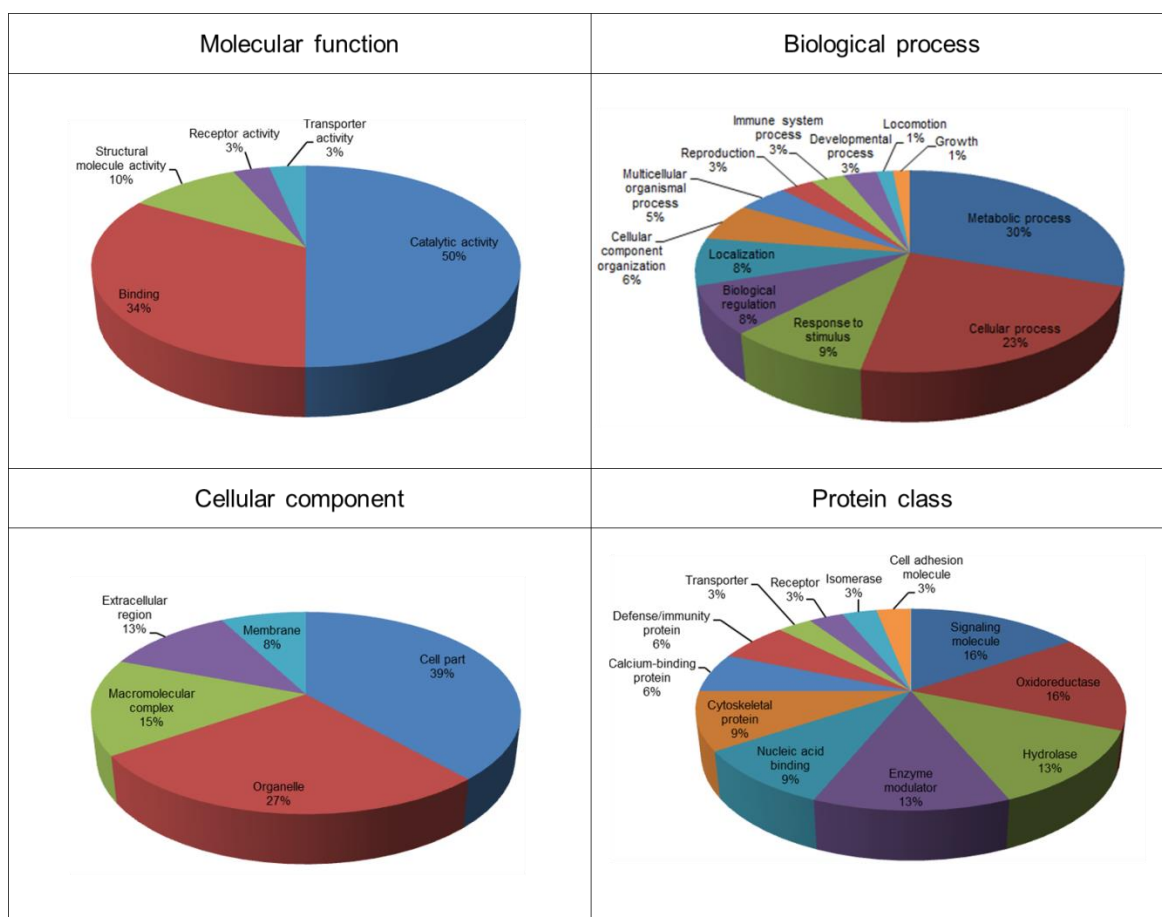
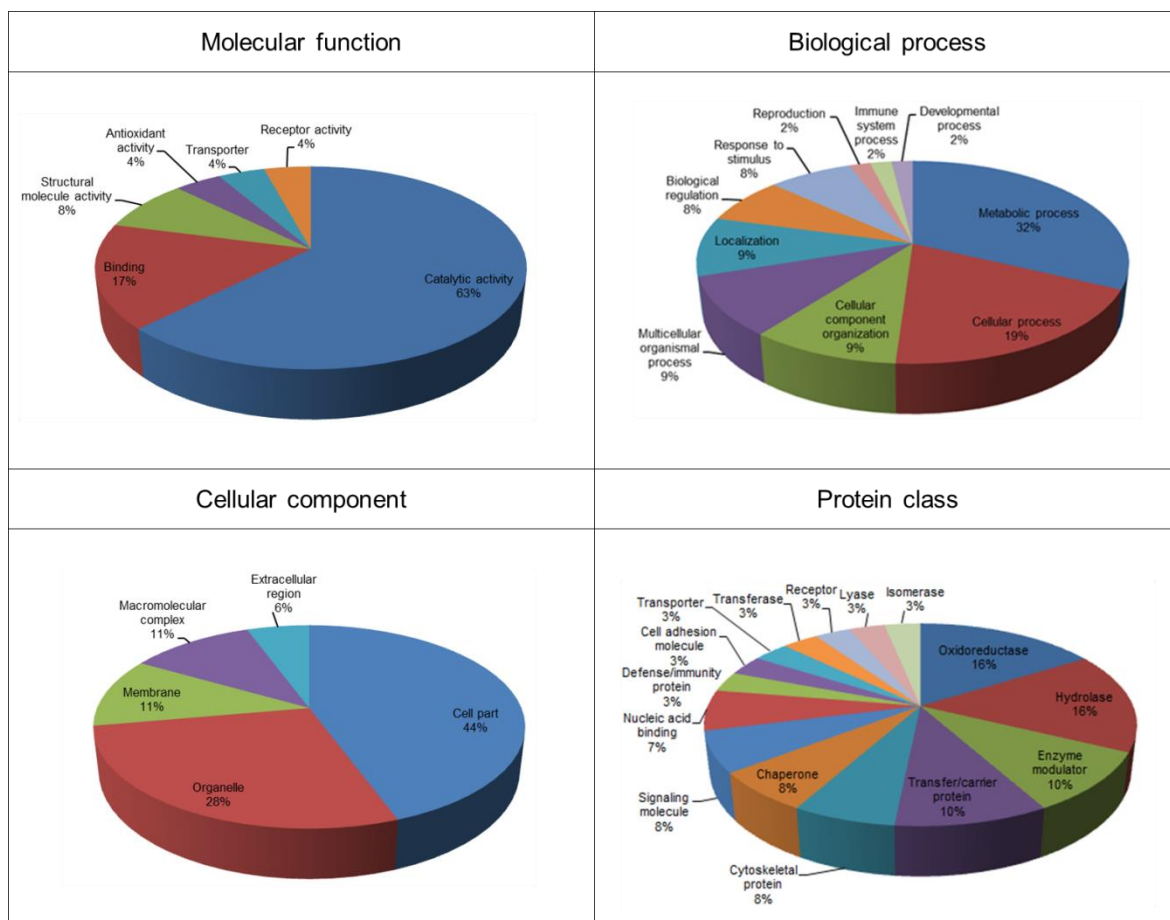


Figura 1. Resumo da ontologia gênica das proteínas extraídas de espermatozoides do ejaculado de touros. Imagens obtidas no software livre, PANTHER version 10 (HUAIYU et al., 2016) - <http://www.pantherdb.org>

415



416

417 **Figura 2.** Resumo da ontologia gênica das proteínas extraídas de espermatozoides da
 418 cauda do epidídimo de touros. Imagens obtidas no software livre, PANTHER *version 10*
 419 (HUAIYU et al., 2016) - <http://www.pantherdb.org>

420

421

422

423

424

425

426

427

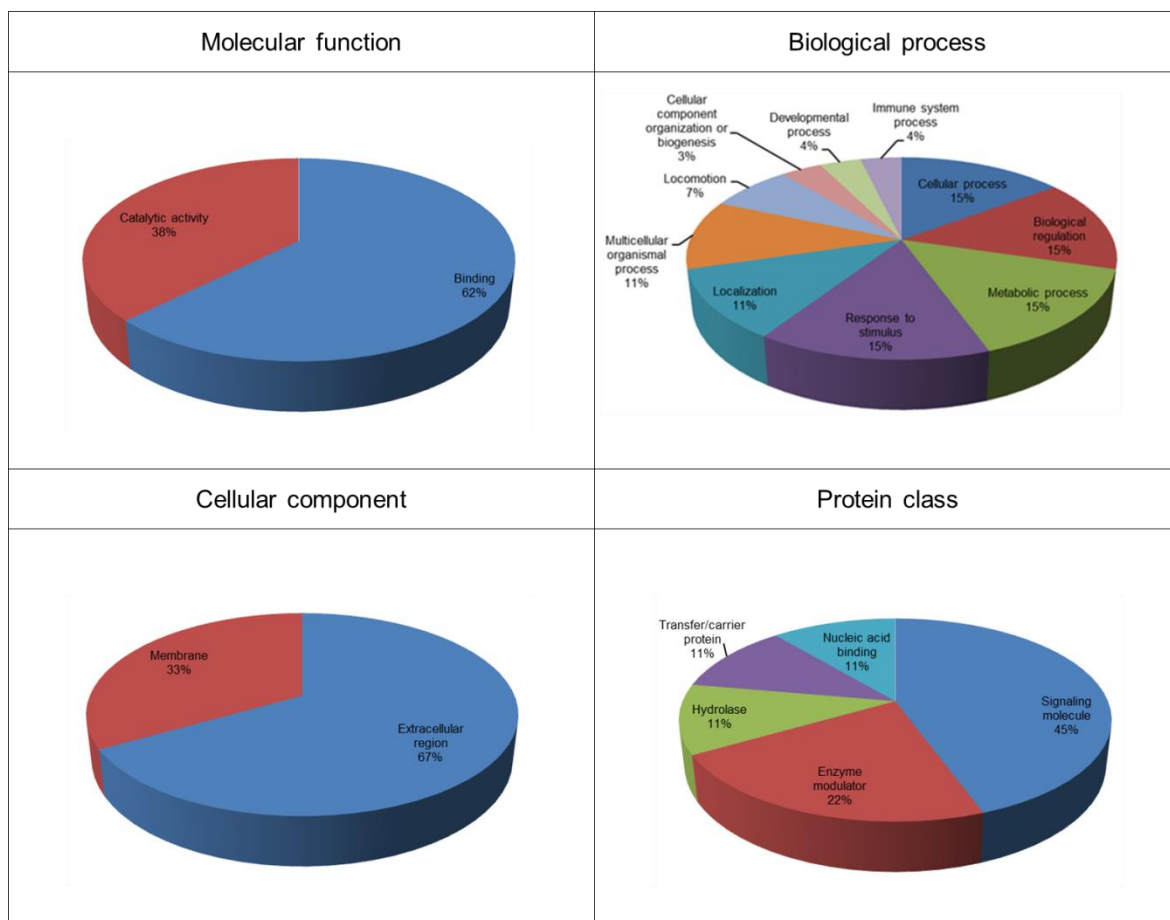
428

429

430

431

432



433

434 **Figura 3.** Resumo da ontologia gênica das proteínas extraídas de plasma seminal de
 435 touros. Imagens obtidas no software livre, PANTHER *version* 10 (HUAIYU et al., 2016) -
 436 <http://www.pantherdb.org>

437

438

439

440

441

442

443

444

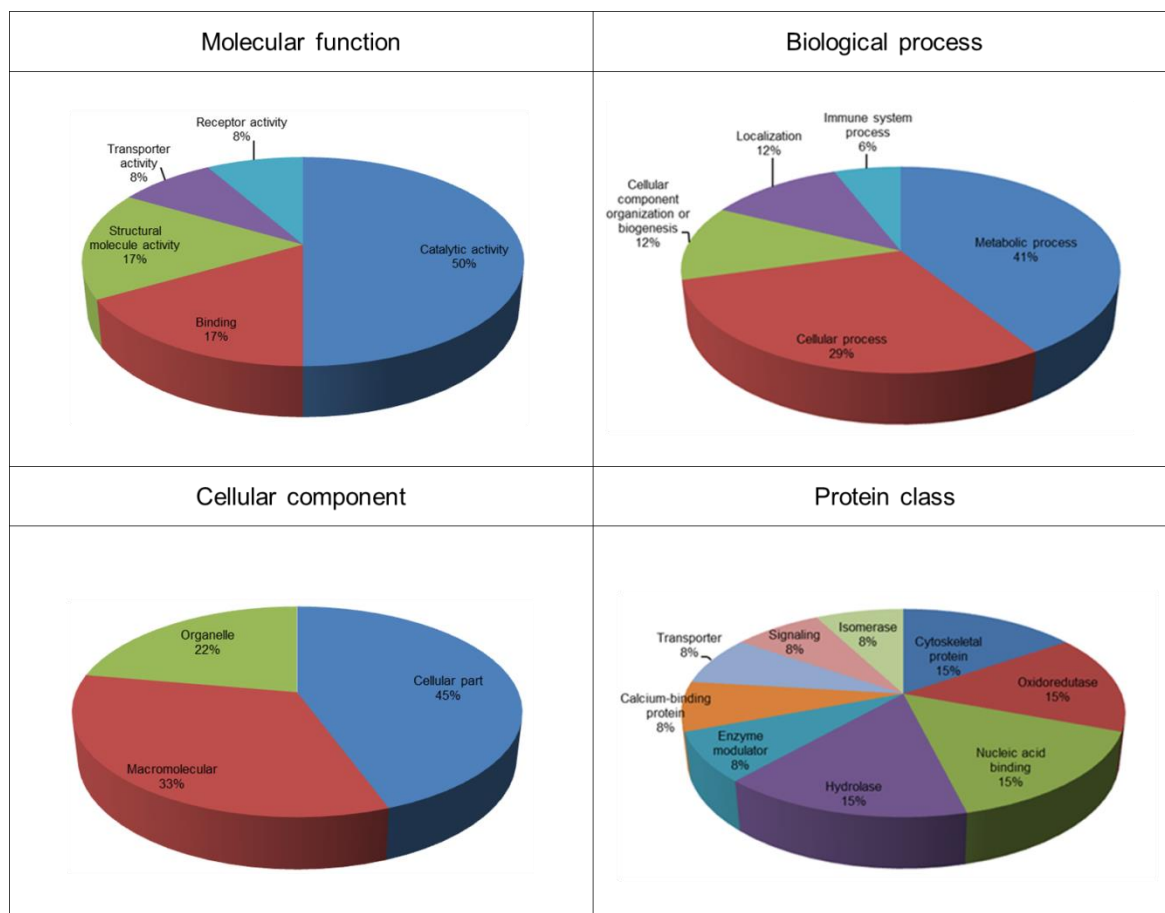
445

446

447

448

449



450

451 **Figura 4.** Resumo da ontologia gênica das proteínas extraídas do líquido epidídimo de
 452 touros. Imagens obtidas no software livre, PANTHER *version* 10 (HUAIYU et al., 2016) -
 453 <http://www.pantherdb.org>

454

455

456

Foram encontradas 52 proteínas em comum nas células espermáticas obtidas do ejaculado e epidídimo, e 9 no plasma seminal e fluido epididimário (Figura 5).

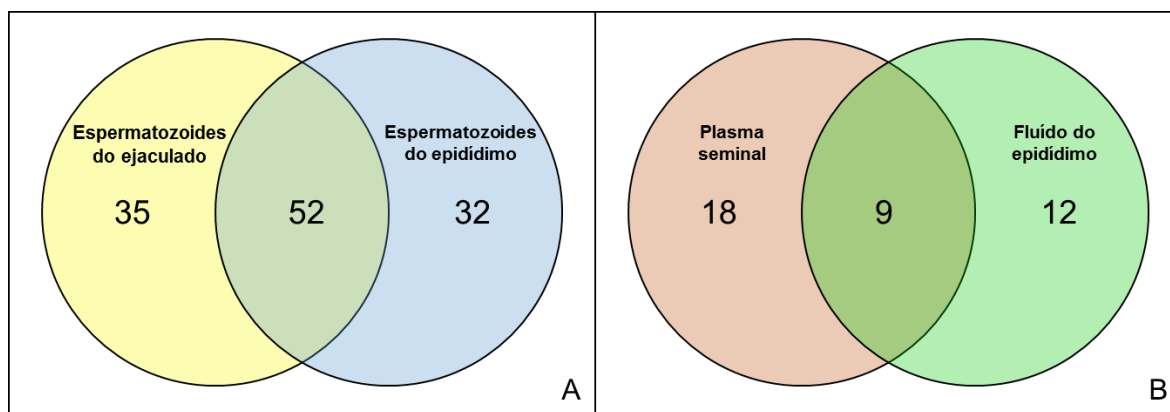


Figura 5. Diagrama de Venn das proteínas espermáticas (A) e dos fluidos seminais (B).

4. Discussão

Este estudo é o primeiro a abordar as proteínas do plasma seminal, fluido epididimário, células espermáticas do ejaculado e da cauda do epidídimo dos mesmos touros da raça Brangus. A raça Brangus é considerada de importância significativa na cadeia produtiva da carne, desta forma este estudo pode contribuir com o planejamento e a adoção de programas de melhoramento genético. Para a discussão as proteínas foram agrupadas com base nos processos fisiológicos e função biológica que participam.

Proteínas associadas à proteção da integridade espermática

Os resultados do presente estudo permitiram identificar diferentes proteínas envolvidas na proteção da integridade espermática. Assim, as proteínas mais relevantes relacionadas a esta característica fisiológica foram *hemoglobin subunit α* , *hemoglobin subunit β* , *protein S100-A8*, *protein S100-A9*, *clusterin*, *serum albumin*, *calmodulin*, *serotransferrin*, *epididymal secretory protein E1*, *seminal ribonuclease* e *metalloproteinase inhibitor 2*.

A *hemoglobin subunit α* identificada nos espermatozoides e no fluido do epidídimo já foi estudada pela sua função na proteção espermática, especificamente como integrante do sistema antioxidante que atua na peroxidação lipídica, produto do metabolismo do ferro (20). Esta proteína foi identificada no ejaculado de touros Brahman obtidos por eletroejaculação (21), o que diferiu deste estudo; ainda não tem sido identificada nas células obtidas do ejaculado nem no fluido das glândulas sexuais acessórias. Uma

justificativa para esta diferença pode estar relacionada à raça, que apesar de ser originária da Brahman, o Brangus brasileiro, normalmente é uma mistura de Aberdeen Angus e qualquer raça zebuína, com predominância do Nelore. Ainda, a hemoglobina pode atuar como uma linha adicional de defesa dos espermatozoides como antioxidante, protegendo contra o estresse oxidativo já que durante a maturação no epidídimo, a célula espermática é mais vulnerável. No ejaculado, as células espermáticas, diluídas no plasma seminal, possuem outros mecanismos de defesa, com outros tipos de enzimas antioxidantes (22).

A *hemoglobin subunit β* , neste estudo foi a proteína que apresentou maior expressão, foi identificada tanto nas células espermáticas obtidas da cauda do epidídimo como no fluido epididimal, se classificando como a principal proteína obtida neste fluido. Este tipo de hemoglobina, ainda não tinha sido identificada nos espermatozoides epididimário nem no fluido epididimário da espécie bovina, mas foi a proteína mais abundante em um trabalho realizado analisando o epidídimo da Codorna japonesa; aonde as hemoglobinas subunidades tipo alfa e beta foram as principais proteínas detectadas (23). Nixon et al., (23) sugeriram que a *hemoglobin subunit β* pode estar envolvida na manutenção do metabolismo do espermatozoide epididimário, além de promover a proteção contra agentes antioxidantes do epidídimo. Assim, pode se inferir que a *hemoglobin subunit β* identificada no fluido epididimário dos touros analisados neste estudo tem contribuição direta na manutenção da proteção e da integridade espermática, durante a maturação e armazenamento epididimário. Provavelmente, os achados obtidos sobre esta proteína, podem ser atribuídos a sua participação na defesa antioxidante, e a *hemoglobin subunit β* pode ter o papel de fornecer oxigênio para o processo da respiração celular espermática e consequente aquisição da motilidade. Desta maneira, a expressão diferencial da *hemoglobin subunit β* no ambiente epididimário tem como possível relação a utilização da fosforilação oxidativa dependente de um alto metabolismo epididimário para exercer a motilidade (23).

Outra possibilidade do aparecimento de hemoglobin é a contaminação com sangue das amostras obtidas do epidídimo, embora todas as precauções tenham sido tomadas para que isto não ocorresse. Além disso, duas amostras, visivelmente, contaminadas foram eliminadas da análise proteômica.

As *protein S100A8* e a *S100A9* pertencem a família S100 de proteínas multifuncionais, que podem ser encontradas em diversos tecidos tendo interação com as chamadas proteínas efetoras presentes nas células, com a função de regular uma variedade de processos

celulares (24). Estão relacionadas as regulação do lesão celular provocado por processos oxidativos nos tecidos (25), contribuindo com a proteção espermática e são consideradas proteínas ligadoras de cálcio (26). No presente estudo, estas proteínas foram identificadas apenas nas células obtidas do ejaculado. Outro estudo em bovinos (21) reportou a proteína *S100A9* no plasma seminal de *Bos indicus*, e as proteínas *S100A8* e *S100A9* nas células do cumulus durante a ovulação em humanos (27) e foram relacionadas a redução da atividade proliferativa bacteriana e aumento da capacitação espermática e reação do acrossomo.

A *clusterin*, uma glicoproteína heterodimérica multifuncional, participa na proteção espermática em resposta ao dano celular (28; 29), faz ligação e aglutinação dos espermatozoides epididimários defeituosos (30; 31) e modula a lise celular induzida pelo sistema complemento (31). Em bovinos, já foi correlacionada com espermatozoides com defeitos (33). No nosso estudo, a *clusterin* foi identificada nas células espermáticas do ejaculado, no plasma seminal e no fluido epididimário. No fluido epididimário sua expressão foi elevada; outros estudos tem reportado sua expressão no fluido das glândulas sexuais acessórias (9), e no fluido da cauda do epidídimo de touros (10), resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo. Em humanos, esta proteína foi uma das únicas encontradas nos espermatozoides de homens férteis, indicando-a como um potencial marcador de fertilidade (34). Ademais, possui dois sítios de ligação à heparina (35) e pode ter funções similares aquelas relacionadas com as BSPs, especialmente durante a proteção da célula espermática durante a criopreservação (36).

A *serum albumin* não foi encontrada nas células espermáticas e foi mais expressas no fluido epididimário, concordando com os resultados obtidos em outro estudo (10) em touros. A *serum albumin* no epidídimo atua na defesa contra a peroxidação lipídica diminuindo os possíveis danos provocados nas membranas plasmáticas dos espermatozoides (37; 38) e mantém os níveis de ATP intra-espermáticos requeridos para metabolismo no epidídimo (38). Além disso, foi encontrada maior expressão de *serum albumin* em touros mestiços de alta fertilidade (39).

Serotransferrin é uma proteína pertencente a família das transferrinas, proteínas que possuem sítios de ligação para o ferro e podem transportar este metal; na maioria dos estudos é simplesmente chamada de transferrin (40; 41). Atua como coadjuvante no mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo produzido pelo metabolismo do ferro (21), atuando no epidídimo em conjunto com a hemoglobina subunit α e enzimas antioxidantes, retirando o excesso de ferro do líquido epididimário (42; 20). No nosso

estudo, encontramos a *serotransferrin* apenas no fluido epididimário, sendo uma das proteínas mais expressas, similarmente à outros estudos (10). Além da sua importância como no epidídimo, níveis baixos de esta transferrin têm sido relacionados com a infertilidade e disfunção testicular em homens e espermatozoides defeituosos em ratos (43; 44; 45).

A *seminal ribonuclease* faz parte de um grupo de enzimas antioxidantes que atua como um imunossupressor do trato reprodutor feminino (46). Esta proteína já foi encontrada no plasma seminal e no fluido das glândulas sexuais acessórias (47; 21; 48) e no nosso estudo foi identificada nos espermatozoides do ejaculado e no plasma seminal, indicando esta origem. Nas células obtidas da cauda do epidídimo foi identificada também, mas em menor quantidade. Contrariamente, a ausência desta proteína no espermatozoide do epidídimo foi relatada por Matousek e Klaudy (49), o qual ainda sugeriu que a proteína é sintetizada exclusivamente pela ampola e a vesícula seminal.

Proteínas que contribuem com a espermatogênese

Dentre as proteínas que fazem parte ou que contribuem com a espermatogênese foram identificadas neste estudo, a *calmodulin*, a *14-3-3 protein zeta/delta* e a *C-C motif chemokine 2*. Dentre estas proteínas, a *calmodulin* foi a de maior expressão nas células espermáticas, embora não tenha sido encontrada nos fluidos, como já observado em estudo anterior (10). Esta proteína comumente se encontra envolvida nos processos de sinalização intracelular dependentes do cálcio. Já foi identificada tanto no espaço perinuclear como no citoplasma dos espermatozoides testiculares, indicando sua participação no mecanismo de condensação do núcleo espermático, mediante ligação à outras proteínas durante as etapas finais da espermatogênese (50). Além disso, no trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo, a *calmodulin*, está localizada na região pós-acrossomal, participando da regulação da motilidade espermática (51), posterior capacitação e reação do acrossomo (52,53). A participação da *calmodulin* na capacitação e reação do acrossomo está diretamente relacionada a sua função moduladora das concentrações de cálcio intracelular (52,54).

Outra proteína relacionada com a espermatogênese, a *14-3-3 protein zeta/delta*, a qual foi identificada nas células espermáticas da cauda do epidídimo. É uma proteína relacionada com o processo de produção dos espermatozoides, já que faz parte de um complexo de proteínas do epitélio seminífero que atuam influenciando a regulação de muitos eventos

celulares que ocorrem durante a espermatogênese, além de estar envolvida na adesão das espermátides no epitélio seminífero (55). Resultados reportados por Huang et al., (56) permitem sugerir que esta proteína, embora sendo expressa em todas as células eucariotas, tem isoformas que são expressas exclusivamente nos testículos, durante a espermatogênese. Contudo, no nosso estudo foi identificada em espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo bovino. Ademais, a *14-3-3 protein zeta/delta* dos espermatozoides epididimários, associada a uma fosfatase, estão envolvidas na regulação da motilidade espermática e deste forma é associada a fertilidade em bovinos (56).

A *C-C motif chemokine 2* é uma proteína tipo receptor transmembrana que exerce sua função dependendo do ligante (57). Tem sido identificada nos testículos e possui importante papel na regulação da esteroidogênese gonadal (58). No presente estudo foi expressa tanto nas células espermáticas obtidas do ejaculado, assim como no plasma seminal, mas sua expressão no plasma seminal foi mais elevada. A expressão desta proteína é dependente da produção da testosterona ao nível gonadal, sendo que Li et al. (58) observou em ratos maior expressão nos testículos e nas vesículas seminais de comparado ao epidídimo e fígado.

Além disso, foram encontradas outras proteínas também associadas a espermatogênese, mas com menor expressão nos touros avaliados, as quais foram *sperm acrosomal protein FSA-ACR 1*, *dynein light chain 2 cytoplasmic*, *histone H2B type 1-K* e *a phosphoglycerate kinase 2*.

Proteínas associadas com as modificações da membrana espermática: enzimas glicolíticas, proteases e inibidores de proteases

Nesta categoria, as principais proteínas identificadas neste estudo foram *protein S100-A8*, *phosphoglycerate mutase 2* e o *metalloproteinase inhibitor 2*. Além destas proteínas, outras foram incluídas nesta categoria, mas apresentaram-se expressas mas em menor intensidade, como a *ATP synthase subunit d mitochondrial* e a *spindlin-3* encontradas nas células do ejaculado.

A *protein S100-A8*, como já mencionada anteriormente, está relacionada a proteção espermática e as modificações da membrana espermática, pela sua participação na translocação de componentes do citoesqueleto até a membrana plasmática, com consequente aumento da concentração de cálcio intracelular, hiperativação espermática e capacitação (59). O presente estudo é o primeiro a identificar a *protein S100-A8* nas células

espermáticas obtidas do ejaculado bovino.

Enzimas glicolíticas como a *phosphoglycerate mutase 2*, *phosphoglycerate kinase 2* e a *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase testis-specific*, participam de diferentes vias metabólicas e já foram identificadas no fluido epididimário e nas células do tecido epididimário (60). A *phosphoglycerate mutase 2* e a *phosphoglycerate kinase 2* foram identificadas também nos espermatozoides obtidos do ejaculado, porém com maior expressão nas células espermáticas obtidas da cauda do epidídimo. A enzima *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase testis-specific* que embora tendo apresentado baixa expressão nos dois tipos de células analisados, foi maior nas células da cauda do epidídimo. Este incremento das enzimas nas células espermáticas epididimárias está de acordo com o aumento do metabolismo espermático que ocorre no epidídimo para a aquisição da motilidade (61).

A *metalloproteinase inhibitor 2* tem a função de inibir as metaloproteinases presentes nos fluidos, incluindo o epididimário, que podem conter elementos que danificam o espermatozoide, razão pela qual esta proteína também pode ser relacionada a proteção da integridade celular (62). Além disso, já foi identificada em outros fluidos, como os das glândulas sexuais acessórias e no ejaculado (9; 21; 48), concordando com o apresentado no nosso estudo, no qual esta proteína foi uma das principais identificadas no plasma seminal e nos espermatozoides do ejaculado.

Proteínas associadas com a motilidade e a maturação espermática

O trânsito do espermatozoide no trato reprodutor feminino é o resultado da aquisição de motilidade ao longo do trato reprodutor masculino. Várias proteínas estão envolvidas neste processo, especialmente as contidas no fluido epididimário, mas também as produzidas pelas glândulas sexuais acessórias, as quais auxiliam na aquisição da motilidade e na maturação espermática (61; 9). Neste estudo foram identificadas as proteínas *epididymal secretory protein E1*, *ropporin-1*, *A-kinase anchor protein 4*, *phosphoglycerate kinase 2*, e as anteriormente mencionadas *calmodulin*, *protein S100-A8*, *14-3-3 protein zeta/delta*, *caltrin* e *phosphoglycerate mutase 2* as quais foram relacionadas a motilidade e maturação espermática.

Epididymal secretory protein E1 foi determinada como uma das principais proteínas presentes no fluido epididimário neste estudo. Esta proteína tem sido estudada pela sua participação durante a maturação, no armazenamento e na capacitação dos

espermatozoides (63). Além de ser identificada no fluido epididimário (10; 64), também já foi encontrada no plasma seminal (21) e nas células espermáticas do ejaculado, como foi observado no presente estudo.

A *ropporin-1* faz parte da bainha fibrosa dos espermatozoides de mamíferos, encontrada na peça principal e final da cauda (65; 66). É uma proteína dependente de proteínas tipo quinase reguladoras, e pela sua localização nas células espermáticas, acredita-se ter uma relação com a motilidade espermática (65). Neste estudo, a *ropporin-1* foi identificada apenas nas células espermáticas, fato relacionado a sua localização intracelular (65). Desta maneira, pode-se inferir que esta é uma proteína sintetizada pela célula espermática antes de se tornar uma célula transcritacionalmente inerte (67). Ademais, a expressão da *ropporin-1* foi maior nas células obtidas da cauda do epidídimo, nas quais a proteína pode exercer sua função no processo de aquisição da motilidade.

Tubulin beta-4B chain e *A-kinase anchor protein 4* são proteínas envolvidas na regulação da motilidade espermática, atuando na montagem da bainha fibrosa e do axonema durante a espermatogênese (68). Estas duas proteínas foram expressas principalmente nas células espermáticas obtidas da cauda do epidídimo, porém a *tubulin beta-4B chain* foi uma das mais abundantes nos dois tipos de células analisadas, já que é uma proteína constitutiva do axonema flagelar; são necessários vários polímeros da tubulin para conformar os microtubulos que formam o axonema das células espermáticas (69; 70).

A *caltrin* é a principal proteína secretada pela vesícula seminal e tem um papel importante na maturação espermática (71; 72). Esta proteína inibe a captação de Ca^{2+} pelos espermatozoides epididimários, aparentemente pela união a transportadores específicos de Ca^{2+} localizados na membrana plasmática. Esta inibiçãopromove uma inativação da exocitose do acrossomo antes da reação acrossomal (73; 71; 74). Neste estudo esta proteína foi identificada com uma expressão baixa, mas foi a mais abuntante no plasma seminal, no qual é secretada no momento da ejaculação para atuar como fator regulador e protetor da integridade acrossomal (71; 72).

Nesta categoria foram encontradas outras proteínas com menor expressão, tais como a *C-type natriuretic peptide*, *adenylate kinase isoenzyme 1*, *Dynein light chain 2 cytoplasmic*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase testis-specific*, *outer dense fiber protein 2*, *solute carrier family 2 facilitated glucose transporter member 3*.

Proteínas associadas com a reação do acrossomo e capacitação espermática

A seminal plasma protein-BSPs (BSP1, BSP3 e BSP5) foram as principais proteínas identificadas nas células espermáticas obtidas do ejaculado e no plasma seminal, resultados similares aos obtidos por outros estudos no plasma seminal de touros (75; 9; 8). As BSPs são proteínas que possuem dois domínios tipo fibronectina II (76), que se ligam ao espermatozoide na ejaculação (77), ativando o fluxo de colesterol e estimulando a permeabilidade da membrana espermática, para dar início capacitação espermática via glicosaminocanos e lipoproteínas de alta densidade (HDLs) (78). Estas proteínas estão também envolvidas na interação dos espermatozoides com as células da tuba uterina, contribuindo para formação de um reservatório espermático (79). Interessantemente e como já mencionado por Manjunath et al. (75), não foram encontradas BSPs nas amostras obtidas dos espermatozoides da cauda do epidídimo e no fluido epididimário. Apesar disso, a expressão de genes de várias BSPs foi encontrada no tecido epididimário em diferentes espécies (revisado por 80). Como as BSPs estão relacionadas com a capacitação espermática e nas células criopreservadas isto pode ser uma desvantagem (81; 82; revisado por 83), a ausência de BSPs nas células da cauda do epidídimo pode indicar uma fonte de estudo para a congelação do sêmen, embora a função de interação das BSPs com as células da tuba uterina (84) pode prejudicar a fertilidade espermática.

A *spermadhesin-1* e *Z13* foram encontradas no plasma seminal, no fluido epididimário e nas células espermáticas do ejaculado, como já mencionado em outros estudos (85; 9; 10; 21; 8). Contudo, como no nosso estudo Moura et al. (10) encontraram no fluido epididimário apenas a *spermadhesin-1*. As spermadhesins se ligam a glicoproteínas, fosfolipídios e carboidratos da zona pelúcida, sendo consideradas como promotoras da interação espermatozoide-oócito (86; 87). Apesar de não terem sido identificadas nos espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo, também são responsáveis pela inibição da motilidade de forma irreversível durante o armazenamento dos espermatozoides na cauda epididimária (88).

Entre outras proteínas envolvidas na capacitação espermática e na reação do acrossomo foram identificadas a *cytochrome b-c1 complex subunit 6 mitochondrial*, *cytochrome c oxidase subunit 5B mitochondrial*, *acrosin-binding protein*, *L-lactate dehydrogenase C chain*, *Ras-related protein Rab-2* e a *acrosin*.

Proteínas associadas com a interação dos gametas

A principal proteína relacionada com a interação dos gametas foi a *sperm surface protein Sp17*, uma proteína presente na superfície espermática que tem um importante papel na ligação do espermaotozoide á zona pelúcida do oócito (89; 90). Ao iniciar a reação acrossomal, a *sp17* é liberada e processada em frações menores, perdendo um sitio de união a calmodulina (CaM) que possui na sua estrutura; assim, a liberação da CaM desencadeia a ativação de enzimas tipo quinase que participam nas diferentes vias de sinalização envolvidas na facilitação da penetração do espermatozoide a zona pelúcida e na consequente fusão ao oócito (91). Segundo estudos anteriores, a *sp17* é uma proteína de ligação á zona pelúcida, mas não se encontra nem no acrossoma nem na superfície externa da membrana espermática (92); antes da reação acrossomal, esta proteína está localizada no citoplasma da cabeça tendo associação a parte interna da membrana plasmática de espermatozoides com o acrossomo intato (92). No presente estudo foi uma das principais proteínas identificadas nas células espermáticas obtidas da cauda do epidídimo, o que pode sugerir que sua expressão diferencial nestas células pode ser a consequência da presença de espermatozoides reactantes no epidídimo, já que em condições normais esta proteína deveria estar localizada no citoplasma de espermatozoides que contem um acrossomo íntegro, e somente é liberada durante a reação acrossomal (91). Por outro lado, a *sperm surface protein Sp17* foi identificada na bainha fibrosa do espermatozoide, relacionando-a com a ativação da A-kinase anchoring protein (84). Desta forma, a presença desta proteína nas células obtidas da cauda do epidídimo no nosso estudo pode indicar sua participação na aquisição da motilidade espermática.

Proteínas como a *osteopontin*, *izumo sperm-egg fusion protein 4* e a *prosaposin* são consideradas de grande relevância biológica, e podem ser incluídas nesta categoria, porém foram apresentadas em menor expressão. A *osteopontin*, identificada apenas nas células espermáticas obtidas do ejaculado e no plasma seminal; é uma proteína que tem sido achada em diferentes tecidos, na matriz ósea bovina (93), nas glândulas mamárias, oviducto, útero, o ovário e nos testículos (94). Anteriormente, já foi identificada como uma das principais proteínas do plasma seminal em diferentes estudos de touros, sendo assim associada a fertilidade bovina (7; 95; 85; 21). Embora, um estudo realizado avaliando o plasma seminal de touros da raça *Bos jabanicus*, reportou a ausência desta proteína neste fluido (8). A *osteopontin*, tem um importante papel na adesão células e na reorganização das membranas (96), tendo assim participação na interação espermatozoide-oócito; desta forma se pode explicar sua importância na fertilidade bovina (97).

A proteína *izumo sperm-egg fusion protein 4*, é um membro da família de proteínas IZUMO, exposta na superfície espermática após a reação acrossomal; considerada indispensável para a fusão do espermatozoide e oócito (98). Segundo, Bianchi et al., (99), a *izumo* forma um complexo de adesão com uma proteína transmembrana do oócito chamada *juno*, na ausência da formação deste complexo a fertilização não é realizada. Neste estudo, *izumo* foi identificada exclusivamente nas células espermáticas obtidas do epididimo, resultado similar ao obtido em outro estudo analisando o proteoma epididimário (100). Yoon et al., (100), sugerem que a presença desta proteína no fluido epididimário, pode estar relacionada à reação acrossomal neste fluido.

A *prosaposin*, pode se apresentar conformando os lisossomos celulares e também pode ser secretada em vários fluidos (101). É uma proteína de 65-70 kDa envolvida na interação das gametas, possivelmente agindo nos esfingolipídeos da membrana do oócito e facilitar a fusão (102). Neste estudo, foi expressada diferencialmente nas células espermáticas obtidas do ejaculado, provavelmente na forma lisossomal, mas sua expressão foi baixa.

Alem, também podem ser associadas nesta categoria outras proteínas que tiveram expressão baixa, a *annexin*, *sperm acrosome membrane-associated protein 1*, *parkin coregulated gene protein homolog* e a *zona pellucida-binding protein 1*.

Conclusão

Em conclusão, foram identificadas várias categorias de proteínas segundo a sua contribuição para a fisiologia espermática. Assim, baseado nos resultados obtidos, podemos concluir que a maioria das proteínas associadas às células da cauda do epidídimo e as presentes no fluido epididimário tem papel importante nas modificações da membrana espermática, na proteção dos espermatozoides, e na modulação/aquisição motilidade espermática. Já as proteínas associadas às células espermáticas do ejaculado e do plasma seminal tem participação nos processos de capacitação, reação do acrossomo, ligação entre os gametas e fertilização.

Referências

1. Wassarman PM. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. Cell. 1999 Jan 22;96(2):175-83.
2. Yanagimachi R, Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (eds) The physiology of reproduction. Raven Press, New York, 1993;189–317

- 781 3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York:
782 Garland Science; 2002. Sperm. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26914/>
- 783 4. Cooper TG. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. Asian J Androl.
784 2011;13(1):130-138. doi:10.1038/aja.2010.97.
- 785 5. Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipids-binding proteins in sperm
786 membrane lipid modification that occurs during capacitation. J Reprod Immunol 2002;58:109–19.
- 787 6. Maxwell WM, de Graaf SP, Ghaoui Rel-H, Evans G. Seminal plasma effects on sperm handling
788 and female fertility, Soc Reprod Fertil Suppl. 2007;64:13-38.
- 789 7. Killian, G. J.; Chapman, D. A.; Rogowski, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull
790 seminal plasma. Biol Reprod, v. 49, p. 1202-1207. 1993.
- 791 8. Sarsaifi K, Haron AW, Vejayan J, Yusoff R, Hani H, Omar MA, Hong LW, Yimer N, Ju TY,
792 Othman AM. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*)
793 seminal plasma proteins and their relationship with semen quality. Theriogenology. 2015 Oct
794 1;84(6):956-68.
- 795 9. Moura A, Chapman D, Koc H, Killian G. A comprehensive proteomic analysis of the accessory
796 sex gland fluid from mature Holstein bulls. Anim Reprod Sci 2007;98:169–88.
- 797 10. Moura AA, Souza CE, Stanley BA, Chapman DA, Killian GJ. Proteomics of cauda epididymal
798 fluid from mature Holstein bulls. J Proteomics 2010;73:2006–20.
- 799 11. Huang XY, Sha JH. Proteomics of spermatogenesis: from protein lists to understanding the
800 regulation of male fertility and infertility. Asian J Androl. 2011 Jan;13(1):18-23
- 801 12. Garde, J.; Aguado, M.; Pérez, S.; Garrido, D.; Pérez-guzmán, Montoro, V. Physiological
802 characteristics of epididymal spermatozoa from post mortem rams. Theriogenology. 41: 203,
803 1994.15. Bruemmer JE. Reger H; Zibinski G; Squires el. Effect of storage at 5°C on the motility
804 and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. Theriogenology. 2002; v.58; p. 405–407.
- 805 13. Bruemmer JE. Reger H, Zibinski G, Squires el. Effect of storage at 5°C on the motility and
806 cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. Theriogenology. 2002; v.58, p. 405–407.
- 807 14. Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE. Teratospermic and normospermic domestic cats:
808 ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and
809 morphology after swim-up processing. J Androl. 1990; 11 (3): 204-15.
- 810 15. Baker; S.S; Cardullo; R.A.; Thaler; C.D sonication of mouse membranes reveals distinct
811 proteins domains. Biol. Reprod.; 2002;v.66; p.57-64;.
- 812 16. Souza, F. F.; Chirinéa, V. H. ; Martins, M. I. M. ; Lopes, M. D. . Identificação da osteopontina
813 no plasma seminal e na membrana espermática de cães. In: XXI Reunião Anual da Sociedade
814 Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), 2007, Costa do Sauípe - BA. Acta Scientiae
815 Veterinariae. Porto Alegre - RS: UFRGS, 2007. v. 35. p. 1305.
- 816 17. Villén, J.; Gygi, S.P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis
817 by mass spectrometry. Nature Protocols, 2008. v. 3, n.10, p. 1630-1638,
- 818 18. Shinoda, K.; Tomita, M.; Ishihama, Y. emPAI Calc—for the estimation of protein abundance
819 from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
820 Bioinformatics (2010) 26 (4): 576-577.
- 821 19. Mi, H.; Huang, X.; Muruganujan, A.; Tang, H.; Mills, C.; Kang, D.; Thomas, P. D. Panther
822 version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data
823 analysis tool enhancements. Nucl. Acids Res. (2016) doi: 10.1093/nar/gkw1138.
- 824 20. Mollan TL, Banerjee S, Wu G, Parker Siburt CJ, Tsai AL, Olson JS, Weiss MJ, Crumbliss AL,
825 Alayash AI. α -Hemoglobin stabilizing protein (AHSP) markedly decreases the redox potential and

- 826 reactivity of α -subunits of human HbA with hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 2013 Feb
827 8;288(6):4288-98.
- 828 21. Rego JP, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, Venus B, Corbet NJ, Corbet DH, Burns
829 BM, Boe-Hansen GB, McGowan MR. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus*
830 bulls. *Anim Reprod Sci.* 2014 Jul;148(1-2):1-17.
- 831 22. Vernet P, Aitken RJ & Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and*
832 *Cellular Endocrinology.* 2004;216 31–39.
- 833 23. Nixon B, Ewen KA, Krivanek KM, Clulow J, Kidd G, Ecroyd H, Jones RC. Post-testicular
834 sperm maturation and identification of an epididymal protein in the Japanese quail (*Coturnix*
835 *coturnix japonica*). *Reproduction.* 2014 Jan 25;147(3):265-77.
- 836 24. Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice.
837 *Hippokratia.* 2008;12(4):198-204.
- 838 25. Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8)
839 and MRP14 (S100A9). *Biochim Biophys Acta.* 1998 Dec 10;1448(2):200-11.
- 840 26. Thorey, I. S., Roth, J., Regenbogen, J., Halle, J. P., Bittner, M., Vogl, T., ... & Graf, A. The
841 Ca^{2+} -binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes. *Journal*
842 *of Biological Chemistry,* 2001;276(38), 35818-35825.
- 843 27. Shimada, M., Mihara, T., Kawashima, I., & Okazaki, T. Anti-bacterial factors secreted from
844 cumulus cells of ovulated COCs enhance sperm capacitation during in vitro fertilization. *American*
845 *Journal of Reproductive Immunology,* 2013;69(2), 168-179.
- 846 28. Bailey R, Griswold MD. Clusterin in the male reproductive system: localization and possible
847 function. *Mol Cell Endocrinol* 1999;151:17–23.
- 848 29. Reyes-Moreno C, Boilard M, Sullivan R., Sirard MA. Characterization of secretory proteins
849 from cultured cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. *Mol.*
850 *Reprod. Dev.* 2002;63, 500–509.
- 851 30. Sylvester SR, Morales CR, Oko R, Griswold MD. Localization of sulfated glycoprotein-2
852 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. *Biol Reprod* 1991;45: 195–
853 207.
- 854 31. Ibrahim NM., Troedsson MH. Foster DN, Loseth KJ, Farris JA, Blaschuk O, Crabo BG.
855 Reproductive Tract Secretions and Bull Spermatozoa Contain Different Clusterin Isoforms That
856 Cluster Cells and Inhibit Complement-induced Cytolysis. *J Androl,* 1999;20(2), 230-240.
- 857 32. Meri S, Jarva H. Complement regulatory proteins. *Nat Encycl Life Sci* 2001;1:1–8.
- 858 33. Ibrahim, N. M., Gilbert, G. R., Loseth, K. J., & Crabo, B. G. Correlation between clusterin-
859 positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. *J Androl,* 2000;
860 21(6), 887-894.
- 861 34. Thacker, S., Yadav, S. P., Sharma, R. K., Kashou, A., Willard, B., Zhang, D., & Agarwal, A.
862 Evaluation of sperm proteins in infertile men: a proteomic approach. *Fertility and sterility,*
863 2011;95(8), 2745-2748.
- 864 35. Mortarino, M., Tedeschi, G., Negri, A., Ceciliani, F., Gottardi, L., Maffeo, G., & Ronchi, S.
865 Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins.
866 *Electrophoresis,* 1998; 19(5), 797-801.
- 867 36. Jobim, M. I. M., Oberst, E. R., Salbego, C. G., Souza, D. O., Wald, V. B., Tramontina, F., &
868 Mattos, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma
869 proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology,* 2004; 61(2), 255-266.
- 870 37. Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of
871 fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 1995;42:334–46.

- 872 38. Armstrong JS, Rajasekaran M, Hellstrom WJ, Sikka SC. Antioxidant potential of human serum
873 albumin: role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive
874 technology. *J Androl.* 1998;19:412–9.
- 875 39. Aslam MK, Kumaresan A, Sharma VK, Tajmul M, Chhillar S, Chakravarty AK, Manimaran A,
876 Mohanty TK, Srinivasan A, Yadav S. Identification of putative fertility markers in seminal plasma
877 of crossbred bulls through differential proteomics. *Theriogenology.* 2014 Dec;82(9):1254-62.e1.
- 878 40. Chasteen, N. D. Human serotransferrin: structure and function. *Coordination Chemistry*
879 *Reviews*, 1977; 22(1-2), 1-36.
- 880 41. Farnaud, S., & Evans, R. W. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial
881 properties. *Molecular immunology*, 2003; 40(7), 395-405.
- 882 42. Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story.
883 *Mol Cell Endocrinol.* 2006 May 16;250(1-2):70-9.
- 884 43. Holmes SD, Lipshultz LI, Smith RG. Transferrin and gonadal dysfunction in man. *Fertil Steril*
885 1982;38:600–4.
- 886 44. Bernstein SE. Hereditary hypotransferrinemia with hemosiderosis, a murine disorder
887 resembling human atransferrinemia. *J Lab Clin Med* 1987;110:690–705.
- 888 45. Zalata A, Hafez T, Schoonjans F, Comhaire F. The possible meaning of transferrin and its
889 soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. *Hum Reprod.* 1998
890 Apr;11(4):761-4.
- 891 46. Quayle AJ, James K. Immunosuppression by seminal plasma and its possible biological
892 significance. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 1990;38, 87–100
- 893 47. Kelly VC, Kuy S, Palmer DJ, Xu Z, Davis SR, Cooper GJ. Characterization of bovine seminal
894 plasma by proteomics. *Proteomics.* 2006 Nov;6(21):5826-33
- 895 48. Westfalewicz B, Dietrich MA, Mostek A, Partyka A, Bielas W, Nizański W, Ciereszko A.
896 Analysis of bull (*Bos taurus*) seminal vesicle fluid proteome in relation to seminal plasma
897 proteome. *J Dairy Sci.* 2017 Mar;100(3):2282-2298.
- 898 49. Matousek J, Klaudy J. Qualitative and quantitative analyses of seminal ribonuclease in
899 reproductive tract fluids of bulls. *Anim.Reprod. Sci.* 1998;51, 111–118.
- 900 50. Moriya M, Katagiri C, Yagi K. Immuno-electron microscopic localization of calmodulin and
901 calmodulin-binding proteins in the mouse germ cells during spermatogenesis and maturation. *Cell*
902 *Tissue Res.* 1993 Mar;271(3):441-51.
- 903 51. Schlingmann K, Michaut MA, McElwee JL, Wolff CA, Travis AJ, Turner RM. Calmodulin and
904 CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway.
905 *J Androl* 2007;28:706–16.
- 906 52. Bendahmane M, Lynch CN, Tulsiani DRP. Calmodulin signals capacitation and triggers the
907 agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Arch Biochem Biophys* 2001;390:1–8.
- 908 53. Igotz GG, Suarez SS. Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation
909 in demembrated bovine sperm. *Biol Reprod* 2005;73:519–26.
- 910 54. Si, Y., & Olds-Clarke, P. Evidence for the Involvement of Calmodulin in Mouse Sperm
911 Capacitation 1. *Biol Reprod*, 2000;62(5), 1231-1239.
- 912 55. Sun S, Wong EW, Li MW, Lee WM, Cheng CY. 14-3-3 and its binding partners are regulators
913 of protein-protein interactions during spermatogenesis. *J Endocrinol.* 2009 Sep;202(3):327-36.
- 914 56. Huang Z, Myers K, Khatra B, & Vijayaraghavan S. Protein 14-3-3 ζ binds to protein
915 phosphatase PP1 γ 2 in bovine epididymal spermatozoa. *Biol Reprod*, 2004;71(1), 177-184.

- 916 57. Yoshimura T, Oppenheim JJ. Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C
917 motif) receptor-like 2 (CCRL2); two multifunctional receptors with unusual properties. *Exp Cell*
918 *Res.* 2011 Mar 10;317(5):674-84.
- 919 58. Li L, Ma P, Huang C, Liu Y, Zhang Y, Gao C, Xiao T, Ren PG, Zabel BA, Zhang JV.
920 Expression of chemerin and its receptors in rat testes and its action on testosterone secretion. *J*
921 *Endocrinol.* 2014 Jan 8;220(2):155-63.
- 922 59. Roth J, Burwinkel F, van den Bos C, Goebeler M, Vollmer E, Sorg C. MRP8 and MRP14, S-
923 100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and
924 intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood.* 1993 Sep 15;82(6):1875-83.
- 925 60. Brooks DE. Activity and androgenic control of glycolytic enzymes in the epididymis and
926 epididymal spermatozoa of the rat. *Biochem J.* 1976 Jun 15;156(3):527-37.
- 927 61. Dacheux JL, Castella S, Gatti, JL, Dacheux F. Epididymal cell secretory activities and the role
928 of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, 2005;63(2), 319-341.
- 929 62. Metayer S, Dacheux F, Dacheux JL, Gatti JL. Comparison, characterization, and identification
930 of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. *Matrix*
931 *metalloproteinases* are major fluid gelatinases. *Biol. Reprod.* 2002;66, 1219–1229.
- 932 63. Kirchhoff C, Osterhoff C, Pera I, & Schröter, S. Function of human epididymal proteins in
933 sperm maturation. *Andrologia*, 1998;30(4-5), 225-232.
- 934 64. Souza CEA, Rego JPA, Lobo CH, Oliveira JTA, Nogueira FCS, Domont G.B., Fioramonte, M.,
935 Gozzo FC, Moreno FB, Monteiro-Moreira ACO, Figueiredo JR, Moura AA. Proteomic analysis of
936 the reproductive tract fluids from tropically adapted Santa Ines rams. *J. Proteom.* 2012;75, 4436–
937 4456.
- 938 65. Fujita A, Nakamura K, Kato T, Watanabe N, Ishizaki T, Kimura K, et al. Ropporin, a sperm-
939 specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *J Cell*
940 *Sci.* 2000; 113 (Pt1):103–12.
- 941 66. Chen J, Wang Y, Wei B, Lai Y, Yan Q, Gui Y. Functional expression of roporin in human
942 testis and ejaculated spermatozoa. *J Androl.* 2011; 32(1):26–32.
- 943 67. Lalancette C, Miller D, Li Y, Krawetz SA. Paternal contributions: new functional insights for
944 spermatozoal RNA. *J Cell Biochem.* 2008;104(5):1570–1579.
- 945 68. Moretti E, Scapigliati G, Pascarelli NA, Baccetti B, Collodel G. Localization of AKAP4 and
946 tubulin proteins in sperm with reduced motility. *Asian J Androl.* 2007 Sep;9(5):641-9.
- 947 69. Walker RA, O'Brien ET, Pryer NK, Soboeiro MF, Voter WA, Erickson HP, Salmon ED.
948 Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants
949 and transition frequencies. *J Cell Biol.* 1988 Oct;107(4):1437-48.
- 950 70. Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. Cytoskeletal track selection during cargo transport in
951 spermatids is relevant to male fertility. *Spermatogenesis.* 2011 Jul;1(3):221-230.
- 952 71. Clark EN, Corron ME, Florman HM. Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of
953 spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to the egg's zona pellucida. *J Biol Chem.*
954 1993 Mar 5;268(7):5309-16.
- 955 72. Grasso EJ, Sottile AE, Coronel CE. Structural Prediction and In Silico Physicochemical
956 Characterization for Mouse Caltrin I and Bovine Caltrin Proteins. *Bioinform Biol Insights.* 2016
957 Oct 30;10:225-236.
- 958 73. Coronel CE, Winnica DE, Novella ML, Lardy HA. Purification, structure, and characterization
959 of caltrin proteins from seminal vesicle of the rat and mouse. *J Biol Chem.* 1992 Oct
960 15;267(29):20909-15.

- 961 74. Winnica DE, Novella ML, Dematteis A, Coronel C E. Trypsin/acrosin inhibitor activity of rat
962 and guinea pig caltrin proteins. Structural and functional studies. *Biol Reprod*, 2000; 63(1), 42-48.
- 963 75. Manjunath P, Chandonnet,L, Leblond E, Desnoyers L. Major pro-teins of bovine seminal-
964 vesicles bind to spermatozoa. *Biol. Reprod*. 1994;50,977.
- 965 76. Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW. Newnomenclature for mammalian BSP
966 genes. *Biol. Reprod*. 2009;80, 394–397.
- 967 77. Desnoyers L, Manjunath. PMajor proteins of bovine seminalplasma exhibit novel interactions
968 with phospholipid. *J. Biol. Chem*. 1992;267, 10149–10155.
- 969 78. Moreau R, Manjunath. PCharacteristics of the cholesterol effluxinduced by novel seminal
970 phospholipid-binding proteins. *Biochim.Biophys. Acta: Mol. Cell Biol. Lipids*. 2000;1487, 24–32.
- 971 79. Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath , Suarez SS. Bovine seminal plasma
972 proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the
973 oviduct. *Biol. Reprod*. 2006;75, 501–507.
- 974 80. G. Plante and P. Manjunath. Epididymal Binder of SPERM genes and proteins: what do we
975 know a decade later? *Andrology*, 2015, 3, 817–824.
- 976 81. Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from hen's
977 egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and
978 prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod*. 2004 Mar;70(3):708-17.
- 979 82. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm
980 protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev*. 2006 Oct;73(10):1338-44.
- 981 83. Manjunath, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by
982 extender components. *Anim Reprod*, 2012, 9(4), 809-15.
- 983 84. Chiriva-Internati M, Gagliano N, Donetti E, Costa F, Grizzi F, Franceschini B, Albani E, Levi-
984 Setti PE, Gioia M, Jenkins M, Cobos E, Kast WM. Sperm protein 17 is expressed in the sperm
985 fibrous sheath. *J Transl Med*. 2009 Jul 15;7:61.
- 986 85. Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ. Identification of proteins in the accessory sex
987 gland fluid associated with fer-tility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J. Androl*.
988 2006;27,201–211.
- 989 86.Sanz L, Calvete JJ, Mann K., Schafer W, Schmid ER, Amselgruber W,Sinowatz F, Ehrhard M,
990 Topferpetersen E. The complete pri-mary structure of the spermadhesin awn, a zona-pellucida-
991 bindingprotein isolated from boar spermatozoa. *FEBS Lett*. 1992;300, 213–218.
- 992 87. Solis D, Romero A, Jimenez M, Diaz-Maurino T, Calvete JJ. Bind-ing of mannose-6-phosphate
993 and heparin by boar seminal plasmaPSP-II, a member of the spermadhesin protein family. *FEBS*
994 *Lett*. 1998;431,273–278.
- 995 88. Dostalova Z, Calvete JJ, Sanz L, Hettel C, Riedel D, Schoneck C, Einspanier R, Topfer-
996 Petersen E. Immunolocalization andquantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in
997 ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 1994;375,457–
998 461.
- 999 89. O'Rand MG, Widgren EE, Fisher SJ. Characterization of the rabbit sperm membrane
1000 autoantigen, RSA, as a lectin-like zona binding protein. *Dev Biol*. 1988 Sep;129(1):231-40.
- 1001 90. Yamasaki N, Richardson RT, O'Rand MG. Expression of the rabbit sperm protein Sp17 in COS
1002 cells and interaction of recombinant Sp17 with the rabbit zona pellucida. *Mol Reprod Dev*. 1995
1003 Jan;40(1):48-55.
- 1004 91. Wen Y, Richardson RT, O'rand MG. Processing of the sperm protein Sp17 during the acrosome
1005 reaction and characterization as a calmodulin binding protein. *Dev Biol*. 1999 Feb 15;206(2):113-
1006 22.

- 1007 92. Richardson RT, Yamasaki N, O'Rand MG Sequence of a rabbit sperm zona pellucida binding
1008 protein and localization during the acrosome reaction. *Dev Biol.* 1994 Oct;165(2):688-701.
- 1009 93. Franzen, A., Heinegard, D., 1985. Isolation and characterization of 2 sialoproteins present only
1010 in bone calcified matrix. *Biochem. J.* 232, 715–724
- 1011 94. Luedtke, C.C., McKee, M.D., Cyr, D.G., Gregory, M., Kaartinen, M.T., Mui, J., Hermo, L.,
1012 Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during
1013 postnatal development through to adulthood. *Biol. Reprod.* 2002;66, 1437–1448
- 1014 95. Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated
1015 protein in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod.* 1997 Dec;57(6):1293-301
- 1016 96. Denhardt, D.T., 2004. The third international conference on osteopontin and related proteins,
1017 San Antonio, Texas, May 10–12, 2002. *Calcif. Tissue Int.* 74, 213–219
- 1018 97. Moura, A.A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin.
1019 *Anim. Reprod.* 2005; 2, 3–10.
- 1020 98. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is
1021 required for sperm to fuse with eggs. *Nature.* 2005; 434(7030):234–8.
- 1022 99. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for
1023 mammalian fertilization. *Nature.* 2014 Apr 24;508(7497):483-7
- 1024 100. Yoon, S. J., Rahman, M. S., Kwon, W. S., Park, Y. J., Pang, M. G. addition of cryoprotectant
1025 significantly alters the epididymal sperm proteome. *Plos One*, 2016; 11(3), e0152690.
- 1026 101. Morales, C. R., Zhao, Q., Lefrancois, S., Ham, D. Role of prosaposin in the male reproductive
1027 system: effect of prosaposin inactivation on the testis, epididymis, prostate, and seminal vesicles.
1028 *Archives of andrology*, 2000; 44(3), 173-186.
- 1029 102. Magargee, SF, Cramer, PG, Hammerstedt, RH. Increased in vitro binding and fertilizing
1030 ability of mouse sperm exposed to a synthetic peptide. *Mol Reprod Dev.* 2000 Dec;57(4):406-11.
- 1031
- 1032
- 1033
- 1034
- 1035
- 1036
- 1037
- 1038
- 1039

Tabela 2. Resultados da espectrometria de massas e ontologia gênica das proteínas extraídas de espermatozoides do ejaculado de touros. Ontologia gênica obtida no UniprotKB (www.uniprot.org).

Name	ID	Score	Mass (Da)	Matches	Ontologia gênica		
					Molecular function	Biological process	Cellular compartment
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	P26772	159	10895	2 (2)	ATP binding; chaperone binding; metal ion binding; unfolded protein binding	Chaperone mediated protein folding requiring cofactor; response to unfolded protein	Mitochondrial matrix; mitochondrion
14-3-3 protein zeta/delta	Q5R651	261	27899	4 (4)	--	--	Melanosome
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	Q2HJD7	96	35786	2 (2)	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase activity; NAD binding; phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) activity	Branched-chain amino acid catabolic process; valine catabolic process	Mitochondrion
Acrosin	P10323	182	46502	5 (5)	Amidase activity; copper ion binding; DNA binding; drug binding; fucose binding; mannose binding; protease binding; serine-type endopeptidase activity; zinc ion binding	Acrosome matrix dispersal; acrosome reaction; activation of adenylate cyclase activity; binding of sperm to zona pellucida; response to steroid hormone single fertilization	Acrosomal matrix; extracellular region; Golgi-associated vesicle; nucleus; protein complex
Acrosin-binding protein (Fragment)	Q29016	336	61641	8 (8)	--	Sperm capacitation	Acrosomal membrane; acrosomal vesicle; extracellular region; nucleus
Acrosin-binding protein	Q60485	192	62303	6 (5)	--	May be involved in packaging and condensation of the acrosin zymogen in the acrosomal matrix via its association with proacrosin	Acrosomal membrane; acrosomal vesicle; extracellular region
Adenylate kinase isoenzyme 1	P00569	435	21738	7 (7)	Adenylate kinase activity; ATP binding; nucleoside diphosphate kinase activity	ADP biosynthetic process; AMP metabolic process; ATP metabolic process; Nucleoside diphosphate phosphorylation; nucleoside triphosphate biosynthetic process	Cytoplasm
A-kinase anchor protein 3	O77797	300	95638	3 (3)	Protein kinase A binding	Regulation of protein kinase A signaling	Acrosomal vesicle; cytoplasm; sperm fibrous sheath; sperm principal piece
A-kinase anchor protein 4	O35774	675	94916	16 (15)	Protein kinase A binding	Cell projection organization; regulation of protein kinase A signaling; sperm motility	Cytoplasm; motile cilium; sperm fibrous sheath; sperm principal piece
Annexin A1	P46193	112	39212	2 (2)	Calcium-dependent phospholipid binding; calcium ion binding; phospholipase A2 inhibitor activity	Actin cytoskeleton reorganization; adaptive immune response; calcium ion transmembrane transport; cellular response to glucocorticoid stimulus; G-protein coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger; granulocyte chemotaxis; inflammatory response; innate immune response; monocyte chemotaxis; negative regulation of exocytosis; negative regulation of T-helper 2 cell differentiation; phagocytosis; positive regulation of interleukin-2 production; positive regulation of T cell proliferation; positive regulation of T-helper 1 cell differentiation; positive regulation of wound healing; regulation of cell shape; regulation of hormone secretion; regulation of inflammatory response; regulation of interleukin-1 production; regulation of leukocyte migration	Apical plasma membrane; basolateral plasma membrane; cytoplasmic vesicle membrane; cytosol; early endosome membrane; extracellular exosome; extracellular space; extrinsic component of endosome membrane; extrinsic component of external side of plasma membrane; lateral plasma membrane; membrane; motile cilium; nucleus; phagocytic cup
Arylsulfatase A	Q08DD1	255	54571	2 (2)	Calcium ion binding; cerebroside-sulfatase activity	Binding of sperm to zona pelúcida; metabolic process	Integral component of membrane; lysosome; plasma membrane

ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	A5A6H5	852	59828	8 (8)	ATP binding; poly(A) RNA binding; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; proton transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	ATP hydrolysis coupled proton transport; ATP synthesis coupled proton transport; lipid metabolic process; negative regulation of endothelial cell proliferation	COP9 signalosome; extracellular exosome; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; myelin sheath; plasma membrane; proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P00829	1354	56249	37 (24)	ATP binding; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	Angiogenesis; ATP hydrolysis coupled proton transport; ATP synthesis coupled proton transport; lipid metabolic process; negative regulation of cell adhesion involved in substrate-bound cell migration; osteoblast differentiation; regulation of intracellular pH	Cell surface; extracellular exosome; mitochondrial nucleoid; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; myelin sheath; nucleus; plasma membrane; proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)
ATP synthase subunit d, mitochondrial	P13620	114	18738	2 (2)	Hydrogen ion transmembrane transporter activity	Atp synthesis coupled proton transport	Mitochondrial proton-transporting atp synthase, stator stalk; mitochondrial proton-transporting atp synthase complex
Beta-actin-like protein 2	Q8BFZ3	15	42319	2 (1)	ATP binding	Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells.	Cytoplasm; Cytoskeleton; extracellular exosome; extracellular space
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-3	Q6GQS1	34	52692	1 (1)	Calcium ion binding; structural constituent of ribosome	Adenine nucleotide transport; calcium ion transmembrane import into mitochondrion; cellular response to calcium ion; mitochondrial calcium ion transport; regulation of cellular respiration; regulation of oxidative phosphorylation; regulation of sequestering of calcium ion; translation; urea homeostasis	Integral component of membrane; mitochondrial inner membrane; mitochondrion
Calmodulin	Q5RAD2	462	16827	5 (5)	Calcium ion binding; protein phosphatase activator activity	Detection of calcium ion; positive regulation of cyclic nucleotide metabolic process; positive regulation of cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity; positive regulation of phosphoprotein phosphatase activity; positive regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity; regulation of cardiac muscle contraction; regulation of cytokinesis; regulation of heart rate; regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol by sarcoplasmic reticulum; substantia nigra development	Calcium channel complex; centrosome; extracellular exosome; nucleus; sarcomere; spindle microtubule; spindle pole
Caltrin	P06833	130	9028	6 (6)	G-protein coupled receptor binding ; neuropeptide hormone activity	Cell-cell signaling; defense response to bacterium; digestion; feeding behavior; neuropeptide signaling pathway; regulation of appetite	Extracellular space
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	P00515	312	45408	4 (4)	cAMP binding; cAMP-dependent protein kinase inhibitor activity; cAMP-dependent protein kinase regulator activity	Negative regulation of camp-dependent protein kinase activity	cAMP-dependent protein kinase complex; centrosome Source: Ensembl cytoplasm; extracellular exosome; focal adhesion; nucleotide-activated protein kinase complex; plasma membrane raft
Carboxypeptidase Q	Q17QK3	100	51703	2 (2)	Carboxypeptidase activity; metal ion binding; metallopeptidase activity; protein homodimerization activity	Peptide catabolic process; proteolysis; thyroid hormone generation; tissue regeneration	Cytoplasm; endoplasmic reticulum; extracellular exosome; extracellular space; golgi apparatus; lysosome
Cathelicidin-4	P33046	114	16697	1 (1)	--	Defense response to bacterium; defense response to fungus; killing of cells of other organism	Extracellular región
C-C motif chemokine 2	P28291	76	11392	4 (2)	CCR chemokine receptor binding; chemokine activity	Astrocyte cell migration ; cellular response to fibroblast growth factor stimulus; cellular response to interferon-gamma; cellular response to interleukin-1; cellular response to organic cyclic compound; cellular response to tumor necrosis factor; chemokine-mediated signaling pathway; l cytoskeleton organization; G-protein coupled	Extracellular space; intracellular

						receptor signaling pathway; helper T cell extravasation; inflammatory response; lipopolysaccharide-mediated signaling pathway; lymphocyte chemotaxis; macrophage chemotaxis; MAPK cascade; monocyte chemotaxis; negative regulation of angiogenesis; negative regulation of glial cell apoptotic process; negative regulation of natural killer cell chemotaxis; negative regulation of neuron apoptotic process; neutrophil chemotaxis; positive regulation of apoptotic cell clearance; positive regulation of calcium ion import; positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade; positive regulation of gtpase activity; positive regulation of immune complex clearance by monocytes and macrophages; positive regulation of inflammatory response; positive regulation of macrophage chemotaxis; positive regulation of monocyte chemotaxis; positive regulation of nitric-oxide synthase biosynthetic process; positive regulation of T cell activation; protein kinase B signaling; regulation of cell shape; regulation of vascular endothelial growth factor production ; response to wounding	
Clusterin	P17697	141	51651	3 (3)	Misfolded protein binding; ubiquitin protein ligase binding	Chaperone-mediated protein folding; intrinsic apoptotic signaling pathway; negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage; negative regulation of protein homooligomerization; positive regulation of apoptotic process; positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway; positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity; positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process; positive regulation of protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process; protein stabilization; response to misfolded protein	Chromaffin granule; cytosol; endoplasmic reticulum; extracellular space; mitochondrial membrane; nucleus; perinuclear region of cytoplasm; spherical high-density lipoprotein particle
C-type natriuretic peptide	P18104	67	13406	4 (3)	Receptor binding	Cgmp biosynthetic process; growth plate cartilage chondrocyte differentiation; growth plate cartilage chondrocyte proliferation; negative regulation of meiotic cell cycle; negative regulation of oocyte maturation; ossification; post-embryonic development; receptor guanylyl cyclase signaling pathway; regulation of blood vessel size; regulation of camp metabolic process; regulation of cgmp metabolic process; regulation of multicellular organism growth; single organism reproductive process	Extracellular region
Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	P00126	110	10902	1 (1)	Ubiquinol-cytochrome-c reductase activity	Mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	Mitochondrial inner membrane; respiratory chain
Cytochrome c oxidase subunit 2	Q38RU7	128	26041	2 (2)	Copper ion binding; cytochrome-c oxidase activity	Electron transport chain	Integral component of membrane; mitochondrial inner membrane; respiratory chain complex iv
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	Q9TTT8	39	19643	1 (1)	Cytochrome-c oxidase activity	--	Mitochondrial inner membrane
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	B0VYY2	358	16766	10 (8)	Cytochrome-c oxidase activity; metal ion binding	--	Mitochondrial inner membrane
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	P00428	26	14053	2 (1)	Cytochrome-c oxidase activity; metal ion binding	--	Mitochondrial inner membrane; respiratory chain complex IV

Disintegrin metalloproteinase containing protein 2	and domain-	O77780	109	85605	3 (2)	Metalloendopeptidase activity; zinc ion binding	Cell adhesion	Integral component of membrane
Dynein light chain 2, cytoplasmic		Q3MHR3	80	10457	2 (1)	Motor activity	Microtubule-based process; transport	Centrosome; cytoplasm; dynein complex; membrane; microtubule; myosin complex; nucleus
Epididymal secretory protein E1		P79345	122	16972	3 (3)	Cholesterol binding	Cholesterol efflux; cholesterol homeostasis; cholesterol metabolic process; cholesterol transport; intracellular cholesterol transport; response to virus	Endoplasmic reticulum; extracellular exosome; lysosome
F-actin-capping protein subunit beta		A0PFK7	166	31581	5 (5)	Actin filament binding	Actin cytoskeleton organization; barbed-end actin filament capping ; cell morphogenesis; cytoskeleton organization; negative regulation of filopodium assembly; regulation of cell morphogenesis; regulation of lamellipodium assembly	Actin filament; f-actin capping protein complex; sarcomere; wash complex
Fibronectin type III domain-containing protein 3B		Q6NWW9	29	134846	7 (2)	Poly(A) RNA binding	Cell migration; negative regulation of osteoblast differentiation; positive regulation of fat cell differentiation; positive regulation of fibroblast proliferation; substrate adhesion-dependent cell spreading; Type II pneumocyte differentiation	Endoplasmic reticulum Source: MGI integral component of membrane
Fibronectin type III domain-containing protein 8		Q2YDH8	240	35675	4 (4)	--	--	--
GLIPR1-like protein 1		Q32LB5	47	28004	2 (2)		binding of sperm to zona pellucida	acrosomal vesicle; extracellular region;
Glucose-6-phosphate isomerase		Q3ZBD7	343	63043	4 (4)	Glucose-6-phosphate isomerase activity	Angiogenesis; erythrocyte homeostasis; gluconeogenesis; glucose homeostasis; glycolytic process; in utero embryonic development; mesoderm formation	sperm connecting piece Ciliary membrane; cytoplasm; extracellular exosome; extracellular space; myelin sheath; nucleoplasm
Glutamate-rich protein 3		Q5RHP9	49	169047	3 (3)	--	--	--
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific		Q2KJE5	478	43659	7 (7)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity; NAD binding; NADP binding	Glucose metabolic process; glycolytic process	Cytoplasm; nucleus
Golgin subfamily A member 1		Q9CW79	27	87740	3 (1)	--	Protein targeting to Golgi	Golgi apparatus; Golgi cisterna membrane; intracellular membrane-bounded organelle; perinuclear region of cytoplasm; trans-Golgi network
Hexokinase-1		P27595	150	104139	2 (2)	ATP binding; fructokinase activity; glucokinase activity; glucose binding; mannokinase activity	Cellular glucose homeostasis; glycolytic process; hexose metabolic process	Cytosol; mitochondrial outer membrane
Histone H2A type 1 GN=HIST1H2AG PE=1 SV=2		P0C0S8	160	14083	2 (2)	DNA binding; enzyme binding	Chromatin silencing	Extracellular exosome; nuclear chromatin; nucleosome; nucleus
Histone H2B type 1-K		Q2M2T1	216	13867	2 (2)	DNA binding	Nucleosome assembly	Nuclear nucleosome
L-amino-acid oxidase		O09046	96	70375	2 (2)	L-amino-acid oxidase activity	Aromatic amino acid Family metabolic process	Lysosome
Leucine zipper protein 2		Q5R8Y4	46	39147	1 (1)		extracellular region	
L-lactate dehydrogenase A chain		A0A1F3	83	36947	2 (2)	L-lactate dehydrogenase activity	Carbohydrate metabolic process; carboxylic acid metabolic process	Cytoplasm
L-lactate dehydrogenase C chain		Q29563	472	36534	6 (5)	L-lactate dehydrogenase activity	carbohydrate metabolic process; carboxylic acid metabolic process	Cytoplasm
Malate dehydrogenase, mitochondrial		P04636	242	36117	4 (3)	L-malate dehydrogenase activity; malate dehydrogenase (NADP+) activity;	Carbohydrate metabolic process; internal protein amino acid acetylation; malate metabolic process; NADH metabolic process; oxaloacetate metabolic; tricarboxylic	Extracellular exosome; mitochondrial inner membrane; mitochondrial matrix;

					dehydrogenase activity; poly(A) RNA binding ; protein self-association	acid cycle	mitochondrion; myelin sheath; nucleoplasm; plasma membrane
Metalloproteinase inhibitor 2	Q9TRZ7	349	22519	8 (6)	Metal ion binding; metalloendopeptidase inhibitor activity	--	Extracellular region
NADH-cytochrome b5 reductase 1	Q3MHW9	495	34010	5 (5)	Cytochrome-b5 reductase activity, acting on NAD(P)H; FAD binding	Sterol biosynthetic process	Integral component of membrane; mitochondrion
Osteopontin	P10451	175	35572	3 (3)	Extracellular matrix binding	Biomaterial tissue development; cell adhesion; decidulization;embryo implantation;extracellular matrix disassembly; extracellular matrix organization; inflammatory response; negative regulation of collateral sprouting of intact axon in response to injury; osteoblast differentiation; positive regulation of bone resorption; response to steroid hormone; response to vitamin d	Cell projection ; extracellular exosome; extracellular region; extracellular space; perinuclear region of cytoplasm
Outer dense fiber protein 2	Q2T9U2	307	76249	6 (6)	--	Cell differentiation; multicellular organism development; spermatogenesis	Centriole; cilium; microtubule; spindle pole
Parkin coregulated gene protein homolog	Q9DAK2	135	27880	1 (1)	Actin binding; alpha-tubulin binding; beta-tubulin binding ; chaperone binding; G-protein coupled receptor binding heat shock protein binding Hsp70 protein binding; Hsp90 protein binding; ubiquitin protein ligase binding	Cellular response to unfolded protein; negative regulation of cell death; spermatid development	Cell body; cilium; cytosol; mitochondrion; neuron projection; nucleus; sperm midpiece;vesicle
Peroxioredoxin-5, mitochondrial	Q9BG11	34	23523	1 (1)	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity involved in apoptotic process; peroxidase activity; peroxynitrite reductase activity; RNA polymerase III regulatory region DNA binding	Cell redox homeostasis; cellular response to reactive; Ensembl hydrogen peroxide catabolic process; NADPH oxidation; negative regulation of oxidoreductase activity; negative regulation of transcription from RNA polymerase III promoter; positive regulation of collagen biosynthetic process;reactive nitrogen species metabolic process; regulation of apoptosis involved in tissue homeostasis	Cytoplasmic vesicle; cytosol; extracellular exosome; extracellular space; mitochondrion; nucleus; perinuclear region of cytoplasm;peroxisomal matrix
Phosphoglycerate kinase 2	Q6RI85	44	45266	2 (2)	ATP binding; phosphoglycerate kinase activity	Glycolytic process; phosphorylation	Cytoplasm
Phosphoglycerate mutase 2	Q32KV0	499	28838	9 (9)	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase activity; bisphosphoglycerate 2-phosphatase activity; bisphosphoglycerate mutase activity	Gluconeogenesis; glycolytic process; regulation of pentose-phosphate shunt	Cytosol
Prosaposin	P26779	103	59837	3 (2)	Enzyme activator activity; G-protein coupled receptor binding	Adenylate cyclase-inhibiting G-protein coupled receptor signaling pathway; epithelial cell differentiation involved in prostate gland development;glycosphingolipid metabolic process; prostate gland growth; regulation of lipid metabolic process	Cytoplasm; extracellular space; lysosome
Protein FAM205CP	Q32LN6	69	45915	1 (1)	--	--	Integral component of membrane; nucleus
Protein S100-A8	P28782	648	10567	10 (10)	Antioxidant activity; arachidonic acid binding; calcium ion binding; zinc ion binding	Activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process; apoptotic process; astrocyte development; autophagy; innate immune response ; leukocyte migration involved in inflammatory response; neutrophil aggregation; neutrophil chemotaxis; peptidyl-cysteine s nitrosylation; positive regulation of inflammatory response; positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway; positive regulation of peptide secretion	Cytoplasm; cytoskeleton; extracellular exosome; extracellular space;nucleus; plasma membrane

Protein S100-A9	P28783	193	17160	5 (3)	Antioxidant activity; arachidonic acid binding; calcium ion binding; zinc ion binding	Activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process; apoptotic process;autophagy; innate immune response; leukocyte migration involved in inflammatory response; neutrophil aggregation; neutrophil chemotaxis; positive regulation of inflammatory response; positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway	Cytoplasm; cytoskeleton; extracellular region; plasma membrane
Ras-related protein Rab-2A	Q4R4X6	130	23702	3 (2)	GDP binding; gtpase activity; GTP binding	Protein transport; small gtpase mediated signal transduction; vesicle-mediated transport	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membrane; endoplasmic reticulum membrane; Golgi membrane; melanosome
Ribonuclease UK114	Q3T114	22	14321	2 (1)	Extracellular mitochondrion	--	--
Ropporin-1	Q3T064	522	24125	6 (6)	--	--	--
Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	Q3T067	33	47688	1 (1)	Oxidoreductase activity	--	--
Seminal plasma protein A3	P04557	242	16586	11 (11)	--	Single fertilization; sperm capacitation	Extracellular space
Seminal plasma protein BSP-30 kDa	P81019	462	21711	6 (6)	Heparin binding	Single fertilization	Extracellular region
Seminal plasma protein PDC-109	P02784	2451	15926	33 (32)	--	Single fertilization ; sperm capacitation	Extracellular space
Seminal ribonuclease	P00669	747	16936	16 (14)	Identical protein binding; nucleic acid binding; ribonuclease A activity	--	Extracellular region
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	P47843	226	54673	7 (7)	Dehydroascorbic acid transporter activity; D-glucose transmembrane transporter activity; glucose binding; glucose transmembrane transporter activity; Biological processi glucose transmembrane transport	--	Acrosomal membrane; integral component of membrane; integral component of plasma membrane
Sperm acrosomal protein FSA-ACR.1 (Fragment)	P53353	964	37034	36 (26)	--	--	acrosomal vesicle
Sperm acrosome membrane-associated protein 1	Q2YDG7	265	31433	5 (4)	--	Acrosome assembly	Acrosomal membrane; integral component of membrane
Sperm acrosome membrane-associated protein 3	A6QQ77	288	18543	6 (6)	Lysozyme activity	Fertilization	Extracellular region
Sperm surface protein Sp17	P36425	338	16938	4 (4)	Heparin binding	Binding of sperm to zona pellucida	Cytoplasm; external side of plasma membrane; primary cilium; sperm fibrous sheath; sperm principal piece
Spermadhesin Z13	P82292	99	13660	1 (1)	--	Single fertilization	Extracellular region
Spermadhesin-1	P29392	1406	15255	38 (36)	--	Single fertilization	Extracellular region
Spindlin-3	Q5JUX0	26	29303	2 (1)	--	Gamete generation	--
T-complex protein 1 subunit epsilon	Q4R6V2	38	60089	4 (2)	ATP binding; G-protein beta-subunit binding	Protein folding	Chaperonin-containing t-complex; microtubule organizing center
Tetraspanin-8	Q2KIS9	60	26875	2 (2)	--	Cell surface receptor signaling pathway	Integral component of plasma membrane
Tubulin alpha-3 chain	Q32KN8	855	50578	16 (16)	GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasm; microtubule
Tubulin alpha-8 chain	Q6AY56	580	50690	11 (11)	GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasm; microtubule
Tubulin beta-4B chain	Q3MHM5	2375	50255	43 (41)	Double-stranded RNA binding; gtpase activity; GTP binding;	Microtubule-based process	Cytoplasm; extracellular exosome; microtubule; myelin sheath; nucleus

					structural constituent of cytoskeleton		
Tubulin beta-6 chain	Q9BUF5	323	50281	9 (9)	Gtpase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasm; extracellular exosome; microtubule; nucleus
Uncharacterized protein C9orf9 homolog	Q7TPM5	83	19812	1 (1)	Calcium-dependent protein binding	--	Acrosomal vesicle; cytoplasm; cytoplasmic microtubule
Vesicle-fusing ATPase	Q5R410	42	83087	2 (1)	ATP binding ; hydrolase activity; metal ion binding	Protein transport	Cytoplasm
Zinc finger protein 516	Q7TSH3	22	126820	1 (1)	Activating transcription factor binding; core promoter proximal region sequence-specific DNA binding; metal ion binding; transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	Adipose tissue development; brown fat cell differentiation; positive regulation of transcription, DNA-templated; response to cold; signal transduction; transcription from RNA polymerase II promoter	Nucleus
Zinc finger protein 652	A1L1J6	24	70825	2 (1)	DNA binding; metal ion binding	Regulation of transcription, DNA-templated; transcription, DNA-templated	Nucleus
Zona pellucida-binding protein 1	Q29108	125	40454	2 (2)	Binding of sperm to zona pellucida	--	Acrosomal vesicle; extracellular região

Tabela 3. Resultados da espectrometria de massas e ontologia gênica das proteínas extraídas de espermatozoides do epidídimo de touros. Ontologia gênica obtida no UniprotKB (www.uniprot.org).

Name	ID	Score	Mass (Da)	Matches	Ontologia gênica		
					Molecular function	Biological process	Cellular compartment
14-3-3 protein zeta/delta	Q5R651	867	27899	12 (12)	--	--	Melanosome
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	Q29RZ0	200	45146	2 (2)	Acetyl-coa C-acetyltransferase activity; metal ion binding	Metabolic process	Extracellular exosome; mitochondrial inner membrane
Aconitate hydratase, mitochondrial	Q9ER34	60	86121	1 (1)	3 iron, 4 sulfur cluster binding; 4 iron, 4 sulfur cluster binding; aconitate hydratase activity; iron ion binding	Citrate metabolic process; isocitrate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	Mitochondrion; myelin sheath; nucleus
Acrosin	P10323	182	46502	6 (6)	Amidase activity; copper ion binding; DNA binding; drug binding; fucose binding; mannose binding; protease binding;serine-type endopeptidase activity; zinc ion binding	Acrosome matrix dispersal; acrosome reaction; activation of adenylate cyclase activity; binding of sperm to zona pellucida; response to steroid hormone; single fertilization	Acrosomal matrix; extracellular region; Golgi-associated vesicle; nucleus; protein complex
Acrosin-binding protein (Fragment)	Q29016	203	61641	4 (4)	--	Sperm capacitation	Acrosomal membrane; acrosomal vesicle; extracellular region; nucleus
Adenylate kinase isoenzyme 1	P00569	234	21738	4 (4)	Adenylate kinase activity; ATP binding; nucleoside diphosphate kinase activity	ADP biosynthetic process; AMP metabolic process; ATP metabolic process; nucleoside diphosphate phosphorylation; nucleoside triphosphate biosynthetic process	Cytoplasm
A-kinase anchor protein 3	O77797	356	95638	7 (7)	Protein kinase A binding	Regulation of protein kinase A signaling	Acrosomal vesicle; cytoplasm; sperm fibrous sheath; sperm principal piece
A-kinase anchor protein 4	O35774	1497	94916	35 (34)	Protein kinase A binding	Cell projection organization; regulation of protein kinase A signaling; sperm motility	Cytoplasm; motile cilium; sperm fibrous sheath; sperm principal piece
Alpha-enolase	Q9XSJ4	350	47639	6 (6)	Magnesium ion binding; phosphopyruvate hydratase activity	Glycolytic process	Cytoplasm; phosphopyruvate hydratase complex; plasma membrane

Aspartyl aminopeptidase	Q2HJH1	52	52366	1 (1)	Metalloaminopeptidase activity; zinc ion binding	Peptide metabolic process	Blood microparticle; cytoplasm; extracellular region; nucleoplasm
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	A5A6H5	343	59828	7 (5)	ATP binding; poly(A) RNA binding; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	ATP hydrolysis coupled proton transport; ATP synthesis coupled proton transport; lipid metabolic process; negative regulation of endothelial cell proliferation	COP9 signalosome; extracellular exosome; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; myelin sheath; plasma membrane; proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P00829	1625	56249	30 (25)	ATP binding; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	Angiogenesis; ATP hydrolysis coupled proton transport; ATP synthesis coupled proton transport; lipid metabolic process; negative regulation of cell adhesion involved in substrate-bound cell migration; osteoblast differentiation; regulation of intracellular pH	Cell surface; extracellular exosome; mitochondrial nucleoid; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; myelin sheath; nucleus; plasma membrane; proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)
Calcyclin-binding protein	Q5R6Z8	26	26274	3 (1)	--	--	Cytoplasm; nucleus
Calmodulin	Q5RAD2	1489	16827	35 (25)	Calcium ion binding; protein phosphatase activator activity	Detection of calcium ion; positive regulation of cyclic nucleotide metabolic process; positive regulation of cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity; positive regulation of phosphoprotein phosphatase activity; positive regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity; regulation of cardiac muscle contraction; regulation of cytokinesis; regulation of heart rate; regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol by sarcoplasmic reticulum; substantia nigra development	Calcium channel complex; centrosome; extracellular exosome; nucleus; sarcomere; spindle microtubule; spindle pole
Caltrin	P06833	43	9028	1 (1)	G-protein coupled receptor binding; neuropeptide hormone activity	Cell-cell signaling; defense response to bacterium; digestion; feeding behavior; neuropeptide signaling pathway; regulation of appetite	Extracellular space
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	P00515	433	45408	5 (5)	cAMP binding; cAMP-dependent protein kinase inhibitor activity; cAMP-dependent protein kinase regulator activity	Negative regulation of camp-dependent protein kinase activity	cAMP-dependent protein kinase complex; centrosome; cytoplasm; extracellular exosome; focal adhesion; nucleotide-activated protein kinase complex; plasma membrane raft
Carboxypeptidase Q	Q17QK3	196	51703	4 (4)	Carboxypeptidase activity; metal ion binding; metallopeptidase activity; protein homodimerization activity	Peptide catabolic process; proteolysis; thyroid hormone generation; tissue regeneration	Cytoplasm; endoplasmic reticulum; extracellular exosome; extracellular space; golgi apparatus; lysosome
Cell division cycle-associated 7-like protein	Q96GN5	19	53086	1 (1)	--	Positive regulation of cell proliferation; regulation of transcription, DNA-templated; transcription, DNA-templated	Cytoplasm; nucleolus; nucleus
Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	P00126	184	10902	2 (2)	Ubiquinol-cytochrome-c reductase activity; Biological process	Mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	Mitochondrial inner membrane; respiratory chain
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	Q9TTT8	32	19643	1 (1)	Cytochrome-c oxidase activity	--	Mitochondrial inner membrane
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	B0VYY2	181	16766	5 (3)	Cytochrome-c oxidase activity; metal ion binding	This is the heme a-containing chain of cytochrome c oxidase, the terminal oxidase in mitochondrial electron transport.	Mitochondrial inner membrane
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	P00428	53	14053	3 (3)	Cytochrome-c oxidase activity; metal ion binding	This protein is one of the nuclear-coded polypeptide chains of cytochrome c oxidase, the terminal oxidase in mitochondrial electron transport.	Mitochondrial inner membrane; respiratory chain complex iv
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	Q8CIZ7	120	54667	1 (1)	Dihydrolipoyl dehydrogenase activity; flavin adenine dinucleotide binding	Cell redox homeostasis	Mitochondrial matrix
Disintegrin and metalloproteinase domain-	O77780	360	85605	4 (4)	Metalloendopeptidase activity; zinc ion binding	Cell adhesion	Integral component of membrane

containing protein 2

Dynein light chain 2, cytoplasmic	Q3MHR3	98	10457	6 (4)	Motor activity	Microtubule-based process; transport	Centrosome; cytoplasm; dynein complex; membrane; microtubule; myosin complex; nucleus extracellular region
Epididymal sperm-binding protein 1	Q7YR83	102	27151	5 (5)	--	single fertilization	
F-actin-capping protein subunit beta	A0PFK7	346	31581	6 (6)	Actin filament binding	Actin cytoskeleton organization; barbed-end actin filament capping; cell morphogenesis; cytoskeleton organization; negative regulation of filopodium assembly; regulation of cell morphogenesis; regulation of lamellipodium assembly	Actin filament; f-actin capping protein complex; sarcomere; wash complex
Fibronectin type III domain-containing protein 8	Q2YDH8	190	35675	3 (3)	--	--	--
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	Q3SZB7	554	37047	8 (8)	AMP binding; fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphatase activity; metal ion binding; monosaccharide binding	Cellular response to drug; cellular response to magnesium ion; dephosphorylation; fructose 6-phosphate metabolic process; fructose catabolic process; gluconeogenesis; negative regulation of cell growth; negative regulation of glycolytic process; negative regulation of Ras protein signal transduction; protein homotetramerization; regulation of gluconeogenesis	Cytoplasm; Cytosol; extracellular exosome
GLIPR1-like protein 1	Q32LB5	49	28004	2 (2)	--	Binding of sperm to zona pellucida	Acrosomal vesicle; extracellular region; sperm connecting piece
Glucose-6-phosphate isomerase	Q3ZBD7	634	63043	8 (8)	Glucose-6-phosphate isomerase activity	Angiogenesis; erythrocyte homeostasis; gluconeogenesis; glucose homeostasis; glycolytic process; in utero embryonic development; mesoderm formation	Ciliary membrane; cytoplasm; extracellular exosome; extracellular space; myelin sheath; nucleoplasm
Glutathione S-transferase Mu 3	Q9BEA9	281	26985	4 (4)	glutathione transferase activity	glutathione metabolic process	Cytoplasm
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	Q2KJE5	1223	43659	18 (16)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity; NAD binding; NADP binding	Glucose metabolic process; glycolytic process	Cytoplasm; nucleus
GRB2-associated-binding protein 1	Q9QYY0	31	77449	2 (1)	Signal transducer activity	Activation of jun kinase activity; activation of mapk activity; epidermal growth factor receptor signaling pathway; epidermis development; heart development; interleukin-6-mediated signaling pathway; labyrinthine layer development; platelet-derived growth factor receptor signaling pathway; positive regulation of mapk cascade; regulation of cell migration; response to oxidative stress; signal transduction	Cytoplasm
Heat shock protein HSP 90-alpha	Q4R4P1	137	85135	3 (3)	ATP binding	Protein folding; response to antibiotic; response to cold; response to heat	Cytoplasm; Melanosome; nucleus; plasma membrane
Heat shock-related 70 kDa protein 2	Q9TUG3	56	70109	1 (1)	ATP binding	Cell differentiation; response to cold; response to heat; spermatogenesis	CatSper complex; cytoplasm; meiotic spindle
Hemoglobin subunit alpha	P01966	831	15175	22 (18)	Heme binding; iron ion binding; oxygen binding; oxygen transporter activity	--	Hemoglobin complex
Hemoglobin subunit beta	P67819	926	16033	18 (13)	Heme binding; iron ion binding; oxygen binding; oxygen transporter activity	--	Hemoglobin complex
Hemoglobin subunit beta	P02070	1107	16001	23 (17)	Heme binding; iron ion binding; oxygen binding; oxygen transporter activity	--	Hemoglobin complex
Hexokinase-1	P27595	95	104139	1 (1)	ATP binding; fructokinase activity;	Cellular glucose homeostasis; glycolytic process;	Cytosol; mitochondrial outer

					glucokinase activity; glucose binding; mannokinase activity	hexose metabolic process	membrane
Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial	Q8SQ21	153	17250	2 (2)	Hydrolase activity; nucleotide binding	Apoptotic process; steroid biosynthetic process	Mitochondrion; nucleolus
Izumo sperm-egg fusion protein 4	D3Z690	19	26885	1 (1)	--	--	Extracellular region; nucleus
L-amino-acid oxidase	Q96RQ9	67	63070	1 (1)	L-amino-acid oxidase activity	L-phenylalanine catabolic process	Extracellular region; lysosome
Leucine zipper protein 2	Q5R8Y4	61	39147	2 (2)	--	--	Extracellular region
L-lactate dehydrogenase B chain	Q4R5B6	62	36900	2 (1)	L-lactate dehydrogenase activity	Carbohydrate metabolic process; carboxylic acid metabolic process	Cytoplasm
L-lactate dehydrogenase C chain	Q29563	311	36534	6 (4)	L-lactate dehydrogenase activity	Carbohydrate metabolic process; carboxylic acid metabolic process	Cytoplasm
Malate dehydrogenase, mitochondrial	P04636	540	36117	8 (7)	L-malate dehydrogenase activity; malate dehydrogenase (NADP+) activity; malate dehydrogenase activity; poly(A) RNA binding; protein self-association	Carbohydrate metabolic process; internal protein amino acid acetylation; malate metabolic process; NADH metabolic process; oxaloacetate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	Extracellular exosome; mitochondrial inner membrane; mitochondrial matrix; mitochondrion; myelin sheath; nucleoplasm; plasma membrane
Melanoma inhibitory activity protein 3	Q5JRA6	17	214255	3 (1)	Lipoprotein transporter activity	Cargo loading into copii-coated vesicle; er to golgi vesicle-mediated transport; exocytosis; lipoprotein transport; negative regulation of cell adhesion; negative regulation of cell migration; positive regulation of leukocyte migration; protein transport; wound healing	Endoplasmic reticulum exit site; endoplasmic reticulum membrane; golgi membrane; integral component of membrane; intracellular membrane-bounded organelle; membrane
Mitochondria-eating protein	E1BLK7	59	61458	1 (1)	--	Cellular response to DNA damage stimulus; mitochondrial protein catabolic process; mitophagy by induced vacuole formation	Cytoplasm; intracellular membrane-bounded organelle; mitochondrial outer membrane
NADH-cytochrome b5 reductase 1	Q3MHW9	216	34010	3 (3)	Cytochrome-b5 reductase activity, acting on NAD(P)H; FAD binding	Sterol biosynthetic process	Integral component of membrane;mitochondrion
Outer dense fiber protein 2	Q2T9U2	1348	76249	23 (22)	--	Cell differentiation; multicellular organism development; spermatogenesis	Centriole; cilium; microtubule; spindle pole
Peroxisomal protein 5, mitochondrial	Q9BG11	155	23523	6 (6)	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity involved in apoptotic process; peroxidase activity;peroxynitrite reductase activity;RNA polymerase III regulatory region DNA binding	Cell redox homeostasis; cellular response to reactive oxygen species; hydrogen peroxide catabolic process; NADPH oxidation; negative regulation of oxidoreductase activity; negative regulation of transcription from RNA polymerase III promoter; positive regulation of collagen biosynthetic process; reactive nitrogen species metabolic process; regulation of apoptosis involved in tissue homeostasis	Cytoplasmic vesicle; cytosol; extracellular exosome; extracellular space; mitochondrion; nucleus; perinuclear region of cytoplasm; peroxisomal matrix
Phosphoglycerate kinase 2	Q6RI85	361	45266	8 (8)	ATP binding; phosphoglycerate kinase activity	Glycolytic process; phosphorylation	Cytoplasm
Phosphoglycerate mutase 2	Q32KV0	796	28838	12 (12)	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase activity; bisphosphoglycerate 2-phosphatase activity; bisphosphoglycerate mutase activity	Gluconeogenesis; glycolytic process; regulation of pentose-phosphate shunt	Cytosol
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	Q9N2J2	178	22739	7 (5)	Glutathione peroxidase activity; phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase activity	Multicellular organism development; response to oxidative stress	Mitochondrion
Proteasome subunit alpha type-2	Q3T0Y5	98	25996	1 (1)	Threonine-type endopeptidase activity	Ubiquitin-dependent protein catabolic process	Cytoplasmic mRNA processing body; nucleus; proteasome core complex; proteasome core complex, alpha-subunit complex
Protein FAM205CP	Q32LN6	176	45915	3 (2)	--	--	Integral component of membrane;nucleus

Protein MENT	Q9BUN1	67	37259	2 (2)	--	--	Cytoplasm; extracellular region;nucleoplasm
Rab GDP dissociation inhibitor beta	Q5RCE1	44	51088	1 (1)	GTPase activator activity; oxidoreductase activity; Rab GDP-dissociation inhibitor activity	Protein transport; small gtpase mediated signal transduction	Cytoplasm; membrane
Ras-related protein Rab-2A	Q4R4X6	253	23702	4 (4)	GDP binding; GTPase activity; GTP binding	Protein transport;small gtpase mediated signal transduction; vesicle-mediated transport	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membrane; endoplasmic reticulum membrane; Golgi membrane; melanosome
Ropporin-1	Q3T064	799	24125	10 (10)	--	--	--
Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	Q3T067	122	47688	4 (2)	Oxidoreductase activity	--	--
Seminal ribonuclease	P00669	49	16936	1 (1)	Identical protein binding; nucleic acid binding; ribonuclease A activity	--	Extracellular region
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	P47843	212	54673	4 (4)	Dehydroascorbic acid transporter activity; D-glucose transmembrane transporter activity; glucose binding; glucose transmembrane transporter activity;	Glucose transmembrane transport	Acrosomal membrane; integral component of membrane; integral component of plasma membrane
Sperm acrosomal protein FSA-ACR.1 (Fragment)	P53353	643	37034	33 (17)	--	--	Acrosomal vesicle
Sperm acrosome membrane-associated protein 1	Q2YDG7	266	31433	15 (10)	Acrosome assembly	--	Acrosomal membrane; integral component of membrane
Sperm acrosome membrane-associated protein 3	A6QQ77	211	18543	5 (5)	Lysozyme activity	Fertilization	Extracellular region
Sperm surface protein Sp17	Q62252	534	17342	10 (9)	--	--	--
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Q0QF01	19	73812	2 (1)	--	Binding of sperm to zona pellucida	Cilium; cytoplasm; external side of plasma membrane; motile cilium; primary cilium; sperm fibrous sheath; sperm principal piece
Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	Q9Y6N5	55	50214	7 (2)	Quinone binding;sulfide:quinone oxidoreductase activity	Hydrogen sulfide metabolic process; sulfide oxidation, using sulfide:quinone oxidoreductase	Mitochondrial inner membrane
					chaperone binding; copper ion binding; protein phosphatase 2B binding; superoxide dismutase activity; zinc ion binding	activation of MAPK activity; apoptotic DNA fragmentation;auditory receptor cell stereocilium organization; cell aging; cellular iron ion homeostasis; double-strand break repair; embryo implantation; glutathione metabolic process; heart contraction; hydrogen peroxide biosynthetic process; locomotory behavior; muscle cell cellular homeostasis; myeloid cell homeostasis; negative regulation of cholesterol biosynthetic process; negative regulation of neuron apoptotic process; neurofilament cytoskeleton organization; ovarian follicle development; peripheral nervous system myelin maintenance;positive regulation of catalytic activity; positive regulation of cytokine production ; reactive oxygen species metabolic process;regulation of blood pressure;regulation of mitochondrial membrane potential; regulation of multicellular organism growth; regulation of protein kinase activity; relaxation of vascular smooth muscle; removal of superoxide radicals; response to axon injury, response to drug; response to etanol; response to heat; response to hydrogen peroxide; response to	Cytoplasm; cytoplasmic vesicle; cytosol; dendrite cytoplasm; extracellular matrix; extracellular space; mitochondrion; neuronal cell body;nucleus; protein complex
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Q8HXP8	48	16051	2 (2)			

								organic substance; response to superoxide; retina homeostasis; sensory perception of sound; spermatogenesis; superoxide metabolic process; transmission of nerve impulse		
T-complex protein 1 subunit delta	Q5R637	218	58373	4 (2)	ATP binding	Protein folding		Chaperonin-containing t-complex; cilium; melanosome; microtubule organizing center		
T-complex protein 1 subunit epsilon	Q4R6V2	289	60089	6 (5)	ATP binding; G-protein beta-subunit binding	Protein folding		Chaperonin-containing t-complex; microtubule organizing center		
T-complex protein 1 subunit eta	Q2NKZ1	115	59918	1 (1)	ATP binding	Protein folding		Chaperonin-containing t-complex		
T-complex protein 1 subunit gamma	Q3T0K2	100	61118	1 (1)	ATP binding; poly (A) RNA binding	Binding of sperm to zona pelúcida; pore complex assembly; protein folding; toxin transport		Cell body; chaperonin-containing t-complex; extracellular exosome; microtubule; myelin sheath; plasma membrane; zona pellucida receptor complex		
Tetraspanin-8	Q2KIS9	45	26875	1 (1)	--	Cell surface receptor signaling pathway		Integral component of plasma membrane		
Tripeptidyl-peptidase 2	A5PK39	44	139813	1 (1)	Aminopeptidase activity; serine-type endopeptidase activity	Proteolysis		Cytoplasm; nucleus		
Tubulin alpha-3 chain	Q68FR8	1230	50612	28 (24)	Gtpase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process		Ciliary basal body; cytoplasm; microtubule		
Tubulin alpha-8 chain	Q6AY56	961	50690	18 (17)	Gtpase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process		Cytoplasm; microtubule		
Tubulin beta-4B chain	Q3MHM5	1596	50255	28 (27)	Double-stranded RNA binding; gtpase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process		Cytoplasm; extracellular exosome; microtubule; myelin sheath; nucleus		
Uncharacterized protein C9orf9 homolog	Q7TPM5	118	19812	2 (2)	Calcium-dependent protein binding	--		Acrosomal vesicle; cytoplasm; cytoplasmic microtubule		
Zinc finger protein 516	Q7TSH3	24	126820	3 (2)	Activating transcription factor binding; core promoter proximal region sequence-specific DNA binding; metal ion binding; transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	Adipose tissue development; brown fat cell differentiation; positive regulation of transcription, DNA-templated; response to cold; signal transduction; transcription from RNA polymerase II promoter		Nucleus		
Zinc finger protein 652	A1L1J6	32	70825	3 (2)	DNA binding; metal ion binding	Regulation of transcription, transcription, DNA-templated	DNA-templated;	Nucleus		
Zona pellucida-binding protein 1	Q29108	165	40454	3 (3)	--	Binding of sperm to zona pellucida		Acrosomal vesicle; extracellular region		

Tabela 4. Resultados da espectrometria de massas e ontologia gênica das proteínas do plasma seminal de touros. Ontologia gênica obtida no UniprotKB (www.uniprot.org).

Name	ID	Score	Mass (Da)	Matches	Ontologia gênica		
					Molecular function	Biological process	Cellular compartment
Acrosin inhibitor 1	P01000	72	7716	5 (5)	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	--	Extracellular region
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-3	Q6GQS1	24	52692	3 (1)	Calcium ion binding	Adenine nucleotide transport; calcium ion transmembrane import into mitochondrion; cellular response to calcium ion; mitochondrial calcium ion transport; regulation of cellular respiration; regulation	Integral component of membrane; mitochondrial inner membrane; mitochondrion

Caltrin	P06833	92	9028	4 (3)	G-protein coupled receptor binding; neuropeptide hormone activity	of oxidative phosphorylation regulation of sequestering of calcium ion; urea homeostasis Cell-cell signaling, defense response to bacterium; digestion; feeding behavior; neuropeptide signaling pathway; regulation of appetite	Extracellular space
C-C motif chemokine 2	P28291	66	11392	5 (2)	Ccr chemokine receptor binding; chemokine activity	Astrocyte cell migration; cellular response to fibroblast growth factor stimulus; cellular response to interferon-gamma; cellular response to interleukin-1, cellular response to organic cyclic compound; cellular response to tumor necrosis factor; chemokine-mediated signaling pathway; cytoskeleton organization; g-protein coupled receptor signaling pathway; inflammatory response; lipopolysaccharide-mediated signaling pathway; lymphocyte chemotaxis; macrophage chemotaxis; mapk cascade; monocyte chemotaxis; negative regulation of glial cell apoptotic process; negative regulation of natural killer cell chemotaxis; negative regulation of neuron apoptotic process; neutrophil chemotaxis; positive regulation of calcium ion import; positive regulation of erk1 and erk2 cascade; positive regulation of gtpase activity; l positive regulation of inflammatory respons,; protein kinase b signaling; regulation of cell shape	Extracellular space; intracellular
Clusterin	P17697	49	51651	3 (1)	Misfolded protein binding; ubiquitin protein ligase binding	Chaperone-mediated protein folding; intrinsic apoptotic signaling pathway; negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to dna damage; negative regulation of protein homooligomerization; positive regulation of apoptotic process; positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway; positive regulation of nf-kappab transcription factor activity; positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process; positive regulation of protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process; protein stabilization; response to misfolded protein	Chromaffin granule; cytosol; endoplasmic reticulum; extracellular space; mitochondrial membrane; nucleus; perinuclear region of cytoplasm; spherical high-density lipoprotein particle
C-type natriuretic peptide	P55206	245	13454	6 (5)	Receptor binding	cgmp biosynthetic process; growth plate cartilage chondrocyte differentiation; growth plate cartilage chondrocyte proliferation ;negative regulation of meiotic cell cycle; negative regulation of oocyte maturation; ossification; post-embryonic development; receptor guanylyl cyclase signaling pathway; regulation of blood vessel size; regulation of camp metabolic process; regulation of cgmp metabolic process; regulation of multicellular organism growth; single organism reproductive process	Extracellular region
Ephrin-A1	Q3ZC64	64	24165	1 (1)	Ephrin receptor binding	Activation of mapk activity; angiogenesis; aortic valve morphogenesis; axon guidance; cell migration; endocardial cushion to mesenchymal transition involved in heart valve formation; ephrin receptor signaling pathway; mapk cascade; mitral valve morphogenesis; negative regulation of dendritic spine morphogenesis; negative regulation of epithelial to mesenchymal transition negative regulation of thymocyte apoptotic process; negative regulation of transcription from rna polymerase ii promoter;	Anchored component of plasma membrane; extracellular exosome; intracellular

						notochord formation; positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation; regulation of angiogenesis; regulation of axonogenesis; regulation of blood vessel endothelial cell migration; regulation of cell adhesion mediated by integrin; regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation; substrate adhesion-dependent cell spreading	
Epididymal secretory protein E1	P79345	57	16972	4 (3)	Cholesterol binding	Cholesterol efflux;cholesterol homeostasis; cholesterol metabolic process; cholesterol transport;intracellular cholesterol transport; response to virus	Endoplasmic reticulum; extracellular exosome; lysosome
Fibronectin type III domain-containing protein 3B	Q6NWW9	33	134846	9 (1)	Poly(A) RNA binding	Cell migration; negative regulation of osteoblast differentiation; positive regulation of fat cell differentiation; positive regulation of fibroblast proliferation; substrate adhesion-dependent cell spreading; Type II pneumocyte differentiation	Endoplasmic reticulum; integral component of membrane
Keratin; type I cytoskeletal 10	P13645	149	59020	8 (6)	Structural constituent of epidermis	Keratinocyte differentiation	Cytoplasm; extracellular exosome; extracellular space;intermediate filament; membrane; nucleus
Keratin; type I cytoskeletal 9	P35527	242	62255	17 (10)	Structural constituent of cytoskeleton	Epidermis development; intermediate filament organization; skin development; spermatogenesis	Extracellular exosome; extracellular space; intermediate filament; membrane; nucleus
Keratin; type II cytoskeletal 1	A5A6M6	228	65621	17 (11)	Structural molecule activity		Keratin filament; plasma membrane
Keratin; type II cytoskeletal 6B	P04259	66	60315	4 (3)	Structural constituent of cytoskeleton	Ectoderm development	Extracellular exosome; keratin filament
Metalloproteinase inhibitor 2	Q9TRZ7	238	22519	12 (6)	Metal ion binding; metalloendopeptidase activity		Extracellular region
Ninein	Q61043	18	236801	4 (1)	Calcium ion binding; GTP binding; kinase binding	Centrosome localization centrosome-templated microtubule nucleation; collateral sprouting; corpus callosum morphogenesis; corticospinal tract morphogenesis; microtubule anchoring at centrosome; positive regulation of axonogenesis; positive regulation of microtubule polymerization	Apical part of cell; axon; axonal growth cone; centriole; centrosome; ciliary transition fiber;dendrite; microtubule;mitotic spindle pole; nucleolus; pericentriolar material;plasma membrane; spindle pole
Osteopontin	P31096	75	31000	2 (1)	Extracellular matrix binding	Biom mineral tissue development; cell adhesion; osteoblast differentiation; positive regulation of bone resorption	Extracellular region; extracellular space
Ribonuclease 4	Q5NVS4	59	17301	2 (2)	Endonuclease activity; nucleic acid binding	--	Extracellular exosome
Secretoglobulin family 1D member	A0JNP2	30	11515	4 (2)	--	-	Extracellular region
Seminal plasma protein A3	P04557	185	16586	14 (12)	Heparin binding	Single fertilization;sperm capacitation	Cell surface; extracellular space
Seminal plasma protein BSP-30 kDa	P81019	305	21711	14 (8)	Heparin binding	Single fertilization; sperm capacitation	Cell surfasse; extracellular region
Seminal plasma protein PDC-109	P02784	1302	15926	41 (32)	Heparin binding	Single fertilization; sperm capacitation	Cell surface; extracellular space
Seminal ribonuclease	P00669	366	16936	17 (12)	Identical protein binding; nucleic acid binding; ribonuclease A activity		Extracellular region
Serum albumin	P02769	83	71244	4 (3)	DNA binding; drug binding; fatty acid binding; metal ion binding; pyridoxal phosphate binding; toxic substance binding	Cellular response to starvation; hemolysis by symbiont of host erythrocytes; maintenance of mitochondrion location; negative regulation of apoptotic process; transport	Extracellular region; extracellular space; protein complex
Spermadhesin Z13	P82292	276	13660	10 (8)	Single fertilization		Extracellular region

Spermadhesin-1	P29392	681	15255	25 (18)	Single fertilization		Extracellular region
Tissue factor pathway inhibitor 2	Q7YRQ8	48	27683	2 (2)	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Blood coagulation	Extracellular matrix; nucleus
Trypsin	P00761	368	25078	12 (11)	Metal ion binding; endopeptidase activity	Digestion	Extracellular space

Tabela 5. Resultados da espectrometria de massas e ontologia gênica das proteínas extraídas de espermatozoides do Líquido epididimário de touros. Ontologia gênica obtida no UniprotKB (www.uniprot.org).

Name	ID	Score	Mass (Da)	Matches	Ontologia gênica		
					Molecular function	Biological process	Cellular compartment
Actin; cytoplasmic 1	Q0PGG4	120	42064	6 (5)	ATP binding	--	Cytoskeleton; dense body; focal adhesion; plasma membrane
Alpha-2-macroglobulin	Q7SIH1	47	168953	1 (1)	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of complement activation; lectin pathway; stem cell differentiation	Blood microparticle; extracellular exosome
Beta-galactosidase	Q58D55	103	73766	9 (2)	Beta-galactosidase activity	Carbohydrate metabolic process	Lysosome; vacuole
Beta-mannosidase	Q29444	143	101910	6 (6)	Beta-mannosidase activity	Carbohydrate metabolic process	Intracellular membrane-bounded organelle; lysosome
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-3	Q6GQS1	50	52692	2 (2)	Calcium ion binding	Adenine nucleotide transport; calcium ion transmembrane import into mitochondrion; cellular response to calcium ion; mitochondrial calcium ion transport; regulation of cellular respiration; regulation of oxidative phosphorylation; regulation of sequestering of calcium ion; urea homeostasis	Integral component of membrane; mitochondrial inner membrane; mitochondrion
Carboxylesterase 5A (Fragment)	Q3T930	120	42840	6 (4)	Carboxylic ester hydrolase activity	--	Extracellular region
Clusterin	P17697	778	51651	27 (20)	Misfolded protein binding; ubiquitin protein ligase binding	Chaperone-mediated protein folding; intrinsic apoptotic signaling pathway; negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to dna damage; negative regulation of protein homooligomerization; positive regulation of apoptotic process; positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway; positive regulation of nf-kappab transcription factor activity; positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process; positive regulation of protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process; protein stabilization; response to misfolded protein	Chromaffin granule; cytosol; endoplasmic reticulum; extracellular space; mitochondrial membrane; nucleus; perinuclear region of cytoplasm; spherical high-density lipoprotein particle
DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2	Q9NW08	18	129242	2 (1)	DNA binding; DNA-directed RNA polymerase activity; metal ion binding; ribonucleoside binding	Defense response to virus; innate immune response; positive regulation of innate immune response; positive regulation of interferon-beta production; positive regulation of type I interferon production; transcription from RNA polymerase III promoter	Cytosol; DNA-directed RNA polymerase III complex nucleoplasm
Epididymal secretory protein E1	P79345	514	16972	18 (16)	Cholesterol binding	Cholesterol efflux;cholesterol homeostasis; cholesterol metabolic process; cholesterol transport; intracellular cholesterol transport; esponse to virus	Endoplasmic reticulum; extracellular exosome; lysosome
Hemoglobin subunit alpha	P01966	572	15175	19 (18)	Heme binding; iron ion binding; oxygen binding; oxygen transporter	--	Hemoglobin complex

					activity		
Hemoglobin subunit beta	P02070	1895	16001	48 (41)	Heme binding; iron ion binding; oxygen binding; oxygen transporter activity	--	Hemoglobin complex
Hemoglobin subunit beta-A	P04346	1671	16011	42 (36)	Heme binding; iron ion binding; oxygen binding; oxygen transporter activity	--	Hemoglobin complex
Keratin; type I cytoskeletal 9	P35527	26	62255	1 (1)	Structural constituent of cytoskeleton	Epidermis development; intermediate filament organization; skin development; spermatogenesis	Extracellular exosome; extracellular space; intermediate filament; membrane; nucleus
Keratin; type II cytoskeletal 1	A5A6M6	105	65621	3 (2)	Structural molecule activity	--	Keratin filament ; plasma membrane
Keratin; type II cytoskeletal 2 epidermal	P35908	75	65678	2 (2)	Structural constituent of cytoskeleton	Epidermis development; intermediate filament organization; keratinization; keratinocyte activation; keratinocyte development; keratinocyte migration; keratinocyte proliferation	Cytoplasm; extracellular exosome; extracellular space; golgi apparatus; intermediate filament; intermediate filament cytoskeleton; keratin filament; membrane; nucleus
Ribonuclease pancreatic	Q9WUS2	52	16850	1 (1)	Nucleic acid binding; ribonuclease A activity	--	Extracellular region
Serotransferrin	Q29443	340	79870	17 (13)	Ferric iron binding; ferric iron transmembrane transporter activity	Cellular iron ion homeostasis	Cell; extracellular space
Serum albumin	P02769	958	71244	38 (28)	DNA binding; drug binding; fatty acid binding; metal ion binding; pyridoxal phosphate binding; toxic substance binding	Cellular response to starvation; hemolysis by symbiont of host erythrocytes; maintenance of mitochondrion location; negative regulation of apoptotic process; transport	Extracellular region; extracellular space; protein complex
Spermadhesin-1	P29392	107	15255	6 (4)	--	Single fertilization	Extracellular region
TBC1 domain family member 20	Q2T9Q1	23	46055	2 (1)	Gtpase activator activity; Rab gtpase binding	Acrosome assembly; cargo loading into COPII-coated vesicle; ER to Golgi vesicle-mediated transport; Golgi organization; lens fiber cell morphogenesis; lipid particle organization; positive regulation by host of viral genome replication; positive regulation by virus of viral protein levels in host cell; positive regulation of ER to Golgi vesicle-mediated transport; seminiferous tubule development; virion assembly	Endoplasmic reticulum membrane; integral component of Golgi membrane; nuclear membrane
Trypsin	P00761	372	25078	8 (7)	Metal ion binding;serine-type endopeptidase activity	Digestión	Extracellular space

Tabela 6. Expressão diferenciada das proteínas identificadas no extrato proteico dos espermatozoides colhidos do ejaculado (EJAC) e do epidídimo (EPID) de touros.

PROTEIN NAME	emPAI		Raio*
	EJAC	EPID	
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	0,32	--	--
14-3-3 protein zeta/delta	0,25	0,76↑	3,04
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	0,09	--	--
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	--	0,07	--
Aconitate hydratase, mitochondrial	--	0,04	--
Acrosin	0,15	0,15	1,00
Acrosin-binding protein (Fragment)	0,23	0,17	1,35
Acrosin-binding protein	0,11	--	--
Adenylate kinase isoenzyme 1	0,54	0,54	1,00
A-kinase anchor protein 3	0,03	0,11↑	3,66
A-kinase anchor protein 4	0,24	0,72↑	3,13
Alpha-enolase	--	0,31	--
Annexin A1	0,08	--	--
Arylsulfatase A	0,06	--	--
Aspartyl aminopeptidase	--	0,06	--
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	0,24	0,31	1,29
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	0,67	0,67	1,00
ATP synthase subunit d, mitochondrial	0,18	--	--
Beta-actin-like protein 2	0,08	--	--
Calcyclin-binding protein	--	0,13	--
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-3	0,06	--	--
Calmodulin	1,08	1,99↑	1,84
Caltrin	0,39	0,39	1,00
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	0,07	0,07	1,00
Carboxypeptidase Q	0,06	0,06	1,00
Cathelicidin-4	0,20	--	--
C-C motif chemokine 2	0,30	--	--
Cell division cycle-associated 7-like protein	--	0,06	--
Clusterin	0,13	--	--
C-type natriuretic peptide	0,57	--	--
Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	0,32	0,32	1,00
Cytochrome c oxidase subunit 2	0,13	--	--
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	0,17	0,17	1,00
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	0,74↑	0,44	1,68
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	0,24	0,24	1,00
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	--	0,06	--
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2	0,04	0,12↑	3,00
Dynein light chain 2, cytoplasmic	0,33	0,33	1,00

Epididymal secretory protein E1	0,20	--	--
Epididymal sperm-binding protein 1	--	0,12	--
F-actin-capping protein subunit beta	0,22	0,22	1,00
Fibronectin type III domain-containing protein 3B	0,05	--	--
Fibronectin type III domain-containing protein 8	0,09	0,19↑	2,11
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	--	0,29	--
GLIPR1-like protein 1	0,12	0,12	1,00
Glucose-6-phosphate isomerase	0,11	0,23↑	2,09
Glutamate-rich protein 3	0,04	--	--
Glutathione S-transferase Mu 3	--	0,26	--
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	0,24	0,26↑	2,29
Golgin subfamily A member 1	0,04	--	--
GRB2-associated-binding protein 1	--	0,04	--
Heat shock protein HSP 90-alpha	--	0,08	--
Heat shock-related 70 kDa protein 2	--	0,05	--
Hemoglobin subunit alpha	--	3,10	--
Hemoglobin subunit beta	--	2,17	--
Hemoglobin subunit beta	--	1,62	--
Hexokinase-1	0,03	0,03	1,00
Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial	--	0,20	--
Histone H2A type 1	0,24	--	--
Histone H2B type 1-K	0,25	--	--
Izumo sperm-egg fusion protein 4	--	0,12	--
L-amino-acid oxidase	0,10↑	0,05	2,00
Leucine zipper protein 2	0,08	0,08	1,00
L-lactate dehydrogenase A chain	0,09	--	--
L-lactate dehydrogenase B chain	--	0,09	--
L-lactate dehydrogenase C chain	0,19	0,19	1,00
Malate dehydrogenase, mitochondrial	0,09	0,30↑	3,33
Melanoma inhibitory activity protein 3	--	0,02	--
Metalloproteinase inhibitor 2	0,52	--	--
Mitochondria-eating protein	--	0,05	--
NADH-cytochrome b5 reductase 1	0,10	0,10	1,00
Osteopontin	0,09	--	--
Outer dense fiber protein 2	0,13	0,46↑	3,53
Parkin coregulated gene protein homolog	0,12	--	--
Peroxiredoxin-5, mitochondrial	0,14	0,49↑	3,05
Phosphoglycerate kinase 2	0,15	0,33↑	2,20
Phosphoglycerate mutase 2	0,39	0,93↑	2,38
Prosaposin	0,05	--	--
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	--	0,51	--
Proteasome subunit alpha type-2	--	0,13	--

Protein FAM205CP	0,07	0,07	1,00
Protein S100-A8	2,11	--	--
Protein S100-A9	0,20	--	--
Protein MENT	--	0,09	--
Rab GDP dissociation inhibitor beta	--	0,06	--
Ras-related protein Rab-2A	0,14	0,30↑	2,14
Ribonuclease UK114	0,24	--	--
Ropporin-1	0,30	0,68↑	2,26
Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	0,07	0,14↑	2,00
Seminal plasma protein A3	1,11	--	--
Seminal plasma protein BSP-30 kDa	0,54	--	--
Seminal plasma protein PDC-109	5,93	--	--
Seminal ribonuclease	1,97↑	0,20	9,85
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	0,12	0,12	1,00
Sperm acrosomal protein FSA-ACR.1 (Fragment)	0,53	0,67↑	1,26
Sperm acrosome membrane-associated protein 1	0,22	0,35↑	1,59
Sperm acrosome membrane-associated protein 3	0,95	0,65	1,46
Sperm surface protein Sp17	0,20	0,71↑	3,55
Spermadhesin Z13	0,25	--	--
Spermadhesin-1	3,10	--	--
Spindlin-3	0,11	--	--
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	--	0,04	--
Sulfide: quinone oxidoreductase, mitochondrial	--	0,07	--
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	--	0,21	--
T-complex protein 1 subunit delta	--	0,06	--
T-complex protein 1 subunit epsilon	0,05	0,11↑	2,20
T-complex protein 1 subunit eta	--	0,05	--
T-complex protein 1 subunit gamma	--	0,05	--
Tetraspanin-8	0,12	0,12	1,00
Tripeptidyl-peptidase 2	--	0,02	--
Tubulin alpha-3 chain	0,46	0,88↑	1,91
Tubulin alpha-8 chain	0,37	0,65↑	1,75
Tubulin beta-4B chain	1,76	1,43	1,23
Tubulin beta-6 chain	0,37	--	--
Uncharacterized protein C9orf9 homolog	0,17	0,17	1,00
Vesicle-fusing ATPase	0,04	--	--
Zinc finger protein 516	0,03	0,03	1,00
Zinc finger protein 652	0,05	0,05	1,00
Zona pellucida-binding protein 1	0,08	0,08	1,00

(--) ausência da proteína; (↑) aumento superior a 1,5 vezes. *Divisão do emPAI maior pelo menor dos pools de proteína dos espermatozoides do ejaculado (EJAC) e do epidídimo (EPID).

Tabela 7. Expressão diferenciada das proteínas identificadas no extrato proteico do plasma seminal e do liquido epidídimo de touros.

PROTEIN NAME	emPAI		Raio*
	PS	LE	
Acrosin inhibitor 1	1,34	--	--
Actin, cytoplasmic 1	--	0,16	--
Alpha-2-macroglobulin	--	0,02	--
Beta-galactosidase	--	0,09	--
Beta-mannosidase	--	0,13	--
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-3	0,07	0,06	1,16
Caltrin	0,45	--	--
Carboxylesterase 5A (Fragment)	--	0,25	--
C-C motif chemokine 2	0,82	--	--
Clusterin	0,07	0,25↑	10,71
C-type natriuretic peptide	0,67	--	--
DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2	--	0,03	--
Ephrin-A1	0,16	--	--
Epididymal secretory protein E1	0,51	1,97↑	3,86
Hemoglobin subunit alpha	--	4,02	--
Hemoglobin subunit beta	--	20,72	--
Hemoglobin subunit beta-A	--	11,19	--
Keratin, type I cytoskeletal 9	0,42↑	0,05	8,40
Keratin type II cytoskeletal 1	0,55↑	0,10	5,50
Metalloproteinase inhibitor 2	0,87	--	--
Ninein	0,02	--	--
Osteopontin	0,12	--	--
Ribonuclease 4	0,50	--	--
Ribonuclease pancreatic	--	0,20	--
Secretoglobulin family 1D member	0,81	--	--
Seminal plasma protein A3	1,32	--	--
Seminal plasma protein BSP-30 kDa	0,91	--	--
Seminal plasma protein PDC-109	7,96	--	--
Seminal ribonuclease	1,80	--	--
Serotransferrin	--	0,22	--
Serum albumin	0,11	1,15↑	10,45
Spermadhesin Z13	3,56	--	--
Spermadhesin-1	3,95↑	0,83	4,75
TBC1 domain family member 20	--	0,07	--
Tissue factor pathway inhibitor 2	0,14	--	--
Trypsin	1,03↑	0,65	1,58

(--) ausência da proteína; (↑) aumento superior a 1;5 vezes (*upregulated*). *Divisão do emPAI maior pelo menor dos pools de proteína do plasma seminal e do liquido epidídimo.