

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DA OSTEOPONTINA E ASSINATURAS
PROTEÔMICAS DO TRATO REPRODUTOR DE CÃES**

Laíza Sartori de Camargo

BOTUCATU- SÃO PAULO
SETEMBRO/2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DA OSTEOPONTINA E ASSINATURAS
PROTEÔMICAS DO TRATO REPRODUTOR DE CÃES**

LAÍZA SARTORI DE CAMARGO

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca-Alves

BOTUCATU- SÃO PAULO
SETEMBRO/2020

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

Camargo, Laiza Sartori de.

Imunolocalização da osteopontina e assinaturas
proteômicas do trato reprodutor de cães / Laiza Sartori de
Camargo. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Fabiana Ferreira de Souza
Coorientador: Carlos Eduardo Fonseca-Alves
Capes: 50504002

1. Cães - Reprodução. 2. Osteopontina. 3. Testículo.
4. Proteômica.

Palavras-chave: Cão; Maturação espermática; Proteína;
Testículo.

Nome do autor (a): Laíza Sartori de Camargo

Título: IMUNOLOCALIZAÇÃO DA OSTEOPONTINA E ASSINATURAS
PROTEÔMICAS DO TRATO REPRODUTOR DE CÃES

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e Orientadora

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

Prof^ª. Dr^ª. Maria Denise Lopes

Membro

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

Dr^ª. Camila de Paula Freitas-Dellaqua

Membro

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

Prof^ª. Dr^ª. Maricy Apparício Ferreira

Departamento de Patobiologia e Theriogenologia Veterinária FCAV – UNESP –
Jaboticabal/SP

Dr. Daniel de Souza Ramos Angrimani

Departamento de Reprodução Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia – USP - Universidade de São Paulo

Data da defesa: 01 de setembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Este trajeto que decidi traçar, com muitas alegrias e orgulho, cercado de pessoas queridas não poderia ser concluído sem a presença e colaboração daqueles que amamos e admiramos e que me ajudam a crescer diariamente, a eles devo meu sincero agradecimento.

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus**, por me presentear com saúde, disposição e coragem para encarar essa jornada.

Aos meus pais **João e Sirlei**, posso chamá-los de ‘minha torcida particular’, por me incentivar, amparar, me guiar nos momentos de dificuldades, sem uma base familiar consolidada, com muito amor e respeito, a qual incluo meu irmão **Eduardo**, tenho certeza de que essa história não estaria sendo contada agora. A minha orientadora e amiga **Fabiana**, temos alguns anos juntas, de muita parceria, amizade, aprendizados diários, respeito (esse ‘tempero’ nunca nos faltou nessa relação), posso dizer que eu tenho uma amiga, que tenho liberdade em contar e em errar. Me orgulho dessa parceria que fizemos, você faz parte disso tudo.

Ao meu coorientador **Cadu**, eu chamo de sorte da vida ter o encontrado, pessoa em que me espelho muito, exemplo de ser humano e profissional.

Aos meus amigos mais lindos, minha família que eu pude escolher, sejam eles do laboratório ou não, a vida seria mais sem graça, eu não seria capaz de carregar os problemas sozinha. Ao meu querido **Marcos**, por ter entrado em um momento difícil de minha vida e ter permanecido nela de maneira tão ativa, feliz e leve, e desde então se tornou um irmão. A **Priscilla**, mesmo estando longe fisicamente, sempre presente de outras maneiras, com risadas, muito aprendizado, sinceridade e parceria. **Paty**, minha miga, sei o quanto posso contar com você, obrigada por tanto apoio. A **Jaqueline**, uma amiga que descobri em vida, a qual confio demais, muito obrigada por tanto incentivo. A **Thais** por me acolher em sua casinha, pelas risadas, refeições de mãe que tentávamos simular. A **Kelry** pelas risadas, açaí e diversão no lab. A **Vivi Maria**, obrigada por tanto apoio, ajuda em meio a uma pandemia de maneira tão honesta e divertida, obrigada pela sua amizade, jantares e vinhos. A **Marcella Bud**, mulher de garra e força, me inspira com sua sabedoria e amizade.

Aos amigos do laboratório **REPAS** e **LAPROT**, que me proporcionaram risadas,

conhecimento durante esse tempo todo.

Meu muito obrigada aos membros da banca da qualificação, **Priscilla Guasti e João Pinheiro**, pela disposição em acrescentar conhecimento ao trabalho e em particular, a mim, o qual foi de suma importância para conclusão desta etapa.

Obrigada a todos os animais e tutores, que sem eles parte da ciência estaria limitada.

Aos **membros** da banca de defesa, que irão fazer parte também da minha história, pessoas e profissionais as quais admiro demais, me deram honra de poder partilhar conhecimento neste momento tão importante.

A **Unesp**, Botucatu, por ter sido local de tantos feitos, experimentose aprendizados.

A **CnPq** pela concessão da bolsa de doutorado 170848/2017-5, que possibilitou a execução deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

E por fim fecho meu agradecimento e homenagem a todos, mesmo aqueles não citados aqui, porém que eu sei que de forma singular participaram dessa história, com uma frase de Isaac Newton que eu levo comigo: *“Se enxerguei mais longe foi porque me apoiei em ombros de gigantes”*.

“O crédito pertence ao homem QUE está por inteiro na arena da vida, cujo rosto está manchado de poeira, suor e sangue; que luta bravamente; QUE erra, QUE decepciona, PORQUE não há esforço sem erros e decepções; mas que, na verdade, se empenha em SEUS feitos; QUE conhece o entusiasmo, as grandes paixões; QUE se entrega a uma CAUSA digna; QUE, na melhor das hipóteses conhece no final o TRIUNFO da grande CONQUISTA e QUE, na pior, se fracassar, ao menos fracassa ousando grandemente”

Trecho do discurso “Cidadania em uma República”, por Theodore Roosevelt, 1910

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Espermatogênese.....	3
<i>Proteínas envolvidas na espermatogênese</i>	4
2.2. Maturação espermática.....	10
2.3. Osteopontina.....	14
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
4. OBJETIVOS	17
5. REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2.....	32
Proteomic assignatures of canine reproductive tract tissue	27
RESUMO	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS	29
Aspectos éticos	29
Reagentes	30
Desing experimental	30
Animais e preparação das amostras.....	30
Proteômica.....	31
Análise estatística	32
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO.....	39
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO 3.....	48
Osteopontin é expressa no tecido do trato reprodutor de cães?	59
RESUMO	60
ABSTRACT	61
Introdução	62
Material e Métodos.....	63

<i>Aspectos éticos.....</i>	<i>63</i>
<i>Reagente, animais e preparação das amostras.....</i>	<i>63</i>
<i>Imunohistoquímica.....</i>	<i>63</i>
<i>Western Blott</i>	<i>64</i>
<i>Proteômica.....</i>	<i>65</i>
<i>Interpretação dos resultados e análise estatística</i>	<i>65</i>
Resultados.....	66
Discussão	67
Referências.....	69

RESUMO

CAMARGO, L.S. IMUNOLocalização DA OSTEOPONTINA E ASSINATURAS PROTEÔMICAS DO TRATO REPRODUTOR DE CÃES.

Botucatu – SP. 2020. 81p. Defesa (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Os estudos com a tecnologia “ômica” auxiliam a investigar o papel da sinalização proteica na maturação espermática, capacitação e fertilização. Apesar da importância de estudos sobre moléculas envolvidas na fertilidade, até o momento, na espécie canina, a proteômica do tecido reprodutor não foi descrita. Dessa forma, o objetivo desse estudo e a imunolocalização da osteopontina em testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo (Artigo I) e descrever o proteoma destes tecidos (Artigo II). A escolha desta proteína foi devida a importância relacionada a fertilidade já demonstrada em outras espécies. Para realização do artigo I, foram colhidos de 3 cães adultos jovens entre 2 a 5 anos, testículos e epidídimos (cabeça, corpo e cauda), sem raça definida, após a orquiectomia eletiva, totalizando 24 amostras. Para realização do artigo II, testículos e epidídimos (cabeça, corpo e cauda) foram colhidos de 3 cães, adultos jovens entre 2 a 5 anos, amostras armazenadas em formalina tamponada durante 48 horas e transferidas para álcool 70%, as amostras passaram por desidratação e reidratação. Foi utilizado anticorpo anti-OPN, as amostras foram coradas com DAB. Todos os tecidos foram marcados com anticorpo, em células próximas a parte luminal do epidídimo e citoplasma, sem diferença significativa ($P>0,05$). As amostras foram marcadas em célula próximas a parte luminal do epidídimo e citoplasma. Apesar da imunomarcagem da OPN no citoplasma das células, em todos os tecidos, esta proteína não foi identificada na abordagem *shotgun*. Também não houve diferença na imunomarcagem da OPN entre os tecidos. No artigo II, foram encontradas 1.918 proteínas, sendo 132 utilizadas na análise multivariada, a qual incluiu a *principal component analysis* (PCA), *variable importance in projection* (VIP score) determinada pela *partial least squares-discriminant analysis* (PLS-DA), ANOVA, dendrograma e diagrama de Venn. Na PCA foram formados 4 *clusters* distintos, com proximidade dos clusters das amostras da cabeça e corpo do epidídimo. O VIP score indicou 20 proteínas ($\alpha > 1,5$) e 18 foram confirmadas pelo ANOVA como mais relevantes nos *clusters*. Seis proteínas foram mais abundantes no corpo, 4 na cabeça do epidídimo e 10 no testículo. As proteínas *inositol-3-phosphate synthase 1*, *equilibrative nucleoside transporter 1*, *tubulin alpha chain*, *heat shock protein 90 alpha family class A member 1*, *heat shock protein family A member 8*, *heat shock protein family A (HSP70) member 2* e *cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1*, *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta* foram mais abundantes no testículo e reduziram gradativamente em direção a cauda do epidídimo. Concluímos que a abundância das proteínas nos tecidos do trato reprodutor está relacionada com a função dos compartimentos de cada compartimento, como o testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo de cão pode possuir alguma proteína similar a OPN que se ligue ao anticorpo, porém é necessários maiores investigações.

Palavras-chave: testículo, proteína, cão, maturação espermática

ABSTRACT

CAMARGO, L.S. **OSTEOPONTIN IMMUNOLOCALIZATION AND PROTEOMIC ASSIGNATURES OF THE CANINE REPRODUCTIVE TRACT**. Botucatu – SP. 2020. 81p. Thesis (PhD) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Studies with “omic” technology help to investigate the role of protein signaling in sperm maturation, capacitation and fertilization. Thus, the objective of this study is the immunolocation of osteopontin in the testis, head, body and cauda of the epididymis (Article I) and to describe the proteome of these tissues (Article II). The choice of this protein was due to the importance related to fertility already demonstrated in other species. Article I, 3 young adult dogs aged 2 to 5 years, testicles and epididymis (caput, corpus and cauda), of mixed breed, were collected after elective orchiectomy, totaling 24 samples. For the realization of article II, testicles and epididymis (caput, corpus and tail) were collected from 3 dogs, young adults aged 2 to 5 years, samples stored in buffered formalin for 48 hours and transferred to 70% alcohol, the samples were dehydrated and rehydration. Anti-OPN antibody was used, the samples were stained with DAB. All tissues were labeled with antibody in cells close to the luminal part of the epididymis and cytoplasm, with no significant difference ($P > 0.05$). Despite the immunostaining of OPN in the cytoplasm of cells, in all tissues, this protein was not identified in the shotgun approach. There was also no difference in the immunostaining of OPN between tissues. In article II, 1,918 proteins were found, 132 of which were used in multivariate analysis, which included the main component analysis (PCA), variable importance in projection (VIP score) determined by the partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), ANOVA, dendrogram and Venn diagram. In the PCA, 4 distinct clusters were formed, with proximity to the clusters of the head and body samples of the epididymis. The VIP score indicated 20 proteins ($\alpha > 1.5$) and 18 were confirmed by ANOVA as the most relevant in the clusters. Six proteins were more abundant in the body, 4 in the epididymis head and 10 in the testis. Inositol-3-phosphate synthase 1, equilibrative nucleoside transporter 1, tubulin alpha chain, heat shock protein 90 alpha family class A member 1, heat shock protein family A member 8, heat shock protein family A (HSP70) member 2 and cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1, tyrosine 3-monooxygenase / tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta were more abundant in the testis and gradually reduced towards the tail of the epididymis. We conclude that the abundance of proteins in the tissues of the reproductive tract is related to the function of the compartments of each compartment, as the testis, caput, corpus and cauda of the dog epididymis may have some protein similar to OPN that binds to the antibody, however it is further investigation is needed.

Keywords: testis, epididymidis, protein, canine, spermatogenic maturation

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os avanços tecnológicos relacionados com proteômica permitiram o desenvolvimento de diversas áreas (SKERGET et al., 2015), como a descoberta de biomarcadores associados ao câncer para o diagnóstico, prognósticos e alvos terapêuticos de tumores malignos. Na reprodução, humana e animal, o foco dos estudos é voltado a identificação de biomarcadores de fertilidade (HUANG; SHA, 2011), e no cão há a possibilidade da elaboração de vacinas contraceptivas a partir de antígenos espermáticos.

Tais avanços podem ocorrer desvendando os processos durante a espermatogênese e maturação epididimária, devido a inúmeras modificações no perfil de proteínas da célula espermática que podem torná-la incapaz de realizar a fertilização (GUNES et al., 2015; RAIMONDO et al., 2019). A capacidade do espermatozoide fertilizar o oócito depende de alterações bioquímicas, dentre elas, modificações pós-traducionais durante sua trajetória no epidídimo e expressão proteica (BAKER et al., 2012). Porém, com relação à espécie canina ainda há poucos estudos sobre proteômica na reprodução, além de não ter sido descrito o perfil proteico ao longo do trato reprodutor de cães.

Portanto, deve-se direcionar os estudos na espécie canina para a investigação de proteínas que estejam relacionadas com a fertilidade, a fim de buscar vacina contraceptiva, visto que há uma superpopulação de animais errantes no Brasil, assim como o abandono desses animais (FIGUEIREDO, 2006; São Paulo Estado, 2008). Na medicina, buscam-se vacinas com efeito contraceptivo reversível e que não comprometa a fertilidade futura; na veterinária, busca-se por uma vacina esterilizante que não necessite de reaplicações e tenha longa durabilidade.

Na medicina veterinária, as vacinas que interferem na fertilidade são produzidas contra os hormônios da reprodução (MEEUSEN et al., 2007), tais como antígenos acrossomais ou de superfície espermática, antígenos da zona pelúcida (glicoproteína ZP3), antígenos embrionários e placentários (JONES, 1994). Os antígenos espermáticos acrescidos no espermatozoide podem ser utilizados para investigação da fertilidade do macho, como biomarcadores e para a elaboração de vacinas contraceptivas, até o momento este tipo de contracepção não foi estudada em cães.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar os processos fisiológicos envolvidos durante a espermatogênese e maturação espermática, com a finalidade de compreender os aspectos relacionados com a fertilidade. Além de imunolocalizar a osteopontina em testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo de cães adultos saudáveis, visto que esta proteína tem relação com a fertilidade em outras espécies, como bovinos, equinos e caprinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Espermatogênese

A espermatogênese é um processo no qual resulta a formação de espermatozoides a partir de células troncos em um intervalo de tempo entre 5 a 9 semanas, ocorre nos túbulos seminíferos e varia de acordo com cada espécie (SENGER, 2005). Em cães a espermatogênese leva cerca de 62 dias (SENGER, 2005)

Antes de iniciar este processo é necessário que haja produção hormonal adequada, como secreção de GnRH pelo hipotálamo, FSH e LH pela hipófise anterior. O LH atua nas células de Leydig, responsáveis por produzir e secretar testosterona após 30 minutos do início da liberação de LH (SENGER, 2005). Os testículos produzem estradiol e outros estrogênios, este mecanismo ocorre pelo transporte da testosterona até as células de Sertoli, onde é convertida em dihidrotestosterona e estrógeno. A testosterona e o estradiol exercem feedback negativo na produção de GnRH, por consequência, reduzindo níveis de FSH e LH (SENGER, 2005).

Para que o espermatozoide se torne capaz de fertilizar é necessário que tenha regulação endócrina dos testículos, ocorra meiose, desenvolvimento de organelas, acrossoma, flagelo, condensação do núcleo (SENGER, 2005; CHALMEL et al., 2007) e redução do conteúdo citoplasmático, com ausência de várias organelas.

A produção regular de espermatozoides férteis depende de alguns fatores, como regulação endócrina dos testículos, divisão mitótica das espermatogônias, divisão meiótica que irá gerar espermátides haploides, mudança da morfologia das espermátides para espermatozoides (SENGER, 2005).

A espermatogênese é dividida em três fases, todas fundamentais para a produção espermática (KRETER et al., 1998). A primeira etapa é de proliferação de células tronco, com divisão mitótica da espermatogônia, a qual está localizada na periferia, ou seja, compartimento basal dos túbulos seminíferos e vão dar origem a três tipos de espermatogônias.

Na segunda etapa ocorre meiose, com a redução do número de cromossomos, a célula diploide se torna haploide, as espermatogônias do tipo B são submetidas a primeira divisão meiótica, dando origem aos espermatócitos primários e secundários (KRETSER et al., 1998; SENGGER 2005). Durante a meiose, ocorre a replicação de DNA e crossing over, os quais garantem a diversidade genética (SENGGER, 2005), e a última ou terceira fase compreende a diferenciação celular.

Nesse processo, é necessário que os espermatócitos pré-leptotenos se desloquem pelas estreitas junções entre as células Sertoli, que formam a barreira hemato-testicular do compartimento basal para o adluminal do epitélio seminífero. Caso não haja este movimento, não há espermatogênese (MRUK; CHENG, 2000). Estes eventos necessitam da participação de proteases, inibidores de proteases, sinalização molecular e outras macro e micromoléculas (MRUG e CHENG, 1999; WONG et al., 2000).

A falha em algumas das etapas pode resultar em defeitos ou ausência espermática, evidenciando a relevância de se compreender os processos fisiológicos e mecanismos reguladores e proteicos envolvidos na espermatogênese

Proteínas envolvidas na espermatogênese

Proteínas envolvidas na espermatogênese e nas células germinativas já foram descritas em cães (LEE et al., 2017). Foi relatada a expressão das proteínas PGP9.5, DAZL, SCP3, C-kit e acrosina no tecido testicular desta espécie. As proteínas PGP9-5, e DAZL foram relacionadas com os diferentes estádios de desenvolvimento espermático canino. Já o C-kit e SCP3 e acrosina foram. O estudo também identificou um aumento progressivo das células de Sertoli e espermatogônias quando comparou cães com 1 mês e cães 2 a 3 meses de idade. Além disso, aos 4 meses, as espermatogônias expandidas

migraram para a membrana basal, indicando que o início da puberdade ocorre aos 4 meses de idade nesta espécie (LEE et al., 2017).

Resultados foram descritos em ratos com a expressão de proteínas nas diferentes fases da espermatogênese e maturação espermática, as principais proteínas foram *TMED7/p27* (*transmembrane emp24 domain-containing protein 7*), *TM9SF3* (*transmembrane 9 superfamily member*), *TMED4/p25* (*Tmed4 protein*) e *GL54D* (*alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase-like protein MGAT4D*) (Figura 1, HERMO et al., 2019), as quais estão presentes na maioria das etapas envolvidas na espermatogênese. Além disso, Malumbres e Barbacid (2005) observaram mudanças na expressão proteica durante a espermatogênese, as quais controlam a integridade do DNA. Entre essas macromoléculas, há atuação das ciclinas e suas subunidades catalíticas (Figura 2), as *cyclindependent kinases*, durante toda a espermatogênese.

As ciclinas regulam o ciclo celular, sendo que as proteínas E1 e E2 são responsáveis pelo controle da proliferação celular e mitose das células. As subunidades *cyclindependent kinases* ativam outras proteínas para que haja o início da replicação do DNA, biossíntese de histonas, duplicação de centríolos e controle da expressão gênica (GENG et al., 2007). A subfertilidade é observada nos mamíferos com deficiência da ciclina E2 e há redução de ~4 vezes de espermátides e espermatozoides (WOLGEMUTH et al., 2008).

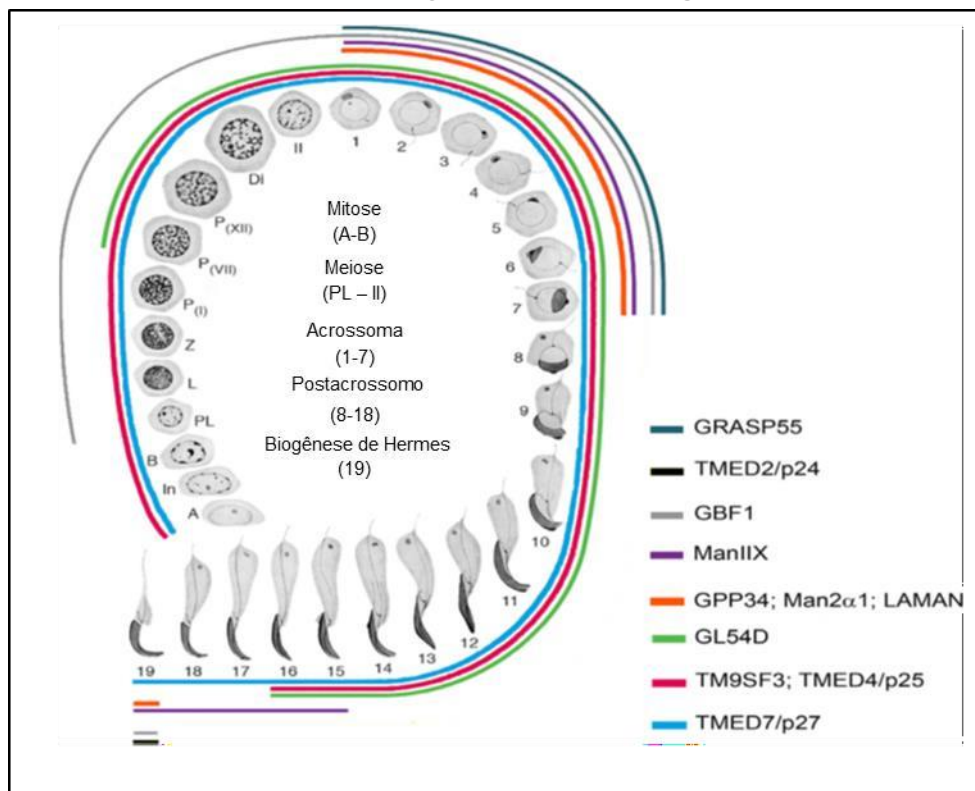


Figura 1. Proteínas expressas nas diferentes fases da espermatogênese de ratos Tipo A, IN e B: espermatogônia em mitose. Espermatócitos em meiose na fase pré-leptoteno (PL), leptóteno (L), zigóteno (Z), paquíteno (P) e diplóteno (DI). Espermatócitos secundários: II. Números de 1 a 7: formação do acrossoma; 8 a 18: eventos pós-formação do acrossoma; 19: formação da gota citoplasmática. (Fonte: adaptado de HERMO et al., 2019)

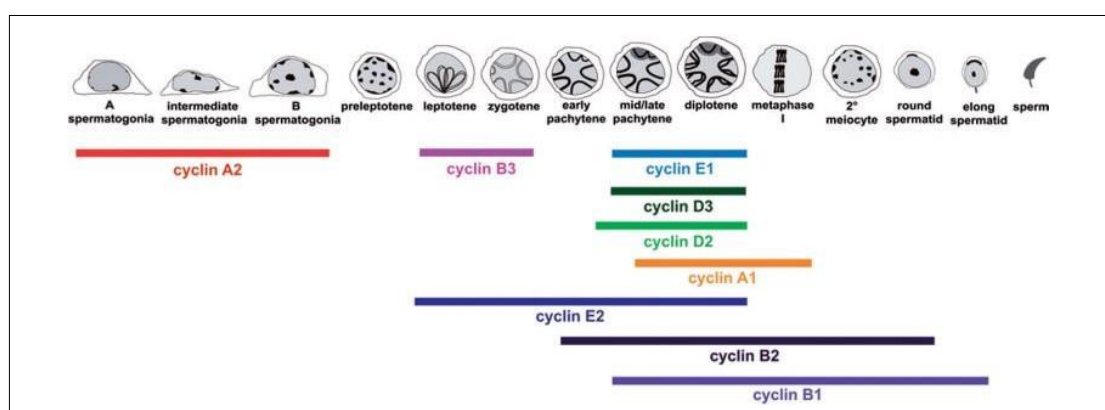


Figura 2. Expressão das ciclinas durante a espermatogênese de ratos. (Fonte: WOLGEMUTH et al., 2008).

Além das células germinativas, as células de Sertoli estão envolvidas na manutenção da espermatogênese no indivíduo adulto (BRENNAN; CAPEL, 2004), sustentação do tecido seminífero, nutrição para as células germinativas, produção de fluidos (JEGOU, 1992). As células de Sertoli foram descritas como *nurse cells*, ou seja, células auxiliares (MEANS et al., 1976), o suporte das células de Sertoli às células germinativas é limitado, ou seja, a produção espermática também está relacionada com o número total de células de Sertoli no tecido testicular (ORTH et al., 1988). Existem *gap junctions* entre as células de Sertoli e a base do epitélio, a qual divide o compartimento basal da porção adluminal do testículo, tornando as células de Sertoli mais relevantes para a nutrição das células germinativas (GUPTA, 2005).

As células de Sertoli sintetizam glicoproteínas dependendo da fase da espermatogênese e são divididas em grupos, de acordo com as funções que exercem. Proteínas de transporte ou proteínas bioprotetoras, secretadas em abundância, incluindo as proteínas de transporte de íons metálicos, *transferrin* e *ceruloplasmin*; proteases e inibidores de proteases envolvidas na remodelação tecidual durante o movimento de espermátócitos pré-leptoténos no compartimento adluminal; glicoproteínas que formam a membrana basal entre as células de Sertoli e as células peri-tubulares; e moduladores das células de Sertoli, produzidas em baixa quantidade, mas que desempenham papéis bioquímicos (GUPTA, 2005). Ainda, as células de Sertoli são responsáveis pela secreção de colágeno tipo IV e laminina, os quais, juntamente com a fibronectina, são componentes essenciais das células mióides que formam a lâmina basal (RICHARDSON et al., 1995).

As células de Sertoli também expressam a proteína CX43, oriunda de um grupo de proteínas denominadas CX, importantes na manutenção nas junções do tipo gap (PELLETIER et al. 2015). Além disso, a proteína CX43 auxilia na organização do metabolismo das células de Sertoli e, indiretamente, na sinalização e proliferação das células germinativas (DECROUY et al., 2004). Há uma relação direta da alteração da espermatogênese com a diminuição da proteína CX43 em humanos e em outras espécies (GERBER et al., 2016). Já em cães, outra proteína, a *occludin*, foi descrita no citoplasma das células de Sertoli, túbulos seminíferos, epidídimo, podendo estar associadas com as barreiras hemato-testicular (GYE, 2004).

Em ratos, o fluído testicular secretado pelas células de Sertoli interage com a membrana das células germinativas e o inverso também ocorre, entre as proteínas APOH e CDC42, APP e NGFR e as células germinativas (CHALMEL et al., 2014). Portanto, as células de Sertoli auxiliam no desenvolvimento e manutenção da espermatogênese. Concomitantemente, as células germinativas controlam e influenciam as secreções e funções das células de Sertoli (DE FRANCA et al., 1995).

A *transferrin* também é produzida pelas células de Sertoli, tem função relacionada com a diferenciação e proliferação celular, via transporte do ferro ao redor das junções para promover o desenvolvimento das células germinativas (SYLVESTER; GRISWOLD, 1984; SYLVESTER, 1993).

A *clusterin* já foi identificada no testículo criptorquida de cães, no entanto não foi identificada em testículos não criptorquidas da mesma espécie (JHUN et al., 2018). O primeiro relato da sua identificação foi no fluido testicular de ovinos, porém já foi identificada em testículo e epidídimos de ovinos (BLASCHUK et al., 1983; TUNG; FRITZ, 1985), touros (HOWES et al, 1998; IBRAHIM, 1998; IBRAHIM et al, 1999) e ratos (SYLVESTER et al, 1984, 1991), participa de processos de transformação, adesão celular e apoptose (ROSENBERG; SILKENSEN, 1995).

Em cães, foi observado a imunomarcagem nas regiões extracelulares, o que pode indicar uma sinalização apoptótica (JHUN et al., 2018). Também já foi encontrada em condições de agressão física, durante o choque térmico (HUMPHREYS et al., 1999), indicando que a *clusterin* pode ser uma proteína anti-apoptótica, regulando a resposta ao estresse a partir da manutenção da homeostase proteica (HUMPHREYS et al., 1999). *In vitro*, a clusterin está envolvida na precipitação de proteínas induzidas pelo estresse e *in vivo* foi associada com a sobrevivência da célula espermática (HUMPHREYS et al., 1999), corroborando com os achados em espermatozoide anormal em humanos (O'BRYAN et al., 1990; O'BRYAN et al., 1994).

A agressão física e química também é responsável por ativar a família das chaperonas, da qual as *heat shock* fazem parte (RITOSSA, 1996). Essa família de macromoléculas é responsável por garantir resistência a fatores estressores ambientais ou fisiológicos, ou seja, mantêm o controle de qualidade das proteínas em diversos tipos celulares (NIXON et al., 2015). As HSP's são

divididas em HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e HSP27 (RITOSSA, 1996). As chaperonas atuam protegendo as funções celulares normais, preservando o metabolismo, crescimento, diferenciação e apoptose celular (BUKAU et al., 2006). Estão envolvidas no processo de maturação espermática, para que o espermatozoide se torne apto a fertilizar (NIXON et al., 2015). Foi observado que as HSP20 exercem um novo papel durante a espermatogênese, pois ocupam o espaço das histonas, temporariamente, antes dessas serem substituídas por protaminas durante a condensação nuclear (KIMMINS; SASSONE-CORSI, 2005).

A apoptose, durante a espermatogênese, é considerado um importante controle de qualidade das células produzidas (SHUKLA et al., 2012), e ocorre quando não há equilíbrio entre os sinais positivos e negativos, e permite eliminar células sem funções, senescentes e aberrantes (KERR, 2002). As células germinativas, assim como outros tipos celulares, respondem a estímulos internos e externos, sendo as proteínas FasLEas-R, p53, Bcl-2 as mais relevantes nas vias apoptóticas (PRINT; LOVELAND, 2000). As proteínas Bax (pró-apoptótica) e Bcl-2 (anti-apoptótica) são determinantes para esse processo, já que excesso de Bcl-2 resulta na sobrevivência celular, por inibição das caspases, e a expressão de Bax leva à morte celular (ADAMS; CORY, 1998). Por sua vez, as caspases, proteínas da família de proteases do ácido cisteno aspártico, também são importantes neste processo (SAKKAS et al., 2002), cuja função é clivar proteínas após um resíduo de ácido aspártico.

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção de ATP, relação com a aquisição de motilidade espermática, espécies reativas de oxigênio e sinalização de cálcio (NICHOLS; FERGUSON 2002). Quando há defeitos genéticos ou em mitocôndria pode comprometer a fisiologia espermática e, conseqüentemente, a motilidade da célula (FOLGERO et al., 1993, MUNDY et al. 1995, SPIROPOULOS et al., 2002^a; PELLICCIONE et al. 2011). Apesar de não ter sido confirmado, existe a hipótese que mutações sofridas no DNA mitocondrial podem ter relação com defeitos respiratórios mitocondriais que leva a alteração da meiose durante a espermatogênese e anormalidades na morfologia do espermatozoide (SPIROPOULOS et al., 2002a, SPIROPOULOS et al., 2002b).

2.2. Maturação espermática

Apesar dos estudos descrevendo o proteoma do espermatozoide, ainda são escassos os resultados a respeito do complexo processo envolvido durante a maturação espermática (SKERGET et al., 2015).

A maturação das células espermáticas ocorre no epidídimo, o qual é dividido em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda, como representado na Figura 3 (ZHOU et al., 2018). O segmento inicial do epidídimo é caracterizado pela baixa concentração de espermatozoides, com epitélio contendo células alongadas e altos estereocílios. Há uma mudança na quantidade das células espermáticas no corpo e cauda do epidídimo, quando comparado com a cabeça (ZHOU et al., 2018). As células que compõem o epidídimo são responsáveis pela secreção e biossíntese de proteínas ao longo de todo trajeto, o qual é composto por glândulas apócrinas. Na parte superior do epitélio há a formação de bolsas, que ao caírem no lúmen liberam vesículas extracelulares, os epididimossomos, que contêm proteínas (NIXON et al., 2019), ncRNA (REILLY et al. 2016, SHARMA et al. 2016) e lipídeos (GIROUARD et al. 2011), moléculas que são disponibilizadas para o espermatozoide durante a maturação (BJÖRKGREN; SIPILA., 2019).

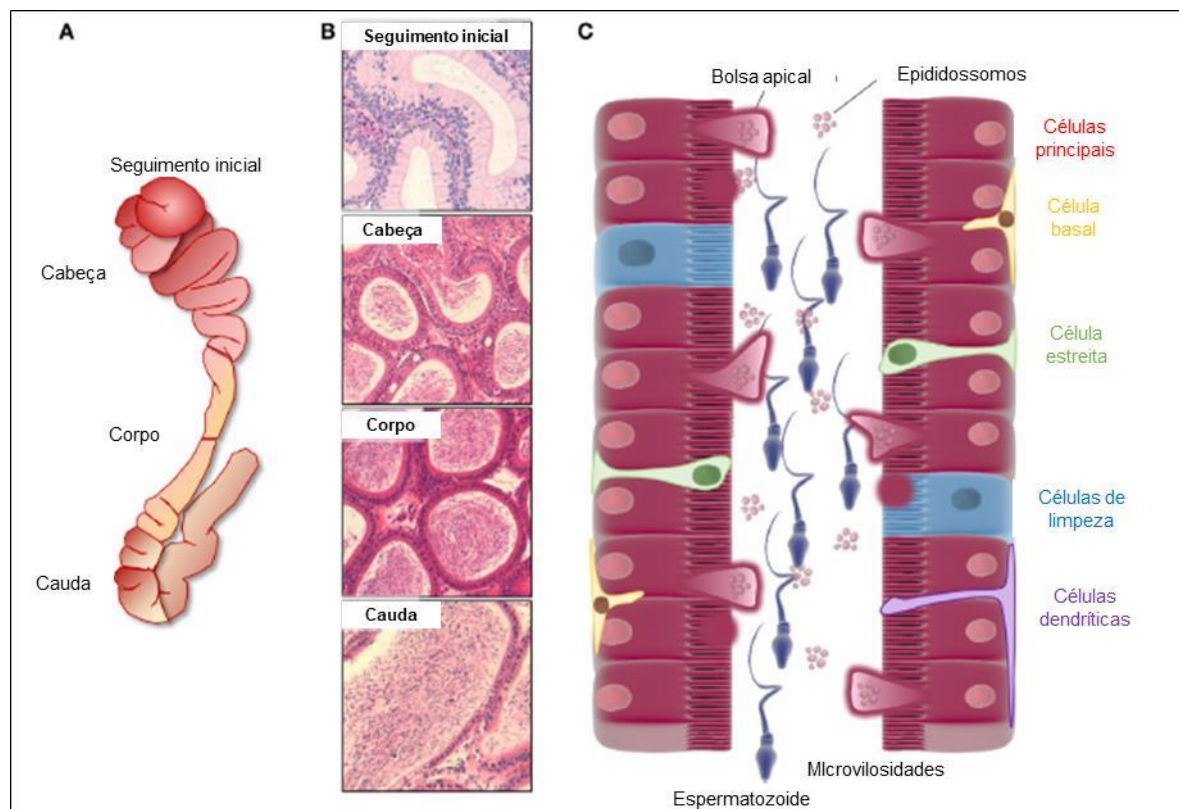


Figura 3. Características do lúmen do epidídimo responsável pela maturação e armazenamento dos espermatozoides. (Fonte: Adaptado de ZOU et al., 2018)

No trajeto do epidídimo, o espermatozoide é capaz de adquirir fatores de maturação, motilidade e fertilidade (ROBAIRE; HINTON, 2015), já que após a espermatogênese, na cabeça do epidídimo, o espermatozoide é considerado imaturo e incapaz de realizar a fertilização (SKERGET et al., 2015). Na década de 60 Bedford e Orgebin-Crist (1960) descreveram a importância da passagem dos espermatozoides pelo epidídimo para adquirir motilidade e capacidade fertilizante (BEDFORD, 1963; ORGENBIN-CRIST 1967). Uma das principais alterações microscópicas que a célula espermática sofre durante sua passagem pelo epidídimo é a migração da gota citoplasmática para região distal da peça intermediária, a qual está relacionada com a aquisição da capacidade fertilizante (ROBAIRE; HERMO, 1988).

Em cães, foi demonstrada a importância da gota citoplasmática para a maturação. A migração da gota ocorre no corpo do epidídimo e há a incorporação de componentes nas mitocôndrias da peça intermediária do espermatozoide, já que há aumento gradativo da atividade mitocondrial durante a maturação espermática. Além disso, a cabeça do epidídimo possui alta concentração de espermatozoides sem atividade mitocondrial. Este trabalho também concluiu que em cães, a migração da gota proporciona ao espermatozoide condições para suportar o ambiente após a ejaculação (ANGRIMANI et al., 2017).

Ainda não se pode concluir de qual maneira a expressão das proteínas no epidídimo contribuem para a função espermática (BJÖRKGREN; SIPILA, 2019), porém este ambiente intraluminal especializado, contribui diretamente para a maturação do espermatozoide (ZHOU et al., 2018) e qualquer alteração da expressão gênica e das vias de sinalização podem levar a subinfertilidade e infertilidade nos machos (RAYMOND et al., 2010; BJÖRKGREN et al., 2019). Apesar disso, identificar as moléculas que levaram a disfunções espermáticas é uma tarefa laboriosa (BJÖRKGREN et al., 2019).

Durante a maturação espermática, as proteínas dos espermatozoides se alteram pela absorção, reposicionamento e modificações pós-traducionais (SKERGET et al., 2015). Em camundongos, as proteínas CRISP1, ADAM7,

GPX5 e SPAM1 já foram descritas no espermatozoide e são adicionadas à célula durante a maturação no epidídimo (OH et al., 2009; REJRAJI et al., 2002; ROBERTS et al., 2008; ZHANG et al., 2004). A CRISP1 pode estar presente na superfície do espermatozoide para inibir os canais de cálcio, necessários para a capacitação (ROBERTS et al., 2008). Já a metaloproteinase ADAM7 pertence à família composta de outras 29 proteínas, é expressa no lúmen do epidídimo e secretada pelos epididimossomos (OH et al., 2009) e participa da ligação entre espermatozoide e ovócito (ALMEIDA, 1995).

A proteína Wnt, secretada pelos epididimossomos, é responsável pela aquisição da motilidade espermática durante a maturação no epidídimo (Figura 4). Quando não há expressão dessa proteína, o espermatozoide se torna imóvel, em vista da ativação de receptores *frizzled* (FZD) e de LDL6 pela ciclina (CCNYL1) inativando o glicogênio sintase quinase-3 (GSK3), permitindo a ligação de PPP1R2 e PPP1R7 ao PPP1CC2, tornando o PPP1CC2 também inativo. Assim, os níveis totais de fosfoserina aumentam e o espermatozoide adquire motilidade. Quando há expressão da Wnt, o GSK3 fosforila as proteínas PPP1R2, PPP1R7 e PPP1R11 (inibidores da Wnt) deixando a proteína PPP1CC2 ativa, tornando o espermatozoide imóvel (BJÖRKGREN e SIPILA, 2019).

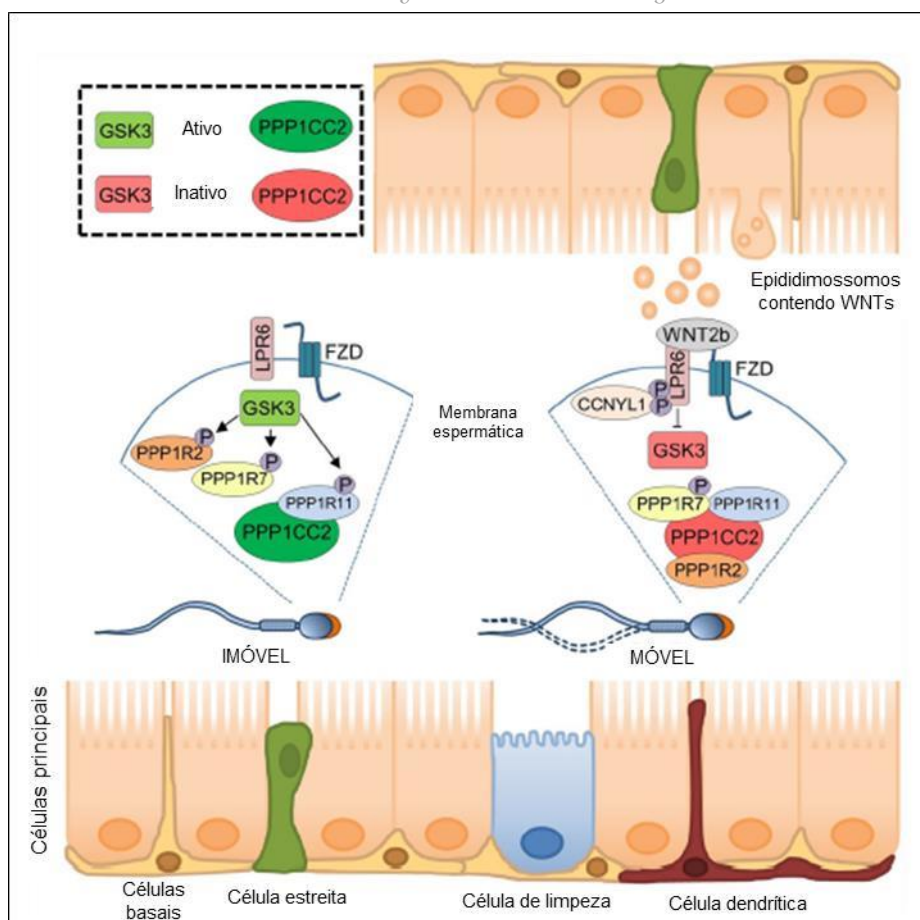


Figura 4. Regulação da motilidade espermática mediada pela proteína Wnt durante a maturação no epidídimo. (Fonte: BJÖRKGREN; SIPILA, 2019)

Em ratos, foram descritas 60 proteínas no fluido do epidídimo, das quais 20 foram identificadas no espermatozoide, incluindo ADAM3, CD46, CD59B, CNPY4, CRISP1, H2-AB1, H2AFX, HSPA4L, MNS1, NPC1, PRKAR1A, RSPH1, SEPT4, SERPINE2, S100A11, SPAM1, SPINK2, THEG, TKT e TSSK1 (SKERGET et al., 2015). Dentre as proteínas espermáticas acrescidas ao espermatozoide, as proteínas da família das CRISPs são consideradas importantes para a maturação e fertilidade das células espermáticas, dependentes de andrógenos (REDDY et al., 2008, FEDORKA et al., 2017). A CRISP1, identificada em ratos no corpo e na cauda do epidídimo (CAMEO; BLAQUIER, 1976), é expressa pelas células do epitélio do epidídimo em resposta a andrógenos, porém é secretada no lúmen, no qual se integra ao espermatozoide (EBERSPAECHER et al., 1995). Sua função foi relacionada com a ligação da célula espermática ao ovócito e regulação da capacitação (CAMEO; BLAQUIER, 1976). Já a CRISP4 que tem as mesmas características,

porém está associada com a maturação espermática (TURUNEN et al., 2011), aquisição da motilidade e capacitação espermática (HU et al., 2018). Na Figura 5 estão descritas as mudanças que ocorrem no perfil de proteínas durante a fertilização, incluindo as CRISPs (BJÖRKGREN et al., 2019).

É importante ressaltar, que na maturação no epidídimo e durante a fertilização não estão envolvidas apenas proteínas, mas também o efluxo e influxo de íons de cálcio (BRANDENBURGER et al. 2011), sendo que os canais de cálcio são regulados por proteínas, como as CRISPs e as DEFBs (DORIN e BARRATT, 2014).

Durante a maturação no epidídimo outros processos que não envolvem proteínas são relevantes, como a ação das espécies reativas de oxigênio (EROs), que promovem modificações no espermatozoide (SHI et al., 2013). Os espermatozoides na cauda do epidídimo apresentam maior quantidade de glutathione peroxidase (ANGRIMANI et al., 2014), devido ao aumento da síntese de proteínas no final da maturação do epidídimo (JERVIS; ROBAIRE, 2001). Em cães, a glutathione peroxidase apresenta relação positiva com a superóxido dismutase de espermatozoides obtidos do corpo e da cauda do epidídimo, indicando homeostase oxidativa durante a maturação, já que durante esse processo o espermatozoide é exposto a fatores que favorecem a oxidação (ANGRIMANI et al., 2014).

2.3. Osteopontina

A osteopontina é considerada uma fosfoproteína que apresenta diversas funções em vários tecidos, incluindo rins (LORENZEN et al., 2012), tecido vascular, células imunológicas (WANG; DENHARDT, 2008) e tumorais (YAMAGUCHI et al., 2013). A primeira identificação foi na matrix óssea celular, em diáfese óssea de bovinos (FRANZEN; HEINEGARD, 1985; DENHARDT et al., 1993; DENHARDT et al., 2001; MOURA, 2005).

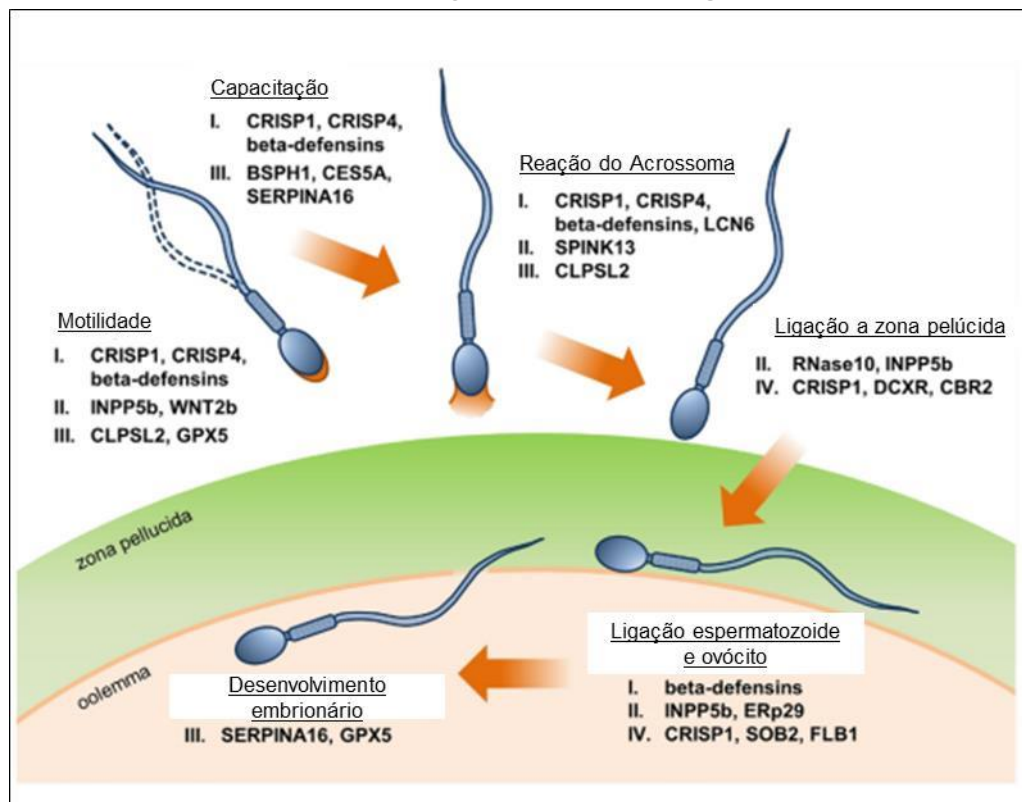


Figura 5. Expressão proteica em diferentes fases da fertilização. I) Proteínas epididimárias que interferem na sinalização de cálcio. II) Proteínas que modificam proteínas espermáticas. III) Proteínas do epidídimo que afetam a composição lipídica da membrana espermática. (Fonte: Adaptado de BJÖRKGREN; SIPILA, 2019)

Dentre as várias proteínas secretadas nos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias, OPN é uma importante macromolécula envolvida na fertilidade de diferentes espécies (KILLIAN et al., 1993; ERIKSON et al., 2007; JHANG et al., 2016), já que o tratamento das células espermáticas com anticorpo anti-OPN resulta na redução na taxa de fertilização (ERIKSON et al., 2007). Esta proteína contém um local de ligação ao cálcio e causa liberação deste íon nos osteoclastos, estimulada pela integrina (ERIKSON et al., 2007).

A OPN, secretada em altas concentrações pelas glândulas vesiculares e ampola em bovinos, equinos e suínos (CANCEL et al., 1999), tem massa molecular que pode variar entre 25 a 80 kDa (DENHARDT et al, 2001; MOURA, 2007). As encontradas na membrana dos espermatozoides ejaculados ou do epidídimo de bovinos possui massa molecular de 55 kDa (KILLIAN et al., 1993; ERIKSON et al., 2007), quando verificada em parênquima testicular apresenta

25 kDa (ERIKSON et al., 2007).

Esta proteína já foi identificada no tecido reprodutor de homens, ratos (SIITERI et al., 1995) e ovinos (ZHANG et al., 2016), e no epidídimo de ratos foi encontrada com massa entre 27 a 32 kDa (SIITERI et al., 1995). Pode ter papel na regulação do desenvolvimento do sistema reprodutor embrionário (ERIKSON et al., 2007) e atua na manutenção da gestação (JOHNSON et al., 2003a; KANG et al., 2014).

Há expressão diferenciada da OPN de acordo com o desenvolvimento sexual, em animais pré-púberes (8 a 10 meses de idade) há menor imunomarcagem da proteína na parte adluminal dos túbulos seminíferos, testículos, cabeça, corpo e cauda dos epidídimos, ductos deferentes e espermatozoides quando comparados com machos adultos (ZHANG et al., 2016).

A OPN pode promover a ativação e a proliferação celular pela transdução de sinal e regula o crescimento e o desenvolvimento dos órgãos reprodutores masculinos (SHEVDE; SAMANT, 2014). A expressão da OPN é possivelmente controlada pela secreção de andrógenos (SHEVDE; SAMANT, 2014).

Esta proteína é considerada um fator de decapacitação espermática, evitando a capacitação precoce no trato reprodutor da fêmea, durante a fertilização (GONÇALVES et al., 2007). No entanto, durante a fertilização *in vitro* de búfalos, a OPN aumentou a porcentagem de espermatozoides capacitados, assim como uma associação entre as proteínas ligadoras de heparina com a OPN (BOCCIA et al., 2013), já que a ligação com a heparina induz a cascata da capacitação (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002).

No cão, a OPN foi identificada no plasma seminal e no extrato proteico da membrana espermática (SOUZA et al., 2009), contudo ainda não foi relacionada com qualquer evento reprodutivo nesta espécie. No plasma seminal de cães e extrato proteico, foi marcada uma maior motilidade pré- e pós-congelação do sêmen de cães (MARTINS et al., 2005), porém a relação desta proteína com a fertilidade em cães não está elucidada (SOUZA et al., 2009).

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Estudos relacionados com a fisiologia e a maturação espermática foram conduzidos a fim de compreender tais processos, estabelecer o envolvimento

das proteínas em cada etapa e encontrar marcadores moleculares relacionados com a fertilidade. Ademais, há poucos estudos relacionados com a espécie canina, especialmente com a expressão de proteínas no trato reprodutor.

4. OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram investigar os eventos fisiológicos durante espermatogênese e maturação espermática no epidídimo de cães por uma abordagem proteômica, com a finalidade de compreender os processos e dinâmicas envolvidas durante as etapas da fertilização espermática em cães e imunolocalizar a osteopontina, proteína já identificada e relacionada com fertilidade em outras espécies, em testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo de cães.

5. REFERÊNCIAS*

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, v. 281, p. 1322-1326, 1998.

ALMEIDA, E.A.; HUOVILA, A.P.; SUTHERLAND, A.E.; STEPHENS, L.E.; CALARCO, P.G.; SHAW, L.M.; MERCURIO, A.M.; SONNENBERG, A.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G.; WHITE, J.M. Mouse egg integrin $\alpha 6 \beta 1$ functions as a sperm receptor. *Cell*, v. 81, p. 1095-1104, 1995.

ANGRIMANI, D. S. R.; LUCIO, C. F.; VEIGA, G. A. L.; SILVA, L. C. G.; REGAZZI, F. M.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Sperm maturation in dogs: sperm profile and enzymatic antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa. *Andrologia*, v. 46, p. 814–819, 2014.

ANGRIMANI, D.S.R.; LOSANO, J.D.A.; LUCIO, CF.; VEIGA, G.A.L.; LANDIM, F.C.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C.I. Cytoplasmic droplet acting as a mitochondrial modulator during sperm maturation in dogs. *Anim. Reprod. Sci.*, v.181, p. 50–56, 2017.

BAKER, M. A.; NIXON, B.; NAUMOVSKI, N.; AITKEN, R. J. Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, v. 58, p. 211–217, 2012.

BEDFORD, J.M. Changes in the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. *Nature*, v. 200, p.1178–1180, 1963.

BJÖRKGREN, I.; GYLLING, H.; TURUNEN, H.; HUHTANIEMI, I.; STRAUSS, L.;

* Referências organizadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023 informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

POUTANEN, M.; SIPILÄ, P. Imbalanced lipid homeostasis in the conditional *Dicer1* knockout mouse epididymis causes instability of the sperm membrane. *The FASEB Journal*, v. 19, p. 433-442, 2015.

BJÖRKGREN, I.; SIPILÄ, P. The impact of epididymal proteins on sperm function. *Reproduction*, v. 158, p. 155–167, 2019.

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.*, v. 258, p. 7714–7720, 1983.

BRANDENBURGER, T.; STREHLER, E.E.; FILOTEO, A.G.; CARIDE, A.J.; AUMÜLLER, G.; POST, H.; SCHWARZ, A.; WILHELM, B. Switch of PMCA4 splice variants in bovine epididymis results in altered isoform expression during functional sperm maturation. *J. Biol.*, v. 286, p. 7938–7946, 2011.

BRENNAN, J.; CAPEL, B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat. Rev. Genet.*, v. 5, p. 509–521, 2004.

BUKAU, B.; WEISSMAN, J.; HORWICH, A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, v. 125, p. 443–51, 2006.

CAMEO, M.S.; BLAQUIER, J.A. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *Int. J. Endocrinol.*, v. 69, p. 317–324, 1976.

CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 454-460, 1999.

CHALMEL, F.; COM, E.; LAVIGNE, R.; HERNIO, N.; TEIXEIRA-GOMES, A.P.; DACHEUX, J.L.; PINEAU, C. An integrative omics strategy to assess the germ cell secretome and to decipher Sertoli–germ cell crosstalk in the Mammalian testis. *PLoS ONE*, v. 9, p. 1044-18, 2014a.

CHALMEL, F.; ROLLAND, A.D. Linking transcriptomics and proteomics in spermatogenesis. *Reproduction and Fertility*, v. 150, p.1 741–7899, 2015.

CHALMEL, F.; ROLLAND, A.D.; NIEDERHAUSER-WIEDERKEHR, C.; CHUNG, S.S.; DEMOUGIN, P.; GATTIKER, A.; MOORE, J.; PATARD, J.J.; WOLGEMUTH, D.J.; JEGOU, B. The conserved transcriptome in human and rodent male gametogenesis. *PNAS*, v. 104, p. 8346–8351, 2007.

CHENG, C.Y. Biology of spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 29, p. 1, 2014.

DE FRANCA, L.R.; HESS, R.A.; COOKE, P.S.; RUSSELL, D. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell controls testis growth. *The Anatomical Record*, v. 242, p. 57–69, 1995.

DECROUY, X.; GASC, J.M.; POINTIS, G.; SEGRETAIN, D. Functional

characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis. *J. Cell. Physiol.*, v. 200, p. 146–154, 2004.

DORIN, J.R.; BARRATT, C.L. Importance of beta-defensins in sperm function. *Molecular Human Reproduction*, v. 20, p. 821–826, 2014.

EBERSPAECHER, U.; KRATZSCHMAR, J.; HAENDLER, B.; QUENSEL PETRI, T.; SCHLEUNING, W.D.; DONNER, P. Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein Crisp-1 (DE/AEG): isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form. *Mol Reprod Dev.*, v. 42, p. 157–172, 1995.

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. *Reprod Fertil Dev.*, p. 1741–7899, 2007.

FEDORKA, C.; SCOGGIN, K.; SQUIRES, E.; BALL, B.; TROEDSSON, M. Expression and localization of cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP-3) in the prepubertal and postpubertal male horse. *Theriogenology*, v. 87, p. 187– 192, 2017.

FIGUEIREDO, A. C. C. Controle da população de animais domésticos em áreas urbanas. Campinas: Prefeitura Municipal de Campinas, 2006

FOLGERO, T.; FOLGERO, K.; BERTHEUSSEN, S.; LINDAL, T.; TORBERGSEN, P.; OIAN. Mitochondrial disease and reduced sperm motility *Hum Reprod.*, v. 8, p. 1863-1868, 1993.

FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J.*, v. 232, p. 715-724, 1985.

GENG, Y.; LEE, Y.M.; WELCKER, M.; SWANGER, J.; ZAGOZDZON, A.; WINER, J.D.; ROBERTS, J.M.; KALDIS, P.; CLURMAN, B.E.; SICINSKI, P. Kinase-independent function of cyclin. *Molecular Cell*, v. 25, p. 127-139, 2007.

GERBER, J.; HEINRICH, J.; BREHM, R. Blood–testis barrier and Sertoli cell function: lessons from SCCx43KO mice. *Reprod Fertil Dev.*, p. 1741–7899, 2016.

GIROUARD, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. *Int. J. Androl.*, v. 34, p. 475–486, 2011.

GONÇALVES, 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, p. 468-474, 2007.

GUNES, S.; AL-SADAAN, M.; AGARWAL, A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed.*, v. 31, p. 309–

319, 2015.

GUPTA, G.S. Proteomics of spermatogenesis, 2005. Editora Springer.

GYE, M.C. Expression of Occludin in Canine Testis and Epididymis. *Reprod Domest Anim*, v. 39, p. 43–47, 2004.

HERMO, L.; OLIVEIRA, R.L.; SMITH, C. E.; AU, C. E.; Bergeron, J.J.M. Dark side of the epididymis: tails of sperm maturation. *Andrology*, v. 7, p. 1–15, 2019.

HOWES, E.A.; HURST, S.; LASLOP, A.; JONES, R. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta-chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. *Mol Hum Reprod.*, v.7, p. 673–681, 1998.

HU, J.; MERRINER, D.J.; O'CONNOR, A.E.; HOUSTON, B.J.; FURIC, L.; HEDGER, M.P.; O'BRYAN, K.M. Epididymal cysteine-rich secretory proteins are required for epididymal sperm maturation and optimal sperm function. *Mol. Hum. Reprod.*, v. 24, p. 111–122, 2018.

HUMPHREYS, D.T.; CARVER, J.A.; EASTERBROOK-SMITH, S.B.; WILSON, M.R. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J. Biol.*, v. 274, p. 6875– 6881, 1999.

IBRAHIM, N.M. Clusterin in the Reproductive Tracts of Bulls and Rams and Its Relationship to Abnormal Sperm and Fertility [thesis]. St Paul, Minn: University of Minnesota; 1998.

IBRAHIM, N.M.; TROEDSSON, M.H.T.; 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, p. 230–240, 1999.

JEGOU, B. The Sertoli cell. *Baillieres. J Clin Endocr Metab*, v. 6, p. 273–311, 1992.

JERVIS, K.M.; ROBAIRE, B. Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol Reprod.*, v. 65, p. 696–703, 2001.

JHUN, H.; PARK, H.J.; LEE, R.; SONG, H.; HURC, T.Y.; LEE, S.; PARK, J.K.; LEE, W.Y. Germ cell-specific apoptosis by extracellular clusterin in cryptorchid dog testes. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 193, p. 158–164, 2018.

JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. KANG, Y.J.; FORBES, K.; CARVER, J.; APLIN, J.D. The role of the osteopontin-integrin $\alpha v \beta 3$ interaction at implantation: functional analysis using three different in vitro models. *Hum. Reprod.*, v. 29, p. 739–749, 2014.

KERR, J.F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, v. 181, p. 471–474, 2002.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod.*, v. 49, p. 1202-7, 1993.

KIMMINS, S.; SASSONE-CORSI, P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*, v. 434, p. 583–9, 2005.

KLEENE, K.C.; CULLINANE, D.L. Maybe repressed mRNAs are not stored in the chromatoid body in mammalian spermatids. *Reproduction*, v. 142, p. 383–388, 2011.

KRETZER, D.M.; LOVELAND, K.L.; MEINHARDT, A.; SIMORANGKIR, D.; WREFORD, N. Spermatogenesis. *Human Reproduction*, v.13, p.1, 1998.

LEE, W.L.; LEE, R.; PARK, H.J.; DO, J.T.; CHANKYU, P.; KIM, J.L.; JHUN, H.; LEE, J.H.; HUR, T.; SONG, H. Characterization of male germ cell markers in canine testis. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 182, p. 1–8, 2017.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.*, v. 30, p. 630-641, 2005.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 53, p. 109-119, 2002.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Eletroforese das proteínas do fluído epididimal canino: Dados preliminares. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 26, p. 72-5, 2002.

MEANS, A. R.; FAKUNDING, J. L.; HASKINS, C.; TINDALL, D. J.; VITALE, R. Follicle-Stimulating Hormone, the Sertoli Cell, and Spermatogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.*, v. 32, p. 477-527, 1976.

MRUK, D.D.; CHENG, C.Y. Sertoli cell proteins in testicular paracrine. In: Jegou B, Pineau C, Saez J (eds) *Testis, Epididymis and Technologies in the Year*. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 197–228, 2000.

MUNDY, A.J.; RYDER, T.A.; EDMONDS, D.K. Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum Reprod*, v. 10, p. 116–119, 1995.

NICHOLS, D.G.; FERGUSON, S.J. *Bioenergetics*, 3rd edn. Amsterdam: Academic Press, 2002.

NIXON, B.; DE IULIIS, G.N.; HART, H.M.; ZHOU, W.; MATHE, A.; BERNSTEIN, I.R.; ANDERSON, A.L.; STANGER, S.J.; SKERRETT-BYRNE, D.A.; JAMALUDDIN, M.F.B. Proteomic profiling of mouse epididymosomes reveals their contributions to post-testicular sperm maturation. *Mol Cell Proteomics.*, v. 18, p. S91–S108, 2019.

NIXON, B.; ROMFIELD, E.G.; DUN, M.D.; REDGROVE, K.A.; MCLAUGHLIN, E.A.; AITKEN, R.J. The role of the molecular chaperone heat shock protein A2

(HSPA2) in regulating human sperm-egg recognition. *Asian J Androl.*, v. 17, p. 568–573, 2015.

O'BRYAN, M.K.; BAKER, H.W.G.; SAUNDERS, J.R.; KIRSZBAUM, L.; WALKER, I.D.; HUDSON, P.; LIU, D.Y.; GLEW, M.D.; D'APICE, A.J.F.; MURPHY, B.F. Human seminal clusterin (SP-40,40) isolation and characterization. *J Clin Invest.*, v. 85, p. 1477–1486, 1990.

O'BRYAN, M.K.; MURPHY, B.F.; LIU, D.Y.; CLARKE, G.N.; BAKER, H.W.G. The use of anticlusterin monoclonal antibodies for the combined assessment of human sperm morphology and acrosome integrity. *Hum Reprod.*, v. 9, p. 1490–1496, 1994.

OH, J.S.; HAN, C.; CHO, C. ADAM7 is associated with epididymosomes and integrated into sperm plasma membrane. *Mol Cell.*, v. 28, p. 441–446, 2009.

ORGBIN-CRIST, M.C. Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature*, v.216, p. 816–818, 1967.

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, v. 122, p. 787–794, 1988.

Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol. Reprod.*, v. 69, p. 458–1471, 2003.

PELLETIER, R.M.; AKPOVI, C.D.; CHEN, L.; KUMAR, N.M.; VITALE, M.L. Complementary expression and phosphorylation of Cx46 and Cx50 during development and following gene deletion in mouse and in normal and orchitic mink testes. *Am J Physiol-Reg I*, v. 309, p. 255–276, 2015.

PELLICCIONE, F.; MICILLO, A.; CORDESCHI, G.; D'ANGELI, A.; NECOZIONE, S.; GANDINI, L.; LENZI, A.; FRANCAVILLA, F.; FRANCAVILLA, S. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril*, v. 95, p. 641–646, 2011.

PRINT, C.G.; LOVELAND, K.L. Gum cdl suicide: New insights into Apoptosis during spermatogenesis. *Biotssays*, v. 22, p. 423-29, 2000.

RAIMONDO, S.; GENTILE, T.; GENTILE, M.; MORELLI, A.; DONNARUMMA, F.; CUOMO, F.; FILIPPO, S.; MONTANO, L. p53 Protein Evaluation on Spermatozoa DNA in Fertile and Infertile Males. *J J. Hum. Reprod. Sci.*, v. 12, p. 114-21, 2019.

RAYMOND, A.S.; ELDER, B.; ENSSLIN, M.; SHUR, B.D. Loss of SED1/MFG-E8 results in altered luminal physiology in the epididymis. *Mol Reprod Dev.*, v.6, p. 550-63, 2010.

REDDY, T.; GERARD M.G.; MERRINER, D.L.; KERR, J.B.; O'BRYAN, M.K

Cysteine-Rich Secretory Proteins Are Not Exclusively Expressed in the Male Reproductive Tract. *Dev. Dyn.*, v. 237, p. 3313–3323, 2008.

REILLY, J.N.; MCLAUGHLIN, E.A.; STANGER, S.J.; ANDERSON, A.L.; HUTCHEON, K.; CHURCH, K.; MIHALAS, B.P.; TYAGI, S.; HOLT, J.E.; EAMENS, A.L. Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. *Scientific Reports*, v. 6, p. 31794, 2016.

REJRAJI, H.; VERNET, P.; DREVET, J.R. GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol Reprod Dev.*, v. 63, p. 96–103, 2002.

RICHARDSON, L.L.; KLEINMAN, H.K.; DYM, M. Basement membrane gene expression by Sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. *Biol. Reprod.*, v. 52, p. 320-30, 1995.

RITOSSA F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones*, v.1, p.97–8, 1996.

ROBAIRE, B.; HERMO, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: *The Physiology of Reproduction* (eds E Knobil & J Neill), p. 999–1080. Raven Press, New York, NY, 1988.

ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. The epididymis. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (eds A Zeleznik & AE Plant), p. 691–771. Elsevier, New York, NY, 2015.

ROBERTS, K.P.; ENSRUD-BOWLIN, K.M.; PIEHL, L.B.; PARENT, K.R.; BERNHARDT, M.L.; HAMILTON, D.W. Association of the protein D and protein E forms of rat CRISP1 with epididymal sperm. *Biol Reprod.*, v. 79, p. 1046–1053, 2008.

ROSENBERG, M.E.; SILKENSEN, J. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 27, p. 633–645, 1995.
SAKKAS, D.; MOFFATT, O.; MANICARDI, G.C.; MARIETHOZ, E.; TAROZZI, N.; BIZZARO, D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol. Reprod.*, v. 66, p. 1061-1067, 2002.
seminal plasma and sperm membrane of dogs. *Reprod Domest Anim.*, v. 44, p. 283–286, 2009.

SENGER, P.L. *Pathways to pregnancy and parturition*. 2005.

SHARMA, U.; CONINE, C.C.; SHEA, J.M.; BOSKOVIC, A.; DERR, A.G.; BING, X.Y.; BELLEANNEE, C.; KUCUKURAL, A.; SERRA, R.W.; SUN, F. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science*, v. 351, p.391–396, 2016.

SHEVDE, L.A.; SAMANT, R.S. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol.*, v.37, p.131–141, 2014.

SHI, Y.; PULLIAM, D.A.; LIU, Y.; HAMILTON, R.T.; JERNIGAN, A.L, et al. Reduced mitochondrial ROS, enhanced antioxidant defense, and distinct age-related changes in oxidative damage in muscles of long-lived *Peromyscus leucopus*. *Am J Physiol-Reg I.*, v. 304, p. 343–355, 2013.

SHUKLA, K.K.; MAHDI, A.A.; RAJENDER, S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Frontiers in Bioscience*, p. 746-754, 2012.

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. *Molec. Reprod. Dev.*, v. 40, n. 1, p. 16-28, 1995.

SKERGET, S.; ROSENOW, M.A.; PETRITIS, K.; KARR, T.L. Sperm proteome maturation in the mouse epididymis. *PLoS One*, v. 10, p. 1-23, 2015.

SOUZA, F.F.; CHIRINEA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; LOPES, M.D. Osteopontin in Seminal Plasma and Sperm Membrane of Dogs. *Reprod Dom Anim.*, v. 44, p. 283–286, 2009.

SPIROPOULOS, J., Spiropoulos, P.F., Chinnery, D.M. Turnbull Pathogenic mitochondrial DNA mutations and human reproduction. *Hum Fertil.*, v. 2, p.133-137, 2002b.

SPIROPOULOS, J.; SPIROPOULOS, D.M.; TURNBULL, P.F. Chinnery Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol. Hum. Reprod.*, v.8, p.719-721, 2002a.

SYLVESTER, S.R. Secretion of transport and binding proteins. In: Griswold MD, Russell L (eds.), *The Sertoli Cell*. Clearwater, FL: Cache River Press; 1993.

SYLVESTER, S.R.; GRISWOLD, M.D. Localization of transferrin and transferrin receptors in rat testes. *Biol Reprod.*, v. 31, p. 195–203, 1984.

TUNG, P.S.; FRITZ IB. Immunolocalization of clusterin in the ram testis, rete testis, and excurrent ducts. *Biol Reprod*, v.33, p.177–186, 1985.

TURUNEN, H.T.; SIPILA, P., KRUTSKIKH, A., TOIVANEN, J., MANKONEN, H., HAMALAINEN, V., BJORKGREN, I., HUHTANIEMI, I., POUTANEN, M. Loss of Cysteine - Rich Secretory Protein 4 (Crisp4) leads to deficiency in sperm–zona pellucida interaction in mice. *Biol Reprod.*, v.86, p.1–8, 2011.

WANG, K.X.; DENHART, D.T. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth F R*, v. 19, p. 333-45, 2008.

WOLGEMUTH, D.J. Function of cyclins in regulating the mitotic and meiotic cell cycles in male germ cells. *Cell Cycle*, v. 7, p. 3509-3513, 2008.

WONG, C.C.S.; CHUNG, S.S.W.; GRIMA, J.; ZHU, L.J.; MRUK, D.; LEE, W.M.; CHENG, C.Y. Changes in the expression of junctional and nonjunctional complex

components genes when inter-Sertoli tight junctions are formed in vitro. J Androl., v .21, p. 227–237, 2000.

ZHANG, G.M.; LANA, S.; JIAA, R.X.; YANA, G.Y.; WANGA, L.Z.; NIEA, H.T.; LEIB, Z.H.; WANGA, F. Age-associated and tissue-specific expression of osteopontin in maleHu sheep reproductive tract. Tissue and Cell, v. 48, p. 496–502, 2016.

ZHANG, H.; JONES, R.; MARTIN-DELEON, P.A. Expression and secretion of rat SPAM1(2B1 or PH-20) in the epididymis: role of testicular lumicrine factors. Matrix Biol., v .22, p.653–661, 2004.

ZHOU, W.; IULIIS, G.N.; DUN, M.D.; NIXON, B. Characteristics of the epididymal Luminal environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. Front. Endocrinol., v.9, 2018.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1²

Assinaturas proteômicas do trato reprodutor de cães

Proteomic assignatures of canine reproductive tract tissue

Laíza S. Camargo,^{*} Marcos G. Carvalho,^{*} Marcus V. N. Alvarez,[†] Carlos E.

Fonseca-Alves,[‡] Fabiana F. Souza,^{*}

^{*}Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

[†]Departamento de Genética, IBTEC, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

²O artigo será encaminhado para *Journal of Proteome Research*, fator de impacto 3,7

RESUMO

Em vista do avanço das biotecnologias relacionadas com a reprodução de cães em conjunto com compreensão relação de marcadores moleculares durante a espermatogênese, maturação e fertilização espermática, o objetivo deste trabalho foi estudar o proteoma de testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo de cães, a fim de compreender os processos fisiológicos envolvidos na fertilização. Foram colhidos testículos (n = 6) e epidídimos de 3 cães submetidos a orquiectomia eletiva. O epidídimo foi dividido em cabeça (EPIDH, n = 6), corpo (EPIDB, n = 6) e cauda (EPIDT, n = 6). Então, as amostras foram sonicadas e submetidas à SDS-PAGE para realização da digestão *in gel* e espectrometria de massas (nano-LC MS/MS). As variáveis foram normalizadas no *software R Analytics* e análise multivariada foi conduzida no *MetaboAnalyst Software* pelo *principal component analysis* (PCA), *partial least squares-discriminant analysis* (PLS-DA), *variable importance in projection* (VIP) score e ANOVA/teste de Fisher. Foram encontradas 1.918 proteínas em todos os tecidos estudados. No tecido testicular foram identificadas 590 proteínas, EPIDH 337, EPIDB 509 e EPIDT 482 proteínas. Do total, 132 proteínas foram utilizadas na análise multivariada. A PCA identificou 4 grupos distintos e segundo o VIP score, 20 proteínas foram diferencialmente abundantes ($\alpha > 1,5$) entre os grupos, contudo 18 confirmadas pela ANOVA/teste de Fisher. Seis proteínas foram mais abundantes no corpo, 4 na cabeça do epidídimo, e 10 no testículo. As proteínas *inositol-3-phosphate synthase 1*, *equilibrative nucleoside transporter 1*, *tubulin alpha chain*, *heat shock protein 90 alpha family class A member 1*, *heat shock protein family A member 8*, *heat shock protein family A (HSP70) member 2* e *cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1*, *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta* foram mais abundantes no testículo e reduziram gradativamente em direção a cauda do epidídimo. Concluiu-se que existe diferença de abundância entre as proteínas quando se comparou os 4 grupos, relaciona-se tal fato aos processos de espermatogênese e maturação espermática que ocorre em cada órgão analisado.

PALAVRAS-CHAVE: proteômica, cão, proteínas, sds-page

INTRODUÇÃO

As proteínas são as principais macromoléculas dos processos reprodutivos e por este motivo a proteômica é uma alternativa para a detecção de marcadores moleculares que estejam relacionados com a fertilidade/infertilidade, como já descrito em humanos (Welch et al., 1998; Klinefelter et al., 2002), ovinos (Favareto et al., 2010), equinos (Guasti et al., 2014; Fedorka et al., 2017; Restrepo et al., 2019) e bovinos (Cancel et al., 1999; Menezes et al 2019a; Menezes et al., 2019b).

Já sobre a proteômica dos tecidos dos compartimentos do sistema reprodutor masculino, no nosso conhecimento, não há estudos até o momento.

Nos túbulos seminíferos dos testículos ocorre espermatogênese, processo que culmina com a formação e secreção das células espermáticas. O epidídimo possui funções diferenciadas a depender da localização, como cabeça, corpo e cauda (Bedford, 1979; Jones, 1998a; Jones, 1998b). É durante esse trajeto que o espermatozoide sofre modificações fisiológicas complexas na superfície da membrana plasmática. As mudanças ocorridas durante o trânsito e a permanência dos espermatozoides no epidídimo têm influência direta das secreções produzidas nestes compartimentos, para que a célula espermática adquira motilidade e se torne apta à fertilização do oócito (Haidl et al., 1994; Turner, 1995; Cooper e Yeung, 2006). Todo o microambiente testicular e do epidídimo contribuem para a formação de espermatozoides férteis, sendo essencial o estudo das moléculas envolvidas nestes processos.

Dessa forma, objetivo deste estudo foi descrever a relação das proteínas nos compartimentos do trato reprodutor de cães (testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo) a fim de relacionar as proteínas encontradas nos testículos e epidídimo com os processos de formação e maturação espermática.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

Os aspectos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Experimento Animal (CONCEA) foram considerados em cada etapa desse estudo, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Institucional (CEUA), sob protocolo nº 0123/2017.

Reagentes

Todos os reagentes utilizados no estudo foram do mais alto grau de pureza e obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), GE Healthcare Life Sciences (São Paulo, São Paulo, Brazil), Waters Corp. (Barueri, São Paulo, Brazil) e Thermo Fisher Scientific (São Paulo, São Paulo, Brazil), salvo indicação em caso de utilização de outros reagentes.

Desing experimental

O design experimental está descrito na Figura 1.

Animais e preparação das amostras

Foram utilizados 3 cães adultos, entre 2 a 5 anos de idade, hígidos, pesando entre 10 e 20 kg, submetidos a orquiectomia eletiva. Foi retirado um fragmento medial de cada testículo (TEST, n = 6) e o epidídimo foi dividido em cabeça (EPIDH, n = 6), corpo (EPIDB, n = 6) e cauda (EPIDT, n = 6) de acordo com a anatomia, totalizando 24 amostras. Os fragmentos foram pesados e armazenados individualmente em solução de extração de proteínas RIPA (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM TRIS-HCl pH 7.5) contendo solução inibidora de proteases (0.8 mmol EDTA, 1.0 µg/mL aprotinin, 1.0 µg/mL leupeptin e 35.0 µg/mL PMSF [phenylmethylsulfonyl fluoride] in 50 mmol TRIS-HCl pH 7.2), na proporção de 1 mL/300 mg. As amostras foram sonicadas e as proteínas concentradas com acetona (1: 5 de amostra e acetona à 4° C). Então, procedeu-se uma centrifugação (10.000g por 30 minutos, à 4° C) para retirada do solvente. As amostras foram eluídas com 50 mM TRIS-HCl pH 7.5.

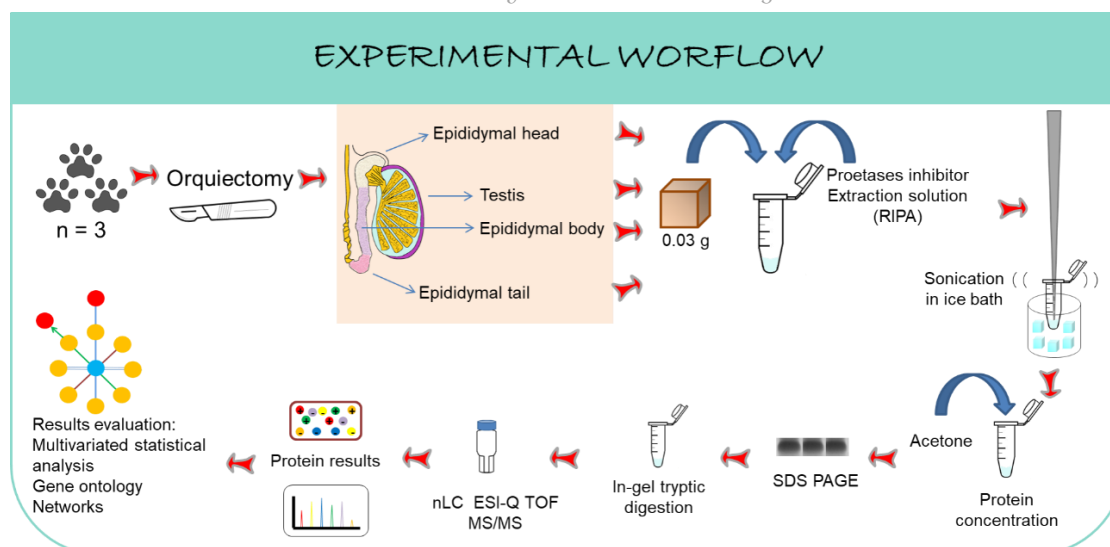


Figura 1. Descrição da metodologia realizada

Proteômica

A concentração de proteína total das amostras foi determinada por método colorimétrico (Pierce™ 660nm Protein Assay, Thermo Fisher Scientific™, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) e espectrofotometria (NanoDrop 2000, Termo Fisher Scientific™ Wilmington, Delaware USA).

Para espectrometria de massas foram utilizados 40 µg de proteína submetida ao SDS-PAGE em um mini-gel 12%, porém o sistema foi desligado quando as amostras atingiram o gel de separação, formando uma banda única. O gel foi corado com Coomassie coloidal (Luo et al., 2006; Neuhoff et al., 1988).

Após a corrida, cada banda (fragmentos de ~1 mm) foi recortada e as amostras foram digeridas segundo (Shevchenko et al., 2006) com modificações (Guasti et al., 2020). Brevemente, as bandas descoradas, as pontes dissulfetos foram reduzidas com DTT e a alquilação foi conduzida com iodoacetamida. A digestão foi efetuada com tripsina (20 ng / µL) 1: 50 enzima /substrato, (Sequence Grade Modified Trypsin V5111, Promega, São Paulo, São Paulo, Brazil) *overnight*.

A extração dos peptídeos foi realizada 2 vezes, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante armazenado. O volume foi reduzido em evaporador (SPD1010 Integrated SpeedVac™ System, Waltham, MA, USA) até 1 µL e as amostras armazenados -20° C.

Para análise em espectrômetro de massas, as amostras foram descongeladas e ressuspendidas em ácido fórmico a 0,1% homogeneizadas em um agitador de

tubos e centrifugada a 1.100g por 5 min. Após este procedimento, 20 μ L da solução final foram depositados em tubos específicos para análise em espectrômetro de massa (0.7 μ g proteína/ μ L) e foram aplicados 4,5 μ L da amostra no espectrômetro de massas.

Espectros foram adquiridos usando MassLynx software v.4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) e os arquivos de dados brutos foram convertidos para um formato de lista de picos (mgf) sem somar os *scans* a partir do software Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Inc., Boston, MA, USA) com carbamidometilação com modificações fixas, oxidação em metionina com modificação variável uma clivagem de tripsina, e tolerância de 0.1 Da para os íons precursores de fragmento.

Após identificação proteica com ProteinPilot, os dados da análise com MALDI usou o banco de dados UniprotKB (www.uniprot.org.br), para obter a anotação da ontologia gênica (GO) usando as categorias função molecular e processo biológico.

A anotação da ontologia gênica de cada proteína foi obtida no UniprotKB (www.uniprot.org, Boutet et al., 2016) usando as categorias função molecular, processo biológico e componente celular.

Depois da identificação das proteínas, foi feita a ontologia gênica das proteínas correspondentes a cada tecido, utilizando função molecular e processo biológico, com o software *Panther* versão 10 (<http://www.pantherdb.org>).

Análise estatística

Os dados no formato XML foram importados e preparados no programa RStudio (Rstudio Team, 2015), ambiente de desenvolvimento integrado para linguagem de programação R. Foi utilizado o pacote *rvest* (Wickham, 2019) para importação dos arquivos e conversão para formato tabular. Os resultados registrados nos arquivos XML foram padronizados de acordo com as nomenclaturas do banco de dados de proteínas UniProt (Uniprot Consortium, 2018).

Os valores de emPAI foram tabulados por GeneName e os resultados filtrados por ProteinExistence e SequenceVersion, mantendo apenas resultados que apresentaram as melhores categorias de evidência experimental para *protein existence* e versões das sequências mais recentes para *sequence version*. Para cada grupo de amostras, foram omitidos os valores de emPAI de proteínas que

apresentaram emPAI igual zero em 50% ou mais das amostras do grupo. Foram eliminadas das análises proteínas que apresentaram emPAI igual a zero em todos os grupos. Calculou-se as proporções das proteínas em cada amostra dividindo o valor de emPAI da j-ésima proteína da i-ésima amostra pela somatória dos valores de emPAI da j-ésima proteína.

O software *MetaboAnalyst* 3.0 (Xia; Wishart, 2006) foi utilizado para realizar análises multivariada, utilizando análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), o qual gerou um *variable importance in projection* (VIP score). O PCA foi usado para descrever os agrupamentos das proteínas em cada tecido analisado, utilizando cluster hierárquico, com os dados fornecidos pelo usuário. Cada amostra começa como um cluster separado e o algoritmo prossegue para combiná-los até que todas as amostras pertençam a um único cluster (Xia; Wishart, 2006). Os resultados encontrados no VIP score ($\alpha > 1,5$) foram confrontados com os resultados do Anova seguido pelo teste de Fisher. As proteínas foram consideradas como expressão diferenciada entre os grupos quando os resultados foram coincidentes nas duas análises. Na análise Anova foi considerado o valor significativo de $P \leq 0.05$ e o valor de *false discovery rate* (FDR) também ≤ 0.05 . Os clusters foram também representados pela análise não-hierárquica no dendrograma. O número de proteínas encontradas em cada grupo foi demonstrado pelo diagrama de Venn.

RESULTADOS

Foi encontrado um total 1.918 proteínas, sendo 590 identificadas no testículo, 337 EPIDH, 509 no EPIDB e 482 EPIDT (Figura 2). Após a normalização, foram consideradas 132 proteínas relevantes para análise multivariada.

De acordo com os resultados do PCA, a soma dos eixos (PC1 + PC2+ PC3) foi de 64,8%, o qual representa resultado significativo da divisão dos *clusters* relacionando proteínas e tecidos. Tais resultados foram confirmados e apresentados no dendrograma (Figura 3).

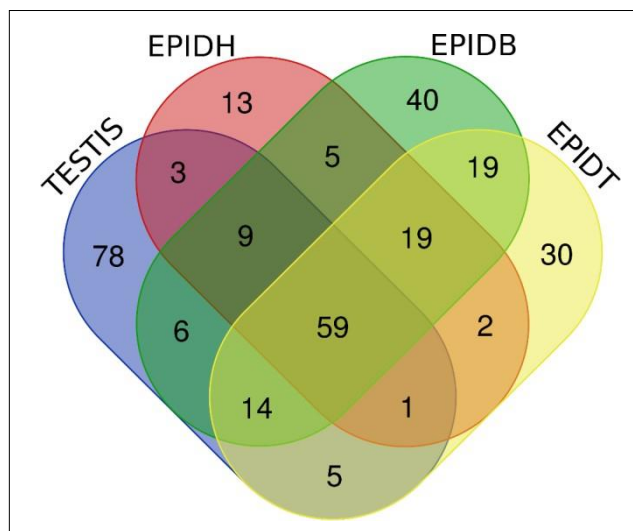


Figura 2. Proteínas do diagrama de Venn observados em tecido testicular, EPIDH, EPIDB e cauda do epidídimo EPIDT. Diagrama de Venn realizado on-line: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>

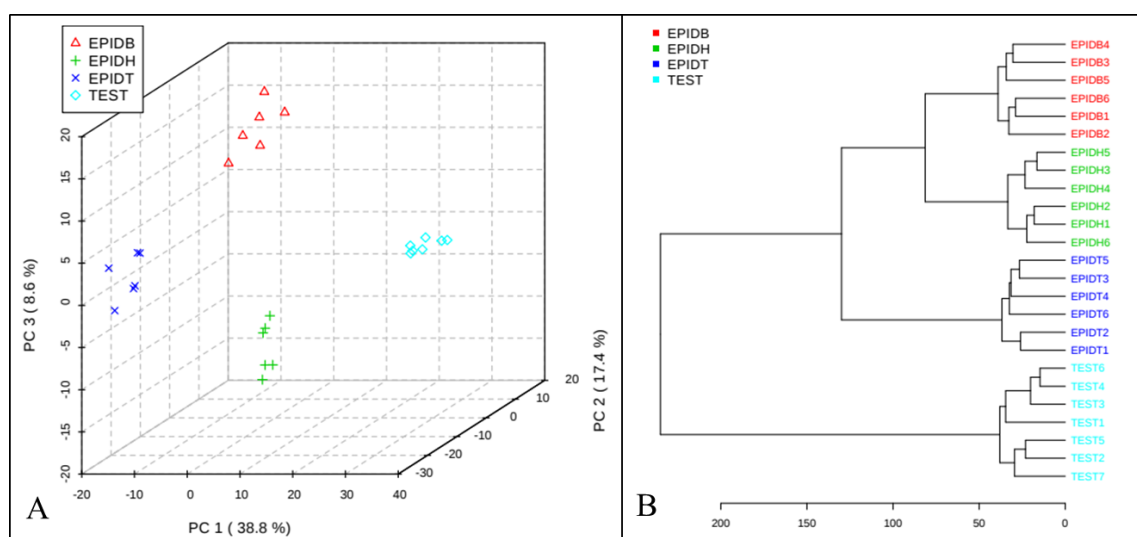


Figura 3. A) Análise do componente principal (PCA) das amostras em testículo, cabeça do epidídimo (EPIDH), corpo do epidídimo (EPIDB) e cauda do epidídimo (EPIDT), indicando diferenças entre os grupos ($PC1 + PC2 + PC3 = 64,8\%$), note a distância entre as amostras. B) dendograma feito por *cluster* hierárquico das amostras.

O *VIP score* (Figura 4) identificou 20 proteínas com expressão diferenciada ($VIP \alpha > 1,5$), das quais 18 foram confirmadas pela análise de variância ANOVA. Das 18 proteínas mais expressas nos agrupamentos, 8 proteínas tiveram maior expressão no testículo e foram gradativamente diminuindo em direção a cauda

do epidídimo. Seis proteínas foram mais expressas no corpo, 4 na cabeça do epidídimo, 10 no testículo, porém não foi encontrado maior expressão de proteínas na cauda do epidídimo.

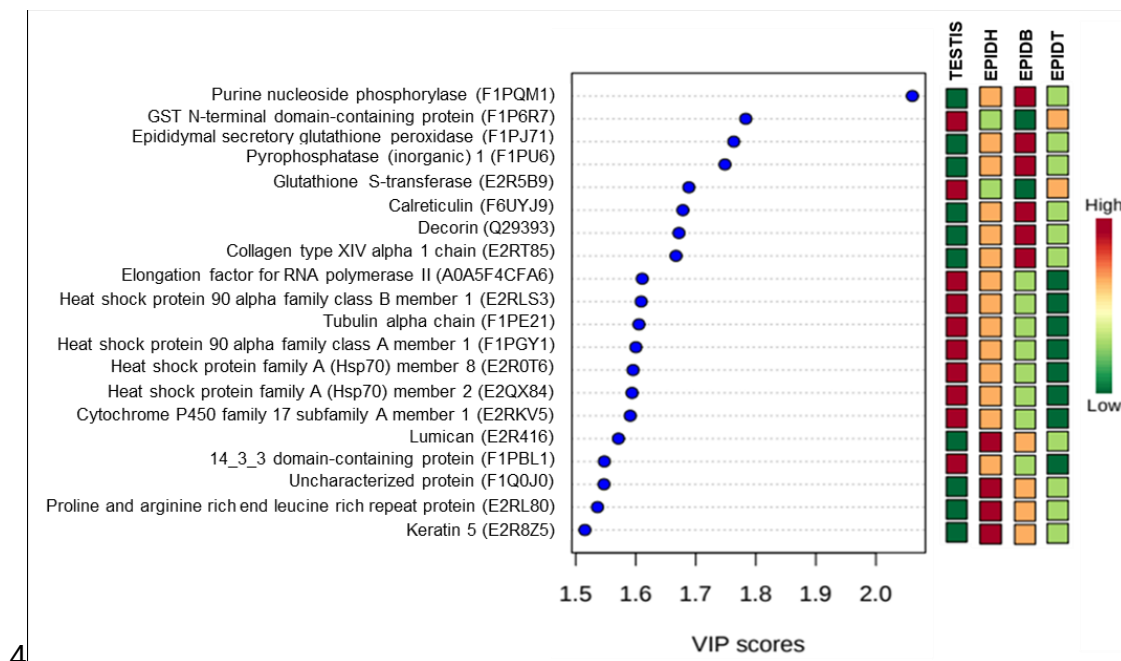


Figura 4. VIP score (*variable importance in projection*) das variáveis mais relevantes (VIP score $\alpha > 1,5$) em ordem de importância relacionando as proteínas com os fragmentos de tecido testicular e epidídimo. Classificado por PLS – DA. Validação dos resultados Q2 = 0,97 no PC3. *Gene PNP – Proteína Purine nucleoside phosphorylase.

A figura 5 ilustra os resultados da abundância das proteínas em cada grupo um dos grupos, testículo, EPIDH, EPIDB, EPIDT, com nome da proteína encontrada e o código encontrado no Uniprot, respectivamente.

Os resultados da ontologia gênica (Figura 6, 7, 8 e 9) foram analisados separadamente, testículo, EPIDH, EPIDB, EPIDT. Foram identificadas processo biológico e função molecular de cada um dos tecidos. O processo biológico predominante foi relacionado a processo celular em todas os tecidos (~36%), função molecular de ligação em testículo e EDPIH (~40%) e atividade catalítica em EPIDB e EPIDT (~40%).

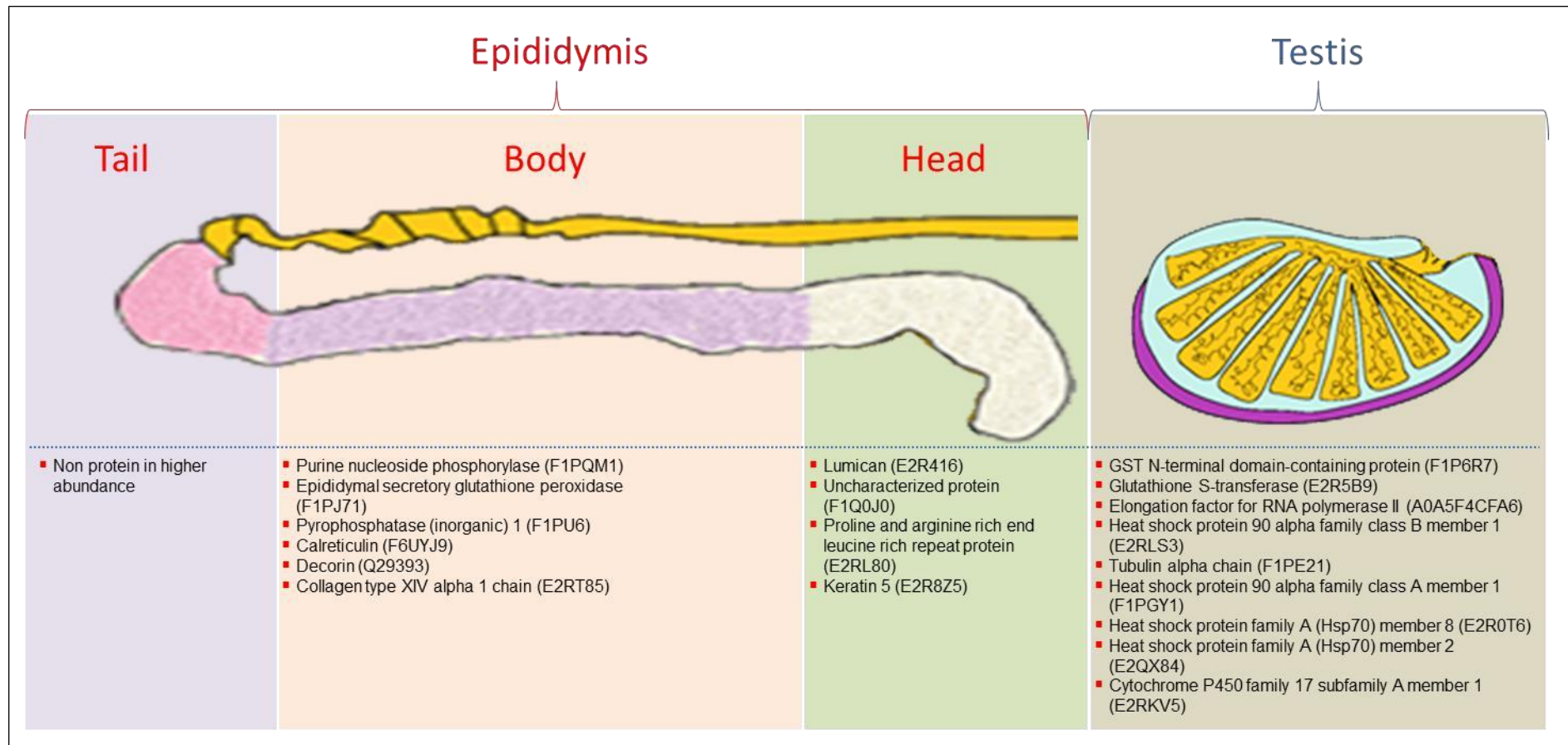


Figura 5. Proteínas de maior abundância em cada compartimento.

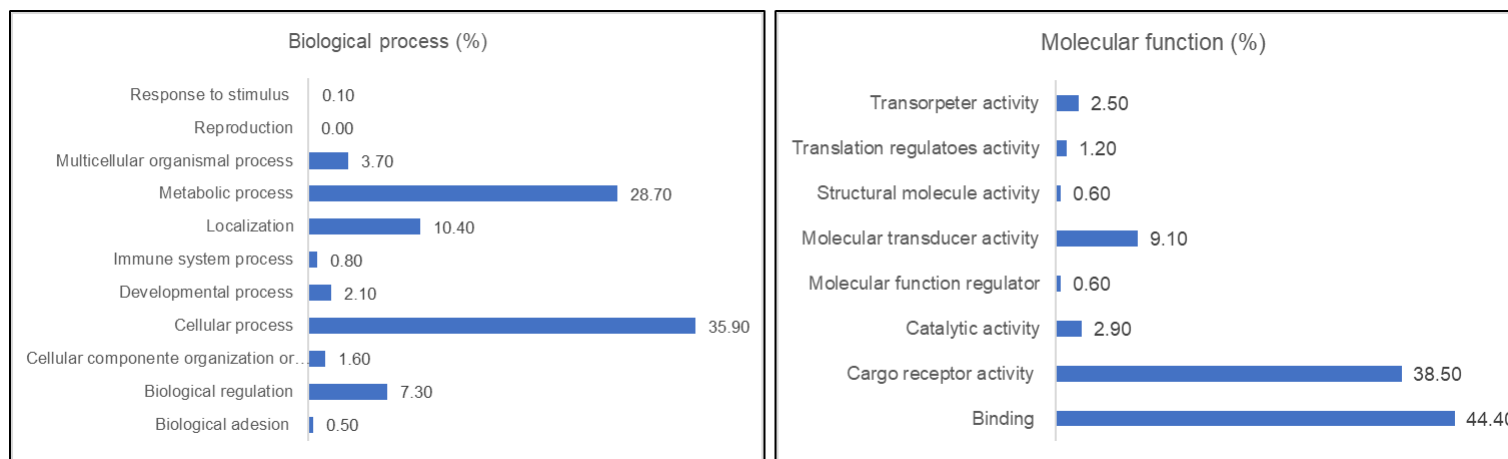


Figura 6. Ontologia gênica das proteínas do testículo, considerando processo biológico e função molecular.

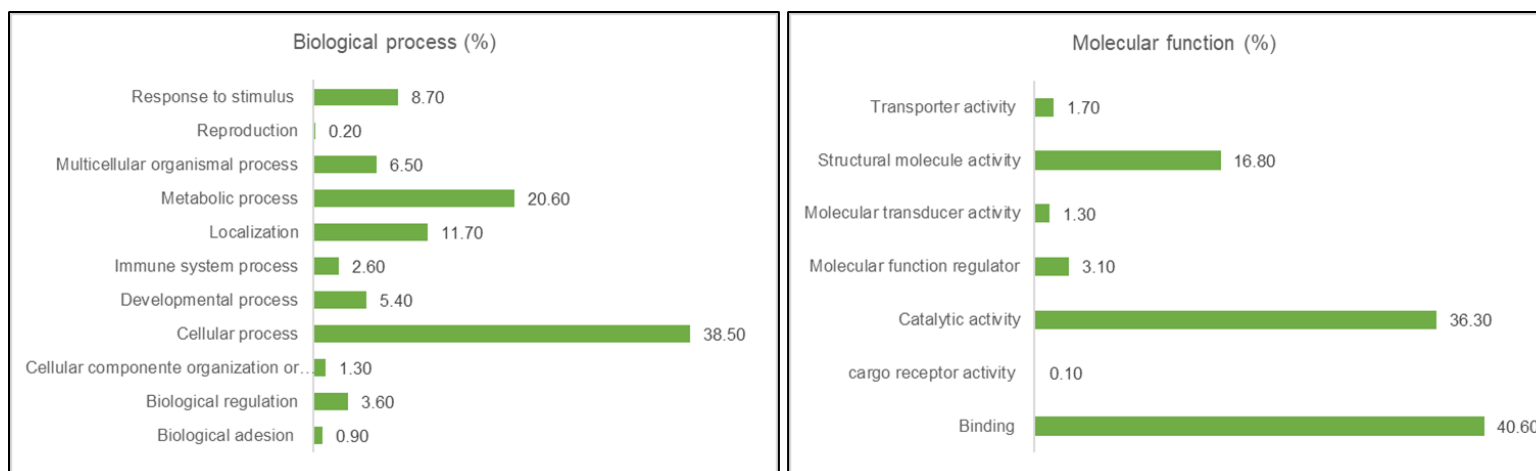


Figura 7. Ontologia gênica das proteínas da EPIDH, considerando processo biológico e função molecular.

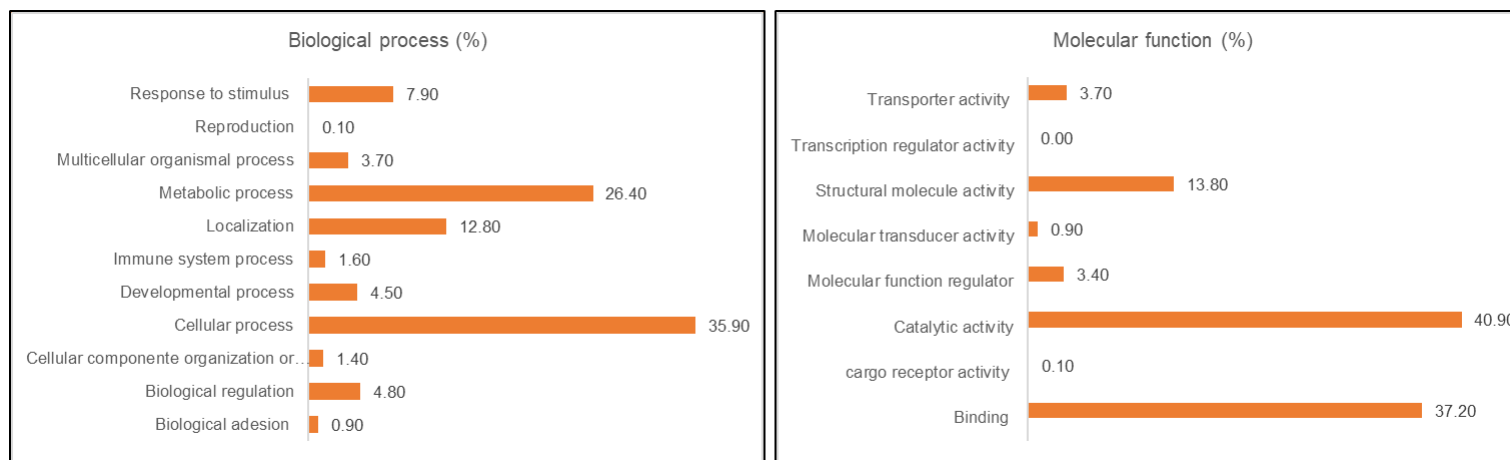


Figura 8. Ontologia gênica das proteínas do EPIDB, considerando processo biológico e função molecular.

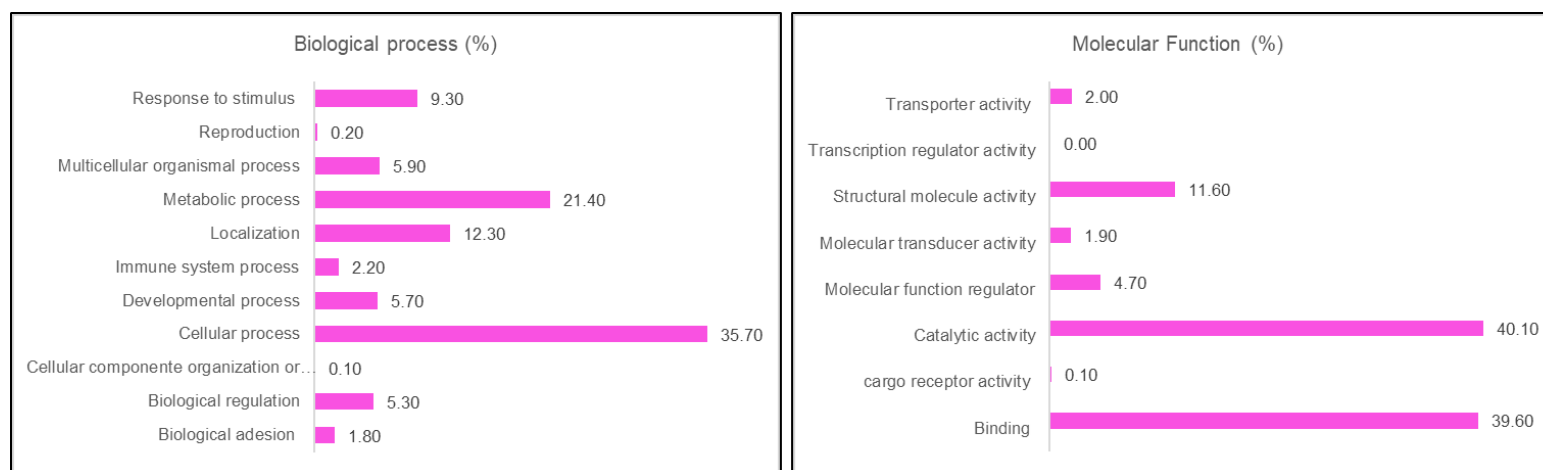


Figura 9. Ontologia gênica das proteínas da EPIDT, considerando processo biológico e função molecular.

DISCUSSÃO

De acordo com a literatura, em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que identifica o perfil proteico do tecido testicular e dos compartimentos do epidídimo de cães. Esta investigação possibilitou a compreensão de maneira global a respeito das alterações na abundância de proteínas durante a espermatogênese e a maturação espermática no epidídimo.

As amostras foram separadas em *clusters* de acordo com o tecido de origem, indicando que cada compartimento apresenta expressão diferenciada de proteínas. Apesar disso, 59 proteínas foram comuns aos tecidos estudados, o qual indica que a expressão de determinadas macromoléculas é mantida desde o testículo e ao longo epidídimo.

Na análise PCA e dendograma é possível observar que os grupos analisados, testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo estão nitidamente separados, podendo estar relacionado com a função desempenhada por cada estrutura, testículo responsável pela espermatogênese e o epidídimo por diferentes etapas da maturação espermática. A ontologia gênica relacionada ao processo biológico de processo celular se manteve semelhante em testículo e epidídimo, porém os processos metabólicos ficaram mais evidentes em testículo, podendo estar relacionado com as etapas da espermatogênese. Com relação a função molecular o testículo se diferenciou dos outros grupos, sendo atividade do receptor de carga expressa em maior quantidade. O epidídimo apresentou função molecular de atividade catalítica e ligação, todos os grupos revelaram função molecular de ligação em grande quantidade.

Dentre as proteínas identificadas encontradas, destacamos a *calreticulin* e *collagen*, as quais foram observadas em todas as amostras, apesar da expressão diferenciada em cada tecido. A *collagen IV* é a proteína mais abundante da membrana basal, juntamente com a *laminina* (Nielsen; Karsdal, 2016).

Pela análise VIP score, foi possível identificar, no tecido testicular, 8 proteínas (*Elongation factor for RNA polymerase II* (A0A5F4CFA6); *heat shock protein family B member 1* (E2RLS3), *tubulin alpha chain* ou F1PE21, *heat shock protein 90 alpha family class A member 1* ou F1PGY1, *heat shock protein family A (Hsp70) member 8* ou E2R0T6, *heat shock protein family A [HSP70] member 2* ou E2QX84, *cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1* ou E2RKV5,

14_3_3 domain-containing protein ou F1PBL1) em maior abundância e que reduziram gradativamente durante a maturação no epidídimo.

A proteína *elongation factor for RNA polymerase II* tem função molecular da *inositol-3-phosphate synthase 1*, responsável por transportar hormônios, modular fatores de crescimento e está envolvida na biogênese da membrana (York et al., 2001; Fisher et al., 2002). No nosso estudo foi encontrada com maior expressão no testículo, corroborando com estudos em ratos (Maeda et al., 1980) e ovinos (Voglmayr et al., 1971), os quais identificaram a mesma proteína em testículo, no entanto, em homens foi encontrada em células do epidídimo, em menor abundância nos cílios de ductos eferentes (Li et al., 2011). As células de Sertoli, espermatócitos e espermátides redondas são responsáveis pela expressão do *inositol-3-phosphate synthase 1*, envolvida na síntese do *myo-inositol*, este pode ser encontrado em variadas concentrações no fluido do túbulo seminífero (Hinton et al., 1980). O *myo-inositol* pode atuar como um osmorregulador, assim como ocorre nos rins (Chauvin e Griswold, 2004).

Outra proteína que foi encontrada em alta abundância no testículo e decresceu de acordo com a passagem do epidídimo, foi a *tubulin alpha chain*, componente fundamental da formação dos microtúbulos do flagelo do espermatozoide (Fouquet et al., 1997), o motivo de ter sido encontrada no testículo pode estar relacionado com espermatogênese.

As proteínas *heat shocks* pertencem à família das chaperonas e apresentam funções relacionadas com o estresse térmico (Kampiga; Craig, 2010). A HSP70 identificada no nosso estudo com maior expressão nos testículos, também denominada HSPA2, é membro mais abundante da família das chaperonas (Kampiga; Craig, 2010; Redgrove et al., 2012). Atuam no desenvolvimento, diferenciação e maturação do espermatozoide durante a espermatogênese (Kampiga; Craig, 2010; Redgrove et al., 2012), contribuem para alterações funcionais da célula, as quais permitem a capacitação, sendo considerada um marcador molecular da qualidade espermática (Nixon et al., 2015). Além disso, proteínas da família das chaperonas possuem função de manutenção do metabolismo celular, crescimento, diferenciação e apoptose (Bukau et al., 2006). As chaperonas são responsáveis pela *folding* de proteínas e em situações de estresse celular em que há proteólise, as HSPs atuam como protetores, promovendo o *refolding* proteico, ou seja inibindo a proteólise (Liu; Craig, 2016).

A HSP70 é sintetizada durante a espermatogênese na fase de meiose e é abundante em espermátides (Eddy, 1999), mais um fator que justifica a alta expressão dessa proteína em testículo e diminuição em direção a cauda do epidídimo.

Outra proteína encontrada em alta abundância no testículo foi *cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1*, responsável pela interferência na duração e intensidade de substâncias tóxicas, em homens foi observado a relação da *cythochrome p450* com a formação de espécies reativas de oxigênio que pode ocasionar mudança na concentração espermática (Aitken, 1989; Chitra et al., 2003). Todavia as espécies reativas de oxigênio também desempenham papel importante em muitas sinalizações celulares (Baker et al., 2004), apoptose, capacitação espermática (Aitken et al., 2003) e proliferação celular (Suh et al., 1990).

No testículo também foi encontrada uma proteína *glutathione S-transferase*, a qual se comportou diminuindo a aundância em cabeça e corpo do epidídimo e aumentando na cauda do epidídimo. Os processos biológicos desta proteína estão relacionados com a resposta ao nitrogênio, processos catabólicos, defesa imunológica, com expressão diminuída em homens inférteis (Fafula et al., 2019), pode estar relacionada como proteína integrante do citoesqueleto de espermatozoides de camundongos, sendo expressa no desenvolvimento de espermatogônias durante a espermatogênese, corroborando com os achados em nosso estudo (Angrimani et al., 2014)

Embora a Wnt não tenha sido encontrada em maior abundância nos compartimentos estudados, foi observado no tecido testicular. Esta proteína é secretada pelas espermátides (Lombardi et al., 2013) e exossomos no lúmen do epidídimo (Roberts; Popler; 2015), mas apesar disso não foi identificada no epidídimo em nosso estudo. A Wnt é importante para a aquisição da motilidade espermática (Björkgren; Sipila, 2019) e maturação dos espermatozoides no epidídimo (Robertis; Popler, 2015), controla a descida dos testículos para o escroto durante a vida embrionária/fetal (Robertis; Popler, 2015). Nos machos adultos está relacionada com a manutenção da espermatogênese e das células germinativas (Kumar et al., 2016). Ratos mutantes sem a expressão da Wnt apresentaram infertilidade e redução do epitélio germinativo (Kumar et al., 2016). Quando ocorre desregulação da sinalização da Wnt (Kypta; Waxman, 2012) está

associada a alterações do trato reprodutor masculino, como testículo e próstata (Clevers; Nusse, 2012; Kypta; Waxman, 2012), infertilidade e formação de tumores testiculares em humanos.

Na cabeça do epidídimo foram encontradas 4 proteínas em maior abundância, *endoplasmic reticulum protein 29* (J9P4L2), *uncharacterized protein* (F1Q0J0), *proline and arginine rich end leucine rich repeat protein* ou E2RL80, *uncharacterized protein* (E2R8Z5).

A proteína *endoplasmic reticulum protein 29* (ERp39), está localizada no retículo endoplasmático (Ferrari et al., 1998) e envolvida no *folding* e *unfolding* de proteínas (Zhang e Richardson, 2011), está presente na carcinogênese (Cheretis et al., 2006; Shnyder et al., 2008), porém seu mecanismo dentro deste processo ainda é obscuro (Zhang e Richardson, 2011), está presente em tecidos secretores, como pâncreas, glândula mamária, tireoide e próstata (Mkrtchian e Sandalova, 2006). Esta proteína está relacionada com fatores protetores contra o estresse celular (Shnyder et al., 2008), considerada uma chaperona, tem função de oxidoreductase e isomerase (Ellgaard; Ruddock, 2005). Esta proteína se adere ao espermatozoide e aumenta significativamente à medida que o espermatozoide sofre maturação. Já foi descrita também no epitélio do epidídimo de camundongos (Guo et al., 2007) e o grupo de proteínas *endoplasmic reticulum protein* foram associadas com a capacidade de fertilização espermática de homens (Ellerman et al., 2006; Zhang et al 2007).

De acordo com o *VIP score* esta proteína foi encontrada em maior abundância na cabeça do epidídimo, corroborando com os resultados encontrados em ratos, nos quais demonstraram que há aumento significativo da expressão da proteína ao longo do epidídimo (Guo et al., 2007). A hipótese é que haja adesão da ERp29 na membrana do espermatozoide no início da maturação espermática na cabeça do epidídimo de cães, visto que já foi sugerido que esta proteína desempenha papel na maturação espermática e secreção de proteínas (Liepinsh et al., 2001; Mkrtchian e Sandalova, 2006).

A *proline and arginine rich end leucine rich repeat protein* foi a terceira proteína mais abundante na cabeça do epidídimo. É encontrada em membranas basais de cartilagens e matriz óssea (Bengtsson et al., 1995; Heinegard et al., 2002) e já foi relacionada com o controle de enfermidades, como a artrite reumatóide no combate a perda óssea (Rucci et al., 2013). Em cães tem a função de proteína

ligadora de heparina (Uniprot, 2020). Este grupo de proteínas já foi identificado em caninos e se ligam ao espermatozoide depois da ejaculação (Souza et al., 2006) e podem estar envolvidas na capacitação espermática e reação acrossomal (Miller et al., 1990). Essa proteína pode se aderir a célula espermática durante a maturação e auxiliar o potencial de fertilização do espermatozoide, durante sua passagem pelo epidídimo.

No corpo do epidídimo, *purine nucleoside phosphorylase* foi identificada em maior abundância quando comparada a todas as outras proteínas, esta já foi identificada em fluido da cauda do epidídimo de homens (Dacheux et al., 2012) e bovinos (Westfalewicz et al., 2017), no entanto não foi descrita sua ação neste órgão. Em outros tecidos está envolvida na resposta imunológica, na secreção de interleucina-2, resposta aos fármacos (Uniprot). Assim sugere-se que esta proteína atue no corpo do epidídimo como proteção imunológica aos espermatozoides durante a maturação, foi identificada neste trabalho porém ainda não havia sido descrita em tecido reprodutor de cães e

Na cauda do epidídimo notou-se a ausência de proteínas em maior abundância corroborando com a fisiologia e função da cauda do epidídimo, que é armazenar os espermatozoides que serão ejaculados (Senger, 2005). Alguns estudos demonstram que a atividade secretora na parte inicial do epidídimo é maior quando comparada com a cauda (Belleannee et al. 2011b; Fouchecourt et al. 2000; Syntin et al. 1999), corroborando com o declínio da abundância proteica observada na cauda do epidídimo na análise *Vip score*.

Algumas proteínas encontradas nos testículos podem ser absorvidas na primeira porção do epidídimo (Dacheux et al., 2012), o que poderia explicar a ausência de proteínas em algumas partes deste órgão, porém em epidídimo de homens foi observado que as proteínas do fluído epididimário são encontradas ao longo de todo órgão (Dacheux et al., 2006). Desta forma, foi possível concluir que há uma relação entre a concentração de proteínas que se difere entre testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo, possibilitando a investigações futuras de marcadores moleculares ao longo do trato reprodutor de cães relacionados a fertilidade, com o objetivo da elaboração de uma vacina contraceptiva em cães.

REFERÊNCIAS

- 1) Aitken, R.J.; Baker, M.A.; Sawyer, D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online* **2003** 7:65–70.
- 2) Aitken, R.J.; Clarkson, J.S.; Fishel, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol. Reprod.* **1989**, 40, 183-197.
- 3) Aquino-Cortez, A.; Silva, L. D. M.; Araújo, A. A.; Menezes, A. S. B.; Moura, A. A. N. Proteins of the canine seminal plasma. *Ciência Rural* **2016**, 46 (5):901-908.
- 4) Baker M.A., et al. Identification of Cytochrome P450-Reductase as the Enzyme Responsible for NADPH-Dependent Lucigenin and Tetrazolium Salt Reduction in Rat Epididymal Sperm Preparations. *Biol. Reprod* **2004**, 71, 1, 1, 307–318.
- 5) Bedford, J. Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions in the epididymis. In: Fawcett DW, Bedford J (ed). The spermatozoa. Baltimore: Urban & Schwarzenberg, **1979**, 7–21.
- 6) Belleannee, C.; et al. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *J Proteomics* **2011**, 74, 59–78.
- 7) Bengtsson, E.; et al. The primary structure of a basic leucine-rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues. *J Biol Chem* **1995**, 270, (43), 25639–44.2.
- 8) Berg JM, Tymoczko JL SL. Biochemistry. 5th editio. New York: **2002**.
- 9) Björkgren, I.; Sipilä, P. The impact of epididymal proteins on sperm function. *Reproduction* **2019**, 58, 55–167.
- 10) Bukau, B.; Weissman, J.; Horwich, A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **2006**; 125, 443–51.
- 11) Cancel, A.M.; Chapman, D.A.; Killian, G.J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol Reprod* **1999**, 60, 454-460
- 12) Chauvin, T.; Griswold, M.D. Characterization of the expression and regulation of genes necessary for myo-inositol biosynthesis and transport in the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* **2004**, 70, (3), 744-51.
- 13) Cheretis, C.; et al. Expression of ERp29, an endoplasmic reticulum secretion factor in basal-cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* **2006**, 28, 410–2.
- 14) Chitra, K.C.; Latchoumycandane, P.P. Mathur. Induction of oxidative

stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* **2003**, 195, 119/127.

15) Clevers, H.; Nusse, R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* **2012**, 149 (6), 1192-1205.

16) Cooper, T.G.; Yeung, C.H. Sperm maturation in the human epididymis. In: De Jonge C, Barratt C. (ed). *The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge: Cambridge University Press, **2006**, 72–107.

17) Dacheux, J.L.; et al. Human epididymal secretome and proteome. *Mol Cell Endocrinol* **2006**, 250, 36–42.

18) Dacheux, J.L.; et al. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med* **2012**, 58: 197–210.

19) Demmer, J.; Zhou, C.; Hubbard, M.J. Molecular cloning of ERp29, a novel and widely expressed resident of the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* **1997**, 402 145–150.

20) Eddy, E.M. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* **1999**, 4, 23–30.

21) Ellerman, D.A.; Myles, D.G.; Primakoff, P. A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: evidence for the participation of ERp57. *Dev Cell* **2006**, 10, 831-837.

22) Ellgaard, L.; Ruddock, L.W. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties *EMBO Rep.* **2005**, 6, 28-32.

23) Erikson, D.W.; et al. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. *Reprod Fertil* **2007**, 1741–7899.

24) Favareto, A.P.A.; et al. Expression and localization of cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP-3) in the prepubertal and postpubertal male horse. *Theriogenology* **2017** 87, 187– 192.

25) Ferrari, DM.; et al. ERp28, a human endoplasmic reticulum lumenal protein, is a member of the protein disulfide isomerase family but lacks a CXXC thioredoxin-box motif. *Eur J Biochem* 1998, 255, 570–9.

26) Fisher, S. K., Novak, J. E., Agranoff, B. W. Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional

significance. *J. Neurochem* **2002**, 82, 736–754.

27) Fouchecourt, S.; et al. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod* **2000**, 62, 1790–1803.

28) Fouquet, J.P.; Kannl, M.L.; Prigent, P.Y. Expression of tubulin isoforms during the differentiation of mammalian spermatozoa. *Tissue and Cell* **1997**, 29, (5), 573-583.

29) Guasti, P.; et al. Protein content of equine seminal plasma and sperm plasma membrane in subfertile stallions. *J. Equine Vet. Sci* **2014**, 34, 84– 85.

30) Guimarães, A. M.; Aalves, E. G. L.; Rezende, G. F.; Rodrigues, M. C. Ovos de *Toxocara* sp. e larvas de *Ancylostoma* sp. em praça pública de Lavras, MG. *Revista de Saúde Pública*. **2005**, 9 (2), 293-295, 2005.

31) Guo, W.; et al. Identification and characterization of ERp29 in rat spermatozoa during epididymal transit. *Reproduction* **2007**, 133, 575-584.

32) Haidl, G.; Badura B, Schill WB. Function of human epididymal spermatozoa. *J Androl* **1994**, 15, 23S–27S.

33) Heinegård, D.; et al. Glycosylated matrixproteins. In: Royce PM, Steinmann B, editors *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects*. New York: *John Wiley & Sons* **2002**, 271–91.

34) Hinton, B.T.; White, R.W.; Setchell, B.P. Concentrations of myo-inositol in the luminal fluid of the mammalian testis and epididymis. *J Reprod Fertil* **1980**; 58, 395–399.

35) Huaiyu, M.; et al. PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic Acids O Res* **2016**, 44, 336–342.

36) Iliadou P.K.; et al. The Sertoli cell: Novel clinical potentiality. *Hormones* **2015**, 14(4), 504-514.

37) Jones, R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* **1998a**; 53:73–84.

38) Jones, R.C. Evolution of the vertebrate epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* **1998b**, 53, 163–181.

39) Kampinga, H.H.; Craig, E.A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**; 11, 579–92.

40) Kempinas, W.G. Identification of the SP22 Sperm Protein in Santa Ines and Dorper Rams. *Reprod Dom Anim* **2010**, v. 45, p. 323– 330, 2010.

- 41) Kypta, R.M.; Waxman, J. Wnt/ β -catenin signaling in prostate cancer. *Nat Rev Urol* **2012**, 9, 418–28.149:1192–205.
- 42) Liepinsh, E.; et al. Thioredoxin fold as homodimerization module in the putative chaperone ERp29: NMR structures of the domains and experimental model of the 51 kDa dimer. *Structure* **2001**, 9, 457–471.
- 43) Liu, Q.; Craig, E. Mature proteins braced by a chaperone. *Mol Bio* **2016**, 539, 361-362.
- 44) Luo, S.; Wehr, N.B.; Levine, R.L. Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green. *Anal. Biochem* **2006**, 350, 233–238.
- 45) Maeda, T.; Eisenberg, F., Jr. Purification, structure, and catalytic properties of L-myo-inositol-1-phosphate synthase from rat testis. *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 8458 – 8464.
- 46) Menezes, E.B.; et al. Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. *BMC Genomics* **2019**; 20-714.
- 47) Menezes, E.S.B.; et al. Sperm miR-15a and miR-29b are associated with bull fertility. *Andrologia* **2020**, 52, 1, 1-11.
- 48) MILLER, D.J.; et al. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin., *Biol Reprod* **1990**, 42, 899-915.
- 49) Mkrtchian, S.; Sandalova T. ERp29, an unusual redox-inactive member of the thioredoxin family. *Antioxid Redox Signal* **2006**, 8, 325–37.
- 50) Mkrtchian, S.; Sandalova, T. ERp29, an unusual redox-inactive member of the thioredoxin family. *Antioxid Redox Signal* **2006**, 8, 325–337.
- 51) Neuhoﬀ, V.; et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. **1988** 9, 255–262.
- 52) Nielsen, S.H.; Karsdal, M.A. Type XXIV Collagen. Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin Structure, *Function and Biomarkers* **2016**, 143-145.
- 53) Nixon, B.; et al. The role of the molecular chaperone heat shock protein A2 (HSPA2) in regulating human sperm-egg recognition. *Asian J Androl* **2015**, 1, 568–573.

- 54) Paulo: o manejo inadequado e as consequências em saúde pública. 2001. p.983- 989. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2001**.
- 55) Redgrove, K.A.; Nixon, B.; Baker, M.A.; Hetherington, L.; Baker, G. The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition. *PLoS One* **2012**; 7, 50851.
- 56) Restrepo, G.; Rojano, B.; Usuga A. Relationship of cysteine-rich secretory protein-3 gene and protein with semen quality in stallions.
- 57) Robertis, E.M.; Popler, D. Sperm Motility Requires Wnt/GSK3 Stabilization of Proteins. *Dev Cell* **2015**, 35(4):401-402.
- 58) RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- 59) Rucci, N., et al. Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein N-terminus is a novel osteoclast antagonist that counteracts bone loss. *J Bone Miner Res* **2013**, 28 (9), 1912–1924.
- 60) Schoendorfer, L. M. P. Interação homem-animal de estimação na cidade de São Shevchenko, A. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* **2006**, 1(6), 2856-2860.
- 61) Shnyder, S.D.; Mangum, J.E.; Hubbard, M.J. Triplex profiling of functionally distinct chaperones (ERp29/PDI/BiP) reveals marked heterogeneity of the endoplasmic reticulum proteome in cancer. *J Proteome Res* **2008**, 7, 3364–72.
- 62) Souza, F. F.; Martins, M. I.; Fernandes, S. C. E.; Ribolla, P. E.; Lopes, M. D. Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. *Theriogenology*, **2006**,66: 1606-1609.
- 63) Souza, F.F.; et al. Herapin-binding proteins of canine seminal plasma., *Theriogenology* **2006**, 66, 1606-1609, 2006.
- 64) Suh, YA.; et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **1999**, 401, 79–82.
- 65) Sullivan, R.; Mieusset, R. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update* **2016**, 22 (5), 574–587.
- 66) Syntin, P.; Dacheux, J.L.; Dacheux, F. Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. *Biol Reprod* **1999**, 61,

1622–1635.

- 67) Timpl, R.; M'iedemann, H.; Van Delden, V.; Furthmayr, H.; Kuhn, K: A network model for the organisation of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem.* **1981**; 120, 203.
- 68) Turner, T.T. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *J Androl* **1995**, 16, 292–298.
- 69) UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*, v. 47, n. D1, p. D506-D515, 2018.
- 70) Voglmayr, J. K.; White, I. G. Synthesis and metabolism of myoinositol in testicular and ejaculated spermatozoa of the ram. *J. Reprod. Fertil* **1971** 24, 29 – 37.
- 71) Wickham, H (2019). rvest: Easily Harvest (Scrape) Web Pages. R package version 0.3.4. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=rvest>.
- 72) Xia, J.; Wishart, D.S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data 580 analysis. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **2006**; 55:1-91.
- 73) York, J. D. Adv. An expanded view of inositol signaling. *Enzyme Regul* **2001**, 41, 57–71.
- 74) Zhang, D.; Richardson, D.R. Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29): An emerging role in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **2011**, 43 (1), 33-36.
- 75) Zhang, J.; et al. ERp57 is a potential biomarker for human fertilization capability. *Mol Hum Reprod* **2007**, 13, 633-639.
- 76) Westfalewicz, M.A.; et al. Identification and functional analysis of bull (*Bos taurus*) cauda epididymal fluid proteome. *Int. J. Dairy Sci* **2017**, 100 (8), 6707-6719.

1. Resultados da espectrometria de massa e ontologia gênica de proteínas extraídas do testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo de cães. Ontologia genética obtida no UniprotKB (www.uniprot.org).

Name	ID*	Mass (Da)	Gene	Gene ontology		
				Molecular functions	Biological process	Cellular compartment
Actin alpha 2, smooth muscle	F2Z4N0	2013	Actg2	ATP binding	Mesenchyme migration, positive regulation of gene expression, vascular smooth muscle contraction	Cytoskeleton
Actinin alpha 1	E2QY07	78	ACTN1	Actin filament binding, alpha-actinin binding, calcium ion binding, protein homodimerization activity, vinculin binding	Actin crosslink formation, actin filament bundle assembly, sarcomere organization, skeletal muscle fiber development	Cytoskeleton, stress fiber, terminal web, plasma membrane, lateral plasma membrane, sarcolemma, bicellular tight junction, cell leading edge, dense body, focal adhesion, inner dense plaque of desmosome, lamellipodium, outer dense plaque of desmosome, smooth muscle dense body, zonula adherens
Alpha 1 antitrypsin	A1ILJ0	172	SERPINA1	***	***	Extracellular region or secreted
ATP synthase subunit beta	Q0QEN2	140	Atp5f1b	ATP binding, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	ATP synthesis coupled proton transport	***
Beta-N-acetylhexosaminidase beta subunit, exons 2-14	K0J5K2	131	HEXB	Beta-N-acetylhexosaminidase activity	Carbohydrate metabolic process	***
Calpolin	E2RB32	397		Actin binding, calmodulin binding	Actomyosin structure organization, negative regulation of vascular smooth muscle cell proliferation	Cytoskeleton
Clusterin	E2QYU2	299	CLU	***	***	Extracellular region or secreted

Cofilin 1	F1PQN5	210		Actin binding	Actin filament depolymerization	Cytoskeleton
Creatine kinase B-type	P05124	469	CKB	ATP binding, creatine kinase activity, kinase activity	brain development, cellular chloride ion homeostasis, phosphocreatine biosynthetic process	Cytoplasm
Decorin	Q29393	328	DCN	collagen binding, extracellular matrix binding, extracellular matrix structural constituent conferring compression resistance, glycosaminoglycan binding	negative regulation of angiogenesis, negative regulation of endothelial cell migration, negative regulation of vascular endothelial growth factor signaling pathway, peptide cross-linking via chondroitin 4-sulfate glycosaminoglycan, positive regulation of macroautophagy, positive regulation of mitochondrial depolarization, positive regulation of mitochondrial fission, positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling, positive regulation of transcription by RNA polymerase II	Extracellular region or secreted
Desmin	Q5XFN2	340	DES	***	intermediate filament organization	Nucleus, plasma membrane, Zline, cytoplasm
Enolase 2	E2RAS8	218	ENO2	Magnesium ion binding, phosphopyruvate hydratase activity	Glycolytic process	Cytosol
Filamin A	F1PWW0	827	FLNA	Actin filament binding, Fc-gamma receptor I complex binding, G protein-coupled receptor binding, ion channel binding, kinase binding, potassium channel regulator activity, protein homodimerization activity, Rac GTPase binding, Ral GTPase binding, transcription	Actin crosslink formation, actin cytoskeleton reorganization, adenylate cyclase-inhibiting dopamine receptor signaling pathway, cilium assembly, cytoplasmic sequestering of protein, establishment of protein localization, mitotic spindle assembly, negative regulation of apoptotic process, negative regulation of DNA-binding transcription factor activity, negative regulation of protein catabolic process, negative regulation of transcription by RNA polymerase I,	Cytoskeleton, cytosol, nucleus, plasma membrane, cell-cell junction, Myb complex

				factor binding	positive regulation of integrin-mediated signaling pathway, positive regulation of potassium ion transmembrane transport, positive regulation of protein import into nucleus, positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading, protein localization to cell surface, protein localization to plasma membrane, protein stabilization, receptor clustering	
Globin A2	A0A1K0GGH0	330	ghbA2	Heme binding, metal ion binding, oxygen binding, oxygen carrier activity	***	Cytosol
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F1P7C9	382	GAPDH S	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity, NAD binding, NADP binding	Glucose metabolic process, glycolytic process	Cytosol
Glutathione peroxidase	F1PJ71	491	HYR1	Glutathione peroxidase activity	Response to oxidative stress	***
Heat shock protein family A (Hsp70) member 2	E2QX84	115	HSPA2	ATPase activity, ATPase activity, coupled, ATP binding, disordered domain specific binding, enzyme binding, glycolipid binding, heat shock protein binding, misfolded protein binding, protein folding chaperone, unfolded protein binding	cellular response to heat, cellular response to unfolded protein, chaperone cofactor-dependent protein refolding, male meiosis I, negative regulation of inclusion body assembly, positive regulation of ATPase activity, positive regulation of ATPase-coupled calcium transmembrane transporter activity, positive regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle, positive regulation of protein phosphorylation, protein refolding, response to cold, response to heat, response to unfolded protein, spermatid	Cytoskeleton, cytosol, nucleus, plasma membrane, cell surface, cytoplasm

					development, synaptonemal complex disassembly, vesicle-mediated transport	
Heat shock protein 90 kDa beta member 1	A0A077KFB1	90	HSP90	ATP binding, unfolded protein binding	Protein folding	***
Histone H2A	F1P790	200	HIST3H 2A	DNA binding, protein heterodimerization activity	chromatin organization, nucleosome disassembly, UV-damage excision repair	Nucleus, chromosome
Histone H2B	F1P782	191		DNA binding, protein heterodimerization activity	Nucleosome assembly	Nucleus, chromosome
Histone H4	F2Z4N2	94	LOC100 856216	DNA binding, protein heterodimerization activity, protein heterodimerization activity	DNA-templated transcription, initiation, nucleosome assembly	Nucleus
IF rod domain-containing protein	F1PW98	96		***	***	Cytoskeleton, keratin filament
IF rod domain-containing protein	F1PVL5	91	KRT79	***	***	Cytoskeleton, keratin filament
Ig-like domain-containing protein	F1PSX2	173		Antigen binding, immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway, complement activation, classical pathway, defense response to bacterium, innate immune response, phagocytosis, engulfment, phagocytosis, recognition, positive regulation of B cell activation	Extracellular region or secreted, plasma membrane
Lumican	E2R416	464	LUM	Collagen binding	collagen fibril organization, positive regulation of transcription by RNA polymerase II, positive regulation of transforming growth factor beta1	Extracellular region or secreted, fibrillar collagen trimer

production, visual perception						
Myosin heavy chain 11	F1PJ01	88	MYH11	actin filament binding, ATP binding, motor activity	***	Cytoskeleton, myosin complex
NPC intracellular cholesterol transporter 2	F1PAR9	502	NPC2	Cholesterol binding, sterol binding	cholesterol efflux, intracellular cholesterol transport, sterol transport	***
Peptidase S1 domain-containing protein	F1PCE8	82	LOC475521	Serine-type endopeptidase activity	Proteolysis	Extracellular region or secreted
Phosphatidylethanol amine-binding protein 1	Q3YIX4	159	PEBP1	ATP binding, lipid binding, serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of MAPK cascade	***
Prostaglandin-H2 D-isomerase	Q9XS65	268	PTGDS	prostaglandin-D synthase activity, retinoid binding, small molecule binding	prostaglandin biosynthetic process, regulation of circadian sleep/wake cycle, sleep	Extracellular region or secreted, nucleus, endoplasmic reticulum, golgi apparatus, perinuclear region
Protein disulfide-isomerase	E2RD86	106	PDIA3	Identical protein binding, peptide disulfide oxidoreductase activity, protein disulfide isomerase activity	cell redox homeostasis, cellular response to interleukin-7, positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway, protein folding, response to endoplasmic reticulum stress	Endoplasmic reticulum, MHC class I peptide loading complex, extracellular space, cell surface.
Protein disulfide-isomerase	F1PL97	98	P4HB	Protein disulfide isomerase activity	Cell redox homeostasis, protein folding, response to endoplasmic reticulum stress	Endoplasmic reticulum, plasma membrane
Serum albumin	F2Z4Q6	5365	ALB	Fatty acid binding, zinc ion binding	***	Extracellular space, cytoplasm
Serum albumin	P49822	4067	ALB	DNA binding, drug binding, enterobactin binding, fatty acid	Cellular response to starvation, maintenance of mitochondrion location, negative regulation of	Extracellular region or secreted

				binding, pyridoxal phosphate binding, toxic substance binding, zinc ion binding	apoptotic process	
Submitted name: Talin 1	F1PSC2		TLN1	actin filament binding, integrin binding, LIM domain binding, phosphatidylinositol binding, phosphatidylserine binding, structural constituent of cytoskeleton, vinculin binding	cell adhesion, cell-substrate junction assembly, cortical actin cytoskeleton organization, cytoskeletal anchoring at plasma membrane, integrin activation, integrin-mediated signaling pathway	Cytoskeleton, focal adhesion, ruffle
Transgelin	E2RAE8	1261	TAGLN	Actin filament binding	***	***
Triosephosphate isomerase	A0A0A0MPD0	139		protein homodimerization activity, triose-phosphate isomerase activity, ubiquitin protein ligase binding	Gluconeogenesis, glyceraldehyde-3-phosphate biosynthetic process, glycerol catabolic process, glycolytic process, multicellular organism development	Cytosol
Tropomyosin 1	F1P912	1499	TPM1	Actin filament binding	Actin filament organization, cardiac muscle contraction	Cytoskeleton, actin filament
Tropomyosin 2	E2R674	930		Actin filament binding	Actin filament organization, regulation of ATPase activity	Cytoskeleton, actin filament
Tubulin alpha chain	A0A077LQA5	183	TUBA1A	GTPase activity, GTP binding, structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoskeleton
Tubulin beta chain	L7N017	283	TUBB4B	GTPase activity, GTP binding, structural constituent of	microtubule-based process, microtubule cytoskeleton organization, mitotic cell cycle	Cytoskeleton

cytoskeleton						
Ubiquitin-like domain-containing protein	F1PEZ4	145	RPS27A	protein tag, structural constituent of ribosome, ubiquitin protein ligase binding	modification-dependent protein catabolic process, protein ubiquitination, translation	Cytosol small ribosomal subunit, nucleus, cytoplasm
Uncharacterized protein	F6V1W9	214		***	***	Extracellular region or secreted, integral componente of membrane
Uncharacterized protein	E2RB37	396	PDIA6	Isomerase activity	Cell redox homeostasis	***
Uncharacterized protein	F1PQL8	1006	ACTG1	***	***	***
Uncharacterized protein	F1P6R7	123	LOC479 912	Glutathione transferase activity	***	***
Vimentin	F1PLS4	138	VIM	***	***	Cytoskeleton, intermediate filament
Vinculin	J9P4F3	401	VCL	Actin filament binding, structural molecule activity	Cell adhesion	Cytoskeleton, plasma membrane, brush border, cell, inner dense plaque of desmosome, outer dense plaque of desmosome, zonula adherens

*ID obtido do Uniprot

CAPÍTULO 3

Osteopontin é expressa no tecido do trato reprodutor de cães?

Osteopontin is expressed in the canine reproductive tract tissue?

Laíza S. Camargo, Viviane Maria Codognoto, Priscila Emiko Kobayashi, Carlos Eduardo
Fonseca-Alves, Fabiana F. Souza

*Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, Universidade
Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

³ O artigo está nas normas da revista *Theriogenology*, fator de impacto 2.09, com exceção das referências.

RESUMO

A osteopontina (OPN) é considerada uma fosfoproteína, encontrada em diversos tecidos e foi identificada em trato reprodutor e células espermáticas de diversas espécies, como bovinos, equinos e caprinos sendo relacionada com a fertilidade espermática. Em cães há pouca informação sobre esta proteína em trato reprodutor, neste contexto o objetivo deste trabalho foi investigar a imunolocalização da OPN em testículo e epidídimo de cães, realizar western blott e espectrometria de massas da banda de 16,5 kDa marcada com o anticorpo anti-osteopontina. Para a imunolocalização foram utilizados 3 cães, machos, submetidos a orquiectomia eletiva, onde foi coletado um fragmento do testículo e epidídimo, o qual foi dividido em cabeça, corpo e cauda e analisados separadamente. As amostras foram armazenadas em formalina tamponada durante 48 horas e depois transferidas para álcool 70% até a realização da imuno-histoquímica com anticorpo anti-osteopontina. A técnica foi realizada com método de peroxidase e DAB. Foram analisadas 5 imagens de cada indivíduo, no *software* ImageJ, resultando na média de cada animal. Foi utilizado ANOVA tukey para análise das médias das imagens de cada grupo e não houve diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). Na espectrometria de massas das bandas marcadas no western blott não foi possível identificar a OPN. A hipótese desse estudo é que a proteína marcada no western blott seja um epítopo que consiga se ligar ao anticorpo anti-osteopontina, no entanto com base neste estudo não é possível afirmar que a osteopontina está presente no trato reprodutor do cão, como já identificado em outras espécies.

Palavras-chave: espermatogênese, cão, imuno-histoquímica, proteômica

ABSTRACT

Osteopontin (OPN) is considered a phosphoprotein, found in various tissues and has been identified in the reproductive tract and sperm cells of other species, such as cattle, horses and goats and is related to sperm fertility. In dogs there is little information about this protein in the reproductive tract, in this context the objective of this work was to investigate the immunolocalization of OPN in the testis and epididymis of dogs, to perform western blot and mass spectrometry of 16.5 kDa band marked with the anti-osteopontin antibody. For immunolocalization, 3 male dogs were used, decomposed to elective orchiectomy, a fragment of the testis and epididymis was collected, which was divided into head, body and tail and percussion. The samples were stored in buffered formalin for 48 hours and then transferred to 70% alcohol until immunohistochemistry with anti-osteopontin antibody. The technique was performed using the peroxidase and DAB method. Five images of each individual were analyzed, with no ImageJ software available on the average of each animal. The t-test was used to analyze the averages of the images of each group and there was no statistical difference between the groups ($P < 0.05$). The mass spectrometry of the bands marked in the western blot was not possible to identify an OPN. To this study is that the protein marked in the western blot is an epitope that can bind to the anti-osteopontin antibody, however based on this study it is not possible to state that osteopontin is present in the reproductive tract of the dog.

Keywords: spermatogenesis, canine, immunohistochemistry

Introdução

A osteopontina, também conhecida como *phosphoprotein 1* (SPP1), é constituída por 278 resíduos de aminoácidos, e possui massa molecular que varia de 25 a 55 kDa (Killian et al., 1993; Moura, 2005). O nome osteopontina se refere ao primeiro local onde foi identificada sendo a matriz extracelular do osso (Franzen e Heinegard, 1985; Fisher et al., 1987; Prince et al., 1987; Zhang et al., 1990). Posteriormente foi observada relação com a fertilidade de bovinos (Killian et al., 1993; Liaw et al., 1995; Mazzali et al., 2002; Wai; Kuo, 2004; Denhardt, 2001; Souza et al., 2008), podendo ser produzida e secretada pela ampola e vesícula seminal (Cancel et al., 1997; Rodríguez et al., 2000). Já foi descrita no trato reprodutor de outras espécies, como equinos (Brandon et al., 1999) e ovinos (Zhang et al., 2016).

A OPN pode ser sintetizada também pelas células de Sertoli e células germinativas dos túbulos seminíferos (Siiteri et al., 1995; Souza et al., 2008). Esta proteína se liga na cauda e na cabeça dos espermatozoides durante a ejaculação (Franzen; Heinegard, 1985; Liaw et al., 1995; Mazzali et al., 2002; Wai; Kuo, 2004; Denhardt et al., 2001; Souza et al., 2008). A OPN possui 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 et al., 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 a proteína capacidade de se ligar aos 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 maior afinidade (Moura, 2005).

A imunolocalização difere de acordo com cada espécie. Em ovinos púberes foi identificada no acrossomo das espermátides finais, próximo do compartimento adluminal e na região pseudo-estratificada do epitélio da cauda do epidídimo (Zhang et al., 2016); já em ratos está presente em testículo, espermatogônia, espermátides, ductos eferentes e epidídimo (Luedtke et al., 2002).

Apesar de ter sido imunolocalizada no plasma seminal e extrato proteico das células espermáticas de cães por *western blotting*, utilizando anticorpo anti-OPN bovino (Souza et al., 2009) não foi identificada em abordagens proteômicas *shotgun* (Aquino-Cortez et al.,

2017; Araujo et al., 2020). Em cães, são necessários mais estudos para comprovar a presença da OPN em trato reprodutor. Em vista disso, este estudo teve como objetivo investigar a imunolocalização da OPN em tecido reprodutor de cães, como testículo, cabeça, corpo e cauda de epidídimo por imuno-histoquímica e identificar as bandas marcadas no *western blotting* do plasma seminal pela espectrometria de massas.

Material e Métodos

Aspectos éticos

Os aspectos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) foram considerados em cada etapa desse estudo, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Institucional (CEUA), sob protocolo nº 0123/2017.

Reagente, animais e preparação das amostras

Todos os reagentes utilizados no estudo foram do mais alto grau de pureza e obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), GE Healthcare Life Sciences (São Paulo, São Paulo, Brazil) e Thermo Fisher Scientific (São Paulo, São Paulo, Brazil), salvo indicação em caso de utilização de outros reagentes.

Para a imunohistoquímica foram utilizados um total de 3 cães adultos, hígidos, entre 2 a 5 anos, entre 10 a 20 kilos, submetidos a orquiectomia eletiva, para obtenção do tecido reprodutor. Foi retirado um fragmento de cada testículo (TEST, n = 3) e o epidídimo foi dividido em cabeça (EPIDH, n = 3), corpo (EPIDB, n = 3) e cauda (EPIDT, n = 3) de acordo com a anatomia, totalizando 20 amostras. Os fragmentos foram fixados em formalina tamponada durante 48 horas, transferidos para álcool etílico 70%, embebidos em parafina para imuno-histoquímica e realizados cortes de espessura de 4 µm.

Para *western blot* foi realizada colheita do sêmen de 30 cães, por manipulação digital do pênis. O sêmen foi centrifugado a 800g, durante 10 minutos, e recentrifugado a 5,000g, durante 30 minutos, a 4° C. O sobrenadante (plasma seminal) foi aliquoteado e armazenado à -20° C até o *western blotting*.

Imunohistoquímica

Os cortes de tecido foram montados em lâminas silanizadas (StarFrost®, Lowestoft, UK) e desparafinadas 2 vezes em xilol (15 minutos cada), seguido da desidratação em álcool etílico em diferentes concentrações (85%, 95% e absoluto), durante 5 minutos e reidratadas

em água deionizada (10 passagens). A recuperação antigênica foi realizada com citrato de sódio (10 mM, pH 6.0) na panela de pressão elétrica por 10 minutos (125° C) e resfriados por 15 minutos. A atividade das peroxidases endógenas foi bloqueada (Dual Endogenous Enzyme Block, Envision, Dako, Carpinteria, USA) por 20 minutos e as lâminas foram lavadas com 10 mM TRIS-EDTA pH 9.0. As ligações inespecíficas foram bloqueadas (Protein Block, Serum Free, Dako, Carpinteria, USA) por 30 minutos, na temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado sobre a lâmina anticorpo primário policlonal (anti-canine OPN MyBioSource, San Diego, CA), após diluição de 1: 400 em diluente de anticorpo (Antibody Diluent Dako, Carpinteria, USA) e incubados overnight a 4° C em câmara úmida, protegido da luz. As lâminas foram lavadas 10 mM TRIS-EDTA pH 9.0, 3 vezes e incubadas com sistema de polímero de peroxidase (Envision, Dako, Carpinteria, USA) durante 60 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB, ref. K3466 Dako, Carpinteria, USA), durante 1 minuto e meio, lavadas 3 vezes com tampão 10 mM TRIS-EDTA pH 9.0 e contracolorados com hematoxilina de Harris (1 minuto e meio). A lâmina foi lavada em água destilada e incubada por 5 minutos também na água destilada. Uma lâmina foi usada como controle negativo, na qual o anticorpo primário foi abolido, amostras de bexiga da espécie canina foram utilizadas como controle positivo.

Western Blott

O plasma seminal armazenado foi descongelado e a concentração de proteínas totais foi determinada em duplicata, pelo método colorimétrico de ácido bicinconínico (BCA, Sigma-Aldrich, St. Louis, CO, USA), segundo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em nanoespectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA). Os valores foram expressos em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, baseados em uma curva padrão confeccionada a partir de concentrações conhecidas de albumina bovina.

As amostras foram diluídas em um tampão contendo agente redutor (TRIS-HCl 60 mM, pH 6,8, glicerol 50%, SDS 2%, 2-mercapetanol 23 mM, 0,1% bromofenol azul em água MilliQ), fervidas à 90°C e aplicadas no gel, numa concentração final de 150 μg de proteínas do plasma seminal canino. Uma amostra de plasma seminal bovino foi usada como controle positivo. Para controle negativo, o anticorpo primário foi abolido. A amostras foram submetidas a corrida eletroforética em gel de separação 12% de poli(acrilamida), em uma mini-cuba vertical (MiniVE, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Uma canaleta do gel foi destinada a um padrão de massa molecular (Full Range Rainbow, Recombinant

Protein Molecular Weight Markers, 10 a 225 kDa, GE HealthCare, Uppsala, Sweden). Para a corrida, a miliamperagem foi fixada em 15 mA/gel e a voltagem permaneceu livre.

Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell; Bio-Rad, Hercules, CA, USA), usando 100 V e 300 mA, durante 1 hora a 4° C. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceu S (0.5% Ponceau S, 1% ácido acético em água destilada) para confrimação da transferência. Então o Ponceau S foi retirado por lavagem em água destilada. O *western blotting* foi realizado de acordo com Souza et al. (2009) utilizando o anticorpo bovino anti-OPN diluídos 1: 800. As imagens foram digitalizadas (VDS; GE Healthcare) e analisadas (Image Master™, GE Healthcare, Upsalla, Sweden) foi utilizada para comparar a migração da massa molecular marcada em cada banda.

Proteômica

A banda imunocorada no *western blotting* foi recortada a partir de um novo gel de eletroforese e preparada para espectrometria de massas.

As proteínas foram digeridas a partir da digestão-*in gel* de acordo com Shevchenko et al (2006) modificado (Guasti et al., 2020). As bandas recortadas foram desidratadas em acetonitrila em temperatura ambiente, as bandas foram submersas em Dithiothreitol em 10 mml de bicarbonato de amônio. Posteriormente, a solução foi removida e adicionado iodoacetamida, durante 30 minutos em temperatura ambiente, removeu-se a iodoacetamida e então houve a reidratação e subsequente desidratação das amostras para que se chegasse a fase líquida para remoção do gel, a digestão foi efetuada com tripsina (V5111; Promega, Madison, USA) em uma concentração de 20 µg/µl, proporção de 1: 50 de enzima: substrato.

Interpretação dos resultados e análise estatística

As imagens foram analisadas no *software* Image J. Foram analisadas 5 campos de cada animal, a média da área de cada imagem foi dividida pela área total e multiplicado por 100, foi feito uma média total dos 5 campos. A análise estatística da média dos 4 grupos foi realizada pelo *software* Sigma Plot for Windows, v. 11.0, 2008, Systat Software Inc utilizando a análise de variância ANOVA One Way e teste de Tukey. O valor de P considerado significativo foi < 0,05.

Resultados

Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos comparados, testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo.

Em testículo, houve imunomarcagem nas células de Sertoli e células germinativas (Figura 1), em cabeça do epidídimo as células do epitélio luminal foram imunoidentificadas (Figura 2), em corpo do epidídimo houve imunomarcagem em células do epitélio basal e cauda do espermatozoide (Figura 3), cauda do epidídimo a OPN foi imunolocalizada em epitélio do epidídimo e cauda do espermatozoide (Figura 4).

De acordo com análise conduzida no String (<http://string-db.org>) na espécie canina, a OPN interage com a serum albumin, informação obtida de bancos de dados confiáveis e apresenta co-expressão. Além disso, contribuem para uma função compartilhada, com edge confidence de 0,9 (highest). Contrariamente, nenhuma interação foi observada entre OPN e epididymal secretory protein E2.

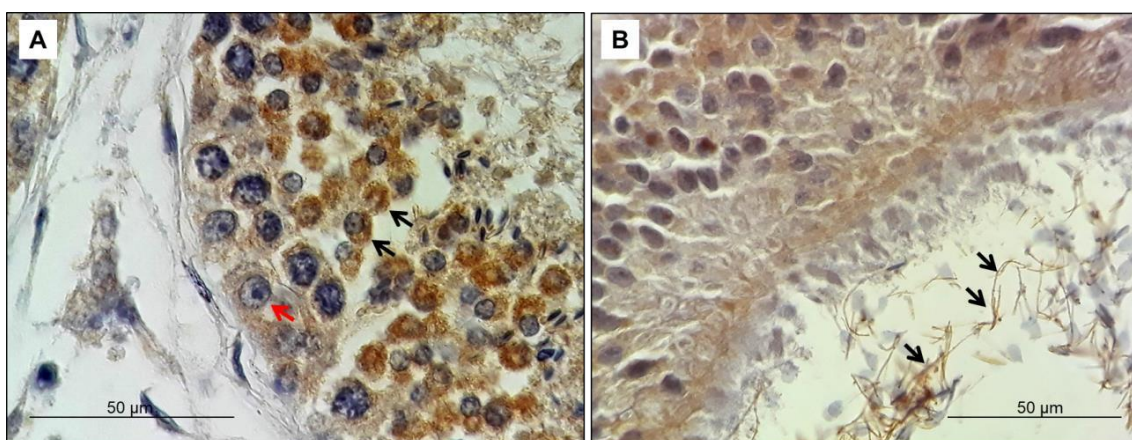


Figura 1. Imunohistoquímica do tecido testicular de cães. A. Imunomarcagem nas células de Sertoli (seta vermelha) e células germinativas (seta preta), aumento 1.000X. B. Imunomarcagem das caudas dos espermatozoides (setas pretas), aumento 400X.

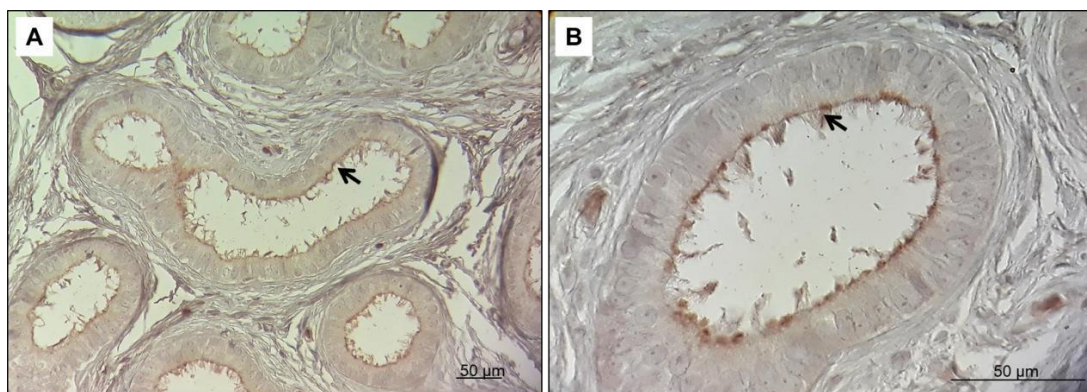


Figura 2. Imunohistoquímica do tecido da cabeça do epidídimo de cães. A. (aumento 100 X) e B. (aumento 200X) Imunomarcação das células do epitélio luminal (setas pretas).

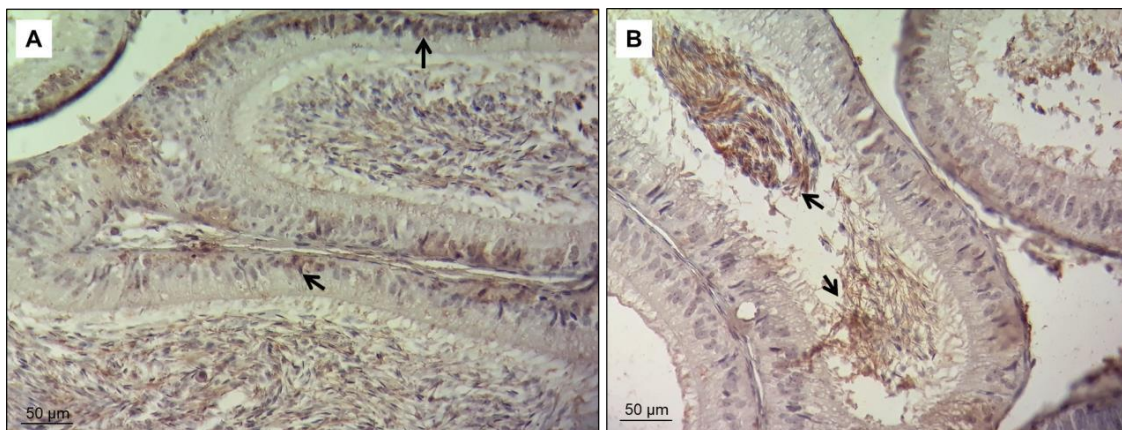


Figura 3. Imunohistoquímica do tecido do corpo do epidídimo de cães. A. Imunomarcação das células do epitélio basal (setas pretas), aumento 200X. B. Imunomarcação da cauda espermática (setas pretas), aumento 200X.

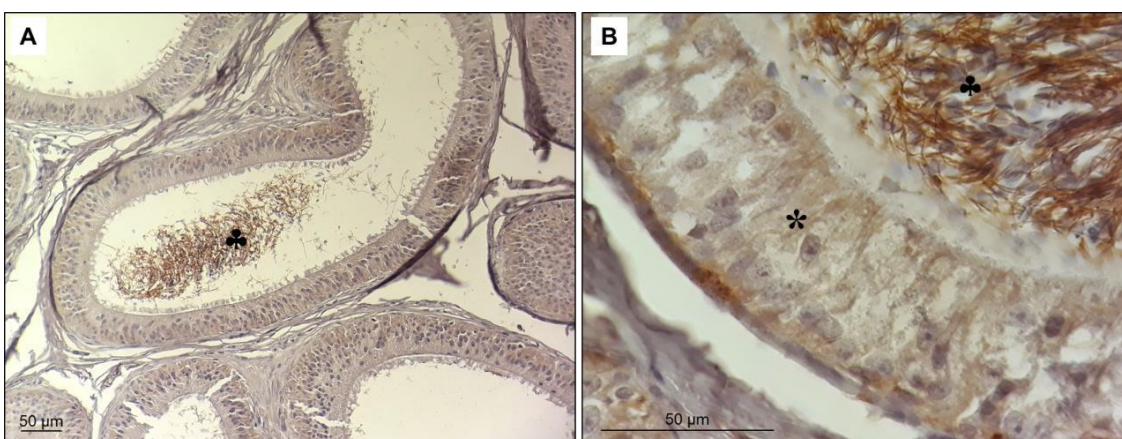


Figura 4. Imunohistoquímica do tecido da cauda do epidídimo de cães. A. Imunomarcação das caudas dos espermatozoides (♣), aumento 200X. B. Imunomarcação das caudas dos espermatozoides (♣) e epitélio (*), aumento 1.000X.

Discussão

No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que reportou a imunolocalização da OPN no trato reprodutor de cães. A osteopontina é expressa em diversos tecidos e já foi identificada no trato reprodutor de várias espécies, como equinos, bovinos (Cancel et al., 1999), ratos (Luedtke et al., 2002) e caprinos (Zhang et al., 2016). Em outras espécies, a OPN pode ser sintetizada também pelas células de Sertoli e células germinativas dos túbulos seminíferos (Siiteri et al., 1995; Souza et al., 2008), o que foi observado em nosso

estudo por imunomarcação.

Nas espécies em que a OPN foi identificada possuem em comum a vesícula seminal e ampola, as quais já foram identificadas como local de produção e secreção da OPN (Cancel et al., 1997; Rodríguez et al., 2000). No entanto, a espécie canina possui apenas a próstata como glândula sexual acessória, o que não justifica a produção e secreção da OPN. Em contrapartida, neste estudo foi identificada imunomarcação da OPN em testículo, cabeça corpo e cauda do epidídimo.

A presença e localização da OPN no trato reprodutor de machos ainda é inconsistente, não havendo um padrão da imunolocalização em todas as espécies já estudadas (Cancel et al., 1999; Zhang et al., 2016).

A marcação do anticorpo anti-OPN neste estudo, foi identificada no citoplasma das células germinativas dos túbulos seminíferos no testículo, na cauda dos espermatozoides e, sobretudo, nas células epiteliais do epidídimo, corroborando com os achados de outros estudos (Brown et al., 1993; Sodek et al., 2000). Em outras espécies, a OPN foi também imunomarcada nas células epiteliais lumbais do trato reprodutor, urinário e brônquios entre outros órgãos (Brown et al., 1993).

O único estudo que menciona a imunomarcação da OPN no plasma seminal e células espermáticas de cães foi conduzido por nosso grupo (Souza et al., 2009). As proteínas marcadas no plasma seminal foram sugeridas como tendo 77,2 e 15,6 kDa, sendo que a de menor massa foi apontada como uma subunidade da *arginine esterase*. Nesta oportunidade, as proteínas não foram identificadas por espectrometria de massas. Desta forma, as bandas foram recortadas em nosso estudo e a banda de maior massa no plasma seminal foi identificada como *serum albumin* e a de menor massa como *epididymal secretory protein E1*.

A *epididymal secretory protein E1* já foi identificada em várias espécies, como suíno, bovino, caprino, ovino, equino (Druart et al., 2013) e humanos (Giacomini et al., 2015) cuja função é transporte de colesterol e mediadora da homeostase do colesterol (Frolov et al., 2003; Infante et al., 2008; Okamura et al., 1999). É a principal proteína secretada pelos fluídos do epidídimo (Kirchhoff et al., 1996; Kirchhoff et al., 1998; Thimon et al., 2008). A proteína foi identificada em menor abundância em homens oligoastenozoospermicos e os resultados foram relacionados com a menor produção da proteína pelo epidídimo e menor concentração nos prostassomos (Giacomini et al., 2015), já que também está localizada nestas estruturas (Poliakov et al., 2009; Ronquist et al., 2013a).

Serum albumin já foi descrita como proteína secretório do trato reprodutivo de muitas

espécies (Turner et al., 1979; Souza et al., 2012), incluindo os cães (Paulo et al., 2020). Também já foi identificada no plasma seminal (Araújo et al., Paulo et al., 2020, Aquino-Cortez et al., 2017) e espermatozoides (Araújo et al., 2020) de cães. Possui várias funções de ligação com outras moléculas e modula negativamente a apoptose (UNIPROT). Além disso, a proteína foi relacionada com a proteção das células espermáticas contra o estresse oxidativo, neutralizando os radicais livres (Roche et al., 2008). A adição de *bovine serum albumin* ao sêmen aumentou a motilidade e estimulou a captação de oxigênio pelos espermatozoides (White et al., 1987).

Apesar de não termos identificado homologia entre a *epididymal secretory protein E1*, *serum albumin* e a OPN, a imunomarcação ocorreu, o que poderia ser justificado por similaridades entre epítomos. Contudo, há uma interação entre a OPN e a *serum albumin*, mas o mesmo não é observado com a *epididymal secretory protein E1*. Além disso, nenhum dos estudos com espectrometria de massas do plasma seminal de cães por abordagem *shotgun* identificou a OPN no cão (Camargo et al., 2017, Araújo et al., 2020, de Paulo et al., 2020). Dessa forma, não podemos concluir que a OPN está presente no trato reprodutor do cão, a hipótese é que pode haver uma proteína semelhante, que se ligue ao anticorpo anti-OPN, podendo ter funções e estruturas semelhantes, estudos futuros são necessários para confirmar a presença da OPN e relacioná-la com a fertilidade em cães.

Referências

- Aquino-Cortez A, Silva LDM, Araújo AA, Menezes ASB, Moura AAN. Proteins of the canine seminal plasma. *Ciência Rural*, 2016, 46 (5):901-908.
- Araujo MS, Paulo, OHO, Paranzi CS, Scott C, Codognoto VM, Dell'aqua, C.P.F.; Papa, F.O.; Souza, F.F. Proteomic data of seminal plasma and spermatozoa of four purebred dogs. *Data in Brief*, 30, June 2020, 105498
- Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA, 1999: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 52, 863–873.
- Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruz A, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DK. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 1993; 3:1169–1180.
- Cancel AM, Chapman DA, KILLIAN GJ. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v. 6, p. 1293 301, 1997.
- Denhardt; D. T.; Giachelli, C. M.; Rittling, S. R. Role of osteopontin in cellular signaling and

toxicant injury. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 41, p. 723-749, 2001.

Druart X, Rickard JP, Mactier S, Kohnke PL, Kershaw-Young CM, Bathgate R, Gibb Z, Crossett B, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Grupen CG, Graaf SP. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Proteomics*. 2013, 8;91:13-22.

Erikson DW, WAY AL, CHAPMAN DA, KILLIAN GJ. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. *Reproduction*, v. 133, p. 909-917, 2007.

Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD (1987). Purification and partial characterization of small proteoglycans I and 11, bone sialoproteins I and 11I and

Franzen A, Heinegard D (1985). Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 232:715-724.

Franzen A, HEINEGARD D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochemical Journal*, v. 232, p. 715-724, 1985.

Frolov A, Zielinski SE, Crowley JR, Dudley-Rucker N, Schaffer J.E, Ory DS, 2003. NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols. *J. Biol. Chem.* 278, 25517– 25525.

Giacomini E, Ura B, Giolo E, Luppi S, Martinelli M, Garcia RC, Ricci G. Comparative analysis of the seminal plasma proteomes of oligoasthenozoospermic and normozoospermic men. *Reproductive BioMedicine Online* (2015)30, 522–531.

Gonçalves, R. F.; Wolimetz, C. D.; Killian, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (αv and $\alpha 5$) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology*, v. 67, p. 468-474, 2007.

Gur, Y.; Breitbart, H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Develop.*, v. 20, p. 411–416, 2006.

Infante, R.E., Wang, M.L., Radhakrishnan, A., Kwon, H.J., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2008. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15287–15292.

Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA, 1993: Fertility associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 49, 1202–1207.

Killian GJ, CHAPMAN DA, ROGOWSKI LA. Fertility-associated proteins in holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

Kirchhoff C, Osterhoff C, Pera I, Schröter S, 1998. Function of human epididymal proteins in sperm maturation. *Andrologia* 30, 225–232.

Kirchhoff C, Osterhoff C, Young L, 1996. Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis. *Biol. Reprod.* 54, 847–856.

Lorenzen, JM, Martino F, Scheffner I, Bröcker V, Leito H, Haller H, Fetuin HG. Matrix-Gla Protein and Osteopontin in Calcification of Renal Allografts. Plos One, 2012.

Mazzali, M.; Kipari, T.; Ophascharoensuk, V.; Wesson, J.A.; Johnson, R.; Hughes, J. Osteopontin—a molecule for all seasons. QJM – Intern. J. Med., v. 95, n. 1, p. 3–13, 2002.

Moura A A, Andrade C. R.; SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; MARTINS, J. A. M.; OLIVEIRA, R. V.; MENEZEA, E. B. S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 35, n. 2, p. 139-144, 2011.

Moura AA. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. Animal Reproduction, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2005.

Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. Anim. Reprod. Sci., v. 98, n. 3–4, p. 169-188, 2007.

Okamura N, Kiuchi S, Tamba M, Kashima T, Hiramoto S, Baba T, Dacheux F, Dacheux JL, Sugita Y, Jin YZ. 1999. A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, specifically binds cholesterol. Biochim. Biophys. Acta 1438, 377–387.

Luedtke CC, McKee MD, Cyr DG, Gregory M, Kaartinen MT, Mui J, Hermo L. Osteopontin Expression and Regulation in the Testis, Efferent Ducts, and Epididymis of Rats During Postnatal Development Through to Adulthood. Biology of Reproduction 66, 1437–1448 (2002)

Poliakov A, Spilman M, Dokland T, Amling CL, Mobley JA. 2009. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. Prostate 69, 159–167.

Prince CW Oosawa T, Butler WT, Iomana M, Bhowan AS, Bhowan M et al. (1987). Isolation, characterization and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. Biol Chem 262:2900-2907.

Rodríguez CM, Day JR, Killian GJ. Osteopontin gene expression in the holstein bull reproductive tract. Journal of Andrology, v. 21, n. 3, p. 414-420, 2000.

Ronquist KG, Ek, B, Morrell J, Stavreus-Evers A, Ström Holst B, Humblot P, Ronquist G, Larsson A, 2013. Prostasomes from four different species are able to produce extracellular adenosine triphosphate (ATP). Biochim. Biophys. Acta 1830, 4604– 4610.

Ronquist KG, Ek BO, Morrell J, Stavreus-Evers A, Holst BS, Humblot P, Ronquist G, Larsson A. Prostasomes from four different species are able to produce extracellular adenosine triphosphate (ATP). Biochimica et Biophysica Acta 1830 (2013) 4604–4610.

Shevchenko A, Tomas H, Havli J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc 2006;1: 2856-60.

Siiteri JE, Ensrud KM, Moore A, Hamilton DW. Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. *Molec. Reprod. Dev.*, v. 40, n. 1, p. 16-28, 1995.

Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11:279–303.

Sorensen ES, Petersen TE. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 198, n. 1, p. 200-205, 1994.

Souza CEA, Moura AA, Monaco E, Killian GJ. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 105, n. 1–2, p. 72-89, 2008.

Souza FF, Chirinéa VH, Martins MIM, Lopes MD. Osteopontin in seminal plasma and sperm membrane of dogs. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 44, p. 283-286, 2009.

Thimon V, Frenette G, Saez F, Thabet M, Sullivan R. 2008. Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Hum. Reprod.* 23, 1698–1707.

Wai PY, KUO PC. Nitric oxide and endotoxin-mediated sepsis: the role of osteopontin. *Gene Ther. Mol. Biol.*, v. 8, p. 501-508, 2004.

Zhang M, Wang MH, Singh RK, Wells A, Siegal GP (1997). Epidermal growth factor induces CD44 gene expression through a novel regulatory element in mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 272:14139-14146.

Zhang, GM, Lana S, JIAA RX, Yana GY, Wanga IZ, Niea HT, Leib ZH, Wanga F. Age-associated and tissue-specific expression of osteopontin in maleHu sheep reproductive tract. *Tissue and Cell*, v. 48, p. 496–502, 2016.